



(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2009/02/05
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2009/08/13
(45) **Date de délivrance/Issue Date:** 2016/11/22
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2010/08/04
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** EP 2009/051332
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2009/098263
(30) **Priorité/Priority:** 2008/02/05 (FR0850736)

(51) **Cl.Int./Int.Cl. C12N 15/81** (2006.01)
(72) **Inventeurs/Inventors:**
NICAUD, JEAN-MARC, FR;
FUDALEJ, FRANCK, FR;
NEUVEGLISE, CECILE, FR;
BECKERICH, JEAN-MARIE, FR
(73) **Propriétaire/Owner:**
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE, FR
(74) **Agent:** SMART & BIGGAR

(54) **Titre : PROCEDE D'INTEGRATION CIBLEE DE MULTICOPIES D'UN GENE D'INTERET DANS UNE SOUCHE DE YARROWIA**
(54) **Title: METHOD FOR THE TARGETED INTEGRATION OF MULTIPLE COPIES OF A GENE OF INTEREST IN A YARROWIA STRAIN**

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne un procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* comprenant les étapes de : (a) mise en culture d'une souche de *Yarrowia*, laquelle souche comprend une délétion parmi au moins trois gènes, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspondant à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche; (b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* ainsi obtenue avec au moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite souche de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et, le cas échéant, du caractère dominant résultant de chacune desdites délétions; et (c) sélection sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants. La présente invention comprend également un procédé de production de polypeptide d'intérêt mettant en oeuvre un tel procédé ainsi qu'un procédé d'obtention de souche de *Yarrowia* modifiée comprenant une délétion parmi au moins trois gènes, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspondant à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
13 août 2009 (13.08.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/098263 A1(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/81 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2009/051332(22) Date de dépôt international :
5 février 2009 (05.02.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0850736 5 février 2008 (05.02.2008) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université,
F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : NICAUD,
Jean-Marc [FR/FR]; 20 Avenue Hoche, 78190 Trappes
(FR). FUDALEJ, Franck [FR/FR]; 6, Rue Jean-Jacques
Rousseau, 92500 Rueil-Malmaison (FR).
NEUEGLISE, Cécile [FR/FR]; 26 Rue des Vaux de
Cernay, 78610 Auffargis (FR). BECKERICH, Jean-
Marie [FR/FR]; 9, Allée Gabrielle d'Estrées, 92340
Bourg-la-Reine (FR).(74) Mandataire : J. WARCOIN;
WARCOIN, AHNER, TEXIER, LE
FORESTIER, CALLON DE
LAMARCK, COLLIN, TETAZ-Cabinet Regimbeau, 20,
Rue de Chazelles, 75847 Paris Cedex 17 (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))(54) Title : METHOD FOR THE TARGETED INTEGRATION OF MULTIPLE COPIES OF A GENE OF INTEREST IN A
YARROWIA STRAIN(54) Titre : PROCÉDÉ D'INTÉGRATION CIBLÉE DE MULTICOPIES D'UN GÈNE D'INTÉRÊT DANS UNE SOUCHE DE
YARROWIA(57) Abstract : The invention relates to a method for the targeted integration of at least three copies of a gene of interest into the
genome of a *Yarrowia* strain, that includes the steps of: (a) cultivating a *Yarrowia* strain, said strain including a deletion among at
least three genes, the phenotype associated with each of said deletions corresponding to an auxotrophy or a dominant character for
said strain; (b) converting the *Yarrowia* strain thus obtained using at least three recombinant vectors including selection markers
enabling, for said *Yarrowia* strain, the complementation of auxotrophy and, potentially, the dominant character resulting from
each of said deletions; and (c) selecting, on a minimum medium, yeasts having integrated said at least three recombinant vectors.
The invention also relates to a method for producing a polypeptide of interest using said method, and to a method for obtaining a
modified *Yarrowia* strain including a deletion among at least three genes, the phenotype associated with each of said deletions
corresponding to an auxotrophy or a dominant character for said strain.(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le
génom d'une souche de *Yarrowia* comprenant les étapes de : (a) mise en culture d'une souche de *Yarrowia*, laquelle souche
comprend une délétion parmi au moins trois gènes, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspondant à une
auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche; (b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* ainsi obtenue avec au
moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite souche de *Yarrowia*, la
complémentation de l'auxotrophie et, le cas échéant, du caractère dominant résultant de chacune desdites délétions; et (c) sélection
sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants. La présente invention comprend
également un procédé de production de polypeptide d'intérêt mettant en œuvre un tel procédé ainsi qu'un procédé d'obtention de
souche de *Yarrowia* modifiée comprenant une délétion parmi au moins trois gènes, le phénotype associé à chacune de ces
délétions correspondant à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche.

WO 2009/098263 A1

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

**LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS
COMPREND PLUS D'UN TOME.**

CECI EST LE TOME __1__ DE __2__

NOTE: Pour les tomes additionels, veuillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

**THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE
THAN ONE VOLUME.**

THIS IS VOLUME __1__ OF __2__

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

PROCEDE D'INTEGRATION CIBLEE DE MULTICOPIES D'UN GENE
D'INTERET DANS UNE SOUCHE DE YARROWIA

La présente invention concerne un procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* comprenant les
5 étapes de (a) mise en culture d'une souche de *Yarrowia*, laquelle souche comprend une délétion parmi au moins trois gènes, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspondant à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche; (b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* ainsi obtenue avec au moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite
10 souche de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et, le cas échéant, du caractère dominant résultant de chacune desdites délétions; et (c) sélection sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants. La présente invention comprend également un procédé de production de polypeptide d'intérêt mettant en œuvre un tel procédé ainsi qu'un procédé d'obtention de souche de
15 *Yarrowia* modifiée comprenant une délétion parmi au moins trois gènes, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspondant à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche.

La levure *Yarrowia lipolytica* est aujourd'hui de plus en plus employée comme hôte d'expression de gènes d'intérêts. Cette levure présente en effet la spécificité de
20 produire et de sécréter avec une grande efficacité dans le milieu de culture des protéines de haut poids moléculaire, comme les protéases alcalines, les protéases acides ou la RNase, lesdites protéines pouvant alors être facilement récupérées à partir du milieu de culture. En vue de permettre l'expression de ces gènes d'intérêt, différentes technologies ont été développées précocement comme celles décrites notamment dans
25 le brevet EP 0 138 508 B1 ou EP 0 220 864 B1. Ces différentes technologies ont en commun d'utiliser des vecteurs dits « intégratifs » qui permettent l'insertion d'un segment d'ADN portant le gène d'intérêt dans l'ADN chromosomique, lequel gène d'intérêt est exprimé par la suite. Pour autant, aucune de ces technologies n'a pu satisfaire complètement les impératifs de la production industrielle, à savoir un
30 rendement et une stabilité dans le temps importants.

En vue de mieux satisfaire ces impératifs industriels, de nouvelles technologies ont été développées.

Ainsi, la demande PCT WO 00/12729 décrit ainsi une technologie qui utilise des vecteurs intégratifs comprenant une séquence d'intérêt flanquée de séquences zéta correspondant aux LTRs du rétrotransposon Ylt1 de *Yarrowia lipolytica*. Ces vecteurs intégratifs, lorsqu'ils sont utilisés dans des souches de *Yarrowia lipolytica* dépourvues
5 de séquences zéta, permettent des intégrations multicopies et aléatoires dans le génome desdites souches. Cette technologie particulière a notamment été utilisée pour la production de la lipase extracellulaire acidorésistante LIP2 (voir demande PCT WO 01/83773).

Toutefois, il est apparu que les souches de *Yarrowia lipolytica* transformées par
10 LIP2 présentaient pour la majorité d'entre elles une médiocre stabilité génétique, généralement inférieure à 50%. De surcroît, ces souches transformées étant obtenues à la suite d'évènements d'intégration aléatoires, le suivi de la stabilité génétique des souches par séquençage des sites d'insertion est extrêmement fastidieux.

A ces problèmes de stabilité des souches obtenues et de difficulté à identifier le
15 site d'intégration précis de la séquence exogène s'ajoutent des difficultés complémentaires associées à l'absence de souches de *Yarrowia lipolytica* déficientes pour de multiples marqueurs de sélection du fait de l'instabilité de ces souches.

Parmi les méthodes d'intégration de cassettes d'expressions, on peut citer celles mettant en œuvre les méthodes de transformation homologue, mais ces dernières
20 utilisent peu de marqueur (LEU2, URA3, LYS5) et peu de souches multimarquées et avec des délétions permettant une forte diminution des taux de conversion. Les souches ont souvent des marqueurs génomiques correspondant à des mutations, peu de marqueur correspondant à des délétions. Les seuls marqueurs génomiques connus avec des délétions sont : ura3-302 (délétion de 695 pb), ura3-41 (délétion de 41 pb), leu2-270
25 (délétion StuI de 681 pb). MADZAK *et al.* (*J. of Biotech.*, vol.109, p :63-81, 2004) décrit ainsi les marqueurs ura3-302 et leu2-270.

Parmi les vecteurs, on peut citer ceux qui permettent une intégration ciblée, mais en intégrant la partie plasmidique (i.e., intégration des plasmides à une plateforme pBR322 Madzak *et al.*, *Fems yeast research*, vol. 5, p : 635-646, 2005) ou zeta (Bordes
30 *et al.*, *J Microbiol Methods* Vol. 70, p. 493-502, 2007). Il existe des vecteurs d'autoclonages pour l'intégration et l'amplification. Mais celles ci sont dispersées et aléatoires.

Pour la production de protéine thérapeutique il ne faut pas d'ADN plasmidique et il faut une intégration ciblée pour identifier l'insertion et vérifier sa séquence. Il faut aussi pouvoir augmenter le nombre de copie du gène pour augmenter l'expression.

Les inventeurs ont conçu une méthode qui permet une intégration ciblée grâce à des « vecteurs d'intégration », qui ont été construits pour libérer la cassette d'intégration (site rare 1) et éliminer la partie vecteur, qui ont des site rares pour introduire les marqueurs de sélection rapidement (site rare 2) et pour cloner les cassettes d'expression (site rare 3). Des combinaisons de vecteurs d'intégration avec différente combinaison de locus/marqueur.

10 Les inventeurs ont également :

- optimisé des conditions de transformation pour augmenter les taux de transformation, notamment pour les marqueurs ADE2 et GUT2 ; et
- réalisé l'association de l'intégration et d'un phénotype pour identifier rapidement les clones intéressant ayant intégré au locus désiré les cassettes d'intégration.

15 Ainsi, les inventeurs ont réalisé ici une méthode d'intégration d'une cassette d'expression à un locus qui permet d'introduire en même temps un nouveau marqueur de sélection (eg, nouveau marqueur génomique, nouvelle auxotrophie) pour permettre une nouvelle intégration avec une nouvelle cassette d'intégration possédant le marqueur de sélection correspondant.

20 Due à la possibilité de bonne efficacité de transformation, de faible taux de conversion, de crible d'identification des insertions (lipase pour LIP2, marron pour ADE2, SUC- pour URA3), il est ainsi possible de réaliser la cointégration (transformer avec deux cassettes d'intégration). Ceci permet de diminuer le temps nécessaire pour l'obtention de la souche de production. De mêmes, l'insertion a des sites définies permet une caractérisation rapide des souches de production. La souche finale étant prototrophe

25 La souche finale n'exprime plus les protéines majeurs secrétées (protéase AEP, lipase Lip2p), elle présente des délétions stables, une faible lyse cellulaire et un surnageant propre (peu de protéines secrétées).

30

Les inventeurs ont mis en évidence également la possibilité d'obtenir avec ces marqueurs excisables, l'excision générale des marqueurs permettant de régénérer les marqueurs et ainsi de pouvoir à nouveau intégrer de nouvelles copies.

Pour l'obtention de souches multi-marquées, on peut introduire un marqueur
5 génomique par différentes méthodes.

Par exemple, la méthode appelée POP IN/ POP OUT utilisée chez *Yarrowia lipolytica* pour la construction des marqueurs leu2-270, ura3-302 et xpr2-322 décrits dans la revue de G. Barth *et al.* : *Yarrowia lipolytica*. in: Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, pp. 313-388. Springer-
10 Verlag. Elle consiste à intégrer un vecteur possédant une délétion du gène au locus puis à sélectionner l'excision de ce vecteur et d'identifier un clone qui par recombinaison à éliminé le gène sauvage et conservé le gène muté. C'est une méthode longue, peu efficace et qui nécessite aussi l'utilisation d'un marqueur permettant une contre sélection. Par exemple, la contre sélection des clones Ura⁺ avec le 5FOA. Cette contre
15 sélection peut introduire des mutations secondaires.

On peut aussi utiliser la méthode SEP (Maftahi M., Nicaud J-M., Gaillardin C., 1996. Sticky-end polymerase chain reaction method for systematic gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, vol. 12, p:859-868) qui a été adapté chez *Yarrowia lipolytica* pour la disruption successive des gènes POX (Wang H. J., Le Dall M-T, Waché Y, Belin J-M, Gaillardin C, Nicaud J-M, 1999. Evaluation of Acyl CoA oxidase (Aox) isozymes function in the n-alkanes-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.*, vol. 181, p.5140-5148). Cette méthode est plus rapide, mais nécessite toujours l'utilisation d'un marqueur permettant une contre sélection.

On peut aussi utiliser la méthode SEP/cre développé par Fickers et collaborateurs
25 (Fickers P., Le Dall M.T., Gaillardin C. Thonart P. Nicaud J-M., New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Microbiol. Methods* vol. 55, p:727-737, 2003). C'est une méthode rapide et qui ne nécessite pas l'utilisation d'un marqueur permettant une contre sélection. Cette méthode consiste à 1) sélectionner le gène d'intérêt que l'on veut déléter, 2) construire une
30 cassette de disruption par PCR (« Polymerase Chain Reaction) ou par clonage, 3) d'introduire un marqueur de sélection contenant de part et d'autre une séquence de recombinaison (avantageusement une séquence loxP ou loxR ou dérivée) permettant

une recombinaison entre elle pour l'élimination du marqueur (avantageusement une séquence de type loxP qui permet la recombinaison sous l'action de la recombinaise cre), 4) de sélectionner les souches avec le gène d'intérêt délété (transformation et sélection des transformants) et de vérifier la disruption, 5) de transformer avec un vecteur permettant l'expression de la recombinaise (avantageusement la recombinaise cre qui permet la recombinaison des séquences loxP/loxR et l'élimination du marqueur) 6) l'isolement d'un clone présentant la délétion du gène d'intérêt et ayant perdu le plasmide d'expression de la recombinaise. Mais il faut optimiser les délétions et les marqueurs afin de minimiser les conversions géniques au cours de la transformation.

10 Il résulte de ce qui précède qu'il n'existe pas de technologies de transformation permettant d'intégrer, spécifiquement et stablement dans le génome de *Yarrowia lipolytica*, la séquence d'un gène d'intérêt de sorte d'obtenir une expression importante de celui-ci.

Les inventeurs ont maintenant mis en évidence que la stabilité des souches de *Yarrowia* 15 obtenues par transformation était fortement dépendante du nombre de copies intégrées. Ainsi, une souche présentant 8 copies intégrées du gène LIP2 présente 70% de stabilité, laquelle stabilité monte à 98% pour 7 copies et à 100% pour 6 copies.

De même, les inventeurs ont réussi à développer de nouvelles souches viables de *Yarrowia lipolytica* présentant une auxotrophie et, le cas échéant, un caractère dominant 20 associée à au moins trois marqueurs de sélection distincts, notamment choisis parmi les marqueurs de sélection Ura3, Leu2, Gut2 et Ade2. Les souches développées et viables présentent en outre de larges délétions (Ura3-302, Leu2-270, Gut2-744 et Ade2-884), avec notamment les nouvelles délétions Gut2-744 et Ade2-844, lesquelles dlétions permettent de limiter considérablement la fréquence de conversion génique (cf. 25 exemples).

L'utilisation de telles souches dans des procédés d'intégration, en particulier ciblée, permet d'obtenir beaucoup plus rapidement et simplement des souches transformées comprenant de multiples intégrations d'un gène d'intérêt.

Finalement, les inventeurs ont pu développer un nouveau procédé de 30 transformation de souches de *Yarrowia lipolytica* permettant d'obtenir des souches transformées stables et présentant un niveau intéressant de production d'un polypeptide d'intérêt.

Objet de l'invention

L'objet de l'invention est de remédier au moins à certains inconvénients de l'art antérieur et d'obtenir rapidement des souches surproductrices d'un gène ou de gènes d'intérêt(s) pour la production de protéines hétérologues et de pouvoir rapidement vérifier les cassettes d'expressions et caractériser la souche de production.

On utilise comme microorganismes des souches possédant des marqueurs de sélection permettant un niveau faible de conversion et une grande efficacité de transformation.

On utilise un ensemble de vecteurs permettant la construction de vecteurs contenant les cassettes d'expression et de vecteurs contenant les cassettes d'intégration ;

On utilise également des méthodes rapides d'identification des transformants contenant l'intégration des cassettes d'intégrations aux loci définis.

Finalement, la méthode selon l'invention permet la production d'une protéine hétérologue.

Selon un aspect, l'invention concerne un procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* comprenant les étapes de :

- a) mise en culture d'une souche de *Yarrowia* comprenant au moins trois délétions, lesdites délétions étant une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique *gut2-744* ou une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique *ade2-844*, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspondant à une auxotrophie ou un caractère dominant pour ladite souche, indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes ;
- b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* possédant une auxotrophie et/ou un caractère dominant avec au moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite souche de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et/ou du phénotype dominant résultant de chacune desdites délétions, lesquels vecteurs recombinants comprennent chacun :
 - i) la séquence dudit gène d'intérêt,
 - ii) un marqueur de sélection, et

6a

- iii) deux séquences d'ADN encadrant la séquence dudit gène d'intérêt et dudit marqueur de sélection, lesquelles deux séquences d'ADN sont homologues aux séquences correspondant aux extrémités du site d'intégration ciblée dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* de sorte de permettre l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant par recombinaison homologue ; et
- c) sélection sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* comprenant les étapes de :

- a) mise en culture d'une souche de *Yarrowia* comprenant au moins trois délétions choisies parmi une délétion dans *URA3*, une délétion dans *LEU2*, et la délétion *gut2-744* ou la délétion *ade2-844*, au moins une des délétions étant *gut2-744* et le phénotype associé à chacune de ces délétions correspond à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche, indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes ;
- b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* possédant un caractère auxotrophe et/ou dominant avec au moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite souche de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et/ou du phénotype dominant résultant de chacune desdites délétions, lesquels vecteurs recombinants comprenant chacun :
 - i) la séquence dudit gène d'intérêt,
 - ii) un marqueur de sélection, et
 - iii) deux séquences d'ADN encadrant la séquence dudit gène d'intérêt et dudit marqueur de sélection, lesquelles deux séquences d'ADN sont homologues aux séquences correspondant aux extrémités du site d'intégration ciblée dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* de sorte

6b

de permettre l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant par recombinaison homologue ; et

- c) sélection sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants.

