

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 874 620**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **04 09157**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 15/10 (2006.01), C 12 N 15/63, C 12 Q 1/68,  
C 12 P 19/34

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 27.08.04.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 03.03.06 Bulletin 06/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BIOMETHODES Société à responsa-  
bilité limitée — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : DELCOURT MARC.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

⑤4 PROCÉDE DE MUTAGENESE DIRIGEE SYSTEMATIQUE.

⑤7 La présente invention concerne le domaine de la bio-  
logie moléculaire et plus particulièrement celui de la muta-  
genèse. Elle a pour objet un procédé de mutagenèse  
dirigée à saturation, présentant des améliorations notables  
par rapport aux procédés selon l'art antérieur. Dans un  
mode de réalisation particulier, le procédé selon l'invention  
permet la constitution d'une collection réunissant tous les  
mutants dirigés simples d'une protéine, lesdits mutants  
étant individualisés et répertoriés. Dans un autre mode de  
réalisation, le procédé selon l'invention permet d'obtenir ra-  
pidement des mutants améliorés d'une enzyme, d'une pro-  
téine thérapeutique, ou de n'importe quelle protéine  
d'intérêt économique.

FR 2 874 620 - A1



## Procédé de mutagenèse dirigée systématique

La présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire et plus particulièrement celui de la mutagenèse dirigée.

5

La mutagenèse dirigée est une technique visant à modifier artificiellement la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN, dans le but de modifier l'activité biologique qui en découle.

10 Elle vise à introduire dans un gène recombinant une ou quelques mutations de nature et de position connues, qui peuvent être soit des délétions (élimination d'un ou plusieurs nucléotides du fragment d'ADN d'intérêt), soit des insertions (ajout de nucléotides), soit des substitutions (remplacement d'une ou de plusieurs bases par un nombre différent ou identiques de bases de nature différente). Le plus souvent, la  
15 mutagenèse dirigée est utilisée pour introduire des substitutions d'une à trois bases constitutives d'un même codon par un même nombre de bases de nature différente, de façon à respecter la phase de lecture.

Un oligonucléotide est utilisé pour introduire cette ou ces mutations. Cet  
20 oligonucléotide est classiquement constitué de vingt à quarante-cinq bases homologues à la région ciblée et contenant au niveau de sa partie centrale la ou les mutations projetées.

Cet oligonucléotide est utilisé pour amorcer une réaction de réplication (ou d'amplification, c'est-à-dire de multiples réplifications) en utilisant comme matrice une molécule d'ADN porteuse de la séquence ciblée. La séquence nouvellement synthétisée  
25 contient alors la modification recherchée.

Les premières techniques de mutagenèse dirigée étaient basées sur l'amplification d'un fragment d'ADN linéaire, qui devait ensuite être introduit dans un plasmide par un procédé intégrant des étapes de clivage par des enzymes de restriction, puis de ligation double brin. Ces étapes techniques sont classiquement associées à des aléas spécifiques  
30 au vecteur, à l'insert, et aux enzymes de restriction utilisées. Ces aléas se sont révélés nécessiter pour leur traitement une quantité d'efforts trop importante pour que ces technologies puissent être utilisées en routine, notamment lorsqu'un nombre important de mutants dirigés est recherché.

Plus récemment, l'oligonucléotide mutant a été utilisé pour amorcer la réplication  
35 circulaire du plasmide contenant le fragment d'ADN d'intérêt, ce qui permet d'éliminer cette étape de ligation double brin. Cependant, une étape de sélection est nécessaire pour isoler les molécules ayant effectivement intégré la mutation des molécules d'ADN de

départ. Cette étape de sélection des molécules mutantes peut reposer sur l'utilisation d'organismes particuliers, comme la souche bactérienne ung- (Kunkel TA, Bebenek K, McClary J. *Methods Enzymol.* 1991;204:125-39.), ou le phage M13. Elle peut aussi être basée sur l'introduction simultanée d'une seconde mutation, co-ségrégeant avec la première et sélectionnable sur un critère de résistance aux antibiotiques (EP 0938552), ou de modification d'un site de restriction unique (Catalogue Clontech 2000, page 45 ; Deng et Nikoloff *Analytical Biochemistry* 1992 200 :81-88 ; Zhu, L *Methods in Molecular Biology* Vol57 :13-29). Ces approches sont maintenant obsolètes parce qu'elles conservent des éléments spécifiques (à la souche utilisée dans le premier cas, aux vecteurs utilisés dans les deux derniers).

On a alors recherché des technologies de mutagenèse universelles, c'est-à-dire permettant d'introduire n'importe quelle mutation, dans n'importe quel vecteur, en utilisant n'importe quelle souche bactérienne. L'approche aujourd'hui la plus répandue est basée sur les différences de méthylation entre l'ADN synthétisé dans des bactéries (méthylé) et l'ADN synthétisé *in vitro* (non méthylé). Un système de criblage basé sur ce critère a été mis au point et est maintenant généralisé. Il s'agit d'utiliser l'enzyme DpnI, spécifique de sites présents sur l'ADN méthylé, mais pas sur l'ADN non méthylé (Lacks et al., 1980, *Methods in Enzymology*, 65 :138). Les enzymes NanII, NmuDI et NmuEI peuvent également être utilisées pour remplir le même objectif, ainsi que, probablement, d'autres enzymes analogues restant à découvrir. Dans la suite du texte, seule l'enzyme DpnI est citée, parce que cette enzyme est la plus utilisée : elle est substituable par n'importe laquelle de ces enzymes analogues. Dans une réaction de mutagenèse par extension circulaire d'un oligonucléotide hybridé sur un plasmide, ces enzymes digèrent les brins parentaux (produits *in vivo* par les bactéries, méthylés), mais pas les brins synthétisés lors de la réaction de mutagenèse, non méthylés. La digestion en utilisant ces enzymes a donc pour effet d'augmenter la fréquence de molécules mutantes en éliminant les brins parentaux non mutants. L'effet de ces enzymes sur les espèces moléculaires dont les deux brins sont identiques est clair ; mais leur action sur les molécules d'ADN dont un seul des deux brins est méthylé, - l'autre ayant été synthétisé *de novo* -, n'a pas été élucidée de façon aussi définitive. Il est cependant probable que ces molécules, parfois appelés « hétéroduplexes », ne puissent pas être digérées efficacement par les enzymes DpnI, NanII, NmuDI ou NmuEI. Or, lorsque l'on utilise un seul oligonucléotide mutant, les hétéroduplexes sont sensés constituer le groupe majoritaire (la mutation recherchée n'est présente que sur un seul des deux brins). Après digestion par une des enzymes précédemment citées, on s'attendrait à avoir une importante fréquence de mutagenèse (50%). Cependant, cette efficacité reste faible et le plus souvent comprise entre 1 et 10% de molécules mutantes, selon les cas. Ce faible taux de mutants est notamment dû au fait

qu'à l'issue de la réaction de mutagenèse, les hétéroduplexes sont introduits dans des bactéries contenant un système de réparation de l'ADN, qui utilise le brin méthylé (et donc non mutant) comme matrice à copier. Ce système de réparation aboutit donc à la correction de la mutation introduite, et à une importante perte de rendement de mutagenèse.

Pour améliorer l'activité de mutagenèse, l'utilisation d'un second oligonucléotide, destiné à synthétiser le deuxième brin, est préconisée.

Ce second oligonucléotide peut être non mutant, et localisé au niveau d'une région différente de la région à muter (EP 96942905; WO 9935281).

Alternativement, le second oligonucléotide peut être réverse complémentaire du premier, et contenir alors, également, la mutation. C'est cette dernière approche qui donne les meilleurs rendements de mutagenèse et qui est à la base du procédé Quickchange (Stratagene 2003 référence #200518). Ce procédé est devenu ces dernières années la référence en terme de mutagenèse, en raison de son rendement inégalé.

Dans tous ces cas, il est possible, pour augmenter les rendements de mutagenèse, de faire en sorte que chaque brin néosynthétisé se ligue sur l'extrémité 5' de l'oligonucléotide ayant servi à en initier la synthèse. Il faut dans ce cas ajouter une ligase thermostable à la réaction, et phosphoryler les oligonucleotides (en utilisant une kinase, ou encore par voie chimique).

D'une façon générale, on considère aujourd'hui que les techniques de mutagenèse existantes permettent d'obtenir en routine des taux d'au moins 50% de molécules mutantes, le complément étant constitué de molécules de type sauvage.

Parmi les molécules mutantes, il est possible qu'une mutation additionnelle ait été incorporée. Ces mutations additionnelles peuvent avoir deux origines :

- l'imperfection des oligonucléotides. La pureté des oligonucléotides suit généralement la formule  $0,995^{\text{exp}N}$ , où N est le nombre des bases le composant. Cette formule traduit le fait que le rendement à chaque étape est d'environ 99,5%. Dans les 0,5% des cas où une étape se passe de façon erronée, c'est le plus souvent une délétion qui est introduite (l'étape se passe de façon inefficace), ou une insertion (traduisant une fuite de réactif dans une électrovanne du synthétiseur d'oligonucléotide). Pour un oligonucléotide de 43 bases, le taux de pureté est donc d'environ 80%. Les 20% de molécules mutantes ayant incorporé un oligonucléotide contenant une erreur sont généralement d'activité nulle, car l'insertion ou la délétion induit un changement de cadre de lecture.

- les erreurs de réplication de la polymérase. Les polymérases thermostables ont une fidélité de réplication imparfaite, et les séquences amplifiées en les utilisant contiennent parfois des erreurs (le plus souvent des substitutions d'un seul nucléotide). Pour pallier cette imperfection, des polymérases particulièrement fidèles (parce que possédant une activité exonucléase de 3' vers 5') ont été isolées et sont disponibles commercialement. Cette amélioration est réelle, mais il reste un taux d'erreur résiduel dans les amplifications menées en les utilisant : un pourcentage non nul des molécules amplifiées contiennent encore, généralement, une ou plusieurs mutations indésirables.

5  
10 En résumé, on peut considérer de façon très schématique que le tube contenant la réaction de mutagenèse contient 50% de molécules de type parental, 45% de molécules ayant intégré la mutation de façon satisfaisante, et 5% de molécules ayant intégré la mutation recherchée, mais également une ou plusieurs mutations additionnelles.

15 Ce mélange de clones ne peut pas être utilisé tel quel pour tester l'effet de la mutation. Dans le cas où la mutation est négative, la présence de clones de type sauvage masquerait cet effet. Dans le cas où la mutation est positive, elle le diluerait.

20 Ces éléments (rendement partiel et présence de mutations indésirables), rendent nécessaire d'isoler, parmi ce mélange, un clone en particulier porteur de la mutation recherchée, et d'aucune mutation additionnelle. Il est ainsi nécessaire de transformer la réaction de mutagenèse dans des bactéries compétentes, d'étaler sur milieu solide, d'isoler et d'étudier un nombre suffisant de clones (généralement deux ou trois) par séquençage, afin d'en isoler un présentant effectivement les caractéristiques recherchées.

25 La mutagenèse dirigée est une approche technologique très puissante. Sa limite principale réside dans son débit et son coût. En effet, il n'est guère possible de générer plus quelques mutants dirigés par jour et par personne, avec un coût en réactifs d'environ 50€ (deux oligonucléotides à 10€ chacun, une réaction de kit (par exemple kit Stratagene Quickchange®) à 10€, deux réactions de séquence à 10€ chacune).

30 Certaines des techniques de mutagenèse dirigée peuvent être dérivées de façon à effectuer de la « mutagenèse à saturation ». Cette approche consiste à utiliser des oligonucléotides pour introduire au niveau d'un codon ciblé non pas une unique substitution, mais un ensemble de mutants contenant les 64 codons possibles, ou un sous-ensemble de ces 64 codons.

35 La mutagenèse à saturation est principalement basée sur l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés. Lors de la synthèse des oligonucléotides, il est facile de

créer une dégénérescence à n'importe quel endroit de la séquence de l'oligonucléotide. Au niveau de la position souhaitée, on utilise alors non pas une base unique, mais un mélange équimolaire de plusieurs bases. Dans une séquence, on note conventionnellement N le mélange équimolaire des quatre bases. Par exemple, ATN correspond à 25% de ATA, 25% de ATT, 25% de ATG et 25% de ATC. Un oligonucléotide contenant deux positions dégénérées est en fait constitué d'un mélange équimolaire de 16 oligonucléotides. Un oligonucléotide avec trois positions dégénérées N est constitué d'un mélange équimolaire de 64 oligonucléotides. Ces oligonucléotides incluant des bases dégénérées sont généralement vendus par les sociétés spécialisées dans la synthèse d'oligonucléotides sans surcoût.

