



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 670 254 A5

⑤① Int. Cl.4: C 12 N 1/16
C 12 N 15/00

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

// (C 12 N 1/16, C 12 R 1:865)

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

②① Numéro de la demande: 2154/84

②② Date de dépôt: 02.05.1984

③③ Priorité(s): 09.05.1983 LU 84795

②④ Brevet délivré le: 31.05.1989

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 31.05.1989

⑦③ Titulaire(s):
Labofina S.A., Bruxelles (BE)

⑦② Inventeur(s):
Delcour, Jean M. A. G., Wahlin (BE)
Colson, Anne Marie J.-C. G. (-Corbisier), Dion
Valmon (BE)
De Baetselier, Annie J. (-Van Broekoven),
Berchem (BE)
Colson, Charles, Dion Valmon (BE)

⑦④ Mandataire:
Dr. Troesch AG Patentanwaltsbüro, Zürich

⑤④ **Procédé de culture de cellules de levure transformées.**

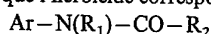
⑤⑦ Pour contrôler la stabilité génétique de la population de cellules de levure transformées au cours de la fermentation il est proposé que les cellules de levure transformées comportent un plasmide, ce plasmide comportant un gène conférant aux cellules de levure la résistance intrinsèque de celles-ci à au moins un inhibiteur de croissance de type herbicide organique. La fermentation est réalisée en ajoutant au milieu de culture l'un des inhibiteurs de croissance auxquels la levure a été rendue résistante par transformation, à une concentration telle que seuls les transformants puissent survivre et/ou se multiplier.

REVENDECATIONS

1. Procédé de culture de cellules de levure transformées, caractérisé en ce que les cellules de levure transformées comportent un plasmide, ce plasmide comportant un gène conférant aux cellules de levure la résistance intrinsèque de celles-ci à au moins un inhibiteur de croissance de type herbicide organique, qui permet de contrôler la stabilité génétique de la population de cellules de levure transformées au cours de la fermentation.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la fermentation est réalisée en ajoutant au milieu de culture l'un des inhibiteurs de croissance auxquels la levure a été rendue résistante par transformation, à une concentration telle que seuls les transformants puissent survivre et/ou se multiplier.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'herbicide correspond à la formule:



où Ar est un radical comportant un noyau à caractère aromatique ou hétéroaromatique,

R_1 est choisi dans le groupe comprenant l'hydrogène, le radical méthyle et le radical hydroxyle,

R_2 est un radical compris dans le groupe formé par les radicaux alkyle, cycloalkyle, alkényle, alkylamino, cycloalkylamino, dialkylamino, alcoxyalkylamino et alcoxy.

4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que le radical R_2 de l'herbicide est compris dans le groupe des radicaux méthylamino, diméthylamino et méthoxyméthylamino.

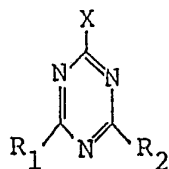
5. Procédé selon l'une des revendications 3 et 4, caractérisé en ce que le radical Ar de l'herbicide comporte un noyau benzénique substitué ou non.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le radical Ar de l'herbicide est un radical phényle comportant 1 ou 2 substituants choisis dans le groupe formé par les atomes d'halogène et les radicaux alkyle, méthoxy et trifluorométhyle.

7. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'herbicide est l'isopropyl-N-(3-chlorophényl) carbamate.

8. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'herbicide est le 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'herbicide correspond à la formule:



où X est un radical compris dans le groupe des radicaux chloro, méthoxy et méthylthio,

R_1 et R_2 sont des radicaux compris dans le groupe des radicaux éthylamino et/ou isopropylamino.

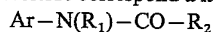
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'herbicide est le 2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine.

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'herbicide est le 2-chloro-4,6-bis(éthylamino)-1,3,5-triazine.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'herbicide est le 3-amino-1,2,4-triazole.

13. Plasmide comportant un gène conférant par transformation d'une cellule de levure la résistance intrinsèque de celle-ci à au moins un inhibiteur de croissance de type herbicide organique, et assurant l'expression de ce gène dans la levure, la rendant ainsi résistante à au moins l'herbicide correspondant pour l'exécution du procédé selon l'une des revendications 1 à 12.

14. Plasmide selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'herbicide correspond à la formule:

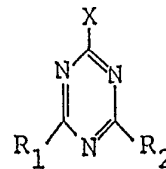


où Ar est un radical comportant un noyau à caractère aromatique ou hétéroaromatique,

R_1 est choisi dans le groupe comprenant l'hydrogène, le radical méthyle et le radical hydroxyle,

R_2 est un radical compris dans le groupe formé par les radicaux alkyle, cycloalkyle, alkényle, alkylamino, cycloalkylamino, dialkylamino, alcoxyalkylamino et alcoxy.