De manière plus détaillée, l'invention propose un ensemble de souches, de vecteurs, de marqueurs de sélection, de tests de phénotype et de caractérisation de l'insertion des cassettes d'insertion pour l'obtention rapide des souches surproductrices d'un gène ou de gènes d'intérêt(s) pour la production de protéines hétérologues et de pouvoir rapidement vérifier les cassettes d'expressions et caractériser la souche de production qui comprend :

- (a) Des souches réceptrices contenant des délétions de gènes conférant une auxotrophie ou un défaut de croissance sur certains milieux;
- (b) Un ensemble de vecteurs de clonage permettant la construction de « vecteurs d'expression » qui contiennent les cassettes d'expression; et un ensemble de « vecteurs d'intégration » permettant la construction de vecteurs d'intégration ;
- (c) Des méthodes d'obtention des transformants, d'identification des transformants contenant l'intégration des cassettes d'intégration au locus définis ; et
- (d) Une méthode de production de la protéine hétérologue.

En conséquence, un premier objet de l'invention concerne un procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* comprenant les étapes de : 2 une délétion dans au moins trois gènes et caractérisée en ce qu'indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes, le

phénotype associé à chacune de ces délétions correspond à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche ;

- b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* auxotrophe et/ou présentant un caractère dominant avec au moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite souche de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et/ou du phénotype dominant résultant de chacune desdites délétions, lesquels vecteurs recombinants comprenant chacun :
- i) la séquence dudit gène d'intérêt,
 - ii) un marqueur de sélection, et
 - 10 iii) deux séquences d'ADN encadrant la séquence dudit gène d'intérêt et ledit marqueur de sélection, lesquelles deux séquences d'ADN sont homologues aux séquences correspondant aux extrémités du site d'intégration ciblé dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* de sorte de permettre l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant par recombinaison homologue ;
- 15 c) sélection sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé d'intégration ciblée selon l'invention est caractérisé en ce que les gènes présentant une délétion est associés à un phénotype d'auxotrophie ou de caractère dominant sont choisis parmi :

- 20 - pour les marqueurs d'auxotrophie, les gènes URA3, LEU2, GUT2, ADE2, HIS et LYS5 ; et
- pour les caractères dominants, le gène de résistance à l'hygromycine HYG4, et les gènes MDR3, KanMX, HPH et Tn5ble.

De préférence, les gènes présentant une délétion sont associés à un phénotype d'auxotrophie, les gènes URA3, LEU2, GUT2 et ADE2 étant les gènes les plus préférés.

Avantageusement, la délétion URA3 correspond à la délétion Ura3-302 bien connue de l'homme du métier et notamment décrite dans MADZAK *et al.* (2004).

Avantageusement, la délétion LEU2 correspond à la délétion Leu2-270 également bien connue de l'homme du métier et notamment décrite dans MADZAK *et al.* (2004).

Avantageusement, la délétion GUT2 correspond à la délétion Gut2-744 décrite dans les exemples. Gut2-744 correspond à une délétion complète de l'ORF du gène GUT2

(SEQ ID NO :4), laquelle délétion est présente dans les souches mutantes FF-Lug (CNCM-3911) et FF-luga (CNCM-3913). Après excision, il reste sur le génome de *Yarrowia*, entre les séquences promotrices et terminatrices de GUT2, la séquence SEQ ID NO : 11.

5 Avantageusement, la délétion ADE2 correspond à la délétion Ade2-844 décrite dans les exemples. Ade2-844 correspond à une délétion complète de l'ORF du gène ADE2 (SEQ ID NO :3), laquelle délétion est présente dans les souches FF-Lua (CNCM-3912) et FF-luga (CNCM-3913). Après excision, il reste sur le génome de *Yarrowia*, entre les séquences promotrices et terminatrices de ADE2, la séquence SEQ
10 ID NO : 12.

Par milieu minimal, on entend ici un milieu ne comportant pas les éléments pour lesquels la souche de *Yarrowia* est auxotrophe, ou permettant, le cas échéant, la sélection de la souche.

Des souches de *Yarrowia* sont bien connues de l'homme du métier. A titre
15 d'exemples préférés de telles souches, on peut citer les souches de *Yarrowia lipolytica*.

La technique de transformation d'une levure par intégration ciblée d'un gène est une technique de biologie moléculaire fréquemment utilisée. Dans cette technique, un fragment d'ADN est cloné dans un vecteur, introduit dans la cellule à transformer, lequel fragment d'ADN s'intègre alors par recombinaison homologue dans une région
20 ciblée du génome receveur (ORR-WEAVER *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.78, p : 6354-6358, 1981). De tels procédés de transformation sont bien connus de l'homme du métier et sont décrits, notamment, dans ITO *et al.* (*J. Bacteriol.*, vol.153, p :163-168, 1983) dans KLEBE *et al.* (*Gene*, vol.25, p :333-341, 1983) et dans GYSLER *et al.* (*Biotechn. Techn.*, vol.4, p : 285-290, 1990). Dans la mesure où cet
25 évènement de recombinaison est rare, des marqueurs de sélection sont insérés entre les séquences assurant la recombinaison afin de permettre, après transformation, d'isoler les cellules où l'intégration du fragment s'est produite par mise en évidence des marqueurs correspondant.

Les marqueurs de sélection permettant la complémentation d'une auxotrophie,
30 également communément appelés marqueurs d'auxotrophie, sont bien connus de l'homme du métier.

Le marqueur de sélection URA3 est bien connu de l'homme du métier. Plus spécifiquement, une souche de *Yarrowia* dont le gène URA3 (SEQ ID N°1 pour *Yarrowia lipolytica*, ladite séquence est aussi accessible par le numéro d'accèsion Yali0E26719g à l'adresse « <http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php#> »), codant pour l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase, est inactivé (par exemple par délétion), ne sera pas capable de pousser sur un milieu non supplémenté en uracile. L'intégration du marqueur de sélection URA3 dans cette souche de *Yarrowia* permettra alors de restaurer la croissance de cette souche sur un milieu dépourvu d'uracile.

Le marqueur de sélection LEU2 décrit notamment dans le brevet US 4,937,189 est également bien connu de l'homme du métier. Plus spécifiquement, une souche de *Yarrowia* dont le gène LEU2 (Yali0E26719g ; SEQ ID N°2 pour *Yarrowia lipolytica*), codant pour la β -isopropylmalate déshydrogénase, est inactivé (par exemple par délétion), ne sera pas capable de pousser sur un milieu non supplémenté en leucine. Comme précédemment. L'intégration du marqueur de sélection LEU2 dans cette souche de *Yarrowia* permettra alors de restaurer la croissance de cette souche sur un milieu non supplémenté en leucine.

Le marqueur de sélection ADE2 est également bien connu de l'homme du métier dans le domaine de la transformation de la levure. Une souche de *Yarrowia* dont le gène ADE2 (SEQ ID N°3 pour *Yarrowia lipolytica*, YALI0B23188g), codant pour la phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, est inactivé (par exemple par délétion), ne sera pas capable de pousser sur un milieu non supplémenté en adénine. Là encore, l'intégration du marqueur de sélection ADE2 dans cette souche de *Yarrowia* permettra alors de restaurer la croissance de cette souche sur un milieu non supplémenté en adénine.

Le gène GUT2 code pour la glycerol-3-phosphate déshydrogénase (SEQ ID N°4, pour *Yarrowia lipolytica*, YALI0B13970g) et son inactivation (par exemple par délétion) entraîne l'incapacité pour le mutant résultant à pousser sur un milieu non fermentable dont la source de carbone correspond à du glycérol.

Parmi les gènes de résistance qui pourront être utilisés comme marqueur de sélection pour conférer à la souche de *Yarrowia* un phénotype présentant un caractère dominant, on peut citer :

5 - Le gène MDR3 originaire de la souris code pour la P-glycoprotéine et, lorsqu'il est exprimé dans une souche de *Yarrowia*, confère une résistance au FK520 (agent antifongique et immunosuppresseur ; RAYMOND *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, vol.14, p :277-286, 1994).

10 - Le module KanMX, qui contient la séquence kan^r issue du transposon Tn903 d'*Escherichia coli* fusionnée aux séquences transcriptionnelles du gène TEF du champignon filamenteux *Ashbya gossypii*, ou à tout promoteur et terminateur de transcription fonctionnels, confère à une souche de *Yarrowia* la résistance à la généticine (G418 ; WACH *et al.*, *Yeast*, vol.10, p :1793-1808, 1994).

15 - Le gène HPH (HYG), originaire d'un plasmide d'*Escherichia coli*, permet la résistance à l'hygromycineB (GRITZ & DAVIES, *Yeast*, vol.8, p : 667-668, 1992 ; CORDERO OTERO & GAILLARDIN, *Applied Microbiol and Biotechnologie*, vol. 46, p : 143-148, 2004).

20 - Le gène Tn5ble, issu de *Escherichia coli*, permet à la levure transformée d'acquérir une résistance à la phléomycine (WENZEL *et al.*, *Yeast*, vol.8, p :667-668, 1992).

D'autres marqueurs de sélection utilisables dans le procédé selon l'invention sont également décrits par BARTH & GAILLARDIN (*The dimorphic fungus Yarrowia lipolytica. In : Non conventional yeasts in biotechnology (Wolf K. Ed.). Springer-Verlag, Berlin, p : 313-388, 1996*).

25 Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé d'intégration ciblée selon l'invention est caractérisé en ce qu'à l'étape b), le site d'intégration ciblé dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* est choisi parmi les gènes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP7, LIP8, AXP, GUT2 et XPR2.

30 De préférence, le procédé d'intégration ciblée est caractérisé en ce qu'à l'étape b), le site d'intégration dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* est choisi parmi les gènes donc la disruption confère un phénotype facilement détectable (visualisable, mesurable), notamment parmi les gènes URA3, ADE2, LIP2, LIP8, AXP.

Le gène LIP2 (SEQ ID N°5 pour *Yarrowia lipolytica*) peut être utilisé comme locus d'insertion. Le gène LIP2 code pour une lipase extracellulaire (PIGNEDE *et al.*, *J. Bacteriol.*, vol. 182(10), p:2802-10, 2000) qui hydrolyse préférentiellement les triglycérides à longue chaîne des résidus oléiques. Une souche de *Yarrowia* dont le gène LIP2 est inactivé (par exemple par délétion), présentera une activité lipase réduite (faible activité lipase extracellulaire, faible halo d'hydrolyse sur boîte de tributyrine).

Le gène LIP8 (SEQ ID N°6 pour *Yarrowia lipolytica*) peut être utilisé comme locus d'insertion. Le gène LIP8 code pour une triacylglycérol hydrolase. Une souche de *Yarrowia* dont le gène LIP8 est inactivé (après avoir inactivé LIP2) ne présentera pas de halo d'hydrolyse de la tributyrine sur boîte YNBT et pas d'activité lipase (FICKERS *et al.*, *Fungal Genetics and Biology*, vol. 42, p : 264-274, 2005).

Le gène AXP (SEQ ID N°7 pour *Yarrowia lipolytica*) peut être utilisé comme locus d'insertion. Le gène AXP code pour une protéase acide extracellulaire normalement exprimée lorsque le pH du milieu est inférieur à 4. Une souche de *Yarrowia* dont le gène AXP est inactivé (par exemple par délétion), présentera sur boîte YNBcaseine à pH acide un halo d'hydrolyse de la caséine diminué et une activité protéase diminuée. (GLOVER *et al.*, *Microbiology*, vol. 143, p.: 3045-54, 1997).

Le gène XPR2 code pour une protéase alcaline extracellulaire exprimée lorsque le pH du milieu est supérieur à 6. Une souche de *Yarrowia* dont le gène XPR2 (SEQ ID N°8 pour *Yarrowia lipolytica*) est inactivé (par exemple par délétion), présentera sur boîte YNBcaseine à pH6 un halo d'hydrolyse de la caséine diminué et une activité protéase diminuée (DAVIDOW *et al.*, *J. Bacteriol.*, vol. 169, p. 4621-9, 1987).

De préférence, ladite souche de *Yarrowia* auxotrophe comprendra au moins une délétion parmi les gènes URA3, LEU2 et ADE2 ou URA3, LEU2 et GUT2.

A titre d'exemple, on peut citer la souche de *Yarrowia lipolytica* déposée le 4 février 2008 conformément au traité de Budapest auprès de la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France sous le numéro CNCM-3912.

A titre d'exemple, on peut citer la souche de *Yarrowia lipolytica* déposée le 4 février 2008 conformément au traité de Budapest auprès de la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France sous le numéro CNCM-3911.

Avantageusement, la souche de *Yarrowia* auxotrophe utilisée à l'étape a) dans le procédé selon l'invention comprend une délétion parmi quatre gènes résultant à un phénotype d'auxotrophie pour les quatre gènes du groupe comprenant URA3, LEU2, ADE2 et GUT2.

5 a souche de *Yarrowia lipolytica* déposée le 4 février 2008 conformément au traité de Budapest auprès de la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France sous le numéro CNCM-3913.

10 Selon un mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, celui-ci permet l'intégration ciblée de 3 à 10 copies du gène d'intérêt, de préférence de 4 à 8 copies et, de manière particulièrement préférée, de 5 à 7 copies dudit gène d'intérêt.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend la transformation de ladite souche de *Yarrowia* auxotrophe avec trois à dix vecteurs recombinants, de préférence de 4 à 8 vecteurs recombinants et, de manière particulièrement préférée, de 5
15 à 7 vecteurs recombinants.

Les vecteurs recombinants utilisés à l'étape b) pourront comprendre en outre un ou plusieurs marqueurs de sélection distincts de ceux permettant, pour ladite souche de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et, le cas échéant du caractère dominant résultant des délétions parmi les au moins trois gènes.

20 Les séquences codant pour le marqueur de sélection et celles du gène d'intérêt comprennent en outre les éléments nécessaires à leur expression dans une souche de *Yarrowia*.

De telles éléments correspondent notamment à des séquences promotrices et terminatrices actives chez une souche de *Yarrowia*. De préférence, les séquences
25 promotrices et terminatrices utilisées appartiennent à des gènes différents de manière à minimiser les risques de recombinaison non désirée dans le génome de la souche de *Yarrowia*.

De telles séquences promotrices sont bien connues de l'homme du métier et peuvent correspondre notamment à des promoteurs inductibles ou constitutifs. A titre
30 d'exemple de promoteurs utilisables dans le procédé selon l'invention, on peut citer notamment le promoteur d'un gène de *Yarrowia lipolytica* qui est fortement réprimé par le glucose et qui est inductible par les acides gras ou les triglycérides tel que le

promoteur POX2 du gène de l'acyl CoA oxydase 2 de *Yarrowia lipolytica* et le promoteur du gène LIP2 décrit dans la demande PCT WO 01/83773. On peut aussi utiliser le promoteur du gène FBA1 du gène de la fructose-bisphosphate aldolase (US 2005/0130280), le promoteur du gène YAT1 du gène du transporteur de l'ammonium
5 (US 2006/0094102 A1), le promoteur du gène GPAT du gène de la glycérol-3-phosphate O-acyltransferase (US 2006/0057690 A1), le promoteur du gène TEF (US 2001/6265185) et le promoteur hybride hp4d (WO9641889).

De telles séquences terminatrices sont également bien connues de l'homme du métier et on peut citer, à titre d'exemple de séquences terminatrices utilisables dans le
10 procédé selon l'invention, la séquence terminatrice du gène PGK1, la séquence terminatrice du gène LIP2 décrit dans la demande PCT WO 01/83773.

Lorsque le produit du gène d'intérêt est destiné à être sécrété par la cellule hôte, ledit insert comprend en outre des signaux de contrôle de la sécrétion dudit produit. On peut utiliser dans ce but des séquences signal fonctionnelles chez les souches de
15 *Yarrowia*, par exemple tout ou partie de la séquence prépro du gène LIP2 décrit dans la demande PCT WO 01/83773.

Le gène d'intérêt code pour un polypeptide que l'on souhaite produire en grande quantité dans la souche de *Yarrowia* transformée. Ledit polypeptide correspond de préférence à un polypeptide hétérologue, comme par exemple la L-asparaginase de
20 *Erwinia chrysanthemi* (SEQ ID N° 9) ou de *Escherichia coli* (SEQ ID N°10), mais il peut également correspondre à un polypeptide autologue comme la lipase LIP2 de *Yarrowia lipolytica* décrite précédemment.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé selon l'invention, les étapes b) de transformation de la souche de *Yarrowia* et c) de sélection sur milieu minimal sont
25 effectuées séparément pour chacun desdits au moins trois vecteurs recombinants.

Selon un mode de réalisation plus préféré, le procédé d'intégration ciblée selon l'invention est caractérisé en ce qu'à l'étape b), les transformations avec au moins les trois vecteurs recombinants sont réalisées de manière indépendante et successivement avec chacun des vecteurs recombinants, ou simultanément avec l'ensemble desdits
30 vecteurs recombinants, et en ce que l'ensemble de ces transformations est suivie d'une étape c) de sélection sur un milieu minimal des levures ayant intégré l'ensemble desdits vecteurs recombinants.

Selon un mode de réalisation également préféré, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que le marqueur de sélection est encadré par des séquences permettant son excision après l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant.

5 Selon un quatrième mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, le marqueur de sélection est encadré par des séquences permettant son excision après l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant.

Le procédé selon l'invention permet alors de réutiliser un même marqueur de sélection, notamment un marqueur d'auxotrophie, pour une autre intégration ciblée lors d'une nouvelle étape de transformation.

10 De telles séquences permettant l'excision et l'élimination, chez une souche de *Yarrowia*, d'une séquence encadrée sont bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, on peut citer l'utilisation de deux séquences identiques ou similaires, dites séquences répétées directes (SRD), en vue d'obtenir un événement de recombinaison comme décrit dans le brevet EP 0994192 B1 ou dans le brevet EP
15 0635574 B1.

A titre d'exemple, on peut également citer le système « Cre-lox » tel que décrit dans le brevet EP 0220009 B1, dans lequel les séquences équivalentes aux séquences répétées directes sont dans ce cas des séquences spécifiques dites « lox » et l'excision de la séquence d'ADN comprise entre les deux séquences « lox » s'effectue en présence
20 d'une recombinase « Cre » exprimée par un vecteur d'expression. D'autres systèmes équivalent et utilisant d'autres recombinases spécifiques sont également connus de l'homme du métier notamment le procédé décrit dans le brevet EP 0814165 B1.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un procédé de production d'un polypeptide codé par un gène d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 25 A) un procédé d'intégration ciblée selon l'invention;
- B) une étape d) de culture de la souche de *Yarrowia* dans un milieu de culture liquide comprenant des sources assimilables de carbone, d'azote et de sels inorganiques de sorte de permettre la croissance de ladite souche transformée de *Yarrowia* et
- C) la récupération dudit polypeptide d'intérêt exprimé à partir des cellules *Yarrowia* ou
30 du milieu de culture obtenus à l'étape B).

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend une étape e), après l'étape C), de purification dudit polypeptide codé par le gène d'intérêt.

Cette étape e) de purification peut être effectuée soit après lyse cellulaire, soit, avantageusement, à partir du milieu de culture dans lequel il est sécrété par les cellules, par des techniques classiques, connues en elle mêmes, par exemple par précipitation fractionnée suivie d'une ou plusieurs étapes de chromatographie.