Les oligonucléotides contenant un codon totalement dégénéré (NNN) permettent d'introduire en un point une diversité maximale, c'est-à-dire les 64 codons possibles. A partir de ces 64 codons possibles seront traduits les 19 acides aminés substituants possibles.

L'introduction des oligonucléotides dégénérés peut être réalisée en utilisant à peu près n'importe laquelle des techniques de mutagenèse dirigée précédemment décrites. Il a cependant été noté que la technique Quickchange® ne s'adaptait pas bien à cette approche.

Par rapport à la mutagenèse dirigée, la mutagenèse à saturation permet de réduire sensiblement le travail à mener pour obtenir une molécule mutante : plusieurs mutants à saturation peuvent être générés en un jour par une seule personne, ce qui correspond à chaque fois à 19 mutants différents. Toutefois, ce gain en efficacité n'est obtenu qu'au prix d'un certain nombre de concessions techniques :

- Chacun des 19 acides aminés est intégré à des fréquences diverses en raison de la dégénérescence du code génétique. Ainsi la Sérine est-elle intégrée 6 fois plus souvent que le Tryptophane, et 2 fois plus souvent que l'Acide Aspartique. Il sera nécessaire de fournir des efforts importants avant d'isoler les mutants correspondant à des acides aminés représentés seulement une ou deux fois.
- Dans 3 cas sur 64, un codon STOP est intégré : environ 5% (3/64) des clones produits sont simplement sans intérêt.
- Une partie importante des codons introduits sont des codons minoritairement représentés dans l'organisme choisi pour l'expression des molécules mutantes. Ces codons minoritairement représentés sont généralement défavorables à l'expression, et peuvent compliquer l'analyse en masquant une mutation positive.

Une solution pour minimiser ces imperfections consiste à utiliser des oligonucléotides partiellement dégénérés, c'est-à-dire constitués de codons de type

NNG/T (encore notés NNK) ou NNG/C (encore notés NNS) au niveau du codon à modifier. Ce type de dégénérescence constitue le codon minimal réalisable avec des bases dégénérées, et permettant d'introduire les 19 acides aminés. Les différences de représentation d'un acide-aminé à l'autre sont atténuées (rapport 3 au maximum au lieu d'un rapport de 6 dans le cas des codons NNN). La fréquence des codons STOP est légèrement diminuée (1 codon sur 32 au lieu de 3 sur 64). L'effet sur la qualité des codons en terme d'expression n'est pas général, et dépend de l'organisme utilisé pour l'expression. En résumé, ces codons de type NNS ou NNK apportent des améliorations si on les compare aux codons de type NNN, mais restent porteur d'une dégénérescence (dégénérescence de 32 codons vers 20 acides aminés), et introduisent des codons STOP et des codons peu favorables à l'expression. L'essentiel des travaux de mutagenèse à saturation est maintenant réalisé en utilisant des codons de type NNS ou NNK (revue récente de Georgescu et al. 2003, *Methods in Molecular Biology* vol 231 :75-83).

L'utilisation des oligonucléotides de type NNN, NNK ou NNS reste donc imparfaite. Une solution alternative permet d'introduire, au niveau du codon mutant de chaque oligonucléotide, uniquement les 20 codons souhaités, c'est-à-dire chacun des 20 codons préférentiellement utilisés par l'organisme dans lequel seront exprimés les mutants. Deux techniques peuvent être utilisées pour synthétiser ces oligonucléotides : la première est basée sur le fractionnement des colonnes de résine pendant le déroulement de la synthèse d'oligonucléotides (US 20030175887). Elle est fastidieuse, et n'est pas adaptée à la synthèse d'un grand nombre d'oligonucléotides. Dans une seconde approche, les 20 triplets de nucléotides sont individuellement synthétisés par procédé chimique sous forme de phosphoramidites. Les vingt trinuécléotides sont ensuite réunis dans un mélange utilisable sur un synthétiseur d'oligonucléotides (au même titre que n'importe quel phosphoramidite de nucléotide simple). Le brevet US 5,869,644 décrit la synthèse de tels oligonucléotides pour la biologie moléculaire. Le brevet US 6,436,675 décrit l'utilisation de tels oligonucléotides dans un contexte de recombinaison par synthèse de gène. Les phosphoramidites-trinucléotides restent cependant très complexes à synthétiser, et coûtent excessivement cher. De ce fait, leur valeur ajoutée par rapport aux codons de type NNS ou NNK est généralement jugée insuffisante pour valoir le surcoût

La mutagenèse dirigée, simple ou à saturation, connaît deux grandes applications :

- o La première application est l'évolution moléculaire. Dans ce cas, des molécules mutantes présentant des propriétés améliorées sont recherchées.

- La seconde application est la cartographie fonctionnelle. Dans cette approche, la mesure de l'activité des mutants permet de mieux comprendre le fonctionnement précis de la protéine étudiée.

L'état de l'art des techniques de mutagenèse dirigée dans le contexte de chacune  
5 de ces deux applications va être décrite dans les paragraphes suivants.

Le premier grand champ d'application de la mutagenèse dirigée est donc l'évolution moléculaire, c'est-à-dire l'amélioration des protéines, et principalement l'amélioration des enzymes et des protéines thérapeutiques.

10 L'amélioration des enzymes est d'un intérêt économique majeur : en effet, de très nombreuses enzymes industrielles sont utilisées dans différents procédés, - comme la synthèse d'antibiotiques ou de vitamines, la fabrication de bière, le traitement des textiles -, ou dans des produits aussi divers que les lessives ou l'alimentation pour le bétail (Turner et al. Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):474-8). L'amélioration des enzymes  
15 permet de réduire les coûts des procédés correspondants, ou permet d'en mettre en œuvre de nouveaux. Enfin les enzymes permettent aujourd'hui de remplacer certains procédés chimiques lourds et polluants par des procédés beaucoup plus respectueux de l'environnement (on parle de chimie verte).

Les paramètres à améliorer sont variés. Par exemple, et sans que cela soit  
20 exhaustif, on peut, par évolution moléculaire, obtenir une enzyme qui a un turn-over extrêmement élevé (Griffiths AD et al., EMBO J. 2003, 22(1):24-35); obtenir une enzyme qui a une thermostabilité accrue (Baik SH et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2003, 61(4):329-35) ; obtenir un peptide qui se lie avec une forte affinité à un ligand donné (Lamla T et al., J Mol Biol. 2003, 329(2):381-8) ; créer *in vitro* un anticorps contre à peu  
25 près n'importe quel ligand, pour une utilisation en diagnostic (Azzazy HM et al., Clin. Biochem. 2002, 35(6):425-45) ; créer un ribozyme avec une nouvelle activité catalytique (McGinness KE et al., Chem Biol. 2002, 9(5):585-96 ; Sun L. et al., Chem. Biol. 2002, 9(5):619-28). Il est parfois souhaitable d'améliorer plusieurs paramètres : par exemple on peut obtenir, par évolution moléculaire, une enzyme à la fois résistante à la chaleur et à  
30 l'oxydation (Oh KH. et al., Protein Eng. 2002, 15(8):689-95) ou élargir la gamme de pH dans laquelle l'enzyme est efficace tout en augmentant son activité (Bessler C. et al. Protein Sci. 2003 Oct;12(10):2141-9).

Dans le domaine des protéines thérapeutiques, l'obtention de protéines mutantes ayant des propriétés nouvelles est également d'un intérêt économique et thérapeutique  
35 majeur (Vasserot AP et al., Drug Discov Today. 2003, 8(3):118-26). L'isolement d'EPO mutant ayant une durée de vie prolongée ou d'insuline à effet retard constituent des exemples de succès dans l'obtention de nouvelles générations de protéines

thérapeutiques par mutagenèse. Parmi les protéines thérapeutiques qu'il serait intéressant d'améliorer, on peut notamment citer les hormones, les cytokines, les interférons, les vaccins, et les anticorps.

5 Dans ce contexte général de la recherche de mutants présentant des propriétés nouvelles ou améliorées, la mutagenèse constitue une première étape et permet de créer de la diversité. Dans une seconde étape, cette diversité est criblée en utilisant un test fonctionnel, afin d'isoler une molécule mutante codant pour une protéine améliorée. Cet événement est généralement rare, et un nombre important de molécules mutantes doivent être analysées avant d'obtenir une molécule améliorée.

10 L'évolution moléculaire d'enzymes ou de protéines thérapeutiques est souvent menée en utilisant des procédés permettant la génération d'un grand nombre de mutants contenant chacun plusieurs mutations. Les techniques existantes sont notamment la PCR mutagène (la PCR mutagène ou 'error-prone PCR' est revue dans Cirino PC et al. *Methods Mol Biol.* 2003;231:3-9 ; *Leung, D.W., et al. (1989) Technique 1: 11-15;*  
15 *Cadwell, R.C. and Joyce, G.F. (1992) PCR Methods Appl. 2: 28-33.*), la recombinaison génique (Brevet Maxygen US 6 132 970 ; Stemmer WP et al. *Nature.* 1994 Aug 4;370(6488):389-91; Aguinaldo AM, et al. *Methods Mol Biol.* 2002;192:235-9 ; Zhao H et al. *Nat Biotechnol.* 1998 Mar;16(3):258-61.) ; Shao, Z et al. *Nucleic Acids Res.* 26 (2): 681-683 ; Kawarasaki Y et al. *Nucleic Acids Res.* 2003 Nov 1;31(21):e126 ; brevet  
20 *Diversa US 5 965 408 ; Brevet Proteus WO 00 09 679 ; Brevet Alligator WO 02 48 351*), ou la mutagenèse massive (Delcourt et Blésa, WO/0216606). Ces techniques de mutagenèse ont l'avantage de permettre de récupérer des banques contenant un très grand nombre de mutants différents en un temps réduit.

Toutefois, le recours à la mutagenèse dirigée simple est également possible. Dans  
25 certains cas, les connaissances structurales et fonctionnelles de la protéine étudiée permettent de pointer une ou quelques mutations à introduire en particulier. Les quelques mutants correspondant sont alors réalisés et testés, dans l'espoir qu'ils correspondent effectivement aux améliorations recherchées. Des succès ont été obtenus dans ce contexte (Muller et al, *Chembiochem* 2001 2 :517 par exemple). Dans d'autres cas, au  
30 contraire, les connaissances sur la protéine d'intérêt sont faibles : l'ensemble des 19 mutations simples peut alors être réalisé sur certaines positions ou sur l'ensemble de la molécule. (Savino et al, *P.N.A.S* 1993 90 :4067-71 ; Airaksinen et al, *Nucleic Acid Res.* 1998 26 :576 ; brevets US6,562,594 et US6,171,820 (Diversa) ; US6,180,341 (université du Texas) ; Maynard JA et al. *Methods Mol Biol* 2002 182:149-63.

35 La mutagenèse à saturation telle qu'elle est décrite dans tous ces documents implique que pour chaque position ciblée, les 19 substitutions possibles soient introduites, simultanément, c'est-à-dire dans un seul tube et au moyen d'un oligonucléotide dégénéré.

Les mutants sont donc mélangés dans ce tube, sous la forme d'une « microbanque » contenant des molécules d'ADN différant entre elles au niveau d'un seul codon. Cette microbanque est destinée à être transformée dans des bactéries compétentes. Les clones obtenus sont ensuite repiqués, et les tests fonctionnels sur chacun de ces clones sont effectués. L'ensemble de ces opérations est effectué en aveugle, c'est-à-dire que l'expérimentateur ne connaît pas l'identité précise de chacun des clones lorsqu'il réalise ces manipulations. Si des clones présentent des activités particulières, ils sont ensuite pleinement caractérisés, et notamment séquencés de façon à identifier leur nature précise.

