



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 652 744 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 12 P 21/02
C 12 N 15/00

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

// C 07 K 15/00 (C 12 P 21/02,
C 12 R 1:865)

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑮① Numéro de la demande: 5349/79

⑮② Date de dépôt: 08.06.1979

⑮③ Priorité(s): 08.06.1978 FR 78 17221

⑮④ Brevet délivré le: 29.11.1985

⑮⑤ Fascicule du brevet
publié le: 29.11.1985

⑮⑦ Titulaire(s):
Institut Pasteur, Paris (FR)

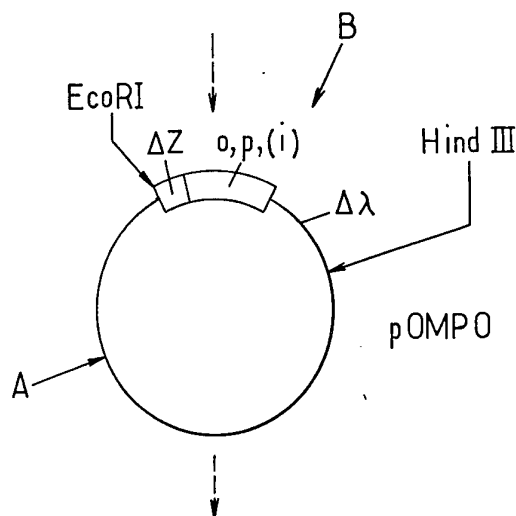
⑮⑦ Inventeur(s):
02 inventeurs ont renoncé à être mentionnées

⑮⑧ Mandataire:
Hartmut Keller Dr. René Keller, Patentanwälte,
Bern

⑮④ Procédé de fabrication d'une protéine hybride.

⑮⑦ On transforme un micro-organisme par un vecteur recombinant. Le vecteur recombinant résulte de l'insertion - par fusion génétique dans un vecteur - d'un fragment d'ADN étranger. Ce fragment résulte de la transcription enzymatique d'un ARN correspondant. A partir des protéines cellulaires formées par le micro-organisme la protéine hybride est récupérable. Une partie de la protéine appartient à une protéine normalement codée, dans une cellule-hôte naturel procaryote ou eucaryote, par un gène déterminé appartenant au génome de cette dernière cellule.

Le procédé s'applique de façon particulièrement avantageuse à la synthèse de protéine nutritives, notamment l'ovalbumine. La majeure partie de la protéine est constituée par la protéine «utile» du point de vue nutritif.



REVENDEICATIONS

1. Procédé de fabrication d'une protéine hybride dont une partie appartient à une protéine normalement codée, dans une cellule-hôte naturel procaryote ou eucaryote, par un gène déterminé appartenant au génome de cette dernière cellule, caractérisé par la transformation d'un micro-organisme par un vecteur recombinant résultant de l'insertion, par fusion génétique dans un vecteur, d'un fragment d'ADN étranger, résultant de la transcription enzymatique d'un ARN correspondant, la protéine hybride, contenant la partie de protéine recherchée, étant alors récupérable à partir des protéines cellulaires formées par le micro-organisme.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ce vecteur recombinant comprend dans une partie non essentielle de son génome un fragment d'ADN dérivé lui-même d'un fragment de phage λ , lié à un fragment d'opéron bactérien comprenant au moins le promoteur bactérien et un fragment du gène lié à ce promoteur, et en ce qu'il est pourvu, au niveau dudit fragment de gène, d'un site de coupure par une endonucléase déterminée, à l'exclusion de tout autre site de coupure par la même endonucléase dans les autres parties de son génome.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ce vecteur recombinant est constitué par un plasmide, en ce que le fragment d'opéron bactérien est un fragment d'un opéron lactose et en ce que le fragment de gène, lié au promoteur lactose, comporte au moins les premiers acides aminés de la β -galactosidase.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le fragment de phage λ lié à l'une de ses extrémités au susdit fragment d'opéron bactérien est délimité à son extrémité opposée par un site Hind III.

5. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que le vecteur recombinant contient — inséré dans le susdit fragment de gène Z ou de façon immédiatement contiguë à celui-ci — le susdit fragment d'ADN étranger.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le susdit fragment d'ADN étranger a une taille, exprimée en nombre de nucléotides, plus élevée que celle du fragment de gène Z ou analogue, ces tailles étant de préférence dans un rapport au moins égal à 50.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le susdit fragment d'ADN étranger code pour une protéine nutritive, ce fragment étant en phase avec la susdite séquence de gène Z.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le susdit fragment du gène Z comprend une séquence de triplets de ceux des nucléotides qui sont susceptibles de coder la traduction des huit premiers acides aminés, y inclus la formylméthionine, de la β -galactosidase bactérienne, d'une part, et, liée à la séquence précédente, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un nombre entier des triplets choisis parmi ceux qui ne sont pas susceptibles d'interrompre la traduction, le susdit fragment étranger, lequel est constitué par une séquence apte à coder la majeure partie de l'ovalbumine, d'autre part.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le vecteur est du type de ceux qui sont capables de transformer une levure.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le vecteur comprend des fragments d'ADN originaires du plasmide 2 μ qui sont capables de transformer une levure du type *Saccharomyces cerevisiae*.

11. Vecteur recombinant pour la mise en œuvre du procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend dans une partie non essentielle de son génome un fragment d'ADN dérivé lui-même d'un fragment de phage λ , lié à un fragment d'opéron bactérien comprenant au moins le promoteur bactérien et un fragment du gène lié à ce promoteur, et en ce qu'il est pourvu, au niveau dudit fragment de gène, d'un site de coupure par une endonucléase déterminée, à l'exclusion de tout autre site de coupure par la même endonucléase dans les autres parties de son génome.

12. Protéine hybride fabriquée d'après le procédé selon la revendication 1.

13. Protéine selon la revendication 12, ayant des propriétés nutritives comportant une partie au moins de la séquence d'acides aminés propre à l'ovalbumine, essentiellement exempte de résidus glycosylés.

14. Protéine selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence correspondant aux huit premiers acides aminés de la β -galactosidase et un autre fragment lié au premier et comprenant la totalité de la séquence des acides aminés de l'ovalbumine, à l'exception des cinq premiers aminoacides de l'ovalbumine naturelle.

L'invention est relative à un procédé de fabrication d'une protéine hybride, un vecteur recombinant pour la mise en œuvre du procédé et une protéine hybride fabriquée d'après le procédé, défini dans le préambule des revendications 1, 11 et 12.

On sait que l'on a déjà réussi l'insertion dans les vecteurs tels que des plasmides de copies d'ARN messagers fonctionnels dans leurs cellules-hôtes naturels et s'exprimant sous la forme d'une protéine déterminée. Par exemple, Humphries et coll. («Nucleic Acids Research», 1977, vol. 4, p. 2389) ont décrit l'insertion dans un plasmide (pCRI) d'un ADN à double brin provenant de la copie d'un ARN messenger purifié de l'ovalbumine de poule. Le plasmide ainsi modifié pCRI ov 2-1 a pu être introduit dans des souches d'*Escherichia coli* K12 par des méthodes de génie génétique devenues classiques. Aucune synthèse d'ovalbumine n'a pu cependant être mise en évidence parmi les produits du métabolisme des souches bactériennes utilisées. A ce titre, cette expérience vient confirmer les difficultés rencontrées jusqu'à ce jour, et non encore vaincues dans la pratique, au niveau de l'expression d'un gène d'eucaryote supérieur dans des bactéries hébergeant un vecteur comportant un tel gène inséré dans son génome. Il faut souligner cependant une exception à ce bilan général encore négatif. Il s'agit de l'expression qui a été réalisée récemment de la somatostatine dans des bactéries *Escherichia coli* transformées par un plasmide comprenant dans son génome le produit de la fusion génétique d'un gène synthétique de la somatostatine et d'un gène de l'opéron lactose d'*E. coli*. Les expérimentations y relatives ont été décrites dans un article intitulé «Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin» (Expression dans *Escherichia coli* d'un gène produit par synthèse chimique pour l'hormone somatostatine), publié par Keiichi Itakura et coll. dans «Science», vol. 198, pp. 1056-1063, du 9 décembre 1977.

On peut cependant noter que les auteurs de cette publication ont su se placer dans des conditions particulièrement favorables pour induire la production par *E. coli* d'une protéine hybride comportant un fragment formé des 14 aminoacides dont est normalement constituée la somatostatine. Ils ont eu recours à un gène synthétique, construit chimiquement de façon à éviter les difficultés auxquelles peut donner lieu la traduction par la bactérie d'un gène naturel.