5 Les cellules de *Yarrowia* transformées susceptibles d'être obtenues par le procédé conforme à l'invention font également partie de la présente invention.

Selon un autre aspect, la présente invention est relative à un procédé d'obtention d'une souche modifiée de *Yarrowia*, caractérisée en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on transforme ladite souche de *Yarrowia* avec au moins trois vecteurs
10 permettant d'aboutir à une souche de *Yarrowia* comprenant une délétion dans au moins trois gènes et caractérisée en ce qu'indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspond à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche.

De préférence ici, la délétion d'au moins trois gènes est associée à un phénotype
15 d'auxotrophie ou de caractère dominant sont choisis parmi :

- pour les marqueurs d'auxotrophie, les gènes URA3, LEU2, GUT2, ADE2, HIS et LYS5, de préférence parmi les gènes URA3, LEU2, GUT2 et ADE2 ; et
- pour les caractères dominants, le gène de résistance à l'hygromycine HPH (HYG), et les gènes MDR3, KanMX et Tn5ble, le gène HYG étant aussi le plus préféré des
20 gènes de résistance.

Dans un mode de réalisation également préféré, le procédé d'obtention d'une souche modifiée de *Yarrowia* selon l'invention est caractérisé en ce que les gènes présentant une délétion sont associés à un phénotype d'auxotrophie, de préférence choisis parmi les gènes URA3, LEU2, GUT2 et ADE2.

25 Selon un dernier aspect, la présente invention a pour objet une souche de *Yarrowia* auxotrophe et, le cas échéant, présentant un caractère dominant acquis, susceptible d'être obtenue par le procédé d'obtention d'une souche modifiée de *Yarrowia* selon l'invention, laquelle souche comprend une délétion dans au moins trois gènes de son génome et caractérisée en ce qu'indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois
30 gènes, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspond à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche. Chacune des préférences définies pour le nombre de gènes délétés, les gènes choisis pour la délétion telles que définies pour

l'étape a) du procédé d'intégration selon la présente invention est également préférée pour ce procédé.

Avantageusement, ladite souche de *Yarrowia* obtenue par ce procédé est une souche de *Yarrowia lipolytica*.

5 De préférence, ladite souche de *Yarrowia* auxotrophe comprendra au moins une mutation parmi les gènes URA3, LEU2 et ADE2 ou URA3, LEU2 et GUT2.

A titre d'exemple, on peut citer les souches de *Yarrowia lipolytica* déposées le 4 février 2008 conformément au traité de Budapest auprès de la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux,
10 75724 PARIS CEDEX 15, France sous les numéros CNCM I-3911 et CNCM I-3912.

Selon un deuxième mode de réalisation préféré, la souche de *Yarrowia* auxotrophe utilisée dans le procédé selon l'invention comprend une mutation parmi quatre gènes nécessaires à la croissance de ladite souche, lesquels trois gènes sont choisis dans le groupe comprenant URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP7, LIP8, AXP, GUT2 et XPR2.

15 De préférence, ladite souche de *Yarrowia* auxotrophe comprendra au moins une mutation parmi les gènes URA3, LEU2, ADE2 et GUT2.

A titre d'exemple on peut citer la souche de *Yarrowia lipolytica* déposée le 4 février 2008 conformément au traité de Budapest auprès de la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux,
20 75724 PARIS CEDEX 15, France sous le numéro CNCM I-3913.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide des figures et de leur légende et du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs d'obtention de souches transformées de *Yarrowia lipolytica* conforme à l'invention.

25

Légendes des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la construction de « cassette d'intégration » ciblée de « cassette d'expression ». 1) Le gène d'intérêt est cloné dans un vecteur d'expression, 2) la cassette d'expression est libérée par une digestion I-SceI,
30 3) puis clonée dans différents vecteurs d'intégration, 4) les cassettes d'intégration sont libérées par une digestion NotI, purifiées et utilisées pour transformer une souche d'intégration.

Figure 2 : Représentation schématique du vecteur de clonage. 1) Le vecteur de clonage comprend un promoteur fort suivi de sites de restriction unique pour le clonage du gène d'intérêt, d'un terminateur de transcription, et de part et d'autre un site rare pour permettre l'excision de la cassette d'expression. 2) le vecteur pVC de base contient un multi sites composé des sites ClaI, BamHI, KpnI et AvrII, , la séquence terminatrice du gène LIP2 (LIP2term) avec de part et d'autre le site rare I-CeuI, 3) le vecteur d'expression contient le promoteur pPOX2 cloné aux sites ClaI et BamHI, 4) La cassette d'expression est obtenue par clonage au multisites du gène d'intérêt, par exemple BamHI-AvrII, puis une digestion du vecteur d'expression par I-CeuI.

Figure 3 : Représentation schématique du vecteur d'intégration et obtention de la cassette d'intégration ciblée. 1) Le vecteur d'intégration contient une région amont du locus d'insertion (région P, pour promotrice) et une région aval du locus d'insertion (région T, pour terminatrice) avec de part et d'autre un site rare 1 pour l'excision de la cassette d'intégration. Entre les régions P et T sont présent deux sites rares, le site rare 2 pour l'insertion du marqueur de sélection, et le site rare 3 pour l'insertion de la cassette d'expression.

Figure 4 : Représentation schématique des vecteurs d'intégration pour une intégration aléatoire. I) représentation schématique du vecteur qui comprend un site rare 1 utilisable pour libérer la cassette d'expression de la partie plasmide, un site rare 2 pour le clonage du marqueur de sélection pour *Y. lipolytica*. Il contient un promoteur entre les sites ClaI et BamHI (ici le promoteur pPOX2), le terminateur du gène LIP2 et les régions Zeta pour une intégration aléatoire (voir brevet amplification). La série JMP61 présente la séquence d'adressage de la lipase Lip2. II) Représentation schématique des vecteurs d'intégration pour une intégration aléatoire construit avec le site NotI comme site rare 1 et le site I-SceI comme site rare 2 utilisé pour l'insertion des marqueurs URA3, LEU2, Hyg, GUT2 et ADE2.

Figure 5 : Expression de l'asparaginase dans les souches contenant différent nombre de copies du gène. A) Analyse sur gel d'électrophorèse NuPAGE 10% et coloration au bleu colloïdal (équivalent à 30 µl de surnageant), B) Analyse sur gel d'électrophorèse NuPAGE 10%, transfert et détection par Western blot avec un anticorps anti Asparaginase (équivalent à 10 µl de surnageant). La bande a correspond à la protéine non glycosylée et la bande b correspond à la protéine mono glycosylée. L1,

Souche réceptrice FF-luga ; L2, souche 5LAsp1 : ade2 :: GUT2-Asp, 1 copie; L3, souche 6LAsp1 : ade2 :: GUT2-Asp, 1 copie; L4, souche 15LAsp2 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp, 2 copies ; L5, souche 21LAsp2 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp, : 2 copies ; L6, souche 1LAsp3 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp leu2
 5 ::ADE2-Asp : 3 copies ; L7, souche 2LAsp4 : ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp leu2
 ::ADE2-Asp ura3 ::LEU2-Asp : 4 copies.

Figure 6 : Analyse phénotypique Suc+/ Suc- pour vérifier l'insertion au locus URA3. Les transformants obtenus avec la cassette d'intégration ciblée au locus URA3 sont testés par strie sur boîte de milieu riche glucose (YPD) et saccharose (YPS). Les
 10 souches réceptrices Suc+ FF-lug, FF-lua et FF-luga sont utilisées comme contrôle.

Figure 7 : Analyse phénotypique Lip+/ Lip- pour vérifier l'insertion au locus LIP2. Les transformants obtenus avec la cassette d'intégration ciblée au locus LIP2 sont cultivés en milieu riche acide oléique (YPD2O2). L'activité lipase dans le surnageant des souches contenant différentes copies de l'asparaginase. La souche réceptrice Lip+
 15 FF-luga est utilisée comme contrôle. Souches avec 1 copie au locus ADE2 (ade2 :: GUT2-Asp) : 5LAsp1 et 6LAsp1 ; souches avec 1 copie au locus ADE2 et 1 copie au locus LIP2 (ade2 :: GUT2-Asp, lip2 ::URA3-Asp) : 14LAsp2, 15LAsp2, 16LAsp2, 17LAsp2 et 21LAsp2.

Figure 8 : Détermination du nombre de copie des gène LIP2 et Asp par RT-qPCR
 20 dans les transformants.

EXEMPLES

Exemple 1 : Souches utilisées dans les exemples

Les souches utilisées dans le procédé de l'invention dérivent d'une souche sauvage de
 25 *Yarrowia lipolytica*, en particulier de la souche sauvage *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC 20460, répertoriée sous CLIB89 dans la Collection du CIRM (Centre International de Ressources Microbiennes)).

Ainsi, on peut utiliser de nouvelles souches mutantes dérivant de la souche *Yarrowia lipolytica* ATCC 20460 par l'intermédiaire de la souche Po1d [souche auxotrophe pour
 30 la leucine (Leu-) et l'uracile (Ura-)], décrite dans la revue de G. Barth et al. : *Yarrowia lipolytica*. in: Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.),

Vol. 1, 1996, pp. 313-388. Springer-Verlag. Elle est répertoriée sous CLIB139 dans la CIRM.

L'obtention de ces nouvelles souches receptrices (FF-lu, FF-lug (CNCM I-3911), FF-lua (CNCM I-3912), FF-luga (CNCM I-3913)) sera décrite plus loin.

5 Obtention des souches

L'obtention des souches mutantes réceptrices utilisables dans le procédé de l'invention peut se faire à partir de la souche Pold, qui dérive de la souche sauvage *Yarrowia lipolytica* W29. La souche Pold est une souche auxotrophe pour la leucine (leu-) et l'uracile (ura-). Elle est décrite dans la revue de G. Barth et al. : *Yarrowia lipolytica* in:
 10 Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, pp. 313-388. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Elle est répertoriée sous CLIB139 dans la collection du CIRM. L'obtention des souches mutantes utilisables dans le procédé de l'invention peut se faire par l'insertion de délétion de gène conférant une
 15 auxotrophie ou conférant un défaut de croissance sur certain milieux, dont le gène présente une délétion, si possible une délétion qui ne puisse par reverser, avantageusement correspond à une délétion complète du gène. Dont le gène correspondant puisse être utilisé comme marqueurs de sélection pour la sélection des transformants ayant intégrée les cassettes d'intégration. Les délétions présenteront une
 20 délétion importante par rapport à la cassette correspondante utilisée pour la construction des markers de sélection, afin de diminuer le taux de conversion.

1. Délétion du gène GUT2 (Δ gut2-744), construction du marqueur GUT2 et obtention de la souche mutante FF-lug (CNCM I-3911).

1.1 Délétion du gène GUT2 (Δ gut2-744)

Pour obtenir cette souche, on peut procéder comme suit :

- 25 1) on sélectionne le gène d'intérêt que l'on veut déléter ;
- 2) on construit une cassette de disruption par clonage ou par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») en amplifiant la région amont du gène (région « promotrice », symbolisé par P) et la région aval du gène (région « terminatrice », symbolisé par T) ;
- 3) on introduit un marqueur de sélection contenant de part et d'autre une séquence de
 30 recombinaison (avantageusement une séquence loxP ou loxR ou dérivée) permettant une recombinaison entre elle pour l'élimination du marqueur (avantageusement une

séquence de type loxP qui permet la recombinaison sous l'action de la recombinaise cre);

- 4) on transforme avec la cassette de disruption et on sélectionne les souches avec le gène d'intérêt délété (transformation et sélection des transformants) et on vérifie la
5 disruption du gène ;
- 5) on transforme avec un vecteur permettant l'expression de la recombinaise (avantageusement la recombinaise cre qui permet la recombinaison des séquences loxP/loxR et l'élimination du marqueur) ;
- 6) on isole un clone présentant la délétion du gène d'intérêt et ayant perdu le plasmide
10 d'expression de la recombinaise.

À partir du mutant FF-lu auxotrophe (Leu-, Ura-), on a construit une souche Y. lipolytica mutante FF-lug auxotrophe pour la leucine et l'uracile (Leu-, Ura-) et incapable d'utiliser le glycérol comme source de carbone (gly-). La première étape est la
15 construction de la souche FF-lug ::URA3 prototrophe pour l'uracile (Leu-, Ura+) par délétion du gène GUT2 par la cassette de disruption gut2 ::URA3ex en transformant le fragment de PCR GUT2-PUexT (JME744) et en sélectionnant les Ura+ sur YNBcasa. On sélectionne les auxotrophes pour l'uracile (Leu+, Ura-) par excision du marqueur URA3ex en transformant avec le vecteur répliatif pRRQ2 contenant la recombinaise
20 Cre et le marqueur LEU2 (Cre-LEU2) et en sélectionnant les transformants auxotrophes pour l'uracile, Leu+. La perte du plasmide pRRQ2 est réalisée par une culture sur milieu riche YPD et par l'isolement d'un clone (Leu-, Ura-, Gly-).

La représentation schématique de la construction de ces mutants est résumée dans le Tableau 1 ci-dessous.

25 Tableau 1 : Étapes de transformation requises pour la production
du mutant FF-lug

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
1	FF-lu, PO1d, Leu-, Ura-	Gut2-PUexT	JMY1202, Leu-, Ura+, Gly-gut2-PUexT

2	JMY1202, Leu-, Ura+, Gly-, gut2-PUexT	Vecteur pRRQ2 (pKS Cre ARS68 LEU2)	FF-lug JMY1346, Leu-, Ura-, Gly- gut2-744
---	--	---------------------------------------	---

La cassette de disruption pour le gène GUT2 a été construite par amplification de la région amont (région P ; Yali0B:1873518..1872400 complémentaire, 1119bp) et de la région aval (région T ; Yali0B:1870468.. 1869652 complémentaire, 817bp) ce qui permet la délétion de l'ORF du gène GUT2 (YaliOB1870469..1872401) et laisse une
5 homologie avec le marqueur de sélection GUT2ex-0.5 (485 bp avec la région P et 56 bp dans la région T) afin de minimiser les conversions géniques. Les marqueurs de sélection ex sont présentés dans le Tableau 11.

Les régions P et T ont été amplifiées avec les primers G3PD-P1, G3PD-P2, G3PD-T1 et G3PD-T2 (Tableau 9).

10 Les primers G3PD-P2 et G3PD-T1 contiennent le site rare I-SceI pour l'insertion du marqueur de sélection excisable URA3ex. Le fragment PT a été cloné dans pGEM-T (Invitrogen) pour donner le plasmide pGEM-GUT2-PT (JME743). Le plasmide de disruption pGEM-GUT2-PUexT (JME744) a été obtenu par insertion du marqueur URA3ex au site I-SceI provenant du plasmide JME507.

15 La cassette de disruption (3245 pb) a été obtenue par PCR avec les primers G3PD-P1 et G3PD-T2. Le produit de PCR a été purifié sur gel d'agarose à l'aide du kit gel extraction Qiagen. Les souches ont été transformée par la méthode à l'acétate de lithium. Les transformants Ura+ ont été sélectionnés sur milieu YNBcasa.

Les transformants Ura+ sont obtenus avec un taux de transformation typique (Fickers, 2003). La vérification de la disruption du gène GUT2 a été vérifiée par PCR avec les
20 primers en 5' de la région P (G3PDver1) et en 3' de la région T (G3PDver2). Le mutant JMY1202 gut2::URA3ex a été ensuite transformé par le plasmide réplcatif pRRQ2 (pKS Cre ARS68 LEU2 ; JME461). Les transformants obtenus sont criblés pour l'excision du marqueur URA3 et la perte du plasmide réplcatif d'expression de la
25 recombinaise cre est réalisée par une culture sur milieu riche YPD et par l'isolement d'un clone (Leu-, Ura-, Gly-). Le mutant JMY1346 (FF-lug) a été sélectionné.

La séquence du locus gut2-844 du mutant JMY1346 a été amplifiée avec les primers G3PDver1 et G3PDver2. Le produit de PCR de taille de 2415 pb a été séquencé. La séquence obtenue montre l'absence de la séquence de marqueur Ura3. Après excision, il
30 reste sur le génome les séquences suivantes entre P et T du locus GUT2:

TGCAGCTTTCGAGAACCGACGCCTGGGACCTGTGTCTGTAGGGATAACAGG
GTAATTCGCTTCGGATAACTCCTGCTATAACGAAGTTATGTAGGGATAACAG
GGTAAT (SEQ ID NO : 11 ; soit site I-SceI - séquence LoxR - site I-SceI).

1.2 Construction du marqueur GUT2ex

- 5 Pour la construction du marqueur GUT2ex, la séquence génomique du locus GUT2 a été amplifiée avec les primers G3PTS et G3PTR (Tableau 8) et cloné dans le vecteur pKS-LPR (Fickers et al., 2003, Journal of Microbiological Methods, vol. 55, p : 727-737) au site EcoRI. Il contient 492 bp de promoteur, l'ORF du gène GUT2, (ORF Yali0B:1870546..1872384) et 132 bp du terminateur et qui correspond à la séquence
- 10 Yali0B:1872876..1870417. Cette ORF contient 2 sites BamHI et 1 site EcoRI qui ont été éliminés par mutagenèse dirigée en introduisant des mutations silencieuses. Nous avons utilisé les primers suivants : G3PB1S et G3PB1R pour le premier site BamHI (ggAtcc en ggCtcc), G3PB2S et G3PB2R pour le deuxième site BamHI (ggatcC en ggatcT) et G3PE1S et G3PE1R pour le site EcoRI (gaAttc en gaGttc) (Tableau 9).
- 15 Le marqueur peut être inséré dans les deux sens. Pour ce marqueur GUT2ex0.5, seul le sens 1 a été obtenu dans le pKS-LPR. Après vérification par séquençage, le plasmide contenant le marqueur GUT2ex0.5 modifié est JME792.

Deux autres marqueurs GUT2ex1.0 et GUT2ex1.5 contenant 1 kb et 1,5 kb de promoteur respectivement ont été construits suite à la difficulté d'obtenir des

20 transformants à partir du marqueur GUT2ex0.5 (paragraphe 1.3). Ces promoteurs ont été amplifiés à partir de l'ADNg (souche E150 *Yarrowia lipolytica*) avec les primers P1KB et PNHE1 et P15KB et PNHE1, respectivement. Le clonage a été réalisé par ligature 3 voies entre le pKS-LPR (EcoRI déphosphorylé) le produit de PCR (EcoRI et NheI) et le reste du marqueur GUT2ex modifié issu de JME792 (NheI et EcoRI). Le

25 marqueur GUT2ex1.0 dans le sens 1 correspond à JME919 et dans le sens 2 correspond à JME920. Le marqueur GUT2ex1.5 dans le sens 1 correspond à JME921 et dans le sens 2 correspond à JME922.

1.3 Transformation avec les marqueurs GUT2ex0.5, GUT2ex1.0 et GUT2ex1.5.

Pour valider l'utilisation du marqueur GUT2ex, le marqueur GUT2ex0.5 a été isolé du

30 plasmide JME792 (pKS-LPR-GUT2ex0.5) par digestion I-SceI et inséré au site I-SceI du plasmide JMP62 I-SceI (JME801) pour donner le plasmide JMP62Gut2-ex0.5 (JME805).