15. Plasmide selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'herbicide correspond à la formule:



où X est un radical compris dans le groupe des radicaux chloro, méthoxy et méthylthio, R_1 et R_2 sont des radicaux compris dans le groupe des radicaux éthylamino et/ou isopropylamino.

16. Levure transformée, caractérisée en ce qu'elle comporte un plasmide selon l'une des revendications 13 à 15.

DESCRIPTION

La présente invention se rapporte à un procédé de culture de cellules de levure transformées, à un plasmide et à une levure transformée, ces objets étant définis dans les revendications 1, 13 et 16.

Plus particulièrement, elle se rapporte au plasmide dans lequel un tel gène a été inséré afin de rendre intrinsèquement résistante à cet inhibiteur la levure transformée par ce plasmide. L'invention concerne aussi une levure rendue résistante à un inhibiteur de croissance du type herbicide par transformation avec un tel plasmide. De plus, la présente invention se rapporte à un procédé de culture de cellules de levure transformées par un plasmide comportant un gène.

Il est connu de reprogrammer génétiquement des micro-organismes par transformation de ceux-ci avec de l'ADN exogène dans des conditions telles que cet ADN se réplique dans la cellule transformée et se transmette à sa descendance. L'intérêt pratique de ces techniques est évident lorsque l'ADN exogène est porteur d'au moins un gène assurant l'expression dans la cellule transformée d'un polypeptide d'intérêt commercial, qu'il s'agisse d'une hormone à usage médical comme l'insuline, ou d'une enzyme à usage industriel comme l'amylase. Il suffit en effet de cultiver dans des conditions appropriées les micro-organismes ainsi transformés pour qu'ils produisent le polypeptide intéressant qu'on pourra récupérer ensuite au départ du micro-organisme lui-même ou du milieu de culture suivant que le polypeptide reste lié à la cellule, ou qu'au contraire il est excrété dans le milieu.

Une méthode de laboratoire couramment mise en œuvre pour transformer un micro-organisme consiste à utiliser comme vecteur du gène en question un plasmide autorépliquatif, c'est-à-dire une molécule circulaire d'ADN comportant une séquence lui conférant le caractère de réplicon dans la cellule-hôte. Ce plasmide doit aussi comporter au moins un site de restriction, c'est-à-dire une séquence clivable spécifiquement par une enzyme de restriction.

Si le plasmide clivé est mis en présence de fragments d'ADN obtenus par restriction d'un ADN exogène ou par synthèse *in vitro*, il est possible d'obtenir par des techniques appropriées d'usage courant des plasmides dits chimériques dans lesquels un fragment d'ADN exogène se trouve inséré au site de restriction. Après avoir incubé une population de micro-organismes en présence d'une préparation d'ADN contenant de tels plasmides, il est possible de sélectionner les clones ayant acquis par transformation un ou plusieurs de ces plasmides chimériques. On procède ensuite au criblage de la banque de clones ainsi constituée en vue d'identifier celui ou ceux dont le génome a été reprogrammé par le gène auquel on s'intéresse. Ceux-ci se reconnaissent soit parce qu'ils ont un trait phénotique nouveau qui peut être aisément mis en évidence par culture sur un milieu indicateur ou sélectif, soit parce qu'ils répondent positivement

à un test fondé sur l'usage de sondes moléculaires spécifiques tels des acides nucléiques complémentaires du gène recherché, ou des immunoglobulines dirigées contre le polypeptide correspondant.

Après avoir identifié les clones recherchés, il reste à développer le procédé de fermentation assurant une production optimale du polypeptide auquel on s'intéresse. Pour ce faire, deux voies d'approche complémentaires sont couramment suivies: d'une part, le vecteur chimérique est soumis à diverses manipulations *in vitro* visant à conférer à la portion codante du gène correspondant un ensemble de séquences assurant au mieux son expression et, d'autre part, on recherche les conditions de culture les mieux appropriées à la survie et/ou à la prolifération des micro-organismes transformés à l'exclusion des révertants phénotypiques susceptibles d'apparaître en cours de fermentation. Lorsque les conditions de culture ont pu être ainsi définies, le procédé de fermentation est qualifié de génétiquement stable, et se prête à une transposition industrielle.

On sait que la transformation d'un micro-organisme par les méthodes décrites ci-dessus produit le plus souvent un transformant instable. Cette instabilité se manifeste par l'apparition, au cours des générations successives en milieu de culture non sélectif, d'une proportion croissante de cellules phénotypiquement révertantes. L'analyse révèle que celles-ci ont perdu la majorité ou la totalité de leurs plasmides (voir K. Nagahari, «J. Bacteriol.», 136, 312, 1978). Cette situation résulte de la conjonction de deux phénomènes:

1. L'apparition spontanée au sein de la culture de micro-organismes partiellement ou totalement curés. Ce curage peut résulter de diverses causes: ségrégation aléatoire des plasmides lors de la division cellulaire, découplage de la réplication des plasmides et des chromosomes, désavantage répliatif des plasmides chimériques par rapport aux plasmides endogènes (voir C.P. Nollenberg, «Curr. Top. Microbiol. Immunol.», 96, 119, 1982).