10 Cette approche de criblage en aveugle connaît des limitations. Tout d'abord, il est nécessaire de surcribler la banque, de façon à maximiser les chances d'avoir testé l'ensemble des espèces moléculaires présentes dans le tube. Chacune d'elle étant présente un grand nombre de fois dans le tube, on se place ici, du point de vue probabiliste, dans le contexte d'un tirage avec remise. La formule décrivant la probabilité d'avoir testé, après  $t$  tirages,  $P(t)$  des  $N$  espèces moléculaires présentes dans la banque est alors la suivante :

$$P(t) = N [ 1 - ((N-1)/N)^t ]$$

20 Dans l'exemple d'une mutagenèse à saturation aboutissant à la génération des 20 acides aminés, on aura testé :

12,8 espèces moléculaires différentes après 20 tests en aveugle

17,5 espèces moléculaires différentes après 40 tests en aveugle

19,1 espèces moléculaires différentes après 60 tests en aveugle

19,7 espèces moléculaires différentes après 80 tests en aveugle

25 19,9 espèces moléculaires différentes après 100 tests en aveugle

Après un surcriblage de la banque d'un facteur 3 (soit dans cet exemple après 60 tests en aveugle), on s'aperçoit que l'essentiel des molécules ont été criblées d'après ces simples calculs de probabilités. Cette valeur (surcriblage de la banque d'un facteur 3), est relativement invariable quel que soit  $N$ . Elle peut paraître satisfaisante, mais en réalité, elle ne tient pas compte de trois facteurs supplémentaires :

30 - Dans l'ensemble de la littérature, les oligonucléotides utilisés pour générer la diversité sont de type NNN, NNS, ou NNK, ce qui correspond respectivement à 64, 32, et 32 espèces moléculaires génétiques différentes, présentes en fréquence théoriquement identiques. Le surcriblage de la banque doit être calculé par rapport à cette diversité génétique, et non par rapport à la diversité protéique. Ainsi, ce ne sont plus 60 clones qu'il faut cribler pour surcribler la

banque d'un facteur 3, mais 96 dans le cas où les oligonucléotides introduisant une cassette NNS ou NNK sont utilisés.

- La présence résiduelle, dans la banque, de clones de type sauvage, doit être considérée. Les techniques de mutagenèse ont un rendement pouvant parfois être élevé, mais n'étant pas total. Si le taux résiduel de clones sauvage est de 50%, par exemple, le facteur de surcriblage de la banque devra être augmenté d'un facteur 2.
- En pratique, des biais d'incorporations sont observées dans de telles microbanque. Certaines des 32 espèces moléculaires peuvent être présentes plus fréquemment que les autres. Ces biais sont notamment la conséquence du fait que parmi les 32 oligonucléotides présents dans le tube d'oligonucléotides dégénéré, certains diffèrent de la séquence cible par trois nucléotides, d'autres par deux, d'autres encore par un seul, et, dans certains cas, une séquence est rigoureusement homologue. Les affinités avec la matrice de ces différentes molécules sont très différentes, et s'incorporent donc avec des fréquences variables. Il est également possible que, une fois l'oligonucléotide intégré dans la séquence, l'efficacité des systèmes de réparation soit d'autant meilleure que le mésappariement est important, ce qui constituerait une seconde source de biais en défaveur des mutations constituée de plusieurs nucléotides contigus. Selon la technique de mutagenèse utilisée, ces biais sont plus ou moins importants.

En résumé, nous avons vu ici que, pour des raisons probabilistes, si la banque était parfaite, il serait nécessaire de la surcribler d'un facteur 3 environ pour pouvoir cribler l'ensemble des espèces moléculaires la composant. En réalité, trois raisons principales font que ce taux devrait être augmenté : la dégénérescence de la diversité génétique par rapport à la diversité protéique, le taux de molécule sauvage résiduel, et les biais d'incorporation introduits lors de l'étape de mutagenèse. Ces trois facteurs rendent nécessaire l'augmentation de ce taux de surcriblage à une valeur généralement comprise entre 10 et 20 fois la diversité protéique de la microbanque. Ainsi, dans l'exemple 5 du brevet 6,171,820 (Diversa), et dans l'article Garrett et al., Applied and Environmental Microbiology 2004, 70 :3041-3046, de la même équipe, le facteur de surcriblage est égal ou supérieur à 10 par rapport à la diversité protéique.

En définitive, la réalisation d'une approche de mutagenèse à saturation de tous les résidus d'un gène se positionne dans un contexte de criblage à haut débit. En effet, pour un gène de 300 codons, - ce qui représente une taille moyenne -, le surcriblage d'un

facteur 10 mène à une banque composée de 300x200, soit environ 60 000 clones individuels à tester (ne contenant que 19x300, soit moins de 6 000 clones différents).

Cette situation de haut débit possède des limitations intrinsèques, qui tiennent à la variabilité des mesures. En effet, le criblage d'un si grand nombre de clones ne peut dans  
5 un premier temps se faire qu'au moyen d'une seule mesure, en utilisant un équipement automatisé. L'écart type naturel du test de criblage étant le plus souvent supérieur à 10% du signal, seuls les clones présentant un accroissement très important de ce signal (au moins 30%) devront être sélectionnés. En effet, si l'on place le seuil de sélection à un  
10 niveau plus bas, le nombre de clones n'étant pas réellement porteur d'une amélioration, mais donnant lieu sur une unique mesure à une valeur supérieure à la normale devient trop important en termes statistiques. Le nombre de clones faux-positifs qu'il faudra alors étudier plus précisément, dans un cadre de criblage secondaire classiquement plus difficile à automatiser, représente alors une quantité de travail très importante.

Il est donc nécessaire de maintenir ce seuil de sélection à un niveau élevé, mais  
15 cette situation présente deux inconvénients : d'une part, les clones présentant un niveau d'augmentation du signal modeste mais réel ne sont pas sélectionnés. Ces clones peuvent pourtant présenter un intérêt économique réel, notamment si ces mutations, une fois combinées sur une seule molécule, sont fonctionnellement additives. D'autre part, des clones intrinsèquement très positifs peuvent présenter, sur une unique mesure, un  
20 niveau de signal insuffisant pour qu'ils soient sélectionnés. Ces clones faux négatifs constituent là encore une limitation dans la mesure où ils peuvent représenter une importante déperdition scientifique et économique.

En résumé, on comprend bien que l'approche de criblage en aveugle des  
microbanques de mutagenèse à saturation s'inscrit dans une logique de criblage à haut  
25 débit, associée à un fort taux de faux positifs et de faux négatifs, ces imperfections ne permettant d'identifier que les clones présentant des améliorations majeures.

Une approche permettant de réduire le taux de surcriblage nécessaire pour cribler  
l'ensemble des mutants composant la banque est utile à l'homme du métier : elle permet  
soit de diminuer le nombre de tests à réaliser, soit de conserver le même nombre de  
30 tests, mais d'obtenir alors des résultats d'une fiabilité supérieure.

D'autre part, si le facteur de surcriblage devient faible, il devient envisageable  
économiquement, non plus de cribler en aveugle les microbanques de mutants, mais de  
les séquencer en aveugle, de façon à obtenir rapidement et économiquement la totalité  
des mutants dirigés simples, individualisés et caractérisés préalablement à toute étape de  
35 mesure de leur activité. Cette approche présenterait un intérêt indéniable. Le criblage de l'ensemble des mutants ne se ferait plus par criblage en aveugle, mais d'une façon plus complète en réalisant non plus une seule mesure, mais plusieurs. Ces mesures répétées,

dont la première fonction sera de réduire la variabilité statistique, pourront éventuellement correspondre à une gamme, c'est-à-dire à une série de mesures dans lequel un paramètre (la concentration en substrat, la température, le pH...) est variable. Dans ce contexte, le taux de faux négatifs et de faux positifs sera nul ou extrêmement réduit, ce qui permettra d'isoler l'ensemble des mutants présentant les améliorations recherchées, même si l'effet est modeste. Cette approche apporterait également la certitude d'avoir effectivement étudié l'ensemble des mutants visés.

Le deuxième grand champ d'application de la mutagenèse dirigée est la cartographie fonctionnelle de protéines. Dans cette approche, sont recherchées les mutations associées à une diminution de l'activité biologique. Cette démarche s'inscrit le plus souvent dans le cadre de recherches en amont sur les relations entre la structure et la fonction des protéines, et a plus particulièrement pour objectif l'identification des résidus directement impliqués dans l'activité de la protéine étudiée. Cette approche n'est le plus souvent pas associée à une application industrielle immédiate, mais la caractérisation précise des protéines peut participer à des découvertes menant à des applications ayant un intérêt économique. Notamment, la caractérisation fonctionnelle précise de cibles thérapeutiques, dans le but de contribuer à identifier des molécules chimiques ou biologiques susceptibles de les activer ou de les inhiber, est un domaine de recherche dans lequel la génération de mutants peut se révéler d'un intérêt majeur.

Si la modification d'un acide aminé entraîne la perte de l'activité biologique, il est probable qu'il intervienne dans la constitution du site actif la supportant. Cette conclusion doit cependant être considérée avec beaucoup de circonspection. Il est alternativement possible que cet acide aminé n'intervienne pas directement dans le site actif supportant l'activité biologique étudiée, mais qu'il prenne part à des activités annexes (comme l'adressage intracellulaire de la protéine par exemple), ou encore que la modification introduite à son niveau déstabilise l'ensemble de la protéine, l'effet de la substitution introduite étant alors indirect, et non direct.

Il est alors important de savoir reconnaître les motifs supportant les activités d'adressage, de localisation membranaire, de liaison de cofacteurs... D'autre part, il est essentiel que les modifications introduites induisent le moins de déstabilisation possible de la structure secondaire de la protéine. C'est pour cela que, le plus souvent, c'est l'alanine qui est introduite en substitution des acides aminés d'origine. Ce petit acide aminé est connu pour conserver la majorité des structures secondaires protéiques (Hélice alpha ou feuillet bêta), pour ne pas entraîner d'importante modification stérique ni électrique, et donc pour minimiser les déstabilisations globales des protéines.

Les travaux menés dans ce domaine impliquent la création d'un grand nombre de mutants ponctuels comportant chacun la substitution d'un acide aminé par une alanine. Ces molécules mutantes sont ensuite destinées à être étudiées individuellement au moyen de tests fonctionnels, pour mesurer l'effet de la substitution introduite. Plusieurs  
5 centaines d'articles ont été publiés qui utilisent cette technique. Le principe de l'alanine scanning, l'intérêt et les limites de cette stratégie sont présentes notamment dans les revues de DeLano WL. (Curr Opin Struct Biol. 2002 Feb;12(1):14-20 ) et de Morrisson KL et al. (Curr Opin Chem Biol. 2001 Jun;5(3):302-7) ; la base de données ASEdb centralise de nombreux résultats d'alanine scan (Thorn KS et al. Bioinformatics. 2001  
10 Mar;17(3):284-5). Dans certain cas, les acides aminés sont remplacés systématiquement par des cystéines et non par des alanines (Tamura N et al. Curr Opin Chem Biol. 2003 Oct;7(5):570-9 ; Winkler HH et al. Biochemistry. 2003 Nov 4;42(43):12562-9).

De plus en plus, le choix de l'alanine comme résidu universel permettant de réaliser la cartographie fonctionnelle d'une protéine est remis en cause. D'une part, cette  
15 approche sous-entend que les résidus alanine présents naturellement dans les protéines sauvages ne participent jamais de façon directe à l'activité de la molécule. D'autre part, le postulat selon lequel les substitutions vers une alanine n'entraînent pas d'effet à distance ne semble pas avoir une valeur si générale. Dans Olins et al (J.Biol. Chem. 1995 :270 :23754-60), les auteurs ont effectué un grand nombre de substitutions  
20 ponctuelles d'un gène, et arrivent à la conclusion qu'une partie des résultats concernant les substitutions alanine ne concordent pas vraiment avec le dogme de sa neutralité.

Il semble intéressant de considérer, dans un but de caractérisation d'une protéine, de mener à bien la génération de tous les mutants simples d'une protéine. Dans cet esprit, Christ D et al. ont récemment décrit une approche faisant appel à de la  
25 mutagenèse semi-aléatoire (Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 22) dans le but de caractériser une protéine, et non d'en isoler des mutants possédant des caractéristiques améliorées.

Cependant, une telle activité de synthétiser tous les mutants simples d'une protéine, dans le but de la caractériser, n'a pas été réalisée à ce jour, même si Olins et al  
30 (JBC 1995) ont tout de même réussi à obtenir une série de 770 mutants séquencés, soit en moyenne environ 7 mutants par position sur un gène de 105 résidus. La récupération des mutants manquants à la collection n'a pas été menée en raison des obstacles statistiques soulevés précédemment : pour les récupérer tous, il aurait été nécessaire de se lancer dans une approche de surcriblage économiquement impossible.

35 Les techniques actuelles n'ont pas permis d'isoler la totalité ni la majorité des mutants simples d'une protéine, dans une collection où chaque mutant est individualisé et séquencé.

En résumé de l'ensemble de cette partie introductive : la mutagenèse est un outil qui permet d'obtenir des molécules améliorées ayant un intérêt économique, tout particulièrement dans le domaine de la biocatalyse (enzymes industrielles) et dans celui de la médecine (protéines thérapeutiques). La mutagenèse est également une approche qui permet la caractérisation fonctionnelle des protéines dans un but de recherche, en identifiant les acides aminés d'une protéine directement liés à sa fonction. Dans chacun de ces deux contextes, des approches de mutagenèse à saturation présentent un intérêt particulier.