Le plasmide JME805 a été digéré par NotI et utilisé pour transformer la souche FF-lug par la méthode au lithium acetate. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu YNBcasa Glycérol 1% supplémenté avec de l'uracile (100 mg/L). Après plusieurs tentatives, ce marqueur n'a pas permis d'obtenir des transformants.

- 5 Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse d'une défektivité trop importante de la partie promotrice (492 pb). Nous avons donc construits 2 autres marqueurs contenant des parties promotrices plus longues (cf paragraphe 1.2) soit le marqueur GUT2ex1.0 et GUT2ex1.5. Les mêmes résultats ont été obtenus.

Il a été décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* une répression de l'utilisation du glucose en présence de glycérol pour des souches Δ gut2. Effectivement, la souche FF-lug est incapable de pousser en présence des 2 sources de carbones pré-citées. En modifiant notre méthode de transformation, nous avons obtenu des transformants. Cette nouvelle méthode de transformation reste identique à la méthode à l'acétate de lithium et au polyéthylène glycol (Gaillardin et al. 1985) auquel on ajoute une étape de phase d'expression avant l'étalement de la transformation sur milieux sélectifs. Cette phase d'expression est réalisée ainsi : après le choc thermique à 42°C pendant 10 minutes. On centrifuge le produit de la transformation à 2000 rpm pendant 3 min et on lave les cellules avec 2 mL de tampon TE pH8. Ce lavage est répété 2 fois. Les cellules sont ensuite reprises avec le milieu nutritif Yeast Extract 1% Peptones 1% et dextrose 0,2%.

20 On effectue une incubation de 16 heures à 28 degrés et sans agitation. De nouveau, on centrifuge à 2000 rpm pendant 3 min et on lave les cellules avec 2 mL de tampon TE pH8. Ce lavage est répété 2 fois. Les cellules sont ensuite reprises avec 2 ml de TE et sont étalées sur milieux sélectifs contenant du glycérol 1% comme seule source de carbone.

- 25 Les résultats de la transformation du marqueur GUT2ex1.0 dans la souche FF-lug sont présentés dans le tableau 2 suivant :

Tableau 2 : Efficacité de transformation selon la méthode de transformation.

Type d'intégration	Méthode classique sans phase d'expression		Nouvelle méthode avec phase d'expression	
	aléatoire	ciblée	aléatoire	ciblée
Nombre de	0	14	133	615

transformants				
Taux de transformation par µg d'ADN	0	187	266	8215
% d'intégration	ND	75%	ND	100%

2. Délétion du gène ADE2 (Δ ade2-844), construction du marqueur ADE2 et obtention des souches mutantes FF-lua (CNCM I-3912) et FF-luga (CNCM I-3913).

2.1 Délétion du gène ADE2 (Δ ade2-844)

5 Pour obtenir ces souches, on peut procéder comme suit : a partir du mutant FF-lu, on a construit la souche FF-lua Leu-, Ura-, Ade- et a partir du mutant FF-lug, on a construit la souche FF-luga Leu-, Ura-, Ade-, Gly-.

2.1a. À partir du mutant FF-lu auxotrophe (Leu-, Ura-), on a construit une souche *Y. lipolytica* mutante FF-lua auxotrophe pour la leucine, l'uracile et l'adénine (Leu-, Ura-, Ade-). La première étape est la construction de la souche FF-lua ::URA3 prototrophe pour l'uracile (Leu-, Ura+, Ade-) par deletion du gène ADE2 par la cassette de disruption Ade2 ::URA3ex en transformant la cassette NotI PTAd2-Ura3Ex (JME844) et en sélectionnant les Ura+ sur YNBcasa, supplémenté avec de l'adénine (800mg/L). On sélectionne les auxotrophes pour l'uracile (Leu+, Ura-, ade-) par excision du marqueur URA3ex en transformant avec le vecteur réplcatif pRRQ2 contenant la recombinaise Cre et le marqueur LEU2 (Cre-LEU2) et en sélectionnant les transformants auxotrophes pour l'uracile, Leu+. La perte du plasmide réplcatif pRRQ2 d'expression de la recombinaise cre est réalisée par une culture sur milieu riche YPD et par l'isolement d'un clone (Leu-, Ura-, Ade-). Le mutant JMY1409 (FF-lua) a été sélectionné.

2.1.b. À partir du mutant FF-lug auxotrophe (Leu-, Ura-) et incapable d'utiliser le glycérol comme source de carbone (Gly-), on a construit une souche *Y. lipolytica* mutante FF-luga auxotrophe pour la leucine, l'uracile et l'adénine (Leu-, Ura-, Ade-) et incapable d'utiliser le glycérol comme source de carbone (Gly-). La première étape est la construction de la souche FF-luga ::URA3 auxotrophe pour la leucine et l'adénine (Leu-, Ade-, Ura+) par délétion du gène ADE2 par la cassette de disruption ade2 ::URA3ex en transformant la cassette NotI PTAd2-PUra3ExT (JME844) et en sélectionnant les Ura+ sur YNBcasa supplémenté avec de l'adénine (800 mg/L). On

sélectionne les auxotrophes pour l'uracile (Leu⁺, Ura⁻) par excision du marqueur URA3_{ex} en transformant avec le vecteur réplcatif pRRQ2 contenant la recombinaise Cre et le marqueur LEU2 (Cre-LEU2) et en sélectionnant les transformants auxotrophe pour l'uracile, Leu⁺. La perte du plasmide pRRQ2 est réalisée par une culture sur milieu riche YPD et par l'isolement d'un clone (Leu⁻, Ura⁻, Ade⁻, Gly⁻). Le mutant JMY1404 (FF-luga) a été sélectionné.

La représentation schématique de la construction de ces mutants est résumée dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Étapes de transformation requises pour la production des mutants FF-lua et FF-luga

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
1	PO1d, Leu ⁻ , Ura ⁻	PTade2-Ura3Ex	JMY1407, Leu ⁻ , Ura ⁺ ade2-PUexT
2	JMY1407, Leu ⁻ , Ura ⁺ ade2-PUexT	Vecteur pRRQ2, sélection Leu ⁺ , vérification Gly ⁻ , perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu ⁻	JMY1409, Leu ⁻ , Ura ⁻ , Ade ⁻ ade2-844 FF-lua
1b	JMY1346, Leu ⁻ , Ura ⁻ , Gly ⁻ gut2-744	PTade2-Ura3Ex	JMY1396, Leu ⁻ , Ura ⁺ Gly ⁻ ade2-PUexT
2b	JMY1396, Leu ⁻ , Ura ⁺ , Gly ⁻ ade2-844	Vecteur pRRQ2, sélection Leu ⁺ , vérification Gly ⁻ , perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu ⁻	JMY1404, Leu ⁻ , Ura ⁻ , Ade ⁻ , Gly ⁻ , ade2-844 FF-luga

La cassette de disruption pour le gène ADE2 (Yali0B23188g ; highly similar to tr|Q9P4V1 *Candida boidinii*), code pour la phosphoribosyl-5-aminoimidazole carboxylase, protéine déduite de 565 aa (Yali0B:3030460..3032157, sens) a été construite par amplification de la région amont (région P ; Yali0B:3029011..3029931, 920 bp) et de la région aval (région T ; 792 pb, Yali0B:3031871..3032662) ce qui

permet la délétion de l'ORF du gène ADE2 Yali0B:3030460..3032157). La région éliminée est de 1939 pb (Yali0B:3029932..3031870) et qui ne laisse qu'une très faible homologie avec le marqueur de sélection ADE2ex (0 bp avec la région P et 415 bp dans la région T) afin de minimiser les conversions géniques. Le marqueur ADE2ex
5 correspond à la région Yali0B:3029961..3032280 fragment de 2319 pb. Les marqueurs de sélection ex sont présentés dans le Tableau 11.

Les régions P et T ont été amplifiées avec les primers suivant P1ADE2, P2ADE2, T1ADE2, T2ADE2 (Tableau 9).

Les primers P2 et T1 contiennent le site rare I-SceI pour l'insertion du marqueur de
10 sélection excisable URA3ex. Le primer T1 contient aussi le site rare I-CeuI pour l'insertion de la cassette d'expression. Les primers P1 et T2 contiennent le site rare NotI pour le clonage dans pHSS6-NotI (JME800). Le fragment PT a été cloné dans le JME800 digéré par NotI et déphosphorylé pour donner le plasmide pADE2-PT dans l'orientation 1 (sens 1, JME813) ou dans l'orientation 2 (sens 2, JME814). Le Sens est
15 défini suivant l'orientation du site I-SceI : soit le sens 1 avec le site I-SceI en sens, soit le sens 2 avec le site I-SceI en complémentaire. Le plasmide de disruption pPTAde2-Ura3Ex (JME844) a été obtenu par insertion du marqueur URA3ex au site I-SceI du plasmide JME813.

La cassette de disruption a été obtenue par digestion NotI et purification de la bande de
20 3 089 pb. La souche Po1d a été transformée par la méthode à l'acétate de lithium Les transformants Ura⁺ ont été sélectionnés sur milieu YNBcasa supplémenté avec de l'adénine (100 mg/L). Les concentrations typiques nécessaires pour la complémententation d'une auxotrophie qui sont utilisées sont généralement comprises entre 100 à 200 mg/L. Les transformants Ura⁺ sont obtenus avec un taux de transformation faible, de l'ordre
25 de 50 transformants par microgramme d'ADN, l'analyse des transformants a révélé qu'ils contenaient une conversion du marqueur ura3-302 et pas la délétion du gène ADE2.

Nous avons réalisé plusieurs essais de disruption avec des concentrations croissance d'adénine. Pour obtenir des taux de transformation supérieur à 103 transformants par µg
30 d'ADN, il est nécessaire d'avoir une concentration supérieure à 400 mg/L d'adénine dans les milieux. La concentration utilisée pour la complémententation est de 800 mg/L. Ce n'est qu'avec ces conditions que nous avons obtenu des transformants présentant

une disruption du gène ADE2. Contrairement à *S. cerevisiae*, les souches Ade- ne présentent pas de couleur rose. Par contre, les clones Ade- de *Y. lipolytica* présentent une couleur marron après plusieurs jours sur boîte et un surnageant marron en milieu liquide. Phénotype utilisable pour identifier les transformants ou l'intégration de la cassette d'expression s'est bien intégrée au locus ADE2.

Vérification de la séquence du locus ade2-844. La séquence du locus ade2-844 a été amplifiée avec les primers verlade2 et ver2ade2 (Tableau 9). Le produit de PCR de taille de 2204 pb a été séquencé. La séquence obtenue montre l'absence de la séquence de marqueur URA3. De plus, cette vérification montre l'absence de l'intégration des sites NotI en 5' et 3' de la cassette de disruption PUexT. Après excision, il reste sur le génome les séquences suivantes entre P et T du locus ade2 :
TAGGGATAACAGGGTAATTATCGCTTCGGATAACTCCTGCTATACGAAGTTA
TG TAGGGATAACAGGGTAATTA ACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA (SEQ
ID NO :12) soit les sites suivants I-SceI – LoxR – I-SceI – I-CeuI .

15 2.2 Construction du marqueur ADE2ex

Pour la construction du marqueur ADE2ex, la séquence génomique du locus ADE2 a été amplifiée en utilisant les primers ADE2S et ADE2R et cloné dans le vecteur pKS-LPR (Fickers et al., 2003, Journal of Microbiological Methods, vol. 55, p : 727-737) au site EcoRI. Il contient 500 bp de promoteur, l'ORF du gène ADE2 (Yali0B23188g) et
20 125 bp du terminateur et qui correspond à la séquence Yali0B:3029961..3032280 soit 2319 pb. Le site EcoRI présent dans l'ORF du gène ADE2 a été éliminé en modifiant la gaatTc en gaatCc par mutagenèse dirigée avec les primers ADE2ES et ADE2ER (Tableau 9). Cette base modifiée crée une mutation silencieuse ATT en ATC.

Le marqueur peut être inséré dans les deux sens. Le marqueur ADE2ex dans le sens 1
25 correspond à JME798 et dans le sens 2 à JME799.

2.3 Transformation avec le marqueur ADE2ex

Pour tester l'utilisation du marqueur ADE2ex, le marqueur ADE2ex a été isolé du plasmide JME798 (pKS-LPR-ADE2) par digestion I-SceI et inséré au site I-SceI du plasmide JMP62 I-SceI (JME793) pour obtenir le plasmide JMP62 ADE2ex (JME862).
30 Le plasmide JME862 a été digéré par NotI et utilisé pour transformer la souche FF-lua par la méthode au lithium acétate. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu YNBcasa supplémenté avec de l'uracile (100 mg/L) et de l'adénine. Dans la

bibliographie, il est couramment décrit chez des mutants Ade- de différentes espèces de levures les milieux sélectifs sont supplémentés par de l'adénine a une concentration de 100 a 200 mg/L. Dans notre cas pour les mutants Ade- précités, la concentration nécessaire pour une croissance correcte des transformants est de 800 mg/L. Dans ces conditions, nous obtenons des taux de transformations similaires aux taux de transformation obtenu avec le marqueur URA3.

3. Délétion du gène LEU2 (marquer Δ leu2-958), obtention des souches mutantes FF2-lu, FF-2lug, FF2-lua et FF2-luag et construction du marqueur LEU2 Δ BamHI.

3.1 Délétion du gène LEU2 (Δ leu2-958)

10 Pour obtenir ces souches, on peut procéder comme suit : a partir du mutant FF-lu, on a construit la souche FF2-lu Leu-, Ura-. D'une manière similaire on peut construire des souches dérivée de FF-lua, FF-lug, FF-luag présentant la délétion Δ leu2-958. A partir du mutant FF-lug, on peut construire la souche FF2-lug Leu-, Ura-, gly-, a partir du mutant FF-lua, on peut construire la souche FF2-lua Leu-, Ura-, ade- et a partir du mutant FF-luag, on peut construire la souche FF2-luag Leu-, Ura-, ade-, gly-.

Par exemple, a partir du mutant FF-lu on a construit la souche *Y. lipolytica* mutante correspondante présentant une délétion du gène LEU2 plus importante que pour le marqueur génétique leu2-270. La première étape est la construction de la souche FF2-lu ::URA3 prototrophe pour l'uracile (Leu-, Ura+) par délétion du gène leu2-270 par la cassette de disruption leu2 ::URA3ex en transformant la cassette NotI issue du plasmide pPTLeu2-Ura3Ex (JME958) contenant ce marqueur et en sélectionnant les Ura+ sur YNBcasa. On sélectionne les auxotrophes pour l'uracile (Leu+, Ura-) par excision du marqueur URA3ex en transformant avec le vecteur réplcatif pRRQ2 contenant la recombinaise Cre et le marqueur LEU2 (Cre-LEU2) et en sélectionnant les transformants auxotrophes pour l'uracile, Leu+. La perte du plasmide pRRQ2 est réalisée par une culture sur milieu riche YPD et par l'isolement d'un clone (Leu-, Ura-). La même méthode peut être utilisée pour obtenir les mutants FF2-lua, FF2-lug et FF2-luga.

La représentation schématique de la construction du mutant FF2-lu est résumée dans le Tableau 4 ci-dessous.

30 Tableau 4 : Étapes de transformation requises pour la production du mutant FF2-lu

Étape	Opérations de transformation		
	Mutant à transformer	Cassette de transformation	Mutant transformé
a1	FF-lu, Leu-, Ura- JMY195, Po1d	PTLeu2-Ura3Ex	FF-lu+, leu-, Ura+ leu2-PUexT
a2	FF-lu+, Leu-, Ura+, leu2- URA3	Vecteur pRRQ2, sélection Leu+, vérification Ura-, perte du plasmide pRRQ2 sur YPD, isolement de Leu-	JMY1516, Leu-, Ura-, leu2-958 FF2-lu

La cassette de disruption pour le gène LEU2 a été construite par amplification de la région amont (région P ; Yali0C44989..Yali0C46081, 1092 pb) et de la région aval (région T ; Yali0C47036..Yali0C47932, 897 pb) ce qui permet la délétion de l'ORF du gène LEU2 (Yali0C46082..Yali0C47035, 954 pb) et qui ne laisse plus qu'une très faible

5 homologie avec le marqueur de sélection LEU2ex (0 bp avec la région P et 207 bp dans la région T) afin de minimiser les conversions géniques. Alors que le marqueur de sélection Leu2Ex présentait une forte homologie avec le marqueur génétique leu2-270 (401 bp avec la région P et 710 bp dans la région T) car celui ci correspond à une simple

10 délétion StuI de 681 bp du gène LEU2. Les marqueurs de sélection ex sont présentés dans le Tableau 11.

Les régions P et T ont été amplifiées avec les primers P1Leu2, P2Leu2, T1Leu2 et T2Leu2 (Tableau 9).

Les primers P2 et T1 contiennent le site rare I-SceI pour l'insertion du marqueur de sélection excisable Ura3ex. Le primer T1 contient aussi le site rare I-CeuI pour

15 l'insertion de la cassette d'expression. Les primers P1 et T2 contiennent le site rare NotI pour le clonage dans pHSS6-NotI (JME800). Le fragment PT a été cloné dans le JME800 digéré par NotI et déphosphorylé pour donner le plasmide pLeu2-PT dans l'orientation 1 (sens 1, JME811) ou dans l'orientation 2 (sens 2, JME812). Le Sens est défini suivant l'orientation du site I-SceI : soit le sens 1 avec le site I-SceI en sens, soit

20 le sens 2 avec le site I-SceI en complémentaire. Le plasmide de disruption pPTLeu2-Ura3Ex (JME958) a été obtenu par insertion du marqueur Ura3ex au site I-SceI du plasmide JME811.

La cassette de disruption a été obtenue par digestion NotI et purification de la bande de 3351 pb. Les souches ont été transformées par la méthode à l'acétate de lithium. Les transformants Ura⁺ ont été sélectionnés sur milieu YNB_{casa}.

3.2 Construction du marqueur LEU2n (LEU2exΔBamHI)

5 Pour la construction des cassettes d'expression et des cassettes d'intégration, les marqueurs de sélection ne doivent pas contenir les sites uniques utilisés pour le clonage des gènes d'intérêts (BamHI, HindIII, KpnI et AvrII). Pour la construction du marqueur LEU2n (LEU2exΔBamHI), les primers Leu2-L1 et Leu2-L2 ont été utilisés pour créer un linker apportant la modification ggaatT en ggaatC et possédant le site
10 ApaI (Tableau 9). Le plasmide pKS-LPR-Leu2 (JME509) a été digéré d'une part par ApaI et ScaI et d'autre part par BamHI et ScaI. Les Bandes ApaI-ScaI de 1471 pb et BamHI-ScaI de 3300 pb ont été purifiées sur gel d'agarose. Une ligation 3 voies a été effectuée avec ces 2 bandes plus le linker Leu2L1/Leu2L2. Nous avons obtenu un plasmide contenant le nouveau marqueur LEU2n modifié LEU2exΔBamHI (JME790).