En outre, ces auteurs ont eux-mêmes indiqué que la synthèse de la somatostatine n'a lieu en pratique que si le gène synthétique susdit est lié à la majeure partie du gène Z de la β -galactosidase de l'opéron lactose. Si le gène de la somatostatine n'est lié qu'à la partie correspondant au fragment de l'opéron lactose (comprenant les gènes p, o et les 8 triplets de base codant pour les premiers aminoacides de la β -galactosidase bactérienne), ci-après appelée lac⁻, aucune synthèse de somatostatine n'est décelée.

Il en résulte que le fragment correspondant à la somatostatine ne représentait, dans les conditions expérimentales les plus favorables décrites par ces auteurs, qu'une faible partie de la protéine hybride exprimée, la plus grande partie de celle-ci consistant en un fragment ayant la séquence d'acides aminés de la β -galactosidase. On peut

considérer que le fragment somatostatine se trouvait vis-à-vis de l'ensemble de la protéine hybride formée dans un rapport de l'ordre de 14 acides aminés (ceux de la somatostatine) à environ 1000 acides aminés.

L'invention a pour but l'obtention d'un procédé de production d'une protéine, procaryote ou eucaryote, mettant en jeu l'expression d'un ADN approprié de beaucoup plus grande dimension que celle du gène synthétique sus-visé de la somatostatine, d'une plus grande efficacité économique en ce que la plus grande partie de la protéine exprimée sera constituée du fragment protéique recherché. Elle a également pour but un procédé permettant l'expression par une bactérie, soit d'un ADN produit par synthèse enzymatique, notamment à partir d'un ARN, soit d'un gène naturel.

Le procédé selon l'invention est caractérisé par la transformation d'un micro-organisme par un vecteur recombinant résultant de l'insertion, par fusion génétique dans un vecteur, d'un fragment d'ADN étranger, résultant de la transcription enzymatique d'un ARN correspondant, la protéine hybride, contenant la partie de protéine recherchée, étant alors récupérable à partir des protéines cellulaires formées par le micro-organisme.

Le micro-organisme est notamment une bactérie, telle qu'*E. coli*, ou une levure, telle que *Saccharomyces cerevisiae*.

Le vecteur recombinant selon l'invention, pour la mise en œuvre du procédé, comprend dans une partie non essentielle de son génome un fragment d'ADN dérivé lui-même d'un fragment de phage λ , lié à un fragment d'opéron bactérien comprenant au moins le promoteur bactérien et un fragment du gène lié à ce promoteur et en ce qu'il est pourvu, au niveau dudit fragment de gène, d'un site de coupure par une endonucléase déterminée, à l'exclusion de tout autre site de coupure par la même endonucléase dans les autres parties de son génome.

De préférence, le fragment d'opéron bactérien est un fragment d'un opéron lactose et le gène est un gène Z codant la production de la β -galactosidase dans l'opéron lactose, le fragment de gène étant éventuellement limité au premier ou aux premiers triplets de nucléotides codant le premier ou les premiers acides aminés de la protéine correspondante, la β -galactosidase dans le cas de l'opéron lactose.

Avantageusement, le site de coupure en question est un site clivable par l'enzyme EcoRI.

Dans un vecteur préféré, le fragment d'opéron bactérien est un fragment d'opéron lactose et il comporte au moins la séquence du gène Z apte à coder les 7 premiers acides aminés de la β -galactosidase bactérienne (ou les 8 premiers acides aminés si on compte la formylméthionine en tant que premier acide aminé).

Un vecteur préféré est constitué d'un recombinant de l'ADN du plasmide pBR322 décrit par Bolivar *et al.*, 1977, «Gene», 2, 95, dont a été séparé un fragment non essentiel sous l'action des enzymes EcoRI et Hind III, d'une part, et d'un fragment de phage λ lié à un fragment d'opéron lactose, comprenant son promoteur sous l'opérateur et le fragment de gène Z codant les 7 (ou 8) premiers acides aminés, comme définis ci-dessus, d'autre part. De préférence, l'opérateur est insensible à la répression catabolique.

On peut incorporer à un tel vecteur un fragment de gène ou d'ADN correspondant à la protéine dont l'expression est recherchée, fragment de gène qui peut être soit synthétisé chimiquement, soit synthétisé par voie enzymatique, notamment à partir d'un ARN messager, soit encore être un gène naturel, ce gène pouvant en outre être d'une taille très supérieure à celle du fragment de gène faisant partie de l'opéron bactérien tel qu'il a été défini plus haut.