2. La prolifération préférentielle des micro-organismes partiellement ou totalement curés en vertu du désavantage sélectif dont souffrent les transformants (voir K. Sakaguchi, «Molecular breeding and genetics of applied microorganisms», Ed. K. Sakaguchi, et M. Okanishi, Academic Press, 1980, p. 1). Celui-ci est d'autant plus accentué que l'expression des gènes portés par le plasmide est intense, et mobilise une part plus importante de l'économie cellulaire. Cette situation est paradoxale, puisque c'est justement vers une expression maximale des gènes clonés que tendent les efforts des chercheurs désireux de développer un procédé rentable de fermentation industrielle.

Il est donc nécessaire, si l'on veut contrôler la stabilité génétique de la population de micro-organismes au cours de la fermentation, de mettre en œuvre une pression de sélection artificielle en faveur des transformants. Celle-ci peut s'exercer en additionnant le milieu de culture d'un inhibiteur de croissance vis-à-vis duquel le plasmide-vecteur porte un marqueur de résistance extrinsèque: c'est le cas de la plupart des vecteurs utilisés pour la manipulation génétique des micro-organismes procaryotes, qui confèrent aux transformants la résistance à divers antibiotiques tels l'ampicilline (inactivée par une β -lactamase), la néomycine (inactivée par une phosphorylase), le chloroamphénicol (inactivé par une acétylase).

La pression de sélection peut également s'exercer en réalisant la fermentation dans un milieu de culture artificiel dépourvu d'un métabolite essentiel dont la synthèse de novo est assurée par une enzyme codée par un gène exclusivement porté par le vecteur — l'allèle correspondant porté par le chromosome de l'hôte étant inactivé par mutation. Cette situation s'applique tout particulièrement à la levure, qui acquiert par transformation au moyen des vecteurs les plus couramment en usage la capacité de croître dans un milieu dépourvu de leucine (pJDB207), de tryptophane (TRp7), d'uracile (pFL1).

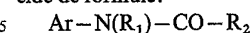
Le contrôle de la stabilité ne constitue généralement pas un sérieux handicap pour la mise en œuvre de procédés industriels de fermentation à petite échelle, tels ceux développés en vue de la fabrication de produits d'intérêt médical à très haute valeur ajoutée comme les hormones ou les vaccins: soit qu'aucun problème majeur

de coût ni d'approvisionnement n'est à craindre si l'on recourt à une sélection du premier type, soit que l'usage d'un milieu de culture artificiel est acceptable d'un point de vue économique aussi bien que pratique, si l'on fait appel à une sélection du second type — les quantités requises restant, dans les deux cas, relativement limitées.

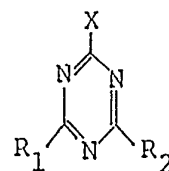
Par contre, la nécessité de recourir à de telles pratiques limite considérablement les perspectives de mise en œuvre de procédés industriels de fermentation à grande échelle, tels ceux qui visent à la fabrication en grandes quantités de produits à valeur ajoutée relativement faible, comme par exemple la production de certaines enzymes à usage agro-alimentaire au départ de levures transformées. Dans ce cas, l'usage de milieux artificiels dépourvus d'un métabolite essentiel que les révertants phénotypiques, contrairement aux transformants, sont incapables de synthétiser, est particulièrement désavantageux compte tenu de la difficulté de préparation et du coût prohibitif de ceux-ci. Par ailleurs, l'usage de milieux de culture naturels relativement abondants et peu coûteux, comme le lactosérum ou la mélasse, s'avère totalement impraticable, puisque ceux-ci, de par leur contenu relativement riche en métabolites essentiels, sont par essence non sélectifs. L'addition à de tels milieux de quantités importantes d'antibiotiques tels le chloramphénicol ou un dérivé de la néomycine connu sous le symbole G418, vis-à-vis desquels une résistance extrinsèque a pu être récemment conférée à la levure par transformation (voir C.P. Hollenberg, «ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.», 15, 325, 1979 et A. Jimenez et J. Davies, «Nature», 287, 869, 1980), non seulement augmenterait significativement le coût de la fermentation, mais entraînerait inévitablement de sérieuses difficultés d'approvisionnement en ces molécules dont l'usage prioritaire est d'ordre médical ou vétérinaire. Il est connu par ailleurs que la levure, comme les autres eucaryotes, est insensible à la plupart des antibiotiques actuellement disponibles: il est donc très improbable que d'autres marqueurs de résistance vis-à-vis d'inhibiteurs de ce type puissent être découverts chez la levure, et a fortiori mis à profit pour contrôler efficacement la stabilité.