15 4. Développement du système d'intégration monocopie aléatoire avec différents marqueurs excisables

La construction a été réalisée à partir des différents marqueurs excisables existants et des marqueurs obtenus dans la présente invention (Tableau 11).

Dans un premier temps, nous avons construit les 2 vecteurs de base nommés I-SceI
20 soient JMP61 I-SceI et le JMP62 I-SceI. À partir des vecteurs JMP61 leu2Ex et JMP62 leu2Ex contenant le marqueur excisable LEU2, nous avons effectué une PCR de la totalité du plasmide avec un couple de primers : 62claS et 62claR (Tableau 9).

Nous avons utilisé le kit « QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit » de Stratagene qui permet d'effectuer des mutations dirigées. Le principe, basé sur l'amplification par
25 PCR, utilise des amorces construites spécifiquement pour forcer la mutation du produit PCR. Habituellement utilisé pour de courtes insertions/délétions ou des mutations ponctuelles, nous avons utilisé ce principe afin d'éliminer le marqueur Leu2Ex par recircularisation du plasmide au site I-SceI. Ces 2 primers ont été construits aussi pour éliminer les sites BamHI et AvrII contenu dans le plasmide JMP61 Leu2Ex en amont du
30 site I-SceI et de restaurer le site ClaI de façon à permettre l'échange du promoteur par ce site unique. Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction DpnI qui permet d'éliminer le brin parentale. Ce dernier, provenant d'une souche d'*E.*

coli dam⁺ est méthylé et, contrairement au brin nouvellement formé, il sera reconnu et digéré spécifiquement par l'enzyme DpnI. Après transformation et criblage, nous avons obtenu les vecteurs JMP61 I-SceI et JMP62 I-SceI (Tableau 12).

Les autres constructions (Tableau 12) ont été réalisées à partir de ces 2 plasmides. Les ligations ont été effectuées avec les plasmides digérés par I-SceI et déphosphorylé et les bandes purifiées I-SceI des différents marqueurs excisables à partir des plasmides pKS-LPR correspondants (Tableau 11). Pour le marqueur excisable Leu2, nous avons utilisé le plasmide JME790 contenant le marqueur LEU2n (Leu2ΔBamHI).

Tableau 5 : Souches obtenus :

10

Souche	N° collection	Génotype
FF-lu	JMY195, Po1d	xpr2-322, leu2-270, ura3-302
FF2-lu		xpr2-322, leu2-958, ura3-302
	JMY1202	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-PUexT
FF-lug	JMY1346	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-744
	JMY1407	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, ade2-PUexT
FF-lua	JMY1409	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, ade2-844
	JMY1396	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-744, ade2-PUexT
FF-luga	JMY1404	xpr2-322, leu2-270, ura3-302, gut2-744, ade2-844
5LAsp1	1 copie	ade2 :: GUT2-Asp
6LAsp1	1 copie	ade2 :: GUT2-Asp
14LAsp2	2 copies	ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp
15LAsp2	2 copies	ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp
16LAsp2	2 copies	ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp
17LAsp2	2 copies	ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp
21LAsp2	2 copies	ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp

1LAsp3	3 copies	ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp leu2 ::ADE2-Asp
2LAsp4	4 copies	ade2 :: GUT2-Asp lip2 ::URA3-Asp leu2 ::ADE2-Asp ura3 ::LEU2-Asp

5. Construction des vecteurs de base, de clonage et d'expression.

5.1 Vecteurs de base et de clonage.

La construction du vecteur de base a été réalisée à partir du vecteur JMP62 en conservant que la partie navette *E. coli* provenant du plasmide pHSS6. Après digestion

5 par NotI du vecteur JMP62, la bande de 2210 pb contenant l'origine de réplication pour *E. coli* et la résistance à la Kanamycine a été isolée et purifiée puis reliquée pour former ainsi le vecteur de base nommé pHSS6-NotI (JME800).

A partir du vecteur de base, nous avons construit le vecteur de clonage (Figure 2) par

10 ligation de 2 linkers et d'un fragment de PCR contenant les séquences de terminaisons de la lipase LIP2 de *Y. lipolytica* contenu dans le vecteur JMP62. Les linkers ont été fait par synthèse de couple de primer phosphorylé en 5' soit le linker 1 avec les primers link1 et link11 et le linker 2 avec les primers link2 et link22 (Tableau 10). Ces linkers créent un multisite de clonage contenant respectivement les sites ClaI et BamHI pour

15 l'insertion d'un promoteur, les sites BamHI/HindIII et SacII/KpnI/AvrII pour l'insertion du gène d'intérêt. Nous avons aussi introduit une séquence « consensus » en -4 et -1 de l'ATG : C⁻⁴ A C A⁻¹. Cette séquence est présente pour les gènes de *Y. lipolytica* qui codent pour des protéines fortement exprimées. Ainsi, pour une expression avec cette séquence le clonage du gène d'intérêt s'effectue par HindIII et sans cette séquence par

20 BamHI en 5'. Le fragment de PCR (840 pb) contenant les séquences de terminaisons de LIP2 a été obtenu avec les primers POX2Xho et Lip2Thc. Ce fragment a été digéré par AvrII et NotI pour obtenir le fragment de 179 pb ne contenant que les séquences de terminaisons de LIP2. Nous avons ajouté un site unique HincII de façon à permettre l'échange de ces séquences de terminaison par AvrII et HincII. Nous avons introduit 2

25 sites rares de l'enzyme de restriction I-CeuI de part et d'autre du multisite et des séquences de terminaison. Ce double site I-CeuI permet d'isoler et de purifier la cassette d'expression pour un clonage dans des vecteurs d'intégration.

Une ligation 3 voies a été réalisée avec les 2 linkers, la bande de 179 pb AvrII/NotI et le vecteur de base pHSS6 NotI déphosphorylé pour obtenir le vecteur de clonage nommé pVC (JME829).

5.2 Vecteur d'expression

- 5 La construction du vecteur d'expression a été réalisée à partir du vecteur de clonage pVC digéré par ClaI et BamHI. Le promoteur pPOX2 réduit (1017 pb) a été isolé et purifié après digestion par ClaI et BamHI du vecteur JMP62 (Tableau 12). Une ligation du pVC et du promoteur pPOX2 a été réalisée pour obtenir le vecteur d'expression nommé pVC-pPOX2 (JME830), Tableau 6.
- 10 **Tableau 6 : Vecteurs utilisés pour la construction du vecteur d'expression.**

Descriptifs	Nom du vecteur	N° collection
Vecteur de base	pHSS6-NotI	JME800
Vecteur de clonage	pVC	JME829
Vecteur d'expression	pVC-pPOX2	JME830

6. Choix des loci d'insertion et principe de construction des vecteurs d'intégrations. Nous avons choisi les différents loci suivants:

15 6.1 Locus Leu2-270

Ce locus a souvent été utilisé comme cible d'intégration homologue par simple « crossing over » (eg. Bordes et al, 2007), mais avec ce marqueur génomique on obtient un taux élevé de conversion (elle correspond à une petite délétion StuI de 681 pb qui laisse une région 5' de 401 pb (Yali0C:46411..46537) et une région 3' de 710 pb (Yali0C:46528..46948) qui permet une double recombinaison avec le marqueur de sélection LEU2 utilisé dans nos vecteurs. Ainsi, un fort taux de conversion est généralement observé lors des transformations de cassette d'expression contenant ce marqueur. Pour diminuer le taux de conversion, nous avons choisi d'insérer dans une première étape une cassette d'expression au locus leu2-270, afin d'éliminer ces régions d'homologie en 5' et 3'. Ainsi, lors d'une insertion d'une nouvelle cassette d'expression contenant le marqueur LEU2 à un autre locus, le taux de conversion est fortement diminué. Alternativement on peut construire une souche avec le marqueur leu2-958 comme décrit dans le chapitre 3.

6.2 Locus Ura3-320

La délétion a été réalisée par double crossing-over ne laissant que 21 pb en position 5' (Yali0E:3171873..3171893) et 108 pb en position 3' (Yali0E:3175134..3175241). Le fragment délété (695 pb) a été remplacé par la cassette d'expression suivante :

5 promoteur du gène XPR2 et le gène SUC2 codant pour l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* en sens inverse (3240 pb, Yali0E:3171894..3175133). L'intégration à ce locus Ura3-320 permet d'éliminer le gène SUC2 provenant de *S. cerevisiae* dans la souche de production et d'effectuer un criblage simple et rapide des transformants Suc- (absence de croissance sur milieu ne contenant que du saccharose comme seule source

10 de carbone) comme décrit dans la Figure 6.

6.3 Locus Lip2

Le gène LIP2 code pour la lipase Lip2p de *Y. lipolytica*. Son expression est induite en présence acide gras et de triglycérides (Pignede et al., 2000). Dans la présente invention, l'expression des protéines d'intérêt est placée sous le promoteur fort et inductible

15 pPOX2. Ce promoteur est aussi inductible par les acides gras comme l'acide oléique. L'intégration au locus LIP2 permet d'invalider le gène LIP2 et d'obtenir l'absence d'expression de la lipase Lip2p dans les surnageants de culture lors de la production. De plus, ceci permet d'effectuer un criblage simple et rapide des transformants Lip2- (absence de dégradation d'une émulsion de tributyrine visible sur milieu gélosé ou

20 absence d'activité lipase dans le surnageant de culture comme décrit dans la Figure 7).

6.4 Locus Ade2

Dans la présente invention, de nouvelles souches Ade- ont été construites, ainsi que le marqueur de sélection Ade2ex. Pour la disruption du gène ADE2 les séquences P et T ont été amplifiées. Ces mêmes séquences ont donc été utilisées dans les vecteurs

25 d'intégration. Ainsi, aucune construction supplémentaire n'a été nécessaire pour ce locus.

Si la souche réceptrice utilisée est FF-lug, l'insertion au locus ADE2 rend la souche Ade-, ce qui crée une nouvelle auxotrophie, qui peut être utilisée pour introduire une copie supplémentaire du gène d'intérêt. Cette disruption est aussi associée à un

30 phénotype rapidement identifiable (coloration marron des colonies disruptées sur milieu riche en boîte de pétrie, coloration marron du milieu de culture).

Cette liste ou ces combinaisons de Locus / Marqueur n'est pas exhaustive. Toutes autres combinaisons sont possible, de préférence avec un locus dont la disruption crée un phénotype rapidement visualisable qui permet un crible rapide des transformant ayant intégrés correctement la cassette d'expression au locus. On peut choisir d'autre locus et
 5 d'autres marqueurs ou de réaliser d'autres combinaisons.

6.5 Principe de construction des vecteurs d'intégration

Le principe de la construction des vecteurs d'intégration est décrit dans la Figure 3. Les différentes cassettes d'intégration à des loci définis ont été construites par une méthodologie identique. A partir de l'ADNg de la souche E150, nous avons amplifié la
 10 partie promotrice nommée P et la partie terminatrice nommée T du gène à disrupter. Les fragments P et T doivent, de préférence, avoir une taille comprise entre 800 et 1000 pb pour obtenir une double recombinaison homologue efficace chez *Y. lipolytica*. Les primers utilisés sont nommée P1/P2 pour le fragment P et T1/T2 pour le fragment T suivi du nom du locus (Tableau 9). Les primers P1 et T2 contiennent un site rare 1, ici
 15 le site NotI, pour permettre le clonage dans le vecteur de base pHSS6-NotI et aussi pour libérer la cassette d'expression. Les primers P2 et T1 contiennent deux autres sites rares, les sites rare 2 et rare 3, ici les sites I-SceI et I-CeuI, respectivement, qui permet la fusion par PCR des 2 fragments et le clonage ultérieur du marqueur de sélection au site rare 2, ici le site I-SceI et de la cassette d'expression au site rare 3, ici le site I-CeuI. La
 20 fusion par PCR est donc réalisée à partir d'un mélange des 2 fragments P et T purifié et du couple de primers P1/T2. Le fragment PT obtenu est digéré par NotI puis est ensuite cloné par ligature dans le vecteur pHSS6 digéré par NotI et déphosphorylé. Les vecteurs d'intégration sont nommés pPT suivi du nom du locus (Tableau 7).

Description des fragments P et T des différents loci :

25 Locus Leu2-270 : Les régions amplifiées pour la double recombinaison homologue sont pour la région P de 1092 pb (Yali0C:44989..46081) et pour la région T de 897 pb (Yali0C:47036..47932). La région qui sera éliminée est de 954 pb (Yali0C:46082..47035). Cette région élimine la totalité de la région 5' du marqueur Leu2 (401pb) et une partie de la région 3' (503pb). Il reste une homologie de 207 pb de
 30 la région 3' du marqueur Leu2.

Locus Ura3-302 : Les régions amplifiées pour la double recombinaison homologue sont pour la région P de 1197 pb (Yali0E:3170698..3171894) et pour la région T de 1013 pb

(Yali0E:3175412..3176424). La région qui sera éliminée est de 3516 pb (Yali0E:3171895..3175411). Cette région élimine la totalité de la cassette d'expression pXPR2+SUC2 et la région 3' du marqueur Ura3 (280 pb). Il reste une homologie de 200 pb de la région 5' du marqueur Ura3.

- 5 Locus Lip2 : Les régions amplifiées pour la double recombinaison homologue sont pour la région P de 1123 pb (Yali0A:2185897..2187019) et pour la région T de 961 pb (Yali0A:2187883..2188843). La région qui sera éliminée est de 863 pb (Yali0C:2187020..2187882). Cette région élimine presque l'intégralité du gène LIP2. Il reste une homologie de la région 3' de 148 pb du gène LIP2.
- 10 Locus Ade2 : Les régions amplifiées pour la double recombinaison homologue sont pour la région P de 920 pb (Yali0B:3029011..3029931) et pour la région T de 792 pb (Yali0B:3031871..3032662). La région qui sera éliminée est de 1939 pb (Yali0B:3029932..3031870) qui ne laisse qu'une très faible homologie avec le marqueur de sélection ADE2ex (0 bp avec la région P et 415 bp dans la région T) afin
- 15 de minimiser les conversions géniques.

Pour chaque locus, les régions P et T ont été amplifiées à l'aide de couple de primers nommé P1/P2 et T1/T2 suivi du nom du locus (Tableau 9). Puis la fusion PT a été réalisée avec le couple P1/T2.

- A partir de ces vecteurs pPT, différents marqueurs excisables ont été introduits par
- 20 clonage au site I-SceI. Ce site permet un clonage orienté du marqueur. Nous avons choisis d'orienter le marqueur en sens inverse de la cassette d'expression. Les vecteurs d'intégration obtenus sont nommés pPT suivi du nom du locus suivi du nom du marqueur excisable inséré (Tableau 7).

- Les combinaisons Locus / Marqueur ne sont données qu'à titre d'exemples, différentes
- 25 combinaisons sont possibles.

Tableau 7 : liste des vecteurs d'intégration

<i>Locus</i>	Nom du vecteur	Orientation I-SceI	N° collection	Marqueur	Nom du vecteur	N° collection
LIP2	pPTLip2	Sens 1	JME806	URA3ex	pPTLip2-Ura3ex	JME815
				GUT2-0.5ex	pPTLip2-Gut2-0.5ex	JME816
		Sens 2	JME807			

URA3	pPTUra3	Sens 1	JME809	LEU2nex	pPTUra3-Leu2nex	JME817
		Sens 2	JME810			
LEU2	pPTLeu2	Sens 1	JME811	ADE2ex	pPTLeu2-Ade2ex	JME818
				URA3ex	pPTLeu2-Ura3ex	JME958
		Sens 2	JME812			
ADE2	pPTAde2	Sens 1	JME813	GUT2-0.5ex	pPTAde2-Gut2-0.5ex	JME819
				URA3ex	pPTAde2-Ura3ex	JME844
		Sens 2	JME814			

7. Principe de construction des vecteurs d'intégrations pour l'expression de protéine d'intérêt.

Le clonage d'un gène d'intérêt est réalisé seulement en 2 étapes de clonage. La première
5 étape est un sous clonage dans le vecteur d'expression pVC pour obtenir le vecteur pVC-gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur POX2 (d'autre promoteur fort peuvent être utilisé constitutif comme par exemple le promoteur hp4d ou des promoteurs inductible). Ce vecteur pVC-gène d'intérêt est digéré par I-CeuI pour isoler et purifier la cassette d'expression. La deuxième étape est le clonage de cette cassette
10 d'expression I-CeuI dans les vecteurs d'intégrations. La cassette d'intégration/cassette d'expression est isolée et purifiée après digestion par NotI avant transformation dans *Y. lipolytica* (Figure 3).

Exemple 2 : Construction et mise en œuvre de cassette intégration/expression pour
15 l'insertion ciblée d'un gène codant pour une protéine d'intérêt thérapeutique non produite par *Y. lipolytica*.

Nous avons pris comme exemple la protéine L-asparaginase d'*Erwinia chrysanthemi*.
On introduit le gène codant pour cette protéine dans le vecteur pVC-pPOX2 au site HindIII/AvrII. Pour ce faire, une fusion par PCR est réalisée entre la séquence
20 preproLIP2 et la partie de la séquence du gène codant pour la forme mature de la protéine L-asparaginase. Les PCR sont réalisés avec les primers preproLip2 et Lip2KR pour amplifier la séquence pre-pro-LIP2 et avec les primers Laspsens et Lasprev pour amplifier la séquence codante pour la protéine mature. Puis en mélangeant les 2 produits de PCR obtenus, on réalise la fusion avec les primers preproLip2 et Lasprev.

Le primer preproLip2 contient le site HindIII et le primer Lasprev le site AvrII pour le clonage du produit de la fusion dans le pCV-pPOX2. On obtient alors le vecteur pVC-pPOX2-preproLip2-LAsp (JME898) contenant la cassette d'expression de la protéine L asparaginase (Tableau 8).

- 5 A partir de ce vecteur, la cassette d'expression est extraite grâce à une digestion par l'enzyme de restriction I-CeuI et purifiée. Cette cassette est ensuite clonée dans les différents vecteurs d'intégration au site I-CeuI. Les différents vecteurs d'intégration/expression obtenus sont décrits dans le Tableau 8.

10 Tableau 8 : Vecteur d'intégration/expression obtenus :

Descriptifs	Nom du vecteur	N° collection
Vecteur d'expression	pVC-pPOX2-LAsp	JME898
Vecteur Int. locus Ura3	pPTUra3-Leu2nEx-LAsp	JME923
Vecteur Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-0.5Ex-LAsp	JME924
Vecteur Int. locus Ade2	pPTAde2-Ura3Ex-LAsp	JME925
Vecteur Int. locus Leu2	pPTLeu2-Ade2Ex-LAsp	JME926
Vecteur Int. locus Lip2	pPTLip2-Ura3Ex-LAsp	JME927
Vecteur Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-1.0Ex(s1)-LAsp	JME941
Vecteur Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-1.0Ex(s2)-LAsp	JME942
Vecteur Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-1.5Ex(s1)-LAsp	JME943
Vecteur Int. locus Ade2	pPTAde2-Gut2-1.5Ex(s2)-LAsp	JME944

Les cassettes d'intégration/expression sont obtenues par digestion de l'enzyme de restriction NotI des différents vecteurs d'intégration/expression. Ces cassettes sont ensuite extraites et purifiées afin d'éliminer les séquences d'ADN exogène *E coli*.