Dans le cas préféré de l'invention décrit plus loin, visant à la production d'une protéine hybride contenant la quasi-totalité de la séquence des acides aminés de l'ovalbumine, on aura de préférence recours à un fragment d'ADN synthétisé par voie enzymatique à partir de l'ARN messager correspondant. Celui-ci peut être obtenu notamment par transcription enzymatique selon la méthode décrite par Humphries et coll. ci-dessus. La possibilité de produire l'expression dans une bactérie, voire une levure, d'un fragment d'ADN ainsi obtenu, après son incorporation préalable dans un vecteur appro-

prié, est remarquable surtout si l'on sait que cette technique ne paraît pas devoir être applicable aux gènes naturels. Il a en effet déjà été indiqué que les gènes codant pour l'ovalbumine sont constitués de séquences d'ADN interrompues par des séquences non codantes appelées introns.

Ainsi, il est possible d'incorporer aux vecteurs la plus grande partie du gène de l'ovalbumine et de faire exprimer le recombinant ainsi obtenu dans un micro-organisme, notamment une bactérie, en particulier dans *E. coli*, de sorte que l'on peut ainsi obtenir la production d'une protéine hybride dont la majeure partie correspond à la séquence d'acides aminés de l'ovalbumine.

On utilise donc particulièrement les plasmides modifiés ainsi obtenus, notamment celui résultant de la recombinaison du plasmide préféré sus-défini et d'un fragment d'ADN susceptible de coder la production de la majeure partie de l'ovalbumine. En particulier, on utilise un plasmide modifié de ce type comportant un fragment d'ADN correspondant à la fusion d'une séquence de triplets de ceux des nucléotides qui sont susceptibles de coder la traduction des huit premiers acides aminés, y inclus la formylméthionine, de la β -galactosidase bactérienne, d'une part, et, liée à la séquence précédente, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un nombre entier des triplets choisis parmi ceux qui ne sont pas susceptibles d'interrompre la traduction, une séquence apte à coder la majeure partie de l'ovalbumine, éventuellement à l'exception des premiers aminoacides de celle-ci (notamment des cinq premiers), d'autre part.

On peut utiliser en outre les vecteurs formés par les plasmides capables de transformer des levures, ces plasmides comportant une insertion dans leur génome de tout ou partie du plasmide précédent, étant entendu que ladite partie de plasmide comprend en tout état de cause le recombinant d'ADN qui a été défini précédemment.

L'invention s'applique de façon particulièrement avantageuse à la synthèse de protéines nutritives, dont l'ovalbumine n'est qu'un exemple. Le procédé est particulièrement avantageux en ce que la majeure partie de la protéine ainsi susceptible d'être exprimée est constituée par la protéine utile du point de vue nutritif, sans qu'il soit nécessaire de procéder à la séparation de ce fragment utile du fragment correspondant aux premiers acides aminés de la β -galactosidase.

En particulier, on notera que dans le cas de l'ovalbumine qui est formée d'environ 385 acides aminés, les 380/387 (exprimés en nombre d'acides aminés) de la protéine hybride finalement obtenue seront constitués par la protéine recherchée.

Il est entendu qu'il sera éventuellement nécessaire de prévoir, dans les plasmides du genre défini ci-dessus, dans lesquels la séquence d'ADN correspondant à l'ovalbumine sera remplacée par celle susceptible de coder toute autre protéine nutritive, l'insertion d'une ou de deux paires de bases (le cas échéant complétées d'un nombre entier de triplets) entre, d'une part, le fragment contenant les triplets codant les sept (ou huit) premiers acides aminés de la β -galactosidase et, d'autre part, la séquence d'ADN codant la production de la protéine nutritive, pour assurer la mise en phase correcte de ces deux fragments à l'occasion de leur traduction ultérieure.

L'invention concerne également le produit nouveau obtenu, c'est-à-dire la protéine hybride fabriquée d'après le procédé selon l'invention.

La protéine obtenue a la capacité d'être détectée par les anticorps de la protéine naturelle, dans des dosages radio-immunologiques courants.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'un exemple de production des vecteurs (plasmides) selon l'invention et de leurs applications à la production d'une protéine nutritive, essentiellement caractérisée par une séquence d'acides aminés substantiellement identiques à une partie au moins et de préférence à la plus grande partie de l'ovalbumine de poule.