La présente invention a pour objet un procédé de culture de cellules de levure transformées selon la teneur de la revendication 1.

En plus, elle a notamment pour objet de fournir un plasmide comportant un gène tel que, après transformation dans une cellule de levure, la levure devienne intrinsèquement résistante à un ou plusieurs inhibiteurs de croissance de type herbicide organique. De tels inhibiteurs, contrairement aux antibiotiques, ont l'avantage d'être abondants et peu coûteux. Dans l'une des réalisations de l'invention, ce gène confère à la levure ainsi transformée la résistance à un herbicide de formule:



où Ar est un radical comportant un noyau aromatique ou hétéroaromatique, R_1 est choisi dans le groupe comprenant l'hydrogène, le radical méthyle ou le radical hydroxyle, et R_2 est un radical compris dans le groupe formé par les radicaux alkyle, cycloalkyle, alkényle, alkylamino, cycloalkylamino, dialkylamino, méthoxyméthylamino et alcoxy. Dans une autre de ses réalisations, ce gène confère à la levure la résistance à un herbicide de formule:



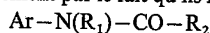
où X est un radical compris dans le groupe des radicaux chloro, méthoxy et méthylthio, R_1 et R_2 , identiques ou différents, sont compris dans le groupe des radicaux éthylamino et isopropylamino.

Un autre objet de l'invention est de fournir un plasmide comportant le gène tel que défini ci-dessus et pouvant être utilisé pour la transformation de la levure dans des conditions telles que la réplication et la transmission du gène à la descendance, de même que l'expression par les levures transformées du phénotype de résistance correspondant au gène, soient assurées.

L'invention a encore pour objet une levure rendue résistante à au moins un herbicide organique synthétique par transformation avec un plasmide tel que mentionné ci-dessus.

On a trouvé de façon inattendue que la croissance de la levure est inhibée par de nombreux produits chimiques de synthèse couramment utilisés comme herbicides totaux ou sélectifs en agriculture et en horticulture. Ce fait est d'autant plus surprenant que la plupart de ces herbicides sont connus pour agir au niveau de la photosynthèse des plantes alors que la levure est totalement dépourvue d'activité photosynthétique.

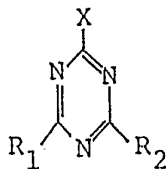
Parmi ces herbicides, un grand nombre se caractérisent chimiquement par le fait qu'ils répondent à la formule générale:



où Ar est un radical comportant un noyau aromatique ou hétéroaromatique.

Ce radical Ar est généralement un noyau benzénique ou alkylbenzénique, pouvant comporter un ou plusieurs substituants polaires, tels que des atomes d'halogène, un radical méthoxy; ou trifluorométhyle. Le radical Ar peut être aussi un noyau hétéroaromatique, comme celui du benzothiazole ou du thiadiazole. Dans cette formule générale, R_1 est généralement un atome d'hydrogène, mais ce peut être aussi un groupe alkyle ou hydroxyle. R_2 peut être un radical alkyle, cycloalkyle, alkényle. C'est le cas pour une catégorie d'herbicides du type carboxyanilide où Ar est un radical phényle généralement substitué. Ces herbicides sont connus pour avoir une action inhibitrice sur la photosynthèse. Un exemple typique en est le 3', 4'-dichloro-propioanilide, généralement connu sous le nom commun de «Propanil» (voir «The Pesticide Manual», Ed. Ch. R. Worthing, ECPC éd. 1979, p. 446). R_2 peut aussi être un groupe alcoxy. Dans ce cas, on a affaire à une catégorie d'herbicides du type carbamate. Un exemple typique est fourni par le méthyl-3,4-dichlorophénylcarbamate couramment appelé «Swep» (*Ibid.*, p. 569) et dont l'action s'exerce également sur la photosynthèse. Un autre exemple est l'isopropyl-N-(3-chlorophényl)carbamate, mieux connu sous le nom de «Chlorpropham» (*Ibid.*, p. 118). R_2 peut être enfin un groupe alkylamino, cycloalkylamino, alcoxyalkylamino, dialkylamino, etc. Ce sont les herbicides dérivés de l'urée et connus eux aussi pour leur action inhibitrice de la photosynthèse. Un exemple classique de cette catégorie d'herbicides est le 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée couramment appelé «Diuron» (*Ibid.*, p. 224). Comme exemples de composés où Ar est un noyau hétérocyclique, on peut citer le 1-(2-benzothiazolyl)-3-méthylurée, dénommé benzo-thiasuron (*Ibid.*, p. 37) et le 1-(5-tert-butyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl) 1,3-diméthylurée, dénommé tebuthiuron (*Ibid.*, p. 495).