10 Cependant, dans le cadre de l'évolution moléculaire, ces approches selon l'art antérieur sont basées sur le criblage en aveugle des mutants obtenus, et sur la caractérisation précise des mutants présentant les caractéristiques recherchées. Cette activité de criblage en aveugle augmente radicalement le nombre de clones indépendants à cribler individuellement, puisque le surcriblage de la banque est nécessaire. Il est  
15 reconnu qu'il est nécessaire de surcribler la banque d'un facteur au moins 10 si on utilise les techniques de l'art antérieur. Cette activité de criblage à haut débit est associée à un taux de faux positifs rendant l'approche fastidieuse, à l'impossibilité de sélectionner les clones présentant une amélioration modeste, et à l'absence de certitude d'avoir criblé l'ensemble des mutants générés. Toute technique permettant de réduire ce taux de  
20 surcriblage sera utile au domaine de l'évolution moléculaire.

Dans le cas de la caractérisation fonctionnelle, le criblage en aveugle n'est guère possible puisqu'il n'est pas question ici de sélectionner quelques clones, mais d'obtenir une réponse fonctionnelle pour chacun d'entre eux. Dans ce domaine de la cartographie fonctionnelle des protéines, l'art antérieur ne décrit pas de technologie permettant  
25 d'obtenir l'ensemble des mutants simples d'une protéine, mais uniquement quelques travaux préliminaires ayant, certes, permis l'obtention d'un grand nombre de molécules mutantes, mais restant cependant bien loin de l'objectif de les fabriquer tous.

Dans ces deux contextes, la communauté scientifique est dans l'attente d'une technologie permettant d'obtenir rapidement et systématiquement tous les mutants  
30 simples d'une protéine, de telle sorte que chacun des mutants soit individualisé et identifié.

#### DESCRIPTION DETAILLEE

La présente invention a pour objet un procédé de mutagenèse dirigée à saturation, présentant des améliorations notables par rapport aux procédés selon l'art antérieur.  
35 Dans un mode de réalisation particulier, le procédé selon l'invention permet la constitution d'une collection réunissant tous les mutants dirigés simples d'une protéine, lesdits

mutants étant individualisés et répertoriés. Dans un autre mode de réalisation, le procédé selon l'invention permet d'obtenir rapidement des mutants améliorés d'une enzyme, d'une protéine thérapeutique, ou de n'importe quelle protéine d'intérêt économique. L'invention concerne également les polynucléotides doubles brins obtenus et les peptides, polypeptides ou protéines codés par ces polynucléotides, qu'ils présentent ou non une ou plusieurs propriétés modifiées et notamment améliorées.

L'objet de l'invention est une nouvelle technique de mutagenèse à saturation, permettant l'obtention de microbanques d'ADN contenant chacune les 19 substitutions d'un acide aminé particulier, lesdites mutations étant réparties dans des conditions plus homogènes que dans les techniques selon l'art antérieur.

Dans l'une de ses applications, le procédé selon l'invention permet l'obtention rapide et dans des conditions économiques raisonnables de l'ensemble des mutants simples d'une protéine ou d'un domaine d'une protéine, de telle sorte que chacun des mutants soit individualisé et identifié. Ainsi, si l'on considère un gène ou un domaine de gène constitué de N codons, le résultat du procédé selon l'invention est constitué d'une collection de 19xN mutants, chacun présent dans un compartiment séparé (tube, puits de plaque, etc...), l'identité de chacun des mutants étant connu de l'expérimentateur.

Dans une autre de ses applications, le procédé selon l'invention permet l'obtention et le criblage en aveugle de l'ensemble des mutants simples d'une séquence codante, dans des conditions permettant de minimiser le facteur de surcriblage.

Le procédé selon l'invention est un procédé de production d'une collection de mutants d'une séquence codante, ladite séquence codante étant insérée dans un plasmide, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) identifier ou sélectionner un ou plusieurs sites de restriction non-contenus dans la séquence codante et dans le plasmide ;

b) préparer en parallèle un mutant intermédiaire, pour chaque codon à muter de la séquence codante, dans lequel soit le codon à muter a été remplacé par une séquence comprenant un des sites de restriction identifiés ou sélectionnés en a), soit un des sites de restriction identifiés ou sélectionnés en a) a été inséré dans le codon à muter ou au niveau des 10 nucléotides bordant le codon à muter ;

c) à partir de chaque mutant intermédiaire, effectuer une mutation permettant de remplacer la séquence comprenant ledit site de restriction par chacun des codons correspondants aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale ou un sous-ensemble de ceux-ci, tout en restaurant le cadre de lecture initial; et,

d) digérer le produit résultant de l'étape c) par l'enzyme de restriction spécifique du site de restriction qui a été inséré à l'étape b).

Dans l'étape c), la mutation permettant de remplacer la séquence comprenant ledit site de restriction par le codon mutant restaure le cadre de lecture initial avec uniquement la mutation du codon ciblé.

De préférence, un seul site de restriction est utilisé pour la préparation de tous les  
5 mutants intermédiaires.

De préférence, les étapes b) et c) sont réalisées par une réaction d'amplification simple brin circulaire.

Dans un mode de réalisation préféré, la séquence comprenant le site de restriction est inséré par remplacement du codon à muter.

10 Dans un mode de réalisation préféré, le procédé comprend:

a) identifier ou sélectionner un site de restriction non-contenu dans la séquence codante et dans le plasmide ;

b) préparer en parallèle un mutant intermédiaire pour chaque codon à muter de la séquence codante dans lequel le codon à muter a été remplacé par une séquence  
15 comprenant le site de restriction identifié ou sélectionné en a) ;

c) à partir de chaque mutant intermédiaire, effectuer une mutation permettant de remplacer ledit site de restriction par chacun des codons correspondants aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale ou un sous-ensemble de ceux-ci;  
et,

20 d) digérer le produit résultant de l'étape c) par l'enzyme de restriction spécifique du site de restriction qui a été inséré à l'étape b).

Dans un mode de réalisation préféré du procédé, la séquence comprenant le site de restriction est sélectionnée selon les critères suivants :

1) le site de restriction doit contenir de préférence au moins 5 bases, de préférence au moins 6 bases ;

2) le site de restriction ne doit pas être reconstruit lors de la deuxième étape de mutagenèse c) ; et,

3) l'insertion du site de restriction ne doit pas créer des sites de méthylation.

30 Dans un mode de réalisation préféré, la séquence comprenant le site de restriction est en outre sélectionnée pour que le site de restriction ne présente pas d'homologie ou d'identité avec les codons qui sont introduits lors de la deuxième étape de mutagenèse c).

De préférence, le procédé comprend en outre le traitement du produit résultant de l'étape c) au moyen d'une enzyme spécifique de sites présents sur l'ADN méthylé, comme l'enzyme DpnI, permettant de digérer les mutants intermédiaires restants.

35 Dans un mode de réalisation préféré du procédé, pour chaque codon à muter, le mutant intermédiaire est préparé dans l'étape b) au moyen d'un oligonucléotide comprenant :

- une partie 5' de 5 à 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 5' le codon à muter ;
- une partie centrale constituée d'un site de restriction identifié ou sélectionné en a), facultativement bordé d'un à dix nucléotides, et
- 5 - une partie 3' de 5 à 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 3' le codon à muter.

De préférence, le site de restriction est facultativement bordé d'un à cinq nucléotides, plus particulièrement d'un à trois nucléotides.

De préférence, pour chaque mutant intermédiaire, un mélange d'au moins 19  
10 oligonucléotides est utilisé dans l'étape c), chacun des oligonucléotides comprenant :

- une partie 5' de 5 à 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 5' ladite séquence comprenant le site de restriction ;
- une partie centrale consistant en l'un des codons correspondant aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale ou au un sous-ensemble de  
15 ceux-ci ; et

- une partie 3' de 5 et 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 3' ladite séquence comprenant le site de restriction.

Plus particulièrement, dans un premier aspect du procédé, pour chaque mutant intermédiaire, un mélange de 19 oligonucléotides comprenant chacun un des codons  
20 correspondant aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale est utilisé dans l'étape c). Dans un deuxième aspect, pour chaque mutant intermédiaire, un mélange de 20 oligonucléotides comprenant chacun à un des codons correspondant aux 20 acides aminés est utilisé dans l'étape c). De préférence, le mélange d'oligonucléotides est synthétisé en utilisant un mélange de triplets de nucléotides correspondant aux  
25 différents codons. Dans un troisième aspect, pour chaque mutant intermédiaire, un ensemble d'oligonucléotides comprenant des parties centrales du type NNG/T, ou NNG/C est utilisé dans l'étape c).

Dans un mode de réalisation du procédé, les 19 mutants de chaque codon de la séquence codante à muter ou d'un sous-ensemble de ceux-ci sont ensuite isolés et  
30 séquencés.

De préférence, le plasmide est un vecteur d'expression, et plus particulièrement, un vecteur d'expression procaryote. Dans ce mode de réalisation, le procédé peut comprendre une étape supplémentaire e) d'expression des mutants obtenus, éventuellement suivie d'une étape f) d'analyse fonctionnelle du produit d'expression. Par  
35 analyse fonctionnelle est entendue de manière non-restrictive des mesures d'activité, de propriété physico-chimique (résistance à la température ou au pH, présence d'un épitope) ou immunogénique.

Pour plus de commodité, on considèrera dans la suite de la description que l'enzyme de restriction E correspondant à l'enzyme de restriction reconnaissant et clivant le site de restriction identifié ou sélectionné au cours du procédé selon la présente invention. Bien entendu, ce qui est décrit pour une enzyme de restriction dans le procédé  
5 est facilement transposable pour l'homme du métier à plusieurs enzymes de restriction utilisées pour les différents mutants intermédiaire.

De préférence, l'étape b) du procédé est réalisée séparément ou en parallèle pour chaque mutant intermédiaire par une réaction de mutagenèse dirigée utilisant un oligonucléotide approprié pour remplacer le codon à muter par le site de restriction, de  
10 préférence uniquement le codon à muter, ou pour insérer le site de restriction dans le voisinage du codon à muter. Par voisinage est entendu que le site de restriction peut être directement inséré dans le codon à muter ou dans les quelques nucléotides bordant le codon à muter. De préférence, le site de restriction sera inséré dans les 10 nucléotides bordant le codon à muter, plus particulièrement dans les 5 nucléotides, et de manière  
15 encore plus préféré dans les 3 nucléotides bordant le codon à muter. Un clone de chaque mutant intermédiaire contenant la substitution visée en b) est isolé et une préparation d'ADN plasmidique à partir de ce mutant intermédiaire est effectuée. Ainsi, si N positions de la séquence codante doivent être mutée, cette étape aboutit à la préparation de N mutants intermédiaires comprenant le site de restriction substitué au niveau des N codons  
20 à muter.

De préférence, l'étape c) du procédé est réalisée pour chaque mutant intermédiaire par une réaction de mutagenèse dirigée utilisant un ensemble d'oligonucléotides appropriés pour remplacer le site de restriction et le codon à muter (si celui-ci est encore présent) par des codons correspondant aux 19 acides aminés non-  
25 présents dans la séquence codante initiale ou un sous-ensemble de ceux-ci. Dans la présente demande, il est entendu qu'en restaurant le cadre de lecture, on aboutit à une molécule comportant uniquement la mutation du codon à muter par un autre codon. Les oligonucléotides sont conçus dans ce but. Ainsi, si N positions de la la séquence codante doivent être mutée, cette étape aboutit à la préparation d'au moins 19 mutants différents à  
30 chacune des N positions. Par sous-ensemble des codons correspondant aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale peut être entendu un sous-ensemble d'acides aminés défini par une propriété physico-chimique comme l'hydrophobicité, la polarité, la charge, etc...

De préférence, le procédé comprend en outre, après la deuxième mutagenèse c),  
35 une étape d'élimination des matrices initiales, de préférence par digestion avec une enzyme spécifique de sites présents sur l'ADN méthylé.

Dans une étape finale supplémentaire du procédé, les 19 mutants de chaque codon de la séquence codante à muter ou un sous-ensemble de ceux-ci sont ensuite isolés et séquencés. Cette caractérisation comprend de préférence le séquençage du mutant. Ainsi, pour chacune des positions de la séquence codante à muter, les 19 mutants possibles ou un sous-ensemble de ceux-ci sont identifiés et isolés. On aboutit ainsi à une collection de mutants isolés et identifiés comprenant pour chaque position de la séquence codante à muter les 19 substitutions codant chacune pour un des 19 autres acides aminés ou un sous-ensemble de ceux-ci.