Il sera fait référence au cours de cette description au dessin dans lequel sont schématiquement représentées les transformations auxquelles le plasmide initialement traité donne lieu.

Exemple:

1. Construction du vecteur

On se propose d'incorporer dans une partie non essentielle du plasmide pBR322 (fig. 4a) déjà mentionné un ADN comportant un fragment de phage λ porteur d'un segment d'opéron lactose, avec un site de coupure par EcoRI situé au niveau du septième acide aminé de la β -galactosidase (formylméthionine non comprise).

Ce dernier ADN a été obtenu de la façon suivante:

On part du phage λ dans lequel a été incorporé par fusion génétique un segment d'opéron lactose tel qu'il a été décrit par Backman et coll. dans «Proc. Natl. Acad. Sci. USA» (vol 73, N° 11, pp. 4174-4178, novembre 1976, «Genetics»). Le génome de ce phage modifié comprend un site EcoRI-Z dans le gène Z de son segment d'opéron lactose.

On a représenté dans la fig. 1 une carte schématique du phage λ , en y faisant apparaître la partie non essentielle principale NE du phage naturel, qui a été modifiée. Les nombres indiqués dans la fig. 1 font référence à l'indication de l'échelle utilisée, exprimée en pourcentages de longueur à partir des gènes de la tête du phage.

Le susdit segment d'opéron lactose contient l'opérateur, le promoteur et l'information codant pour les premiers acides aminés de la β -galactosidase (avec les mutations L8 et UV5). Ce fragment a été inséré *in vitro* dans le site EcoRI situé à la fin du gène Z d'un phage λ plac5 (ce phage n'avait pas d'autre site sensible à EcoRI).

On a schématiquement représenté dans la fig. 2 l'emplacement approximatif du segment d'opéron lactose (rectangle Z) dans ce phage.

Par la technique décrite par les auteurs susdits, on procède à l'insertion dans ce site EcoRI-Z (schématiquement représenté par la flèche correspondante de la fig. 2) d'un fragment OP Hind III 203 également décrit par ces auteurs (fig. 3a). Ce dernier fragment comporte, par rapport à une partie centrale OP, d'une part, un fragment Z' provenant du début du gène Z et correspondant aux sept premiers acides aminés susceptibles d'être codés par le gène Z et, d'autre part, un fragment terminal I' du répresseur de l'opéron lactose. Lorsque le fragment OP Hind III 203 (représenté à échelle réduite dans la fig. 3b) est inséré dans le même sens que le fragment OP homologue à proximité du fragment terminal Z'' du gène Z du phage (visé par la référence op dans la fig. 3b et à proximité d'un fragment terminal I' du gène I du répresseur de l'opéron lactose), une recombinaison intramoléculaire crée une délétion (fig. 3c) de la presque totalité du gène Z. Cela permet, par ailleurs, de créer un site EcoRI (site EcoRI-AZ) à la place du site Hae III, très près de l'origine du gène Z à un site correspondant au septième acide aminé de la β -galactosidase. Il ne subsiste finalement du gène Z initial que les fragments Z'' et Z', de part et d'autre du site EcoRI-AZ.

Dans la fig. 2 a également été représenté le site de coupure par l'enzyme Hind III le plus proche du segment de l'opéron lactose sur l'ADN du bactériophage λ_2 . Ce site est appelé sHind III λ_2 .

Le vecteur ainsi obtenu a été coupé selon les techniques en soi connues par les enzymes EcoRI et Hind III. On recueille par une méthode en soi connue le fragment de phage, y inclus le fragment Z', ayant une extrémité (du côté de Z') correspondant au site de coupure EcoRI-AZ et dont l'extrémité opposée correspond au site de coupure sHind III λ_2 . Cette identification peut être effectuée par exemple en mettant à profit sa capacité d'agir en tant que fragment inducteur de l'opéron lactose dans une souche indicatrice *E. coli* K12 lac Z⁺ sur milieu coloré, notamment sur un substrat chromogène à base de 5-chloro-4-bromo-3-indolyl- β -galactoside.

L'ADN du plasmide pBR322 est lui-même coupé par les enzymes EcoRI et Hind III au niveau de ses sites de coupure correspondants.