Une autre famille importante d'herbicides qui se sont révélés avoir une action inhibitrice sur la croissance des levures se caractérise chimiquement par le fait qu'ils répondent à la formule générale:



où X peut être un radical chloro, méthoxy ou méthylthio, R_1 et R_2 étant constitués par un radical éthylamino et/ou isopropylamino. Il s'agit donc d'herbicides dérivés de la S-triazine qui agissent également au niveau de la photosynthèse et dont l'importance commerciale est considérable. L'un des plus utilisés est le 2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine mieux connu sous le nom de «Atrazine» (*Ibid.*, p. 21). Un autre est le 2-chloro-4,6-bis (éthylamino)-1,3,5-triazine encore appelé «Simazine» (*Ibid.*, p. 474).

D'autres herbicides, ne répondant pas aux formules générales décrites ci-dessus, peuvent être utilisés conformément à la présente invention. A titre d'exemple, on peut citer le 3-amino-1,2,4-triazole, communément appelé amitrole. Cet herbicide est connu pour son action au niveau de la biosynthèse des caroténoïdes.

Bien que le mécanisme exact de l'action de ces herbicides chez la levure n'ait pas été étudié dans le détail, on peut considérer, pour un grand nombre d'entre eux, que cette action se situe au niveau de la fonction respiratoire, au vu de leur effet différentiel sur la croissance de la levure dans un milieu où la seule source de carbone est un substrat exclusivement respiratoire, par exemple le glycérol, comparé à une culture témoin réalisée dans un milieu pourvu d'une source de carbone tel le glucose, permettant à la fois la fermentation et la respiration.

Il est connu que, dans un cas au moins, des mutants de la levure *Saccharomyces cerevisiae* intrinsèquement résistants à un herbicide (Diuron) ont pu être isolés (voir A.M. Colson *et al.*, «Eur. J. Biochem.», 74, 721, 1977). Cependant, la localisation exclusivement mitochondriale des marqueurs génétiques correspondants rend ceux-ci totalement impropres à une utilisation visant à conférer, par transformation, un phénotype de résistance à la levure. Par ailleurs, on sait que les marqueurs de résistance intrinsèque sont en règle générale récessifs, ce qui en principe les rend impropres au clonage dans le but indiqué ci-dessus. Cette règle s'applique de toute évidence à la levure *Saccharomyces cerevisiae* (voir J.R. Broach, «The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* — Life cycle and inheritance», Ed. J. M. Strathern, E.W. Jones et J.R. Broach, Gold Spring Harbor Laboratory, 1981, p. 723), et ce principe se vérifie clairement dans le seul cas connu de clonage d'un marqueur récessif de résistance intrinsèque chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où le phénotype de résistance à l'inhibiteur correspondant (l'antibiotique trichodermine) n'a pas pu être exprimé chez le transformant (voir C.P. Hollenberg, «Curr. Top. Microbiol. Immunol.», 96, 119, 1982).

On a trouvé, et cela constitue un aspect important de la présente invention, qu'il est possible d'isoler des mutants de la levure *Saccharomyces cerevisiae* intrinsèquement résistants à des inhibiteurs de type herbicide tels que ceux décrits plus haut, et caractérisés en ce que le marqueur génétique responsable du phénotype de résistance est localisé dans les chromosomes du noyau, et est semi-dominant. De tels mutants ont été obtenus par la méthode classique de sélection sur un milieu de culture contenant l'herbicide en question.

On a trouvé de façon inattendue, sur la base de l'étude du phénotype de résistance de ces mutants, que ceux-ci étaient résistants non seulement vis-à-vis de l'herbicide ayant permis leur sélection, mais également vis-à-vis d'autres inhibiteurs de type herbicide organique synthétique. Cette caractéristique constitue une propriété importante des gènes de résistance intrinsèque de la présente invention.

On a également trouvé, et cela constitue un autre aspect important de l'invention, que la levure *Saccharomyces cerevisiae* pouvait acquérir par transformation au moyen d'un gène de ce type un phénotype de résistance multiple semblable à celui du mutant d'origine, et cela en appliquant des méthodes de manipulation génétique couramment en usage chez la levure.

L'opération de transformation d'une levure sensible en une levure résistante à au moins un des herbicides auxquels se rapporte l'invention peut en principe être menée à bien avec n'importe lequel des gènes de résistance intrinsèque auxquels elle se rapporte, et cela au moyen de n'importe quel vecteur autorépliquable utilisable chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Comme exemples de vecteurs connus se prêtant à un tel usage, on peut notamment citer ceux construits par J.D. Begge (pJDB207, pJDB219, pJDB248; voir J.D. Begge, «Genetic Engineering 2», Ed. R. Williamson, Academic Press 1981, p. 175) ou par C.P. Hollenberg (pMP78, pMP81; voir C.P. Hollenberg, «Curr. Top. Microbiol. Immunol.», 96, 119, 1982) ou par Ph. Fournier *et al.* (voir demande de brevet européen N° 11 562).