De préférence, la séquence codante code pour une protéine. Dans un mode de réalisation préféré, cette protéine est une enzyme. Elle peut également être une protéine d'intérêt thérapeutique comme, par exemple, une hormone ou une cytokine.

Le procédé selon l'invention est un procédé de mutagenèse à saturation d'une séquence codante insérée dans un plasmide qui peut également être caractérisé par la succession des étapes suivantes :

- 15 a) on identifie un ou plusieurs sites de restriction absent de l'ensemble formé par le plasmide et la séquence codante.
- b) en utilisant un oligonucléotide adapté, on effectue une réaction de mutagenèse dirigée de façon à introduire dans le voisinage nucléotidique du codon ciblé une séquence comprenant le site de restriction identifié en a) ou à remplacer le codon ciblé.
- 20 b') on isole un clone contenant la substitution visée en b), constituant un mutant intermédiaire, et on effectue une préparation d'ADN plasmidique à partir de ce mutant intermédiaire.
- c) on réalise une seconde réaction de mutagenèse en utilisant la préparation d'ADN du mutant intermédiaire, obtenue en b'), et un ensemble d'au moins dix-neuf oligonucléotides ou un sous-ensemble de ceux-ci, homologues aux deux régions flanquant la séquence introduite en b) et porteur d'une mutation par rapport à cette dite séquence d'une part, et à la séquence initiale au niveau de cette position d'autre part, et étant chacun associé à un acide aminé différent.
- d) On réalise une digestion du produit de la réaction c) en utilisant l'enzyme de restriction 30 E et/ou l'enzyme DpnI. On transforme ce produit de digestion dans des bactéries compétentes, on ensemence le produit de transformation en milieu liquide contenant un agent sélectif et, après une période d'incubation, on prépare l'ADN plasmidique de la culture.
- e) On utilise l'enzyme de restriction E pour digérer la préparation d'ADN plasmidique de façon à éliminer la majorité des molécules de mutant intermédiaire résiduelles. On 35 transforme le produit de cette réaction dans des bactéries compétentes, et on étale les bactéries sur un milieu solide contenant l'agent de sélection.

f) On repique individuellement des colonies et on mesure en aveugle l'activité de la protéine recombinante exprimée par chacun des clones, de façon à identifier les clones ayant des propriétés améliorées. On peut également mesurer une propriété fonctionnelle ou physicochimique pour la protéine recombinante exprimée par chacun des clones : par exemple, présence d'un épitope, résistance à la chaleur, etc...

Alternativement, l'étape f) est substituée par l'étape f') :

f') On repique individuellement des colonies, et on séquence l'ADN plasmidique de chacune d'entre elles, de façon à sélectionner l'ensemble des dix-neuf mutants possibles ou un sous-ensemble de ceux-ci. Lesdits mutants sont par la suite utilisés pour mesurer l'activité des protéines exprimées, facultativement après leur introduction dans un hôte d'expression adapté si nécessaire.

Le plasmide dans lequel a été intégrée la séquence codante à muter est de préférence un plasmide d'expression, c'est-à-dire comportant tous les éléments nécessaires à l'expression de cette séquence codante dans une cellule hôte. Préférentiellement, ce plasmide est adapté à une expression dans un hôte procaryote. Facultativement, ce plasmide peut également être adapté à une expression dans un hôte eucaryote. Par exemple, le plasmide pORF-IFNgamma (Invivogen) permet l'expression de l'Interféron gamma lorsqu'introduit dans des cellules eucaryotes. Les plasmides pET (Stratagene) sont adaptés à la production de protéines en bactéries, cette production étant soumise à induction.

Le site de restriction identifié à l'étape a) correspond de préférence à une enzyme insensible aux sites de méthylation. Certains sites de restriction, tels que NruI ou XbaI par exemple, sont susceptibles d'être méthylés si la séquence environnant le site crée un site de dam méthylation ou de dcm méthylation. Dans le cas où un grand nombre de mutants intermédiaires tels que décrits à l'étape b) sont recherchés, il devient probable que certains des sites de restriction tels que décrits à cette étape a) s'inscrivent dans un contexte nucléotidique recréant un tel site de méthylation dam ou dcm. Ces mutants pourront être obtenus, mais ils ne pourront pas être utilisés pour l'étape de mutagenèse ultérieure, parce qu'à l'étape e), la digestion enzymatique ne sera pas efficace. L'ajout de deux bases judicieusement choisies, une du côté 5' du site de restriction choisi, et l'autre en 3' permet d'éliminer les questions de création de site de dam ou de dcm méthylation d'une part, et du site de restriction lui-même d'autre part, exposés dans les paragraphes précédents.

Dans le cas où un grand nombre de mutants intermédiaires sera recherché, et notamment dans le cas extrême où un mutant intermédiaire sera recherché pour chaque codon d'une séquence codante, il faudra également prendre garde à l'environnement

nucléotidique au niveau de chaque codon, de façon à ce que le site de restriction ne soit pas recréé lorsque, à l'étape c), les codons substituants de la seconde réaction de mutagenèse seront introduits. Ainsi, si le codon à muter est précédé d'un codon GAA, et que le site EcoRI est choisi (GAATTC), lorsqu'un des codons substituants de la seconde réaction de mutagenèse est de nature TCC (codant pour une phénylalanine), le site EcoRI est recréé, et le mutant final correspondant au codon substituant TCC est donc contre-sélectionné à l'étape e). L'enzyme EcoRI n'est donc pas utilisable pour générer ce mutant, et il est préférable d'utiliser une autre enzyme.

De préférence, le site de restriction utilisé dans le procédé selon la présente invention comporte plus de 4 bases, de préférence au moins 5 bases et de manière encore plus préférée, au moins 6 bases. Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, le site de restriction contient 6 bases. Par exemple, les sites AatII, EcoRI, HindII, BglII, SacI, SacII, composés de six bases, et les enzymes Avall, Ddel, NciI, composés de 5 bases, sont susceptibles d'être utilisés dans le cadre de l'invention.

Enfin, la séquence mutante intégrée à ce stade se situera en vis-à-vis des codons mutants lors de la seconde étape de mutagenèse (étape c)). Une homologie préférentielle d'un ou plusieurs de ces codons vis-à-vis du site de restriction cherche à être évitée afin d'éliminer la présence des biais. Le fait que la séquence à intégrer à l'étape c) (3 bases), soit en vis-à-vis d'une séquence plus grande (6 bases ou plus) introduit une discontinuité défavorable en général à l'hybridation, mais la permettant quand même si l'on prend garde de mener la réaction d'hybridation à un Tm adapté. Cette portion (3 bases contre 6 ou plus) apporte à la liaison de l'oligonucléotide sur la matrice une contribution presque nulle, la quasi-totalité de cette liaison reposant sur les portions 5' et 3', parfaitement homologues. Il résulte de cette situation une absence de biais dans l'intégration des codons. Cependant, les inventeurs ont observé que, lorsque les trois bases du codon sont parfaitement homologues des trois premiers ou des trois derniers nucléotides de la séquence de six bases intégrée dans le mutant intermédiaire, l'homologie était favorisée. En effet, dans ce cas, le mésappariement n'est pas 6 bases contre 3, mais 3 bases contre 0, et il semble que cette situation soit plus favorable à l'hybridation. Il est possible d'éviter que de telles hybridations se réalisent en choisissant judicieusement la base à mettre en 5' et la base à mettre en 3' du site de restriction intégré dans le mutant intermédiaire. Ainsi, par exemple, si le site choisi est EcoRI et qu'il existe dans la liste des 19 codons substituants (trimères) le codon GAA, mais pas le codon AGA, l'ajout de la base A au site de restriction permet d'éliminer la possibilité, de ce côté du site, d'un mésappariement de type 3 bases contre 0.

En résumé, les principaux critères de sélection de la séquence comprenant le site de restriction sont de préférence les suivants :

1- le site de restriction doit contenir de préférence au moins 5 bases, de préférence au moins 6 bases ;

2- le site de restriction ne doit pas être reconstruit lors de la deuxième étape de mutagenèse ;

5 3- l'insertion du site de restriction ne doit pas créer des sites de méthylation, plus particulièrement des sites dam ou/et dcm ; et,

4- facultativement, le site de restriction ne doit pas présenter d'homologie avec les codons qui sont introduit lors de la deuxième étape de mutagenèse.

10 Les évènements des points 2, 3 et 4 peuvent être évités comme indiqué précédemment par l'ajout d'une ou plusieurs bases appropriées d'un coté ou des deux cotés du site de restriction. De préférence, une seule base est ajoutée d'un coté ou des deux cotés du site de restriction. C'est ce qui est de préférence entendu dans la présente demande par le terme « la séquence comprenant le site de restriction ». Dans un mode préféré de réalisation, la séquence comprenant le site de restriction contient le site de restriction, éventuellement bordé d'un ou deux résidus.

15 A l'étape b), l'oligonucléotide généré et utilisé pour effectuer la réaction de mutagenèse contient

- 20 - une partie 5' parfaitement homologue à la séquence ciblée comprise entre 5 et 50 bases, et préférentiellement comprise entre 10 et 30 bases, et plus préférentiellement encore voisine de 18 bases.
- une partie centrale constituée du site de restriction tel que choisi à l'étape a), éventuellement additionné d'une ou de quelques bases, cette partie centrale constituant la partie porteuse de la mutation, et
- 25 - une partie 3' parfaitement homologue à la séquence ciblée comprise entre 5 et 50 bases, et préférentiellement comprise entre 10 et 30 bases, et plus préférentiellement encore voisine de 18 bases.

30 A cette étape b), la réaction de mutagenèse est de préférence menée en utilisant une approche ne nécessitant aucune étape de ligation double brin, ces étapes étant classiquement consommatrices de temps et génératrices d'aléas. Plus précisément, la réaction de mutagenèse de l'étape b) est de préférence menée en utilisant l'oligonucléotide tel que décrit précédemment pour amorcer une réaction d'amplification simple brin circulaire : cette réaction est amorcée, après la dénaturation du plasmide simple brin, par l'hybridation de l'oligonucléotide porteur de la mutation, et par la synthèse du brin d'ADN en utilisant une ADN polymérase. De préférence, l'ADN polymérase est

35 thermostable, et la réaction peut être réalisée plusieurs fois en réalisant des cycles de température, de façon à en augmenter le rendement. Dans un mode préféré de réalisation, la ligation du brin synthétisé sur l'extrémité 5' de l'oligonucléotide en ayant

initié la synthèse est subséquentement réalisée. Dans ce cas, l'oligonucléotide aura été préalablement phosphorylé, soit par voie chimique, soit en utilisant une kinase, et une ligase thermosable, ainsi que ses cofacteurs, sera ajoutée à la réaction. L'utilisation d'un second oligonucléotide, de sens opposé, de façon à générer le deuxième brin, peut  
5 augmenter le rendement de la réaction de mutagenèse.

Dans le cas où la réaction de mutagenèse est réalisée par réplication circulaire du plasmide en utilisant l'oligonucléotide mutant comme amorce, la fréquence des molécules effectivement mutantes dans la réaction de mutagenèse est généralement faible. La sélection à l'étape b') d'un clone ayant effectivement intégré la mutation peut alors se faire  
10 en deux étapes. Dans un premier temps, une réaction de digestion est menée en utilisant une enzyme spécifique de sites présents sur l'ADN méthylé, par exemple l'enzyme DpnI, ce qui a pour effet de cliver en plusieurs fragments la matrice initiale, tout en laissant intact les molécules néosynthétisées. Des bactéries compétentes sont alors transformées avec la réaction de digestion, et étalées sur une boîte de pétri contenant un agent sélectif.  
15 Une série de clones (24, 48, ou 96) est repiquée individuellement dans du milieu de culture. Une PCR ou une préparation d'ADN plasmidique est réalisée à partir de chacune de ces cultures, et la présence du site de restriction y est analysée en par digestion enzymatique en utilisant l'enzyme E. Un clone présentant le site de restriction recherché est sélectionné.

20 Eventuellement, le clone retenu est séquencé sur l'intégralité de la séquence codante afin de vérifier encore la présence de la séquence mutante, et afin de vérifier l'absence de mutation supplémentaire indésirable, qui aurait pu être introduite au cours du procédé.

A l'étape b') encore, la préparation d'ADN plasmidique du mutant intermédiaire  
25 peut être réalisée en utilisant n'importe quel système connu de l'homme du métier, et en particulier en utilisant les kits proposés par les sociétés spécialisées telles que Qiagen, Macherey-Nalgel, etc... La quantité d'ADN obtenue doit être suffisante pour permettre de réaliser les réactions de mutagenèse de l'étape c).