On procède à la recombinaison *in vitro* des fragments de l'ADN du plasmide pBR322 et des fragments de phage λ porteurs de segments d'opéron lactose, en présence d'une DNA ligase, notamment de celle extraite du phage T4 et l'on isole par clonage dans *E. coli* K12, notamment *E. coli* K12 C600 rk⁻ mk⁺ selon une méthode

classique, par exemple celle décrite dans Humphries et coll. déjà cités, le vecteur recherché schématisé par la fig. 4b. Ce vecteur comprend la partie essentielle A de l'ADN du plasmide initial et l'ADN inséré B comportant le fragment de phage $\Delta\lambda$ et le fragment d'opéron lactose ($\Delta Z_{o,p(i)}$) (i) désignant un fragment seulement du gène (i)).

Le nouveau plasmide ainsi obtenu, dénommé p1397, porte le segment d'opéron lactose indiqué ci-dessus, avec un seul site de coupure par EcoRI au niveau du septième acide aminé (ou du huitième si l'on compte en tant que tel la formylméthionine) de la β -galactosidase. Il est également appelé pOMP0.

2. Construction du recombinant ovalbumine

Il est formé à partir du plasmide modifié susdit et du fragment Hha ov, défini dans Humphries et coll., 1977. C'est un fragment d'ADN bicaténaire découpé par l'enzyme de restriction HhaI à partir du plasmide pCRI ov 2-1 et isolé par sédimentation en gradient de saccharose (ce fragment Hha ov, qui comprend environ 2400 paires de bases, porte la plus grande partie de la séquence correspondant à l'ARN messager de l'ovalbumine). Il est schématisé dans la fig. 4c dans le dessin (référence Hha ov).

Le plasmide p1397 est ouvert par EcoRI et traité par la nucléase spécifique de l'ADN simple brin S1, de manière à rogner les courtes extrémités cohésives produites par EcoRI (Humphries et coll., 1977).

L'ADN obtenu, schématisé en 4d, est traité par la DNA polymérase I d'*E. coli* en présence des 4 déoxytriphosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP (comme décrit dans Humphries et coll., 1977).

Le fragment Hha ov est, de la même façon, traité par la DNA polymérase I d'*E. coli* en présence des 4 déoxytriphosphates.

Ces traitements enzymatiques permettent l'obtention de molécules d'ADN modifiées dépourvues d'extrémités cohésives et se prêtant à une ligature par la DNA ligase du phage T4 mise en excès (Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A.D., Heynecker H.L., Bolivar F., Boyer H.W. (1977), «Science», 198, 1056).

On isole, parmi les molécules recombinantes obtenues, celles dont la séquence codant pour l'ovalbumine (à l'exception des 15 premières paires de bases codant les 5 premiers acides aminés) est fusionnée avec les 7 premiers acides aminés de la β -galactosidase bactérienne (ou les 8 premiers acides aminés si l'on compte la formylméthionine) (fig. 4e). Celle des souches recombinantes qui a ensuite été retenue pour les compléments d'expérimentation décrits plus loin est appelée pOMP0.

Cet isolement est avantageusement réalisé en ayant recours à la méthode de tri qui consiste à introduire les molécules recombinantes dans une souche d'*E. coli* K12 lysogène, porteuse d'un prophage thermo-inductible, et, lorsque cette souche a formé des colonies, à induire la lyse d'une partie des individus qui composent lesdites colonies, les ADN des individus lysés étant alors transférés par contact sur un support distinct, notamment filtre de cellulose, sur lequel les ADN recherchés sont ensuite décelés *in situ* par hybridation avec un ADN-sonde radioactif, en un endroit qui est alors corréléable à l'emplacement dans la culture initiale du micro-organisme ayant produit ce constituant intracellulaire. Cet isolement peut naturellement être réalisé par toute autre méthode de détection connue.

Les souches non lysées appartenant aux colonies répondant positivement dans ce système (donc porteuses de séquence ovalbumine) sont isolées et les plasmides retransférés par transformation dans une autre souche d'*E. coli* K12 non lysogène (C600 rk⁻ mk⁺) selon la technique décrite par Rougeon F., Kourilsky P., Mach B. (1975), «Nucleic Acids Research», 2, 2365. Ces souches sont cultivées dans un bouillon et des extraits sont faits par sonication.

A cette fin, les bactéries sont congelées dans le milieu de culture, puis décongelées et soumises à 0°C à un traitement aux ultrasons suffisant pour les ouvrir (trois fois 20 s dans nos conditions). On obtient ainsi un extrait brut, qui peut éventuellement être ensuite fractionné.