Les levures transformées par un de ces plasmides dans lequel on a inséré au préalable un gène de résistance conforme à la présente invention peuvent être cultivées dans un but commercial, par exemple pour la production industrielle d'un polypeptide dont l'expression est assurée par un gène inséré dans le même plasmide que le gène de résistance, et cela dans des conditions assurant la stabilité génétique de la fermentation, et sans les inconvénients ou obstacles

inhérents aux méthodes de contrôle de la stabilité actuellement utilisables, et dont il a été fait mention plus haut. Il suffit pour cela d'ajouter au milieu de culture l'un des inhibiteurs de croissance auxquels la levure aura été rendue résistante par transformation, à une concentration telle que seuls les transformants puissent survivre et/ou se multiplier, à l'inverse des révertants phénotypiques qui pourraient apparaître en cours de fermentation.

D'autres modalités et avantages de l'utilisation d'un gène de résistance conforme à la présente invention sont considérés comme relevant de celle-ci, et c'est à titre d'illustration seulement que sont donnés les exemples qui suivent.

Exemple 1:

Isolement d'un mutant de la levure Saccharomyces cerevisiae spontanément résistant à des inhibiteurs de croissance de type herbicide.

Au départ de la souche D273-10B/A21 de *Saccharomyces cerevisiae*, on a isolé un mutant spontané de résistance appelé D273-10B/A 21/D₂₁₇^R (en abrégé DIU₂₁₇^R) par sélection sur milieu glycérol additionné de Diuron à la concentration de 100 µM — le seuil d'inhibition pour cette souche ayant été préalablement établi expérimentalement à 75 µM pour les cellules haploïdes aussi bien que diploïdes. La localisation nucléaire du marqueur de résistance de ce mutant a été attestée par l'étude de son mode de transmission à la descendance d'un croisement entre le mutant DIU₂₁₇^R et une souche sensible: l'analyse des tétrades a révélé que le marqueur obéissait à une ségrégation typiquement mendélienne. L'analyse du phénotype de résistance des diploïdes hétérozygotes issus de ce croisement a démontré le caractère semi-dominant du marqueur de résistance: le seuil d'inhibition se situant dans ce cas à 100 µM, alors que le mutant haploïde résistait à la concentration de 150 µM. Ce mutant s'est avéré être résistant non seulement vis-à-vis de l'herbicide qui avait permis de le sélectionner, mais également vis-à-vis d'autres herbicides inhibiteurs respiratoires tels que:

- l'atrazine (seuil 2 mM, résistance 5 mM)
- l'amitrole (seuil 10 mM, résistance 20 mM)
- le chlorpropham (seuil 0,3 mM, résistance 1 mM)
- le chloroxuron: 3-[4-(4-chlorophénoxy)phényl]-1,1-diméthylurée (seuil 0,01 mM, résistance 0,05 mM)
- le monuron: 3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthylurée (seuil 0,5 mM, résistance 1,5 mM)
- le monolinuron: 3-(4-chlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée (seuil 1 mM, résistance 3 mM)
- la desmetryne: 2-isopropylamino-4-méthylamino-6-méthylthio-1,3,5-triazine (seuil 1 mM, résistance 5 mM)
- la metribuzine: 4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-méthylthio-1,2,4-triazine-5-one (seuil 5 mM, résistance 50 mM)
- le dinoseb: 2-sec-butyl-4,6-dinitrophénol (seuil 0,2 mM, résistance 0,4 mM)

Exemple 2:

Clonage et expression dans la levure Saccharomyces cerevisiae d'un gène de résistance intrinsèque à des herbicides.

L'ADN a été purifié au départ d'une culture liquide du mutant DIU₂₁₇^R, et soumis à la restriction par l'enzyme *PstI*. Les fragments de restriction ainsi obtenus ont été insérés par recombinaison *in vitro* dans le plasmide-navette pJDB207 restreint au site *PstI* du marqueur de résistance à l'ampicilline. La souche HB101 d'*Escherichia coli* a été transformée au moyen de ces plasmides, de manière à constituer une banque génomique du mutant DIU₂₁₇^R, sous la forme d'une collection comprenant environ 100 000 clones d'*Escherichia coli* hébergeant chacun un ou plusieurs plasmides chimériques et présentant un phénotype sensible à l'ampicilline et résistant à la tétracycline.