- 15 **Exemple 3** : Transformation des cassettes intégration/expression de la protéine L-asparaginase chez *Y. lipolytica*.

On peut introduire successivement par exemple 4 copies de la cassette d'expression de la L-asparaginase dans les 4 loci précités dans la souche FF-luga.

1 Insertion de la première copie au locus ADE2.

La première cassette d'expression a été introduite par transformation de la souche FF-luga au locus ADE2 en utilisant la cassette d'intégration/expression PTAd2-Gut2-1.0Ex-LAsp issue du vecteur JME941. La sélection des transformant est réalisée sur milieu sélectif YNBcasa supplémenté d'uracile et d'adénine et contenant comme seule
 5 source de carbone 1% de glycérol. Les transformants obtenus sont isolés sur ce même milieu sélectif et l'intégration au locus est vérifiée par PCR en utilisant les primers Ver1ade2 et Ver2ade2 se trouvant en amont et en aval des séquences d'intégration.

Le taux de transformation obtenu est de $8,2 \cdot 10^3$ transformants par μg d'ADN transformé. La vérification par PCR de l'intégration au locus Ade2 a montré que 100%
 10 des transformants ont intégré la cassette d'expression LAsp à ce locus.

Nous avons conservé 2 transformants nommés 5LAsp1 et 6LAsp1 (Tableau 5). Les premiers chiffres au début du nom donnent le numéro du transformant et le deuxième chiffre à la fin du nom donne le nombre de copie de la cassette d'expression LAsp.

2 Insertion de la Deuxième copie au locus LIP2.

15 La deuxième cassette d'expression a été introduite par transformation du transformant 5LAsp1 au locus LIP2 en utilisant la cassette d'intégration/expression PTLip2-Ura3Ex-LAsp issue du vecteur JME927. La sélection des transformant est réalisée sur milieu sélectif YNBcasa supplémenté d'adénine et contenant comme seule source de carbone 1% de glucose. Les transformants obtenus sont isolés sur ce même milieu sélectif et
 20 l'intégration au locus est vérifiée par PCR en utilisant les primers Ver1lip2 et Ver2lip2 se trouvant en amont et en aval des séquences d'intégration.

Le taux de transformation obtenu est de $1,1 \cdot 10^4$ transformants par μg d'ADN transformé. La vérification par PCR de l'intégration au locus LIP2 a montré que 75% des transformants ont intégré la cassette d'expression LAsp à ce locus. Alternativement,
 25 la vérification de l'intégration de la cassette d'expression au locus LIP2 peut être réalisée par mesure de l'activité lipase comme démontrée dans la Figure 7

Nous avons conservé 5 transformants nommés 14LAsp2, 15LAsp2, 16LAsp2, 17LAsp2 et 21LAsp2 (Tableau 5).

3 Insertion de la troisième copie au locus LEU2.

30 La troisième cassette d'expression a été introduite par transformation du transformant 15LAsp2 au locus LEU2 en utilisant la cassette d'intégration/expression PTLeu2-Ade2Ex-LAsp issue du vecteur JME926. La sélection des transformants est réalisée sur

milieu sélectif YNBcasa contenant comme seule source de carbone 1% de glucose. Les transformants obtenus sont isolés sur ce même milieu sélectif et l'intégration au locus est vérifiée par PCR en utilisant les primers Ver1leu2 et Ver2leu2 se trouvant en amont et en aval des séquences d'intégration.

- 5 Le taux de transformation obtenu est de $1,6 \cdot 10^4$ transformants par μg d'ADN transformé. La vérification par PCR de l'intégration au locus LEU2 a montré que 20% des transformants ont intégré la cassette d'expression LAsp à ce locus.

Nous avons conservé 1 transformant nommé 1LAsp3 (Tableau 5).

4 Insertion de la quatrième copie au locus URA3.

- 10 La quatrième cassette d'expression a été introduite par transformation du transformant 1LAsp3 au locus URA3 en utilisant la cassette d'intégration/expression PTUra3-Leu2nEx-LAsp issue du vecteur JME923. La sélection des transformants est réalisée sur milieu sélectif YNB contenant comme seule source de carbone 1% de glucose. Les transformants obtenus sont isolés sur ce même milieu sélectif et l'intégration au locus
15 est vérifiée par PCR en utilisant les primers Ver1Ura3 et Ver2Ura3 se trouvant en amont et en aval des séquences d'intégration.

- Le taux de transformation obtenu est de $5,25 \cdot 10^3$ transformants par μg d'ADN transformé. La vérification par PCR de l'intégration au locus URA3 a montré que 87% des transformants ont intégré la cassette d'expression LAsp à ce locus, 87% des
20 transformants sont Ura- (figure 6).

Nous avons conservé 1 transformant nommé 2LAsp4 (Tableau 5).

Cette dernière souche contient bien au moins une copie supplémentaire (voir Figure 5 (gel électrophorèse) et Figure 8 quantification par RT-qPCR).

5 Variante du procédé d'insertion :

- 25 L'invention peut aussi être mise en œuvre selon les étapes suivantes : dans un 1er temps, les 4 (par exemple) transformations sont réalisées les unes après les autres. Dans un deuxième temps, on réalise le criblage des insertions à l'aide des différents marqueurs. D'où l'intérêt, si on ne met pas en œuvre le système Cre-lox, de détenir autant de système de criblage différents que de copies à intégrer.

- 30 **Exemple 4** : Analyse de l'expression de L-Asparaginase en fonction du nombre de copie intégré.

L'expression de L-Asparaginase a été analysée en production à partir des différents transformants obtenus contenant 1 à 4 copies. La production a été réalisée en fiole de 250 mL contenant 25 mL de milieu riche composé de Yeast Extract 1%, de Bacto^{MC} Tryptone 2%, Glucose 1%, tampon phosphate de sodium 50 mM pH6.8 et d'une émulsion acide oléique 2% (nommé Y1T2D1O2). L'acide oléique sert d'inducteur du promoteur pPOX2. L'expression est analysée par gel d'électrophorèse en condition dénaturante et réductrice à partir du surnageant des cultures. Le gel d'électrophorèse est révélé par coloration au bleu colloïdal et par western blot en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre L-Asparaginase. Les résultats de cette analyse sont présentés Figure 5.

Exemple 5 : Criblage sur boîte des transformants obtenus par insertion de la cassette intégration/expression au locus URA3.

Comme décrit précédemment, l'insertion au locus URA3 permet d'éliminer le gène hétérologue SUC2 codant pour invertase de *S. cerevisiae*. Les transformants ayant intégrés la cassette d'expression deviennent alors Suc2⁻. Ils ne sont plus capables de pousser sur saccharose comme seule source de carbone. Les transformants sont étalés en strie sur 2 milieux riches : YPD (glucose 1%) et YPS (saccharose 1%). Les résultats de cette analyse sont présentés Figure 6. Par ce criblage, nous confirmons les résultats obtenus par analyse par PCR avec les primers Ver1Ura3 et Ver2Ura3.

Exemple 6 : Criblage des transformants obtenus par insertion de la cassette intégration/expression au locus LIP2.

Comme décrit précédemment, l'insertion au locus LIP2 permet d'éliminer le gène LIP2 codant pour la lipase lip2p extracellulaire de *Y. lipolytica*. Les transformants ayant intégrés la cassette d'expression deviennent alors Lip2⁻. Lors d'une production en milieu contenant un inducteur comme l'acide oléique, les transformants ne secrètent plus la lipase dans le surnageant de culture. Le criblage est effectué par culture en milieu de production Y1T2D1O2 pendant 48 heures à 28°C et une agitation de 180 rpm. La présence de la lipase dans le surnageant est détectée par un test enzymatique en microplaque à partir de 20 µL de surnageant. Les résultats de cette analyse sont présentés Figure 7. Par ce criblage, nous confirmons les résultats obtenus par analyse par PCR avec les primers Ver1Lip2 et Ver2Lip2.

Exemple 7 : Analyse des transformants obtenus par RT-qPCR.

Le nombre de copies intégrées peut être analysées par une PCR quantitative en temps réel par amplification spécifique d'un amplicon (150 pb) du gène codant pour la L-Asparaginase. A partir d'ADNg des transformants obtenus, nous avons effectuée une RT-qPCR à l'aide des primers LAsp1 et LAsp2 spécifique du gène codant pour L-Asparaginase et des primers Act4 et Act5 spécifique du gène codant pour l'actine de *Y. lipolytica*. Cette RT-qPCR a été réalisée à l'aide du kit LightCycler Faststart DNA Master SyBR Green I (Roche). L'amplicon de l'actine permet d'être un gène dit de ménage dont l'expression est connue pour ne pas être modifiée entre les conditions testées et dans notre cas un gène présent en seule copie dans le génome. Ainsi, les résultats sont normalisés avec cet amplicon. Nous avons effectuée aussi une RT-qPCR à l'aide des primers Lip2-1 et Lip2-2 spécifique du gène codant pour la lipase Lip2p de *Y. lipolytica* pour vérifier l'absence du gène à partir de la deuxième cassette d'expression intégrée au locus LIP2. Les résultats de cette analyse sont présentés Figure 8.

Tableau 9 : Listes des primers utilisés pour les cassettes de disruption, les vérifications et la construction des nouveaux marqueurs.

	Primer	5'-3'	S/R	Sites
Leu2EX	LEU2-L1	GATCTGCTAGTGTATAAGACTCTATAAAAAGGGCC	S	ΔBamHI
	LEU2-L2	CTTTTATAGAGTCTTATACACTAGCA	R	ΔBamHI
Marqueur GUT2	PG3PTS	CCGGAATTCCTGACCAGTCTCACATCCGACC	S	EcoRI
	PG3PTR	CCGGAATTCTAAAGCAGATACTCAACAACTCAGCAATAGTC	R	EcoRI
	G3PB1S	GGAGCTACCGGCTCCGGTATCGC	S	ΔBamHI
	G3PB1R	GCGATACCGGAGCCGGTAGCTCC	R	ΔBamHI
	G3PB2S	CGGAAACGCTGGATCTTTCAACATCAAGGCC	S	ΔBamHI
	G3PB2R	GGCCTTGATGTTGAAAGATCCAGCGTTTCCG	R	ΔBamHI
	G3PES	GGAGCAGGAGTTCAACACCGGTGTCTG	S	ΔEcoRI
	G3PER	CGACACCGGTGTTGAACTCCTGCTCC	R	ΔEcoRI
ΔGUT2	G3PD-P1	GCAGATCCACTGTCAAGCCG	S	
	G3PD-P2	GCTAGGGATAAACAGGGTAATGCGGTAGGAAAGAGAAGTTCCGCG	R	I-SceI
	G3PD-T1	GCATTACCCTGTTATCCCTAGCCGGACTATTTCCCCGCAGC	S	I-SceI
	G3PD-T2	GCAGCCAGCAGCACGTAGTAG	R	
	G3PD-Ver1	GAATGACGGGGGCAACGCAG	S	
	G3PD-Ver2	CAGCAGCCACAAATAGCAGACTGCC	R	
pGUT2-1.0 et 1.5	P1KB	CCGGAATTCCTGACAAACGGATGATGCTGTCACATGACG	S	EcoRI
	P15KB	CCGGAATTCCTGTTGGCATGCACAGCTCCACTCAACG	S	EcoRI
	PNHE1	TCCCGCTAGCCGAGGTATGCAAGGACGAGTGC	R	NheI
Locus ADE2	P1ADE2	ATAAGAATGCGGCCGCGCGAGCTGAGAGCCGATACCAAGGGATGCGAG	S	NotI
	P2ADE2	CATTACCCTGTTATCCCTACAGACACAGGTCCCAGGCGTCGGTTCTCG	R	I-SceI
	T1ADE2	CTAGGGATAACAGGGTAATTAAGTATAACGGTCCTAAGGTAGCGACCTCG GAAACCACTCTGCCAGTCATCGGTGTC	S	I-SceI /I-CeuI
	T2ADE2	ATAGTTTAGCGGCCGCGGAAGCGTGTCAACGACATGTTCCCTCTTCATACC	R	NotI
	Ver1Ade2	CGACGATAGAGCAGGTCTCACTGTTGGGAATGCTG	S	
	Ver2Ade2	CTACACTGACGAAGTGGACATCCCGGCTTGGACTG	R	
Marqueur ADE2	ADE2S	CGCGAATTCGCCTGCTTGAAAGAAGTGAGTGGTATGCTCGG	S	EcoRI
	ADE2R	CGCGAATTCATTGCCACGACCTGTTAAAAGACAAGATGACC	R	EcoRI
	ADE2ES	GCTGGCCATCCGAATCCTGGCTGCTTACGACGCC	S	ΔEcoRI
	ADE2ER	GGCGTCGTAAGCAGCCAGGATTCGGATGGCCAGC	R	ΔEcoRI
Locus Lip2	P1Lip2	ATAAGAATGCGGCCGCGTGGTACGTTTCGTCGCATCGGACGAG	S	NotI
	P2Lip2	CATTACCCTGTTATCCCTAGAGAGCTGGTACTTGGGTATCAATTGAGG	R	I-SceI
	T1Lip2	CTAGGGATAACAGGGTAATTAAGTATAACGGTCCTAAGGTAGCGACCTGA TCCACCCTCCTCTCTCCAACG	S	I-SceI /I-CeuI
	T2Lip2	ATAGTTTAGCGGCCGCGTGGACACAAGGAAGTATGCGGTCGTCG	R	NotI
	Lip2Ver1	CTCTGTCAGTGTTTCGGATAAGTCCTTAGATCACC	S	
	Lip2Ver2	CCTCACTTCTGTCACAGATGATGCATTCAACAC	R	
Locus Leu2	P1Leu2	ATAAGAATGCGGCCGCGACACTACTCTGGCTACAGCTTGCGGTACTG	S	NotI
	P2Leu2	CATTACCCTGTTATCCCTAGCTCGAATAACATTACAGGCTTGGTG	R	I-SceI
	T1Leu2	CTAGGGATAACAGGGTAATTAAGTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGGTGT	S	I-SceI /I-

		GTTTGTAGTGGAGGACAGTGGTACG		CeuI
	T2Leu2	ATAGTTTAGCGGCCGCGTACTGAACCGACTTTGGTGCTTGCACTC	R	NotI
	Leu2Ver1	CTCCACGCTAATGCCCATCATACTCTGTTTGGC	S	
	Leu2Ver2	CCTGGCGTTACAAAGCCGAGGGAGACAGCCTTGAC	R	
Locus Ura3	P1Ura3	ATAAGAATGCGGCCGCGGTGACACTGCACTATTGGTTTGCTTCTGATG	S	NotI
	P2Ura3	CATTACCCTGTTATCCCTAGTCGAGCTTCGTAGGAGGGCATT TTGGTGG	R	I-SceI
	T1Ura3	CTAGGGATAACAGGGTAATTA ACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGATACGG AGATGCTGGGTACAAGTAGC	S	I-SceI /I- CeuI
	T2Ura3	ATAGTTTAGCGGCCGCCTATGCTACGAGCGTCGGATT CACCACAG	R	NotI
	Ura3Ver1	GGCACACTGCTCACTATCGCAGGCTGCAACAATG	S	
	Ura3Ver2	CCTGACTCGTCTCGATACTCAAGACCTCATTGACGC	R	

Tableau 10 : Liste des primers utilisés pour la construction du vecteur pVC et la PCR quantitative, RT-qPCR.

	Primer	5'-3'	S/R	Sites
Poly linker pVC	Link1	GGCCGCTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCG	S	
	Link11	CCGAATCGATTTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTAGC	R	
	Link2	AATCGATTTCGGATCCCACAATGAAGCTTCCCCGCGGTAC	S	
	Link22	CTAGGTACCGCGGGGAAGCTTCATTGTGGGAT	R	
	Lip2Thc	TATCAAATGCGGCCGCTTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGT TAACACGATTTCGATTTGTCTTAGAGGAACGC	R	NotI
	POX2Xho	GAGTAATGCTCGAGTATCGAAGTCTTGTACC	S	XhoI
JMP62 ISceI	62claS	GCGATATTACCCTGTTATCCCTAGAATCGATTCCCACAAGACGAACAAGT G	S	
	62claR	CACTTGTTTCGTCTTGTGGGAATCGATTCTAGGGATAACAGGGTAATATCGC	R	
Gene LAsp	preproLip2	CGCGGATCCCACAATGAAGCTTTCCACCATCCTTTTCACAGCCTGCGCTAC	S	BamHI HindIII
	Lip2KR	TCGCTTCTGGAGAACTGCGGCCTC	R	
	LAspsens	GAGGCCGCAGTTCTGCAGAAGCGAGCCGACAAGCTGCCCAACATTGTGAT TC	S	
	LAsprev	CCACCTAGGCTAGTAGGTGTGGAAGTACTCCTGGATG	R	AvrII
qPCR Lip2	LIP2-1	TACTCTTGGTCAGCCCAT	S	
	LIP2-2	AGAAGGGCACTTGAGGGA	R	
qPCR Act	Act4	TATTGCCGAGCGAATGC	S	
	Act5	CTTGGAGATCCACATCTGC	R	
qPCR LAsp	LAsp1	GCTGAACGACCGAATTGG	S	
	LAsp2	GTGGTGTGCAGCTTGTC	R	

Tableau 11 : Liste des marqueurs excisables construits.

Marqueur	Nom du vecteur	N° collection
ADE2	pKS-LPR-Ade2 (sens1)	JME798
	pKS-LPR-Ade2 (sens2)	JME799
GUT2-0.5	pKS-LPR-Gut2-0.5 (sens1)	JME792
GUT2-1.0	pKS-LPR- Gut2-1.0 (sens1)	JME919
	pKS-LPR- Gut2-1.0 (sens2)	JME920
GUT2-1.5	pKS-LPR-Gut2-1.5 (sens1)	JME921
	pKS-LPR- Gut2-1.5 (sens2)	JME922
LEU2	pKS-LPR-Leu2 (sens2)*	JME509
LEU2n	pKS-LPR-Leu2 Δ BamHI (sens2)	JME790
URA3	pKS-LPR-Ura3 (sens1)*	JME507
HYG	pKS-LPR-hph (sens2)*	JME508

* *Fickers et al., Journal of Microbiological Methods 55 (2003) 727-737*

Tableau 12 : Liste des vecteurs d'intégration aléatoire, séries JMP61 et JMP62.