30 Le plasmide de mutant intermédiaire utilisé à l'étape c) est soit circulaire, soit prédigéré par l'enzyme E, ce qui peut dans certains cas augmenter les rendements des réactions ultérieures.

A l'étape c), chacun des oligonucléotides constitutifs du mélange contiennent :

- une partie 5' parfaitement homologue à la séquence initiale, comprise  
35 entre 5 et 50 bases, et préférentiellement comprise entre 10 et 30 bases, et plus préférentiellement encore voisine de 18 bases.

- une partie centrale différant de la séquence initiale par un à trois nucléotides appartenant au même codon, cette partie centrale constituant la partie porteuse de la mutation.
- une partie 3' parfaitement homologue à la séquence initiale, comprise entre 5 et 50 bases, et préférentiellement comprise entre 10 et 30 bases, et plus préférentiellement encore voisine de 18 bases.

Les au moins dix-neuf oligonucléotides présents dans le mélange ne diffèrent qu'au niveau de leur partie centrale : chacun des dix-neuf oligonucléotides correspond à un acide-aminé différent. De préférence, le mélange contient dix-neuf oligonucléotides différents. De préférence, les codons choisis pour chaque acide aminé sont favorables à une bonne expression (c'est-à-dire que ce ne sont pas des codons rares). Dans un mode de réalisation préféré, les bases correspondant à la partie centrale des dix-neuf oligonucléotides aura été synthétisées chimiquement de façon séparée, sous forme de triplets de nucléotides. Les dix-neuf triplets auront ensuite été mélangés. La synthèse des dix-neuf oligonucléotides peut alors se faire en une seule fois, en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides standard : les bases de la partie 3' sont synthétisées une par une, puis le mélange des dix-neuf triplets est ajouté en une seule fois, puis les bases de la partie 5' sont ajoutés une par une.

Dans un mode de réalisation préféré alternatif, les bases correspondant à la partie centrale des vingt oligonucléotides aura été synthétisées chimiquement de façon séparée, sous forme de vingt triplets de nucléotides. La synthèse des vingt oligonucléotides peut alors se faire en une seule fois, en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides standard : les bases de la partie 3' sont synthétisées une par une, puis le mélange des vingt triplets est ajouté en une seule fois, puis les bases de la partie 5' sont ajoutés une par une.

Dans un mode de réalisation alternatif, les dix-neuf oligonucléotides auront été synthétisés en utilisant des bases phosphoramidites classiquement dégénérées. Des codons de nature NNK, NNS, ou NNN peuvent ainsi être synthétisés. Dans ce mode de réalisation, les dix-neuf oligonucléotides du mélange sont accompagnés d'un nombre d'autres oligonucléotides, redondants par rapport aux dix-neuf premiers, et indésirables à ce titre, étant égal à douze dans le cas des codons NNS et NNK, et étant égal à quarante quatre dans le cas des codons NNN.

Cette deuxième mutation c) permet de restaurer le cadre de lecture initial. On aboutit à une molécule comportant uniquement la mutation du codon à muter par un autre codon. Les oligonucléotides sont conçus dans ce but. Par exemple, si le site de restriction est inséré dans le codon à muter, la séquence à remplacer comprend le site de restriction inséré dans le codon à muter. Si le site de restriction est inséré à proximité du codon à muter, la séquence à remplacer comprend le codon à muter et le site de restriction et la

mutation c) conserve les codons initiaux éventuellement compris entre le codon à muter et le site de restriction dans le mutant intermédiaire. On aboutit à une molécule dans laquelle seul le codon muter a été remplacé par un des codons correspondant aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence initiale.

5 Bien entendu, le procédé est également applicable pour la réalisation d'une collection de mutants comportant un sous-ensemble des 19 substitutions possibles. Dans ce cas, on utilise un mélange d'oligonucléotides comprenant les codons correspondant à ce sous-ensemble.

10 A cette étape c), la réaction de mutagenèse est de préférence menée en utilisant une approche ne nécessitant aucune étape de ligation double brin, ces étapes étant classiquement consommatrices de temps et génératrices d'aléas. Plus précisément, la réaction de mutagenèse de l'étape c) est de préférence menée en utilisant le mélange des dix-neuf ou vingt oligonucléotides ou un sous-ensemble de ceux-ci tel que décrit précédemment pour amorcer une réaction d'amplification simple brin circulaire : cette  
15 réaction est amorcée, après la dénaturation du plasmide simple brin, par l'hybridation des oligonucléotides porteurs chacun d'une mutation au niveau du même codon, et par la synthèse du brin d'ADN en utilisant une ADN polymérase. De préférence, l'ADN polymérase est thermostable, et la réaction peut être réalisée plusieurs fois en réalisant des cycles de température, de façon à en augmenter le rendement. Dans un mode  
20 préféré de réalisation, la ligation du brin synthétisé sur l'extrémité 5' de l'oligonucléotide en ayant initié la synthèse est subséquentement réalisée. Dans ce cas, le mélange de vingt oligonucléotides aura été préalablement phosphorylé, soit par voie chimique, soit en utilisant une kinase ; une ligase thermostable ainsi que ses cofacteurs aura été ajoutée à la réaction. L'utilisation d'un oligonucléotide additionnel, orienté dans le sens opposé, de  
25 façon à générer le deuxième brin, peut augmenter le rendement de la réaction de mutagenèse.

Dans ce cas où la réaction de mutagenèse de l'étape c) est réalisée par simple réplique circulaire du plasmide, éventuellement répétée plusieurs fois, la fréquence des  
30 molécules effectivement mutantes dans la réaction de mutagenèse est généralement faible (moins de 1%). Lors de la première étape de sélection (étape d)), basée sur la digestion par l'enzyme E, par l'enzyme DpnI, ou par les deux enzymes séquentiellement ou simultanément, ce faible pourcentage est amené à une valeur plus importante : la matrice initiale est clivée, et les molécules néosynthétisées sont conservées intactes.

35 Cette première étape de sélection ne permet pas, le plus souvent, d'atteindre un taux de molécules recherchées satisfaisant, c'est-à-dire supérieur à 90%, notamment en raison de la présence d'hétéroduplexe dans la réaction de mutagenèse de l'étape c). Ces

hétéroduplexes, composés d'un brin de matrice parental (mutant intermédiaire) et d'un brin de matrice néosynthétisé, ne seront a priori digérables ni par DpnI ni par l'enzyme E. Lorsque introduit dans une bactérie, cet hétéroduplexe donnera lieu, par réplication, soit aux deux espèces moléculaires, soit à l'espèce moléculaire correspondant au mutant intermédiaire uniquement, le système de réparation de la bactérie ayant tendance à utiliser la matrice méthylée (initiale) comme modèle.

La transformation bactérienne à cette étape d) peut avoir lieu dans n'importe quelle souche de bactéries de laboratoire, en utilisant n'importe quel procédé connu de l'homme du métier. Les bactéries transformées sont ensuite mises à incuber, de préférence sous agitation, dans un milieu liquide contenant l'agent de sélection associé au plasmide utilisé, pour une durée de préférence comprise entre 10 et 20 heures.

La préparation d'ADN plasmidique réalisée à l'étape d) à partir de la culture bactérienne peut être réalisée en utilisant n'importe quel protocole connu de l'homme du métier, et notamment des kits de préparation d'ADN plasmidique commercialement disponibles.

A l'étape e), une quantité d'ADN plasmidique préférentiellement comprise entre 1 et 1000 ng, et encore plus préférentiellement comprise entre 10 et 100 ng d'ADN est soumise à une digestion par l'enzyme E dans des conditions permettant la digestion à complétion. En particulier, le rapport entre la quantité d'enzyme et la quantité d'ADN peut être augmentée d'un facteur important, éventuellement supérieur à 10, par rapport aux spécifications du fournisseur d'enzyme. Le temps d'incubation peut également être allongé par rapport aux spécifications du fournisseur de l'enzyme.

A l'issue de cette réaction de digestion enzymatique, la quasi-totalité des molécules correspondant au mutant intermédiaire auront été digérées, et seront présentes en solution sous une forme linéaire, non ou très peu susceptible d'être transformée efficacement dans des bactéries. Lors de la transformation et la mise en culture dans un milieu contenant le milieu sélectif, seules les molécules non digérées seront donc efficacement introduites dans les bactéries.

A l'issue de cette réaction de digestion enzymatique, la quasi-totalité des molécules correspondant au mutant intermédiaire auront été digérées, et seront présentes en solution sous une forme linéaire, inactive (c'est-à-dire dans le contexte pas ou très peu susceptible d'être transformée efficacement dans des bactéries).

A l'étape f), les colonies bactériennes repiquées sont utilisées pour ensemercer des cultures, de façon à permettre l'expression de la protéine recombinante mutante. L'activité de ces protéines est ensuite analysée par toute technique connue de l'homme

du métier. Dans le cas où la protéine recombinante est une enzyme, le substrat est mis en présence de la culture, après ou en l'absence d'une étape préalable de lyse bactérienne, et la disparition de ce substrat, ou l'apparition d'un produit de réaction, est mesurée.

5

A l'étape f'), les colonies sont également repiquées et utilisées pour ensemercer une culture, destinée cette fois à être utilisée pour générer une matrice utilisable en séquençage. Plusieurs systèmes existent, parmi lesquels la PCR sur culture, la minipréparation d'ADN plasmidique, ou les approches par cercle roulant, dans lesquelles de l'ADN simple brin linéaire représentant plusieurs fois le tour du plasmide est généré.

10

Dans les étapes f) ou f'), le nombre de clones qu'il faut tester (soit pour leur activité, soit par séquençage), est sensiblement réduit par rapport aux techniques selon l'art antérieur, parce que la microbanque est constituée des 19 espèces moléculaires uniquement ou un sous-ensemble de ceux-ci, présentes à des fréquences égales. On se trouve donc dans la situation précédemment décrite dans lequel seuls les paramètres statistiques interviennent : 19,9 sur les 20 espèces moléculaires auront été testées différentes après 100 tests, soit après un surcriblage d'un facteur 5.

15

Ainsi, dans le mode préféré de l'invention où les oligonucléotides ont été générés en utilisant des triplets de nucléotides phosphoramidite, les trois facteurs qui rendaient nécessaires d'effectuer un surcriblage plus important, d'un facteur 10 au moins, sont éliminés :

20

- la présence de molécules n'ayant pas incorporé la mutation est quasiment nulle, alors qu'elle pouvait représenter jusqu'à 50% dans les techniques selon l'art antérieur.

25

- La différence entre la diversité génétique et la diversité protéique (un facteur 3,2 dans le cas où le codon mutant est de nature NNN, un facteur 1,6 dans le cas où il est de nature NNS ou NNK) n'existe plus.

- Enfin, les biais d'incorporation sont éliminés ou fortement réduits du fait de la rupture de la continuité de l'hybridation des oligonucléotides mutants sur la matrice dans la seconde étape de mutagenèse, et de l'annulation des appariements moins défavorables (de type 3 bases contre 0) par l'ajout éventuel d'une base dans la séquence intégrée au niveau du mutant intermédiaire.

30

Dans le cas où des codons de type NNN, NNK ou NNS sont utilisés, seuls le premier et le troisième de ces facteurs sont éliminés.

35

L'objet de l'invention est particulièrement adapté à la réalisation d'un grand nombre d'échantillons en parallèle, et plus particulièrement à la réalisation du procédé décrit précédemment au niveau de chacun des codons d'une séquence codante, du codon ATG initiateur au codon STOP non compris, de façon à obtenir tous les mutants  
5 simples d'une protéine, ou à les cribler en aveugle.

De préférence, le procédé selon la présente invention est utilisé pour préparer des mutants simples d'une séquence codante, les mutations concernant au moins 50 positions, de préférence au moins 100 positions. Ces positions de mutations peuvent être consécutives ou dispersées dans la séquence codante. Les positions de mutations  
10 peuvent par exemple concerner chacun des acides aminés d'une protéine ou d'un domaine d'une protéine.

Bien que l'essentiel de l'intérêt économique se situe dans le domaine des protéines, la mutagenèse et l'évolution moléculaire d'ADN ou d'ARN, en particulier d'ARN  
15 doués de propriétés catalytiques (ribozymes) peut être intéressante. Une mutagenèse site spécifique haut-débit est également intéressante dans ce contexte.

L'invention a encore pour objet une collection de gènes mutés susceptibles d'être  
20 obtenue par le procédé décrit précédemment.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, donnés à titre d'illustration de la présente invention et non à titre  
limitatif.