La présence d'antigènes semblables à l'ovalbumine a été détectée par analyse radio-immunologique. Dans ce dosage, on fait entrer en

compétition l'extrait bactérien de certaines souches avec de l'ovalbumine marquée à l'iode I^{125} , pour former des complexes avec un anticorps antiovalbumine très spécifique.

Le dosage radio-immunologique indique la présence de 5000 à 50 000 molécules d'antigène par bactérie. L'affinité de l'antigène produit par la bactérie à l'égard de l'anticorps antiovalbumine n'apparaît pas très différente de celle de l'ovalbumine naturelle.

La taille de l'antigène a été mesurée par électrophorèse d'extraits bruts marqués au soufre S^{35} et immunoprécipités.

La molécule hybride a le même poids moléculaire apparent que l'ovalbumine (43 000 daltons environ).

Elle diffère de l'ovalbumine faite dans l'œuf de poule par un petit nombre de modifications effectuées après la synthèse de la protéine. En effet, l'ovalbumine naturelle est phosphorylée en deux endroits et glycosylée en un endroit. L'absence de groupes glycosylés n'est pas de nature à modifier les propriétés nutritives de la protéine obtenue.

La séquence théorique de l'ovalbumine modifiée est la suivante: formylméthionine - thréonine - méthionine - isoleucine - thréonine - acide aspartique - sérine - leucine - alanine - alanine - sérine - méthionine - acide glutamique, ..., les 8 premiers acides aminés provenant de la β -galactosidase et les 5 suivants formant les premiers acides aminés du fragment d'ovalbumine Hha ov (auquel manquent d'ailleurs les 5 premiers aminoacides naturels de l'ovalbumine).

La souche de plasmide P1397 a été déposée le 2 juin 1978 dans la Collection nationale de culture de micro-organismes (CNCM) à l'Institut Pasteur sous le N° I-064.

Le plasmide tel que défini ci-dessus, et plus particulièrement la partie de ce plasmide contenant la séquence correspondant à l'ovalbumine modifiée ci-dessus, peut être incorporé dans un plasmide susceptible de transformer des souches de levure, notamment *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine modifiée est alors susceptible d'être exprimée aussi dans ces levures. Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, le fragment en question paraît donc dépourvu de tout marqueur déclenchant des mécanismes de restriction de ladite levure vis-à-vis de ce fragment d'origine bactérienne.

La construction d'un plasmide modifié susceptible de transformer une levure, son amplification, la transformation d'une levure avec ce plasmide modifié et la détection de l'expression de ce plasmide modifié dans la levure sont brièvement exposées ci-après.

1. Extraction à partir du plasmide pOMP2 de la séquence lac-ovalbumine

pOMP2 est ouvert par l'enzyme de restriction HhaI dont deux sites de reconnaissance, de part et d'autre du fragment Hha ov, sont montrés sur la fig. 4e. Après réinsertion de ce fragment dans un autre vecteur, il est aisément reconnu par la capacité qu'il a de rendre les bactéries transformées lac constitutives (celles-ci étant alors susceptibles de produire de grandes quantités de β -galactosidase, donc formant des colonies bleues en présence du colorant X-gal(5-bromo-4-chloro-indolylgalactoside).

Il a en particulier été procédé comme suit:

20 μ g de l'ADN de pOMP2 ont été digérés par HhaI (Biolab; 25 unités) pendant 30 min à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par chauffage à 65°C pendant 10 min en présence de EDTA 10 mM. Le mélange de réaction est ensuite placé sur un gradient de sucrose 5-20% (poids/volume dans une solution d'acétate de sodium pH 6,0, EDTA 10mM et SDS 0,5%), puis centrifugé à 31 000 tr/min pendant 16 h à 20°C (centrifugeuse Beckman rotor de type SW41). On recueille le fragment le plus lourd qui porte la séquence lac-ovalbumine.

2. Formation du plasmide 8 contenant le fragment EcoRI-D

Il est obtenu par recombinaison *in vitro* d'un plasmide pBR322 comportant un marqueur génétique Ura⁺ (décrit par Marie-Louise Bach, François Lacroute et David Botstein dans «PNAS», 1979, vol. 176, N° 1, pp. 386-390) préalablement ouvert par EcoRI, et du fragment EcoRI-D (décrit par Cameron *et al.*, «Nucleic Acids Research», 1977, vol. 4, N° 5, pp. 1429-1448) originaire du plasmide

2 μ , dont a auparavant été décrite l'aptitude à transformer des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*.