Une culture d'*Escherichia coli* a été réalisée par ensemencement au moyen de l'ensemble des clones de cette banque, de manière à amplifier les plasmides chimériques contenus dans celle-ci. L'ADN a été extrait de cette culture, et les plasmides ont été purifiés par cen-

trifugation isopycnique sur chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium. Ces plasmides ont été utilisés pour transformer la souche AH22 de *Saccharomyces cerevisiae* suivant une méthode classique (voir A. Hinnen *et al.*, «Proc. Natl. Acad. Sci.», USA 75, 1929, 1978). Les transformants ont été sélectionnés sur milieu glucose carencé en leucine, et les clones transformés résistants au Diuron ont été ensuite sélectionnés par culture sur milieu glycérol additionné de Diuron à la concentration de 100 µM.

On a montré que le phénotype de résistance de nombreux clones obtenus par cette méthode résulte effectivement de la présence dans ceux-ci d'un ou plusieurs plasmides chimériques porteurs du marqueur de résistance issu de la souche DIU₂₁₇^R, et cela par deux voies. Tout d'abord, on a procédé au curage de chacun des clones de la collection par la méthode de Hollenberg (voir C.P. Hollenberg, «Curr. Top. Microbiol. Immunol.», 96, 119, 1982), et vérifié que bon nombre d'entre eux révertaient vers un phénotype à la fois auxotrophe pour la leucine et sensible au Diuron après curage; les clones ne répondant pas positivement à ce test ont été écartés. Par ailleurs, on a extrait l'ADN d'une culture liquide ensemencée avec l'un des clones retenus à la suite de ce test, et transformé la souche HB101 d'*Escherichia coli* au moyen de celui-ci, de manière à constituer une banque de plasmides du clone de levure en question. Les clones d'*Escherichia coli* ainsi obtenus, désignés ici comme «secondaires», ont été rassemblés par groupes de 50 pour l'ensemencement d'autant de cultures mixtes dont on a extrait les plasmides comme décrit plus haut. Ceux-ci ont été utilisés pour transformer la souche AH22, comme ci-dessus: on a obtenu par cette méthode, et avec une très haute fréquence, un très grand nombre de clones de levure résistants au Diuron, qualifiés ici de «secondaires».

On a recherché lequel, parmi l'ensemble des plasmides chimériques représentés dans la banque secondaire d'*Escherichia coli*, était responsable de la transformation de résistance observée. Dans ce but, on a procédé comme ci-dessus à la purification des plasmides de chacun des clones individuels composant les groupes de 50 répondant positivement lors de la transformation secondaire de la levure. On a observé par électrophorèse qu'une grande variété de plasmides avait été obtenue de cette manière, se manifestant par des différences notables quant à la taille des fragments y insérés, d'une part, et quant à leurs profils de restriction, d'autre part — ces différents plasmides se regroupant en une dizaine de classes distinctes attestant du caractère hétéroplasmidique du transformant primaire de levure, cet état résultant de la nature multiple de l'événement initial de transformation, de même que de l'occurrence ultérieure d'événements de recombinaison. Des clones représentatifs de chacune de ces classes ont pu être ainsi identifiés, et ont fourni chacun une préparation de plasmides individuellement purifiés comme ci-dessus, dont l'un, appelé ici pDIU202, s'est révélé capable de conférer concomitamment par transformation de la souche AH22 suivant les méthodes décrites plus haut un phénotype à la fois prototrophe pour la leucine et résistant vis-à-vis des herbicides auxquels le mutant DIU₂₁₇^R d'origine était lui-même résistant. La taille du fragment inséré dans le plasmide pDIU202 a été estimée par électrophorèse à 1,5 kb.

Une souche d'*Escherichia coli* HB101 transformée par le plasmide pDIU202 a été déposée le 4 mai 1983 auprès du Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, Postbus 273, 3740 AG Baarn, Pays-Bas, sous le numéro LMD 83.07 = CBS 396.73.

Exemple 3:

Procédé de culture sélective de la levure Saccharomyces cerevisiae transformée par un plasmide porteur d'un gène de résistance intrinsèque à des herbicides assurant la stabilité génétique de la population.