Nom du vecteur	N° collection
JMP61 I-SceI	JME793
JMP61 Leu2nEx	JME794
JMP61 Ura3Ex	JME795
JMP61 HygEx	JME796
JMP61 Gut2-0.5Ex	JME797
JMP61 Ade2Ex	JME861
JMP62 I-SceI	JME801
JMP62 Leu2nEx	JME802
JMP62 Ura3Ex	JME803
JMP62 HygEx	JME804
JMP62 Gut2-0.5Ex	JME805
JMP62 Ade2Ex	JME862

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

**LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS
COMPREND PLUS D'UN TOME.**

CECI EST LE TOME __1__ DE __2__

NOTE: Pour les tomes additionels, veuillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

**THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE
THAN ONE VOLUME.**

THIS IS VOLUME __1__ OF __2__

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* comprenant les étapes de :
 - 5 a) mise en culture d'une souche de *Yarrowia* comprenant au moins trois délétions, lesdites délétions étant une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique *gut2-744* ou une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique *ade2-844*, le phénotype associé à chacune de ces délétions correspondant à une auxotrophie ou un caractère dominant pour ladite souche, indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes ;
 - 10 b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* possédant une auxotrophie et/ou un caractère dominant avec au moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite souche de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et/ou du phénotype dominant résultant de chacune desdites délétions, lesquels
 - 15 vecteurs recombinants comprennent chacun :
 - i) la séquence dudit gène d'intérêt,
 - ii) un marqueur de sélection, et
 - 20 iii) deux séquences d'ADN encadrant la séquence dudit gène d'intérêt et dudit marqueur de sélection, lesquelles deux séquences d'ADN sont homologues aux séquences correspondant aux extrémités du site d'intégration ciblée dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* de sorte de permettre l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant par recombinaison homologue ; et
 - 25 c) sélection sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants.
2. Procédé d'intégration ciblée selon la revendication 1, où lesdites délétions sont choisies parmi les délétions *ura3-302*, *leu2-270*, *gut2-744* et *ade2-844*.
3. Procédé d'intégration ciblée selon la revendication 1, où les gènes associés à un
 - 30 caractère dominant sont choisis parmi le gène de résistance à l'hygromycine HPH (HYG), et les gènes *MDR3*, *KanMX*, et *Tn5ble*.

4. Procédé d'intégration ciblée selon la revendication 3, où ledit gène associé à un caractère dominant est le gène HYG.
5. Procédé d'intégration ciblée selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, où à l'étape b), le site d'intégration ciblée dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* est
5 choisi parmi les gènes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP7, LIP8, AXP, GUT2 et XPR2.
6. Procédé d'intégration ciblée selon la revendication 5, où à l'étape b), le site d'intégration ciblée dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* est choisi parmi les gènes URA3, LEU2, ADE2, LIP2, LIP8 et AXP.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, où les étapes b) de
10 transformation de la souche de *Yarrowia* et c) de sélection sur milieu minimal sont effectuées séparément pour chacun desdits au moins trois vecteurs recombinants.
8. Procédé d'intégration ciblée selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, où à l'étape b), les transformations avec au moins les trois vecteurs recombinants sont réalisées de manière indépendante et successivement avec chacun des vecteurs
15 recombinants, ou simultanément avec l'ensemble desdits vecteurs recombinants, et où l'ensemble de ces transformations est suivie de l'étape c) de sélection sur un milieu minimal des levures ayant intégré l'ensemble desdits vecteurs recombinants.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, où ladite souche est une souche de *Yarrowia lipolytica*.
- 20 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, où ladite souche de *Yarrowia* comprend quatre gènes présentant indépendamment l'un de l'autre une délétion associée à un phénotype d'auxotrophie ou de caractère dominant.
11. Procédé d'intégration ciblée selon la revendication 10, où lesdits quatre gènes sont les gènes URA3, LEU2, GUT2 et ADE2.
- 25 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, où l'étape b) de transformation est effectuée avec trois à dix vecteurs recombinants.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, où le marqueur de sélection est encadré par des séquences permettant son excision après l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant.
14. Procédé de production d'un polypeptide codé par un gène d'intérêt, qui
5 comprend les étapes suivantes:
- i. intégration ciblée d'au moins trois copies dudit gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* selon le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ;
 - ii. culture de la souche de *Yarrowia* modifiée obtenue à l'étape i) dans un
10 milieu de culture liquide comprenant des sources assimilables de carbone, d'azote et de sels inorganiques de sorte de permettre la croissance de ladite souche transformée de *Yarrowia* ; et
 - iii. récupération dudit polypeptide d'intérêt exprimé à partir des cellules *Yarrowia* ou du milieu de culture obtenu à l'étape ii).
- 15 15. Procédé d'obtention d'une souche modifiée de *Yarrowia*, qui comprend une étape dans laquelle on transforme ladite souche de *Yarrowia* avec au moins trois vecteurs permettant d'aboutir à une souche de *Yarrowia* comprenant au moins trois délétions choisies parmi une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique gut2-744 ou une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique
20 ade2-844, où le phénotype associé à chacune de ces délétions correspond à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche, indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes.
16. Procédé selon la revendication 15, où ladite souche comprend en outre au moins un gène associé à un phénotype de caractère dominant choisi parmi le gène de résistance à
25 l'hygromycine HPH (HYG), et les gènes MDR3, KanMX, et Tn5ble.
17. Procédé d'intégration ciblée selon la revendication 16, où ledit gène associé à un caractère dominant est le gène HYG.
18. Souche de *Yarrowia* auxotrophe, laquelle souche comprend au moins trois délétions choisies parmi une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique
30 gut2-744 ou une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2 et la délétion spécifique

ade2-844, où le phénotype associé à chacune de ces délétions correspond à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour ladite souche, indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes.

19. Souche de *Yarrowia* selon la revendication 18, où ladite souche de *Yarrowia*
5 comprend la délétion spécifique gut2-744.

20. Souche de *Yarrowia* selon la revendication 18, où ladite souche de *Yarrowia* comprend les délétions ura3-302 et leu2-270, ainsi que gut2-744 ou ade2-844.

21. Souche de *Yarrowia* selon la revendication 18, qui est choisie dans le groupe consistant dans les souches de *Yarrowia lipolytica* déposées le 4 février 2008
10 conformément au traité de Budapest auprès de la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France sous les numéros CNCM I-3911 et CNCM I-3912.

22. Souche de *Yarrowia* selon la revendication 18, qui correspond à la souche de *Yarrowia lipolytica* déposée le 4 février 2008 conformément au traité de Budapest
15 auprès de la Collection nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), INSTITUT PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France sous le numéro CNCM I-3913.

23. Procédé d'intégration ciblée d'au moins trois copies d'un gène d'intérêt dans le génome d'une souche de *Yarrowia* comprenant les étapes de :

- 20 a) mise en culture d'une souche de *Yarrowia* comprenant au moins trois délétions choisies parmi une délétion dans URA3, une délétion dans LEU2, et la délétion gut2-744 ou la délétion ade2-844, au moins une des délétions étant gut2-744 et le phénotype associé à chacune de ces délétions correspond à une auxotrophie ou à un caractère dominant pour
25 ladite souche, indépendamment l'un de l'autre de ces au moins trois gènes ;
- b) transformation de ladite souche de *Yarrowia* possédant un caractère auxotrophe et/ou dominant avec au moins trois vecteurs recombinants qui comprennent des marqueurs de sélection permettant, pour ladite souche
30 de *Yarrowia*, la complémentation de l'auxotrophie et/ou du phénotype

dominant résultant de chacune desdites délétions, lesquels vecteurs recombinants comprenant chacun :

- 5 i) la séquence dudit gène d'intérêt,
- ii) un marqueur de sélection, et
- 10 iii) deux séquences d'ADN encadrant la séquence dudit gène d'intérêt et dudit marqueur de sélection, lesquelles deux séquences d'ADN sont homologues aux séquences correspondant aux extrémités du site d'intégration ciblée dans le génome de ladite souche de *Yarrowia* de sorte de permettre l'intégration ciblée dudit vecteur recombinant par recombinaison homologue ; et
- c) sélection sur un milieu minimal, des levures ayant intégré lesdits au moins trois vecteurs recombinants.

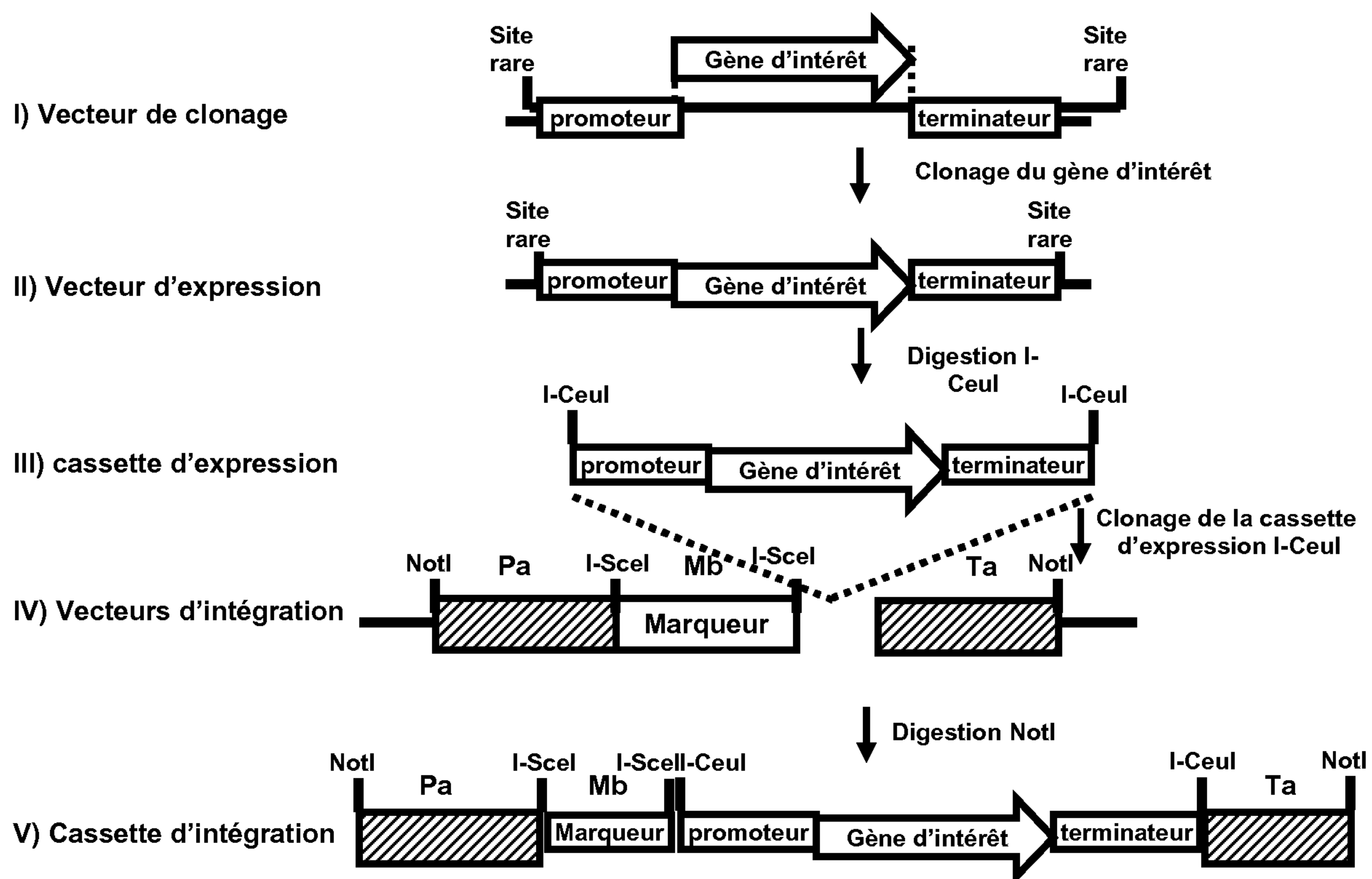


Figure 1

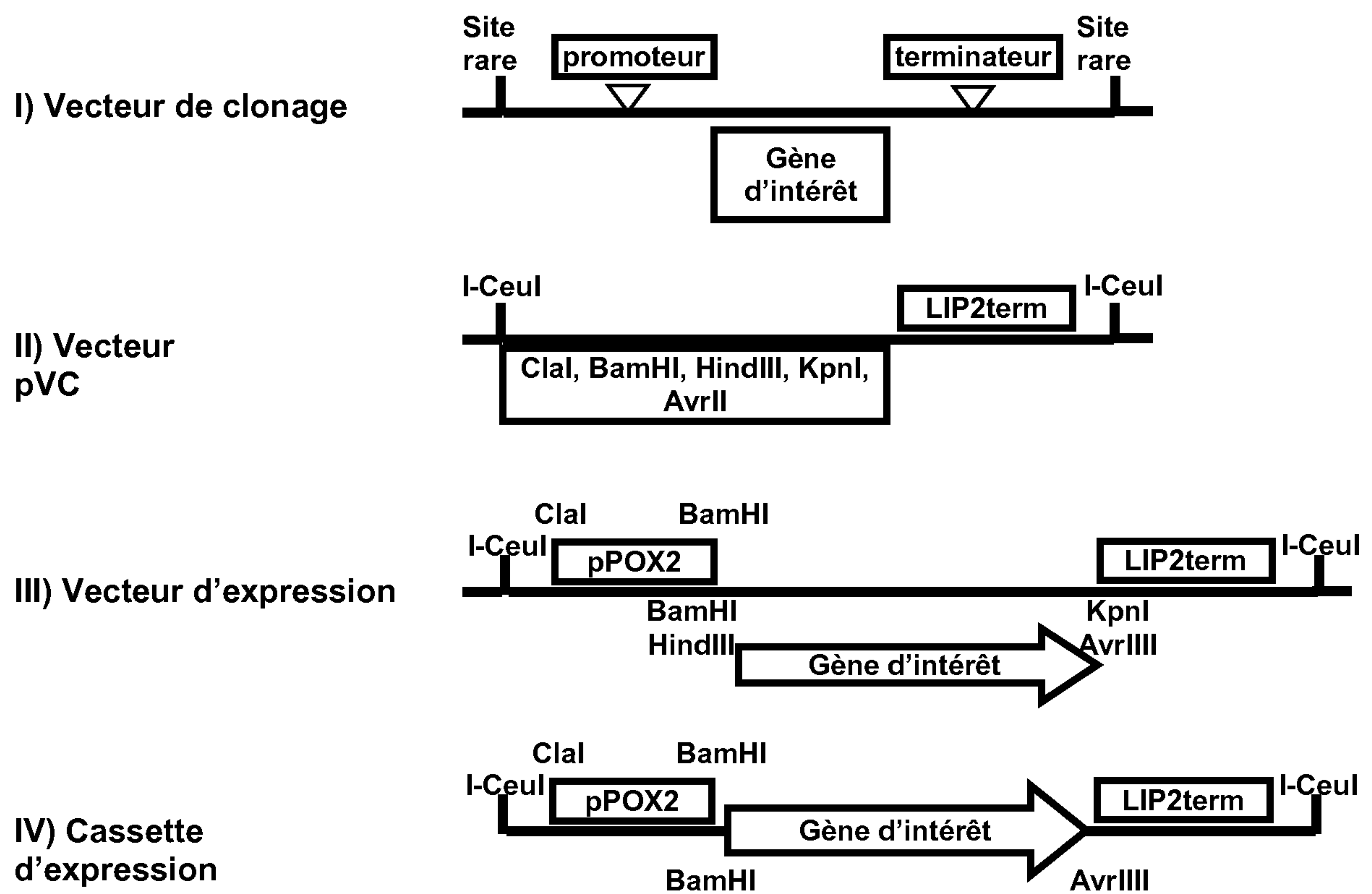


Figure 2

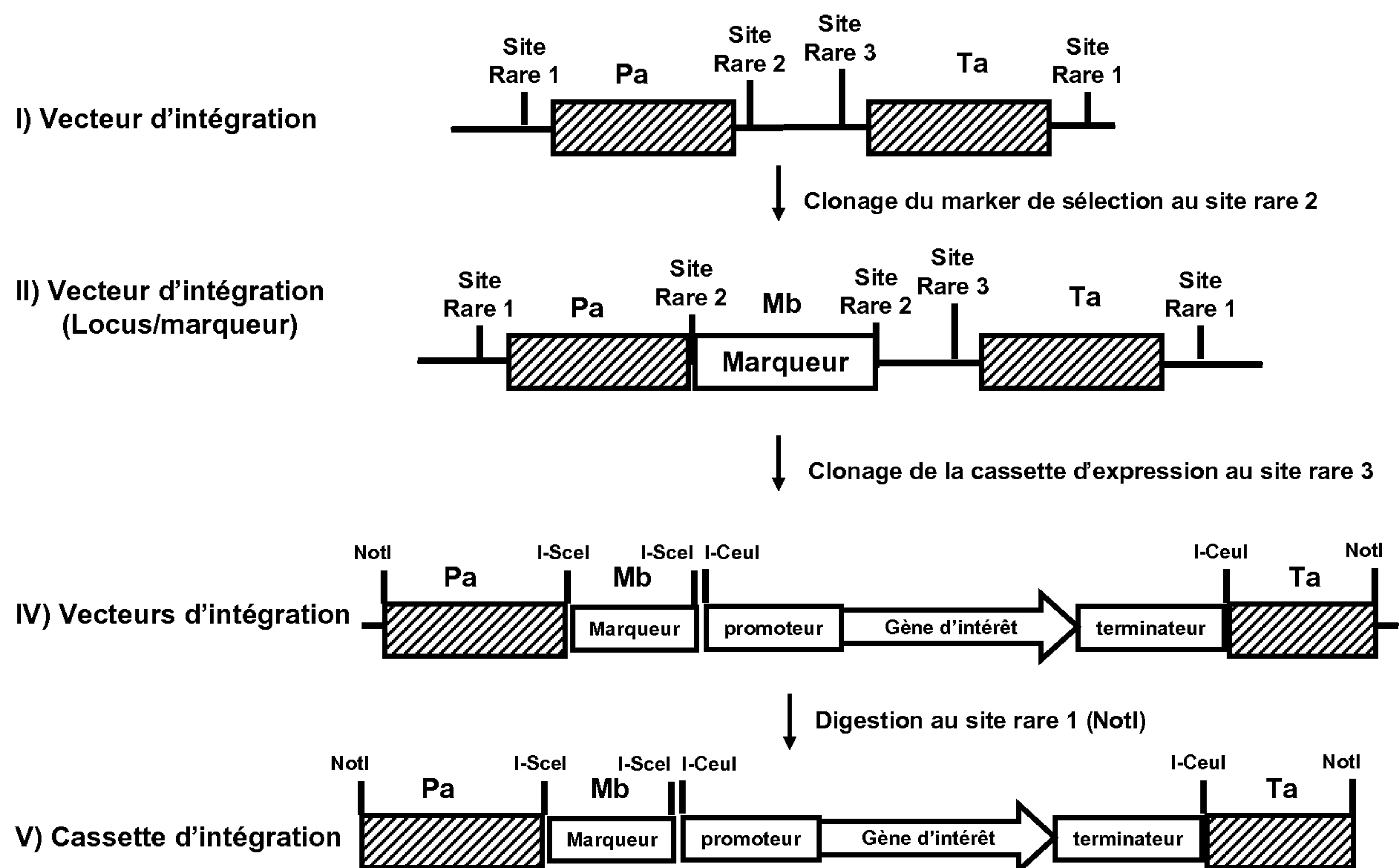
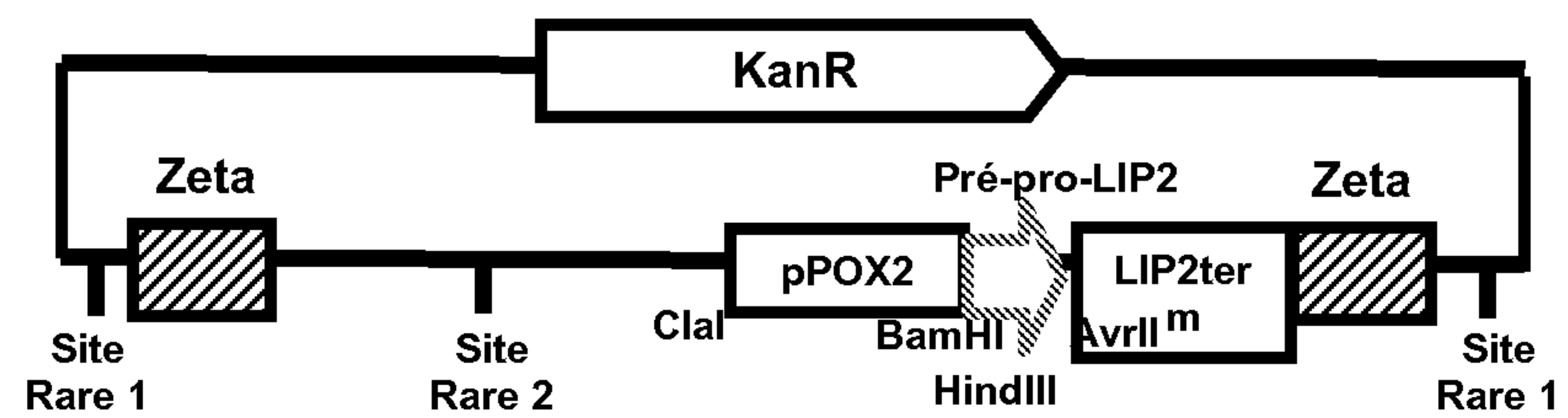