25

**\*\* Exemple #1 : Génération de tous les mutants dirigés simples au niveau de huit codons d'une protéine \*\***

Les inventeurs ont cherché à générer tous les mutants dirigés du plasmide pORF-IFN $\gamma$  (séquence en figure 1) au niveau de 8 positions, (positions 117 à 124 de la séquence 1). Dans un premier temps, les huit mutants intermédiaires ont été générés, puis utilisés dans un second temps pour générer les banques de mutants. Les éléments techniques sont détaillées pour le cas du mutant 117. Celles menées sur les 7 autres positions ont été menées de façon identique ou voisine.

10

Dans un premier temps, l'oligonucléotide permettant d'introduire le site de restriction EcoRI, mut117E (séquence en figure 1), a été phosphorylé en utilisant l'enzyme PNK dans des conditions classiques.

Les réactifs suivants ont ensuite été mélangés :

15

pORF-IFN $\gamma$	200 ng
Oligonucléotide mut117E phosphorylé	50 pmoles
dNTP 2,5 mM chacun	1 $\mu$ l
tampon Pfu 10X	2,5 $\mu$
20 Pfu Polymérase	0,8 $\mu$ l
Tth ligase	0,8 $\mu$ l
NAD 100 mM	0,25 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> 100 mM	1 $\mu$ l
ATP 10 mM	1 $\mu$ l
25 DTT 1M	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	qsp 25 $\mu$ l

Le mélange réactionnel est ensuite soumis à une série de douze cycles de température, dans un thermocycleur, tels que [(94°C,1') ;(40°C,2') ;(68°C,20')].

30

A l'issue de cette réaction, 20  $\mu$ l du mélange ont été prélevés, et 15,5  $\mu$ l d'eau, 4  $\mu$ l de tampon NEB 4, et 0,5  $\mu$ l d'enzyme DpnI (NEB) y sont ajoutées. Le nouveau mélange réactionnel a été incubé 30 minutes à 37°C.

20  $\mu$ l du mélange ont été transformés dans des bactéries chimiocompétentes, et le mélange a été étalé sur une boîte de petri contenant de l'ampicilline (100  $\mu$ g/ml).

35

Le lendemain, 24 colonies bactériennes ont été prélevées et mises en culture. Des réactions de PCR ont alors été menées sur ces cultures bactériennes en utilisant des oligonucléotides situés de part et d'autre du gène, et ces produits de PCR ont été soumis

à une réaction de digestion en utilisant l'enzyme de restriction EcoRI. Trois clones sur les 24 présentaient une sensibilité à EcoRI, indiquant que ces clones avaient bien intégré la mutation ciblée. L'ADN plasmidique correspondant à une de ces colonies a été alors séquencé sur la totalité de la séquence codante, de façon à vérifier la bonne intégration de la mutation ciblée, et l'absence de toute mutation additionnelle.

A partir de l'ADN plasmidique correspondant au clone mutant intermédiaire, la réaction suivante a été menée :

10	pORF-IFNgamma 117E	200 ng
	Oligonucléotide mut117NNS phosphorylé	50 pmoles
	dNTP 2,5 mM chacun	1 µl
	tampon Pfu 10X	2,5 µ
	Pfu Polymérase	0,8 µl
15	Tth ligase	0,8 µl
	NAD 100 mM	0,25 µl
	MgSO4 100 mM	1 µl
	ATP 10 mM	1 µl
	DTT 1M	0,25 µl
20	H2O	qsp 25 µl

L'oligonucléotide utilisé comprenait dans sa partie centrale un codon dégénéré de nature NNG/C (aussi noté NNS). Sa séquence est présentée en figure 1.

Le mélange réactionnel a ensuite été soumis à une série de douze cycles de température dans un thermocycleur tels que [(94°C,1') ;(40°C,2') ;(68°C,20')].

A l'issue de cette réaction, 20 µl du mélange ont été prélevés, et 15,5 µl d'eau, 4 µl de tampon NEB 4, et 0,5 µl d'enzyme DpnI (NEB) y ont été ajoutées.

Vingt microlitres du mélange ont été transformés dans des bactéries chimiocompétentes, puis incubées sur la nuit en milieu liquide contenant de l'ampicilline.

Une minipréparation d'ADN plasmidique était alors réalisée.

500 ng d'ADN plasmidique ont alors été soumis à une réaction de digestion enzymatique en utilisant EcoRI. 2,5 ng du mélange réactionnel a ensuite été transformé dans des bactéries compétentes en utilisant un protocole de choc thermique, et un dixième de cette transformation a été étalé sur une boîte de petri contenant de l'ampicilline.

Le lendemain, 96 colonies bactériennes étaient repiquées en utilisant un repiqueur de colonies, et incubées de façon à pouvoir disposer de cultures bactériennes. Des

minipréparations d'ADN plasmidiques ont été menées à partir de chacune de ces cultures, et la phase codante de chacune de ces culture était analysée par séquençage en utilisant un séquenceur ABI 3700.

Les résultats sont montrés en figure 2 et 3.

5 Sur 88 séquences exploitables, 4 avaient intégré une ou plusieurs mutations additionnelles, et une correspondait au mutant intermédiaire. Sur les 83 séquences correspondant à des mutants recherchés (et n'ayant intégré aucune autre mutation), 26 des 32 codons composant la séquence NNS étaient obtenus au moins une fois. Dix-sept des vingt acides aminés étaient obtenus au moins une fois.

10 Un des codons (TTC, codant pour la phénylalanine), ne pouvait en réalité pas être obtenu en utilisant ce protocole, parce que le codon précédent le codon ciblé était de nature GAA : l'intégration du codon TTC recréait donc le site de criblage (EcoRI), les mutants ainsi formés étant alors contre-sélectionnés à l'étape suivante.

15 Les résultats obtenus au niveau des sept autres positions étaient les suivantes :

Position 118 :

Nombre de séquences lues : 85

Nombre de séquences correspondant au mutant intermédiaire : 0

20 Nombre de séquences mutantes mais ayant une mutation additionnelle : 8

Nombre de séquences correctes : 77

Nombre de codons obtenus au moins une fois : 28

Nombre d'acides aminés obtenus au moins une fois : 19

25 Position 119 :

Nombre de séquences lues : 24

Nombre de séquences correspondant au mutant intermédiaire : 1

Nombre de séquences mutantes mais ayant une mutation additionnelle : 0

Nombre de séquences correctes : 23

30 Nombre de codons obtenus au moins une fois : 12

Nombre d'acides aminés obtenus au moins une fois : 11

Position 120 :

Nombre de séquences lues : 89

35 Nombre de séquences correspondant au mutant intermédiaire : 0

Nombre de séquences mutantes mais ayant une mutation additionnelle : 7

Nombre de séquences correctes : 82

Nombre de codons obtenus au moins une fois : 26

Nombre d'acides aminés obtenus au moins une fois : 19

Position 121 :

5 Nombre de séquences lues : 95

Nombre de séquences correspondant au mutant intermédiaire : 1

Nombre de séquences mutantes mais ayant une mutation additionnelle : 1

Nombre de séquences correctes : 93

Nombre de codons obtenus au moins une fois : 30

10 Nombre d'acides aminés obtenus au moins une fois : 17

Position 122 :

Nombre de séquences lues : 93

Nombre de séquences correspondant au mutant intermédiaire : 3

15 Nombre de séquences mutantes mais ayant une mutation additionnelle : 6

Nombre de séquences correctes : 84

Nombre de codons obtenus au moins une fois : 27

Nombre d'acides aminés obtenus au moins une fois : 18

20 Position 123 :

Nombre de séquences lues : 94

Nombre de séquences correspondant au mutant intermédiaire : 3

Nombre de séquences mutantes mais ayant une mutation additionnelle : 31

Nombre de séquences correctes : 60

25 Nombre de codons obtenus au moins une fois : 26

Nombre d'acides aminés obtenus au moins une fois : 19

Position 124 :

Nombre de séquences lues : 96

30 Nombre de séquences correspondant au mutant intermédiaire : 15

Nombre de séquences mutantes mais ayant une mutation additionnelle : 8

Nombre de séquences correctes : 73

Nombre de codons obtenus au moins une fois : 25

Nombre d'acides aminés obtenus au moins une fois : 19

35

**Exemple #2 : mutagenèse dirigée de tous les codons de l'IFN $\gamma$** 

En utilisant un protocole identique à celui présenté dans l'exemple précédent, tous les mutants intermédiaires de la partie correspondant à la séquence mature de l'IFN $\gamma$  sont réalisés, ce qui représente 139 mutants intermédiaires.

En utilisant un protocole similaire, mais basé non pas sur l'utilisation de codons de nature NNS, mais sur l'utilisation de codons synthétisés par trimères de nucléotides, et ne comportant donc aucune dégénérescence, les 139 microbanques correspondantes aux 139 mutants intermédiaires sont réalisées. Les vingt codons composant le mélange de trimères sont : AAA, AAC, ACT, ATC, ATG, CAG, CAT, CCG, CGT, CTG, GAA, GAC, GCT, GGT, GTT, TAC, TCT, TGC, TGG, TTC.

Le séquençage des clones mutants correspondants laisse apparaître que l'ensemble des 20 acides aminés sont obtenus dans la majorité des cas après séquençage de 96 clones.

**\*\* Exemple #3 : Procédé d'évolution moléculaire d'une enzyme par mutagenèse à saturation et criblage en aveugle \*\***

L'objectif de l'expérience est d'obtenir un ou des clones mutants d'une enzyme recombinante. Le gène codant pour cette enzyme, composé de N codons une fois exclus l'ATG initiateur et le codon STOP, est inséré dans un plasmide permettant l'expression en cellules eucaryotes.

Il est identifié que les sites EcoRI et AatII sont absents du plasmide, séquence codante incluse.

Dans une première étape, chacun des codons est ciblé, et une réaction de mutagenèse est effectuée de telle sorte que N mutants intermédiaires soient obtenus. Certains de ces mutants intermédiaires sont tels que le codon ciblé correspondant est remplacé par un site EcoRI, d'autres sont tels que le codon ciblé correspondant est remplacé par un site AatII. Le choix de l'un ou de l'autre de ces sites tient à l'analyse préalable des mutations à introduire : dans le cas où le site introduit est susceptible d'être recréé par un des codons à introduire dans la phase suivante, l'utilisation de ce site est proscrite, et le second site est utilisé.

Dans une deuxième étape, chacun des mutants intermédiaires est utilisé comme matrice pour une réaction de mutagenèse à saturation : on utilise dans cette réaction un mélange de vingt oligonucléotides, chacun étant composé d'une partie 5' et d'une partie 3' identiques et homologues à la séquence ciblée. La partie centrale de chacun de ces vingt

oligonucléotides est constituée d'un codon différent appartenant à la liste suivante : AAA, AAC, ACT, ATC, ATG, CAG, CAT, CCG, CGT, CTG, GAA, GAC, GCT, GGT, GTT, TAC, TCT, TGC, TGG, TTC. Pour des raisons économiques, ce mélange de vingt oligonucléotides est synthétisé en une seule réaction de synthèse, en utilisant des triplets de nucléotides au niveau du codon de la partie centrale.

La réaction de mutagenèse est menée de façon à disposer de microbanques contenant chacune un mélange équimolaire des vingt espèce moléculaires, chacune différant au niveau du seul codon ciblé.

Ces mélanges réactionnels sont ensuite transformés dans des bactéries compétentes, est étalés sur une boîte de Petri contenant l'agent sélectif. Le lendemain, 96 colonies bactériennes, ce qui représente 4,8 fois la taille de la banque, sont repiquées, et mises à incuber dans des plaques de 96 puits, dans le but de les cribler en aveugle. Après un temps d'incubation, les cultures bactériennes sont lysées, et l'activité enzymatique de chacun des puits est analysée. Les cultures présentant une activité significativement supérieure à celle des clones non mutés sont sélectionnés pour être étudiés plus complètement.

#### **\*\* Exemple #4 : Procédé d'évolution moléculaire d'une protéine thérapeutique par mutagenèse à saturation et criblage en aveugle \*\***

Dans cet exemple, on cherche des mutants améliorés de l'interféron gamma. Le plasmide pORF-IFNgamma, déjà décrit précédemment, est utilisé.