Une culture liquide de la souche AH22 de *Saccharomyces cerevisiae*, préalablement transformée au moyen du plasmide pDIU202 comme décrit dans l'exemple 2, a été réalisée à 30° C sous agitation constante dans un erlenmeyer contenant 100 ml de milieu glycérol complet additionné de Diuron à la concentration finale de 100 µM. Au cours de la phase exponentielle de cette culture, on a prélevé une fraction aliquote de celle-ci que l'on a utilisée pour ensemen-

milieu de culture semblable dans un rapport de dilution tel que cette seconde culture soit immédiatement en phase exponentielle de croissance. Cette opération a été répétée de la même manière au cours d'une période d'observation totalisant 300 heures, et correspondant à 132 générations successives. Des prélèvements ont été réalisés au cours de ces cultures successives à des moments correspondant aux nombres de générations successives suivants: 0, 8, 15, 25, 43, 57, 68, 78, 91, 110 et 132. Les cellules ont chaque fois été étalées sur des boîtes de Petri contenant un milieu glycérol complet solide de manière à obtenir des colonies isolées, dont cinquante ont été chaque fois repiquées par la technique du cure-dent stérile sur un jeu de quatre boîtes de Petri contenant les milieux solides suivants:

1. glycérol complet
2. glycérol complet + Diuron 100 μ M
3. glycérol minimum + histidine
4. glucose minimum + histidine

Les colonies ayant poussé sur chacune de ces boîtes ont été chaque fois dénombrées. Dans tous les cas, on a observé que la totalité des 50 colonies repiquées poussaient sur chacune des quatre boîtes définies ci-dessus. Ces résultats indiquent qu'aucun révertant phénotypique, ni pour le caractère d'auxotrophie leucine, ni pour le caractère de sensibilité au Diuron, n'est apparu au cours de 132 générations successives de culture au cours desquelles une pression de sélection positive a été exercée par la présence du Diuron. Cette remarquable stabilité génétique de la population de levures transformées au moyen du plasmide pDIU202 s'oppose radicalement à l'ensemble des observations rapportées dans la littérature (voir: N. Gunge, «Ann. Rev. Microbiol.», 37, 253, 1983) pour des levures transformées au moyen de plasmides autorépliquatifs de la classe YEp (Yeast Episomal plasmids) à laquelle appartient le plasmide pDIU202 faisant l'objet de la présente invention, et pour lesquels des fréquences de réversion phénotypique de l'ordre d'un ou plusieurs pourcents par génération sont généralement observées, même dans des conditions de culture où une pression de sélection (négative dans tous les cas décrits) est exercée. A titre d'exemples, on peut citer les observations décrites pour des levures transformées au moyen des plasmides suivants et s'avérant génétiquement instables:

— pleu 1.4 et pleu 2.6

(voir: J.B. Hicks, A. Hinnen et G.R. Fink, «Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology», 43, 1305, 1979)

— pJDB110, pJDB207, pJDB209, pJDB210 et pJDB211
(voir: J.D. Beggs, «A. Benzon Symposium», 16, 383, 1981)
— pJDB219

(voir: J.D. Beggs, «A. Benzon Symposium», 16, 383, 1981); C.P. Hollenberg, «Curr. Top. Microbiol. Immunol.», 96, 119, 1982; A. Toh-E, P. Guerry-Kopecko et R.B. Wickner, «J. Bacteriol.», 141, 413, 1980; R. M. Walsley, D.C.J. Gardner and S.G. Oliver, «Mol. Gen. Genet.», 192, 361, 1983)

— G9

10 (voir: C. Gerbaud, P. Fournier, H. Blanc, M. Aigle, H. Heslot and M. Guérineau, «Gene», 5, 233, 1979)

— YEp13

(voir: C.L. Hsiao et J. Carbon, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 78, 3760, 1981)

15 — YEp4

(voir: K. Struhl, D.T. Stinchcomb, S. Scherer et R.W. Davis, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 76, 1035, 1979)

Afin de confirmer directement, si besoin en était, le caractère d'instabilité d'une culture témoin transformée par le plasmide

20 pJDB207, en tous points semblable au plasmide pDIU202 sinon qu'il est dépourvu du fragment de 1,5 kb responsable de la résistance au Diuron et que par conséquent il ne se prête pas à la mise en œuvre d'une pression de sélection positive par l'ajout de cet herbicide au milieu de culture, nous avons réalisé l'expérience suivante.

25 Des cultures liquides sériées de la souche AH22 de *Saccharomyces cerevisiae*, préalablement transformée au moyen du vecteur pJDB207 comme décrit dans l'exemple 2, ont été réalisées suivant un protocole en tous points semblable à celui décrit ci-dessus, sinon que le milieu n'était pas additionné de Diuron, et les prélèvements ont
30 été réalisés à des moments correspondant aux temps de génération suivants: 0, 13, 26, 38, 51 et 66. Des révertants auxotrophes pour la leucine ont effectivement été observés dès la 26^e génération (2%), et avec une fréquence croissante: 38 générations (4%), 51 générations (6%), 66 générations (20%). Ces résultats confirment bien que le
35 procédé de culture sélective faisant l'objet de la présente invention garantit effectivement la stabilité génétique d'une population de levures transformées par la mise en jeu d'une pression de sélection positive exercée par un herbicide en faveur des cellules hébergeant un plasmide porteur d'un gène de résistance intrinsèque vis-à-vis de
40 cet herbicide.