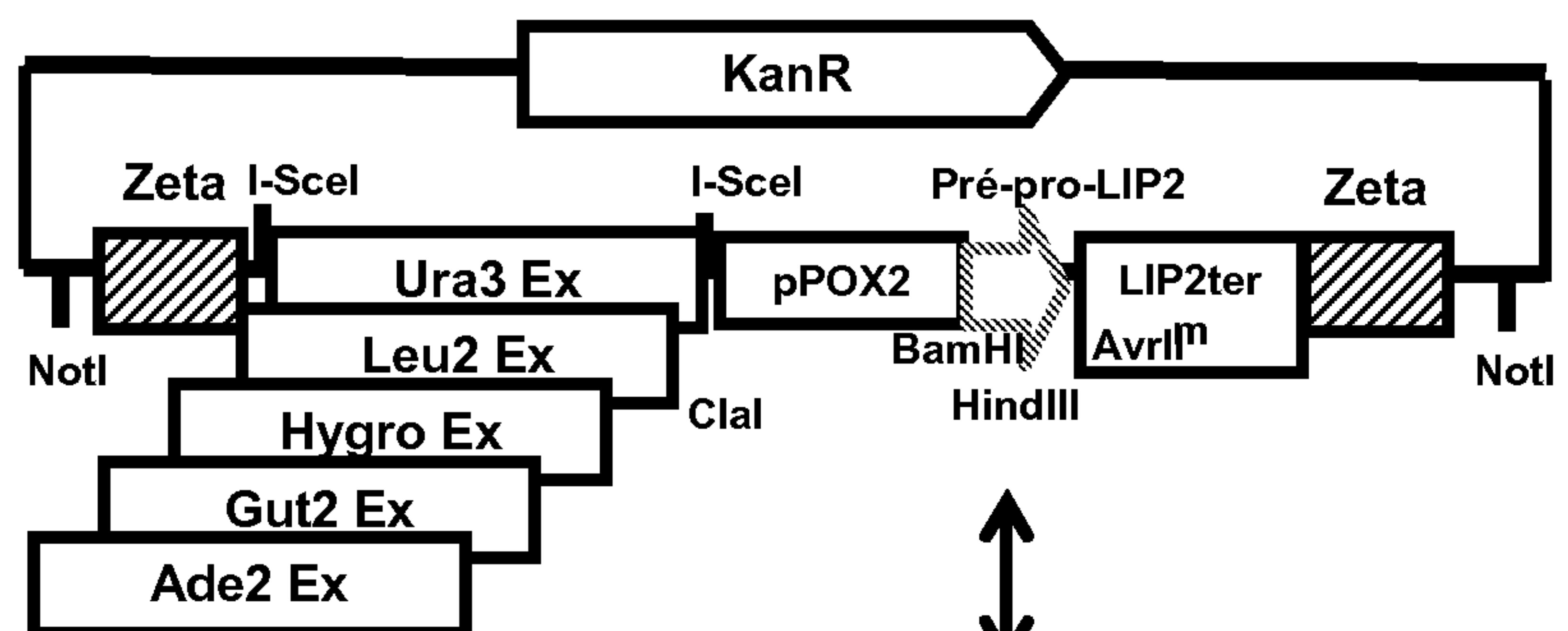
Figure 3

I) Vecteur d'intégration



↓ Clonage du marker de sélection au site rare 2

II) Vecteurs d'intégration aléatoire avec marqueur excisable



↕ Avec pré-pro-LIP2 : série JMP61-marqueur Ex

Sans pré-pro-LIP2 : série JMP62-marqueur Ex

Figure 4

5/8

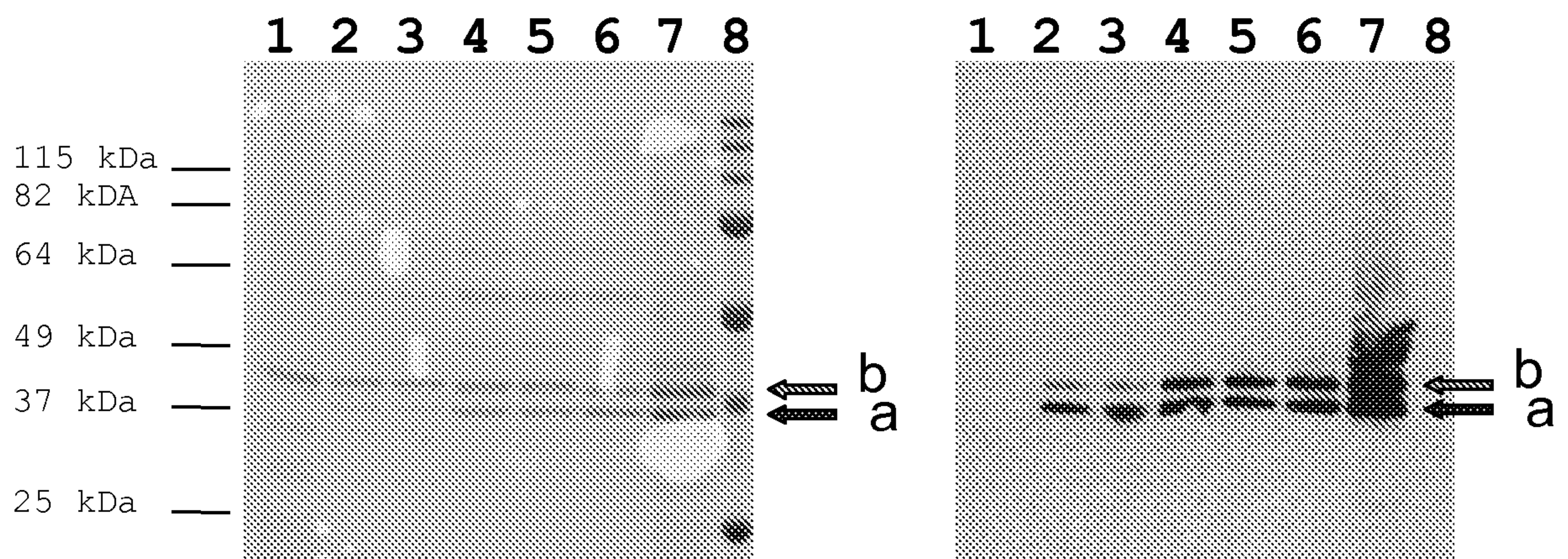
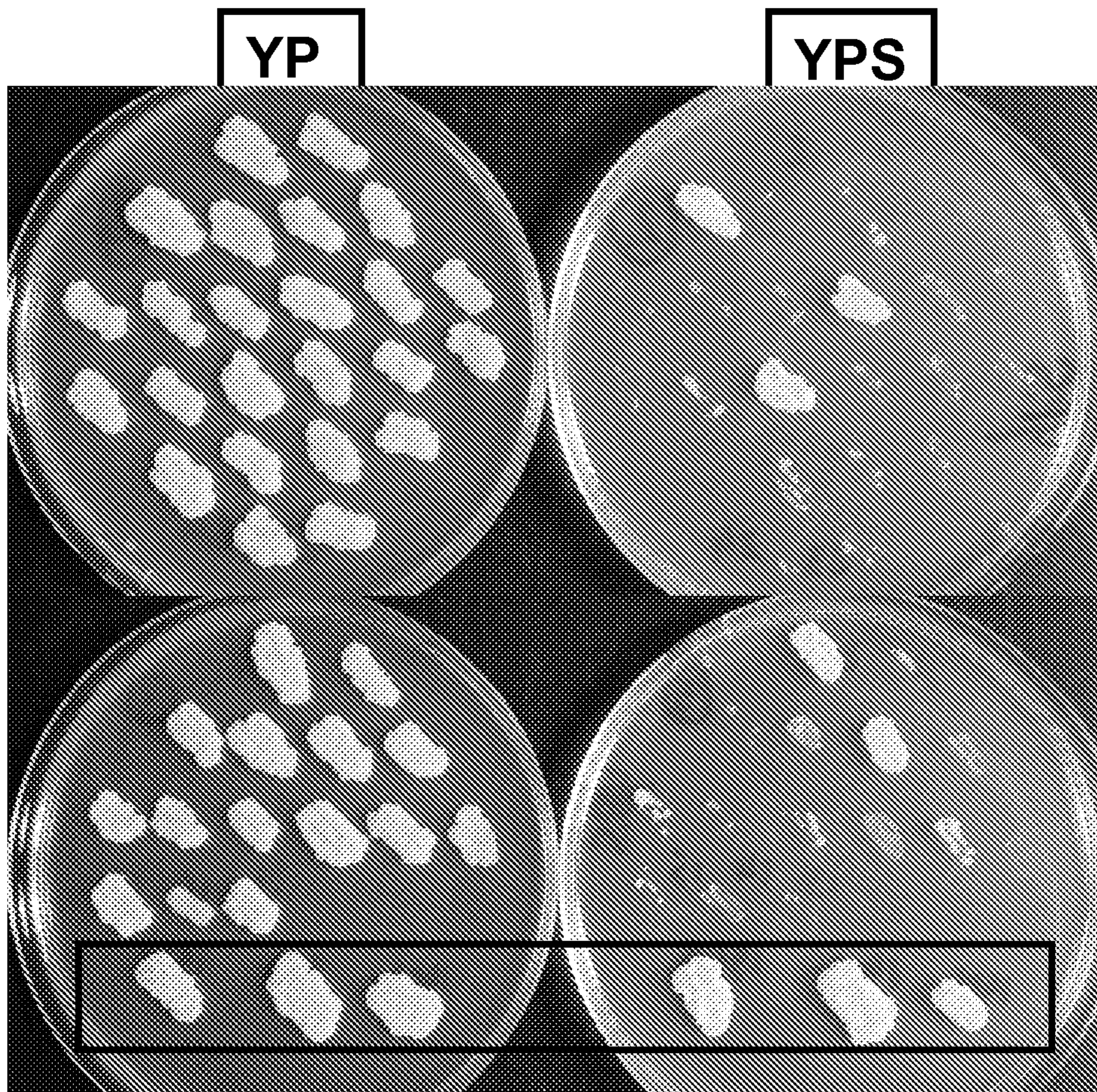


Figure 5

6/8



Souches temoins :FF-lug; FF-lua; FF-luga

Figure 6

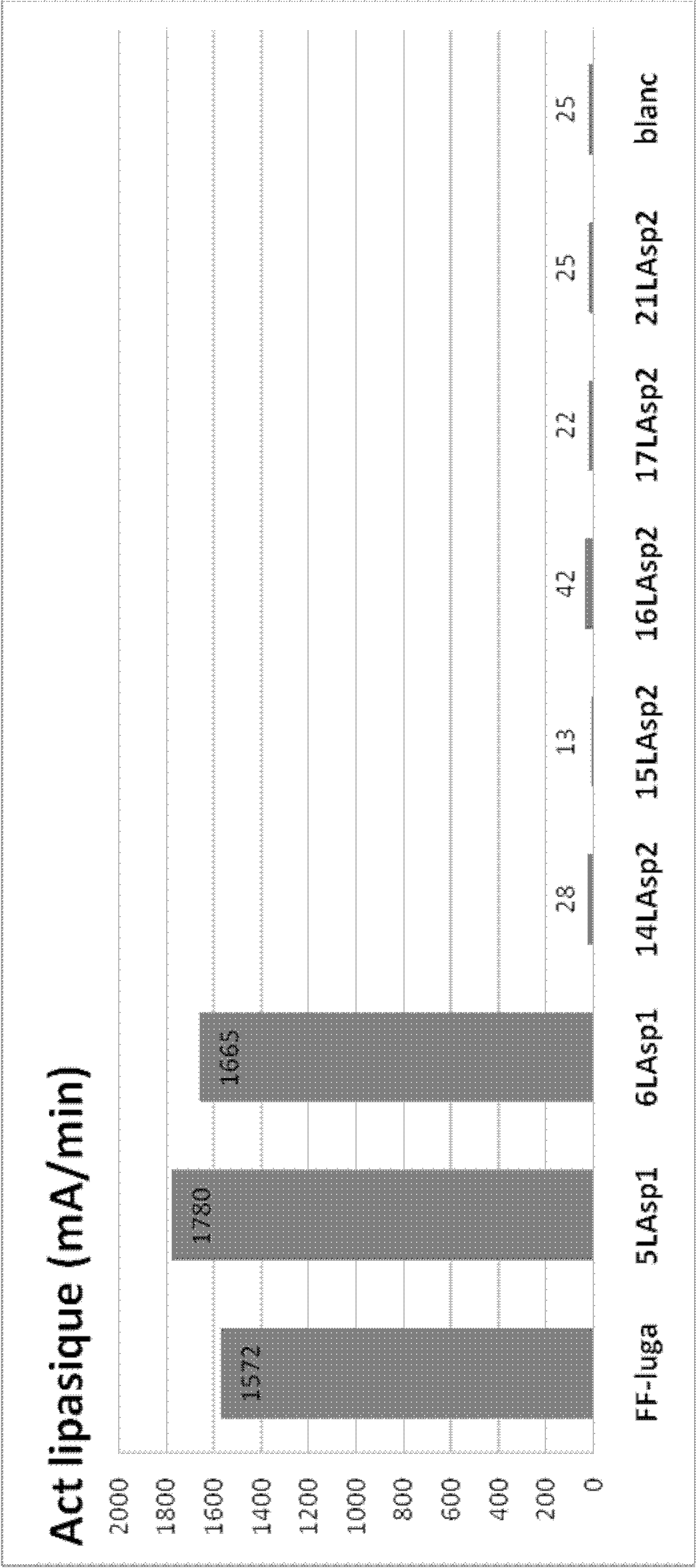


Figure 7

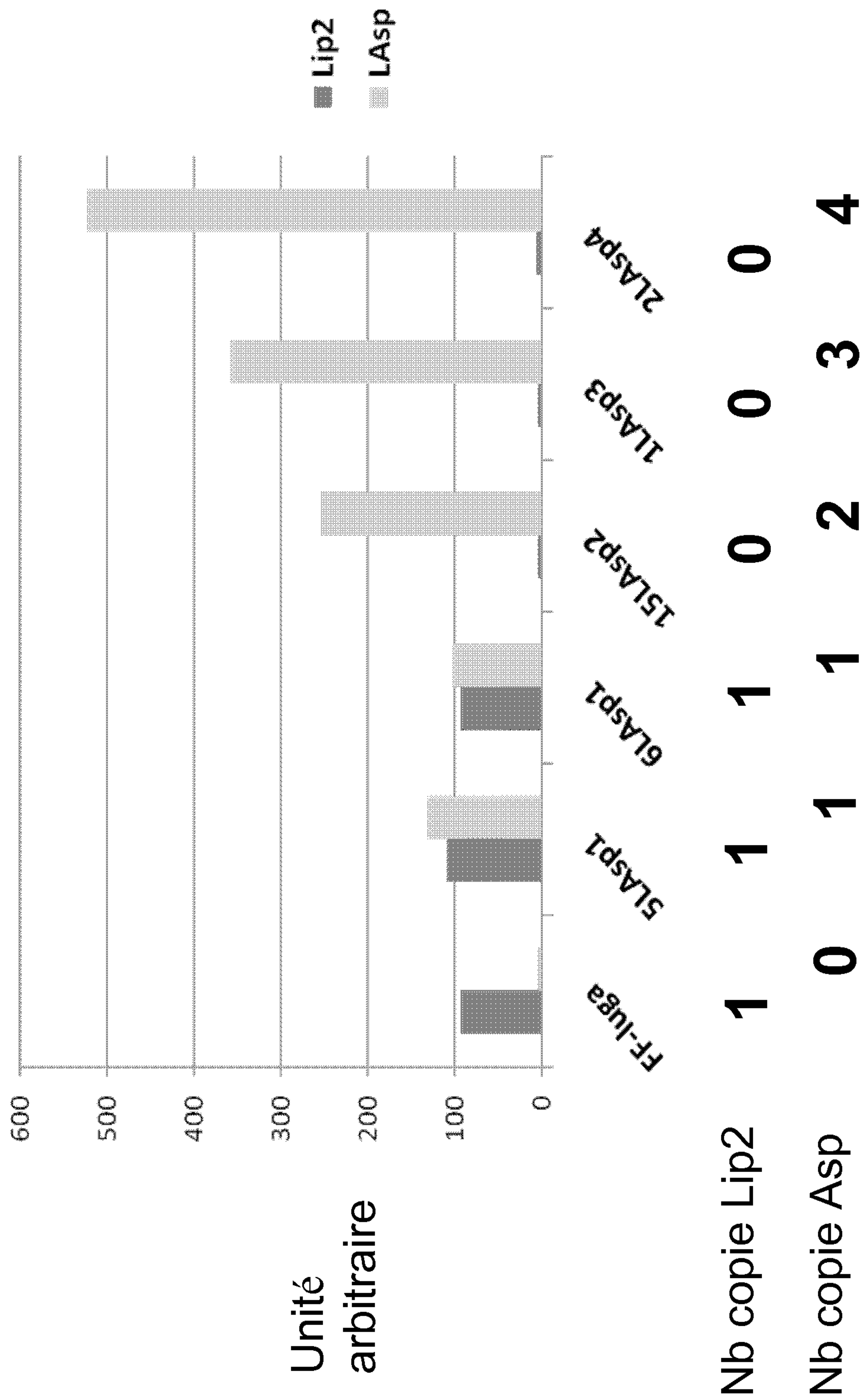


Figure 8