Cet exemple se déroule comme dans l'exemple 1, à l'exception des dernières étapes : les minipréparations d'ADN plasmidiques obtenues, contenant chacune un mutant différent de l'IFNgamma, ne sont pas destinée à être séquencées en aveugle : ces minipréparations d'ADN plasmidique sont transfectées dans des cellules mammifères (par exemple des séquence COS), de façon à ce que l'IFNgamma soit produit dans le surnageant. Chaque surnageant, contenant un IFNgamma muté, est alors testé en aveugle pour son activité en utilisant un test in vitro, ou pour une propriété telle que la présence d'un épitope, en utilisant un test ELISA par exemple. Les clones présentant des propriétés nouvelles sont sélectionnés pour être étudiés plus complètement.

#### **Légende des figures**

Figure 1 : séquence du gène et des oligonucléotides utilisés pour générer le mutant intermédiaire et les 19 mutants ponctuels au niveau de la position 117 de l'interféron gamma.

Figure 2 : représentation des résultats (acides-aminés) obtenus au niveau de la position 117.

5 Figure 3 : représentation des résultats (codons) obtenus au niveau de la position 117.

## REVENDEICATIONS

1- Procédé de production d'une collection de mutants d'une séquence codante, ladite séquence codante étant insérée dans un plasmide, ledit procédé comprenant les  
5 étapes suivantes :

a) identifier ou sélectionner un ou plusieurs sites de restriction non-contenus dans la séquence codante et dans le plasmide ;

b) préparer en parallèle un mutant intermédiaire, pour chaque codon à muter de la séquence codante, dans lequel soit le codon à muter a été remplacé par une séquence  
10 comprenant un des sites de restriction identifiés ou sélectionnés en a), soit un des sites de restriction identifiés ou sélectionnés en a) a été inséré dans le codon à muter ou au niveau des 10 nucléotides bordant le codon à muter ;

c) à partir de chaque mutant intermédiaire, effectuer une mutation permettant de remplacer la séquence comprenant ledit site de restriction par chacun des codons  
15 correspondants aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale ou un sous-ensemble de ceux-ci tout en restaurant le cadre de lecture initial; et,

d) digérer le produit résultant de l'étape c) par l'enzyme de restriction spécifique du site de restriction qui a été inséré à l'étape b).

20 2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence comprenant le site de restriction est sélectionnée selon les critères suivants :

1) le site de restriction doit contenir de préférence au moins 5 bases, de préférence au moins 6 bases ;

2) le site de restriction ne doit pas être reconstruit lors de la deuxième étape de  
25 mutagenèse c) ; et,

3) l'insertion du site de restriction ne doit pas créer des sites de méthylation.

3- Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le procédé comprend en outre le traitement du produit résultant de l'étape c) au moyen d'une enzyme  
30 spécifique de sites présents sur l'ADN méthylé, comme l'enzyme DpnI, permettant de digérer les mutants intermédiaires restants.

4- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, pour chaque codon à muter, le mutant intermédiaire est préparé dans l'étape b)  
35 au moyen d'un oligonucléotide comprenant :

- une partie 5' de 5 à 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 5' le codon à muter ;

- une partie centrale constituée d'un site de restriction identifié ou sélectionné en a), facultativement bordé par un à dix nucléotides, et
- une partie 3' de 5 à 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 3' le codon à muter.

5

5- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, pour chaque mutant intermédiaire, un mélange d'au moins 19 oligonucléotides est utilisé dans l'étape c), chacun des oligonucléotides comprenant :

- une partie 5' de 5 à 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 5' ladite séquence comprenant le site de restriction ;
- une partie centrale consistant en l'un des codons correspondant aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale ou au sous-ensemble de ceux-ci ; et
- une partie 3' de 5 et 50 bases, parfaitement homologue à la séquence codante initiale, bordant en 3' ladite séquence comprenant le site de restriction.

10

15

20

6- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, pour chaque mutant intermédiaire, un mélange de 19 oligonucléotides comprenant chacun un des codons correspondant aux 19 acides aminés non-présents dans la séquence codante initiale est utilisé dans l'étape c).

25

7- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, pour chaque mutant intermédiaire, un mélange de 20 oligonucléotides comprenant chacun à un des codons correspondant aux 20 acides aminés est utilisé dans l'étape c).

30

8- Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que le mélange d'oligonucléotides est synthétisé en utilisant un mélange de triplets de nucléotides correspondant aux différents codons.

9- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, pour chaque mutant intermédiaire, un ensemble d'oligonucléotides comprenant des parties centrales du type NNG/T, ou NNG/C est utilisé dans l'étape c).

35

10- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les 19 mutants de chaque codon de la séquence codante à muter ou d'un sous-ensemble de ceux-ci sont ensuite isolés et séquencés.

11- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le plasmide est un vecteur d'expression.

5 12- Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le plasmide est un vecteur d'expression procaryote.

10 13- Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que le procédé comprend une étape supplémentaire e) d'expression des mutants obtenus, éventuellement suivie d'une étape f) d'analyse fonctionnelle du produit d'expression.

14- Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les étapes b) et c) sont réalisées par une réaction d'amplification simple brin circulaire.

1/2

## SEQ ID No 1

ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTTGGGTTCTCTTGG  
 CTGTTACTGCCAGGACCCATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAATG  
 CAGGTCATTCAGATGTAGCGGATAATGGAACCTTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGG  
 AAAGAGGAGAGTGACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAAC  
 TTTTAAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG  
 ACATGAATGTCAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAA**AAG**CTG  
ACTAATTATTCGGTAACTGACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCATCCA  
 AGTGATGGCTGAACTGTCGCCAGCAGCTAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAGATGC  
 TGTTCGAGGTCGAAGAGCATCCCAGTAAGCTAGCATTATCCCTAATACCTGCCACCCC  
 ACTCTAATCAGTGGTGGGAAGAACGGTCTCAGAAGTGTGGTTCAATTGGCCATTTAA  
 GTTTAGTAGTAAAAGACTGG

## Oligonucléotides au niveau du Codon 117

Oligos de mutagenèse :

mut117E	CGAGATGACTTCGAAG <b>GAATTC</b> CTGACTAATTATTCG	SEQ
ID No 2		
mut117NNS	CGAGATGACTTCGA <b>ANNS</b> CTGACTAATTATTCG	SEQ
ID No 3		

FIGURE 1

2/2

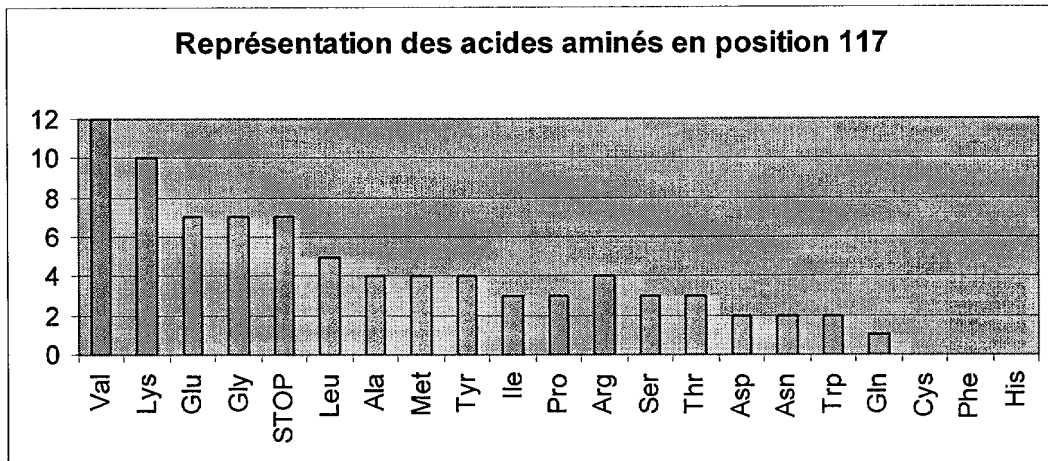


FIGURE 2

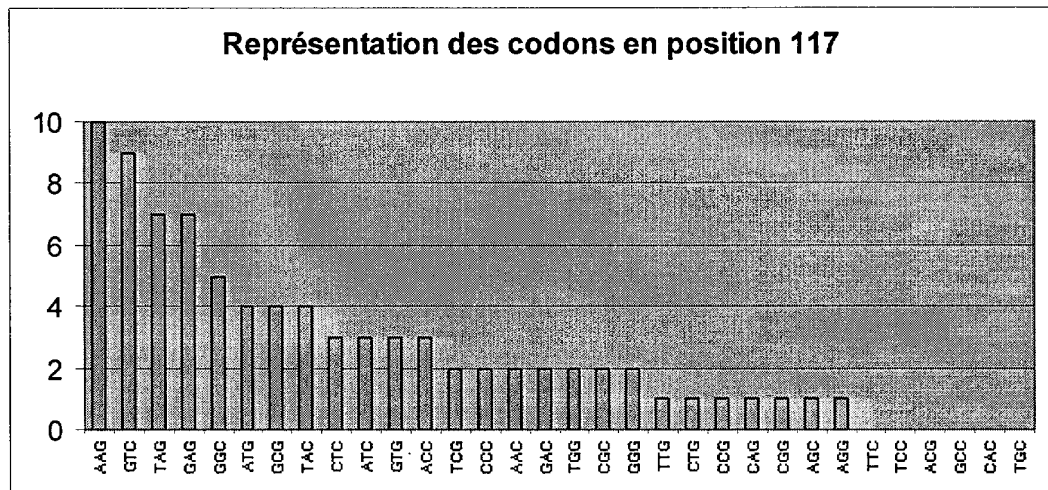


FIGURE 3

1  
SEQUENCE LISTING

<110> BIOMETHODES

<120> Procédé de mutagenèse dirigée systématique

<130> B0311FR

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 610

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgaaatata caagttatat cttggctttt cagctctgca tcgttttggg ttctcttggc      60
tgttactgcc aggaccata tgtaaaagaa gcagaaaacc ttaagaaata ttttaatgca      120
ggtcattcag atgtagcgga taatggaact cttttcttag gcattttgaa gaattggaaa      180
gaggagagtg acagaaaaat aatgcagagc caaattgtct ctttttactt caaacttttt      240
aaaaacttta aagatgacca gagcatcaa aagagtgtgg agaccatcaa ggaagacatg      300
aatgtcaagt ttttcaatag caacaaaag aaacgagatg acttcgaaaa gctgactaat      360
tattcggtaa ctgacttgaa tgtccaacgc aaagcaatac atgaactcat ccaagtgatg      420
gctgaactgt cgccagcagc taaaacaggg aagcgaaaaa ggagtcagat gctgtttcga      480
ggtcgaagag catcccagta agctagcatt atccctaata cctgccaccc cactcttaat      540
cagtgggtga agaacggtct cagaactggt tgtttcaatt ggccatttaa gtttagtagt      600
aaaagactgg                                     610

```

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

2

<223> Amorce

<400> 2

cgagatgact tcgaagaatt cctgactaat tattcg

36

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)..(17)

<223> N = A, T, C or G

<400> 3

cgagatgact tcgaannsct gactaattat tcg

33



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 653285  
FR 0409157

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X,D	OLINS P O ET AL: "Saturation mutagenesis of human interleukin-3." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 6 OCT 1995, vol. 270, no. 40, 6 octobre 1995 (1995-10-06), pages 23754-23760, XP002323239 ISSN: 0021-9258 * page 23754 - page 23755 *	1-14	C12N15/63 C12P19/34 C12Q1/68 C12N15/10
X	MALHOTRA K T ET AL: "Substitution of lysine 213 with arginine in penicillin-binding protein 5 of Escherichia coli abolishes D-alanine carboxypeptidase activity without affecting penicillin binding." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 5 JUN 1992, vol. 267, no. 16, 5 juin 1992 (1992-06-05), pages 11386-11391, XP002323240 ISSN: 0021-9258 * page 11387 *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)  C12N
A	NARANG S A ET AL: "Scanning of key residues in antibody binding sites by two saturation-mutagenesis approaches." NUCLEIC ACIDS SYMPOSIUM SERIES. 1991, no. 24, 1991, pages 173-179, XP008045164 ISSN: 0261-3166 * page 174 - page 175 *	1-14	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 avril 2005		Piret, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

3  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 653285  
FR 0409157

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	HÖRTNAGEL K ET AL: "Saturation mutagenesis of the E. coli RecA loop L2 homologous DNA pairing region reveals residues essential for recombination and recombinational repair." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY. 5 MAR 1999, vol. 286, no. 4, 5 mars 1999 (1999-03-05), pages 1097-1106, XP004462688 ISSN: 0022-2836 * figure 2 *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	SAMBROOK J. & RUSSELL D.W.: "Molecular cloning; a laboratory manual" 2001, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, COLD SPRING HARBOR, NEW YORK, XP002323243 * page 13.26 - page 13.27 *	1-14	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 avril 2005		Piret, B	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

3  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)