On peut avoir recours à toute technique connue, notamment celle décrite par Hinnen *et al.*, «PNAS», 1978, vol. 75, N° 4, pp. 1929-1933.

La souche de plasmide 8 a été déposée à la CNCM sous le N° I-093 le 27 mai 1979.

3. Formation d'un recombinant du plasmide 8 et du fragment de pOMP2 contenant la séquence lac-ovalbumine

30 μ g de l'ADN du plasmide 8 sont coupés par 1,5 unité de HhaI au sein d'un tampon classique, par contact mutuel pendant 5 min à 37°C. La réaction est ensuite interrompue par chauffage à 65°C pendant 10 min en présence de EDTA 10^{-2} M. Les molécules linéaires sont purifiées par centrifugation sur un gradient de saccharose 5-20% dans un tampon Tris-HCl 10^{-2} M, EDTA 10^{-3} M, NaCl 10^{-1} M pendant 4 h à 20°C à 40 000 tr/min, dans une centrifugeuse Beckman rotor de type SW41.

200 ng du susdit fragment lac-ovalbumine de 2,67 kb (kilobases) et 600 ng du plasmide 8 rendu linéaire sont incubés à 4°C en présence de T4 ADN-ligase dans un volume final de 5 μ l d'un tampon Tris pH 7,5, 40 mM, MgCl₂ 10mM, DTT 10mM, ATP 0,1M, sérumalbumine (0,05 mg/ml).

Des cellules lysogènes de la souche 1398 (*E. coli* K12) (CNCM N° I-094 déposée le 27 mai 1979) sont transformées avec des recombinants et les cellules transformées sélectionnées sur milieu de culture contenant de l'ampicilline (20 μ g/ml) par hybridation *in situ* avec une sonde comportant un ADN spécifique de la séquence ovalbumine. Le dosage radio-immunologique (avec une sonde ARN spécifique du fragment Hha ov) indique la présence de protéines contenant de l'ovalbumine dans les bactéries préalablement transformées.

4. Amplification et récupération du plasmide

On transforme une colonie de bactéries *E. coli* C600 rk⁻mk⁺ inducibles en bactéries lac constitutives avec l'ADN isolé au cours de l'opération précédente et, après développement de la colonie, on a recours pour la récupération du plasmide à des techniques classiques de rupture des bactéries, suivies de la récupération des ADN, séparation de la bande de plasmide circulaire dans un gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium.

5. Transformation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (CNCM N° I-095 déposée le 27 mai 1979).

La souche de levure sus-indiquée qui est Ura⁻ est transformée par le susdit plasmide et cultivée sur un milieu de culture dépourvu d'uracile. Seules les cellules rendues Ura⁺ par ledit plasmide se développent sur ce milieu.

On détecte la production d'une protéine hybride contenant une séquence ovalbumine par dosage radio-immunologique dans les conditions qui ont déjà été indiquées plus haut.

Le vecteur contenant le gène de l'ovalbumine peut, à son tour, servir comme vecteur pour fabriquer d'autres protéines hybrides incluant une protéine distincte; cela peut être réalisé par remplacement du fragment de gène ovalbumine de ce vecteur ou addition à celui-ci du fragment de copie d'ARN correspondant à la protéine recherchée et s'exprimant sous la forme de cette protéine dans sa cellule-hôte naturel. A titre d'exemple, on pourrait y insérer le gène de la somatostatine ou de toute autre protéine.

Cette application est en effet d'autant plus intéressante qu'il a été constaté que la majeure partie de la protéine hybride contenant l'ovalbumine, exprimée dans les bactéries par le vecteur sus-défini, est sécrétée dans l'espace périplasmique, c'est-à-dire entre la membrane cytoplasmique et la paroi bactérienne.

Ainsi, on a constaté que, lors de l'expression de pOMP2 dans une souche d'*E. coli* K12, 88% de l'ovalbumine synthétisée sont retrouvés dans le susdit espace périplasmique, 12% seulement restant dans le cytoplasme.

Ces dosages ont été effectués par la susdite méthode radio-immunologique, appliquée au milieu de culture des bactéries, après éclatement sélectif des parois bactériennes selon la méthode de Neu et Heppel décrite dans «J. of Biol. Chem.», 1965, tome 240, pp. 3685-3692. On a de même dosé l'ovalbumine intracellulaire libérée par éclatement des sphéroplastes.

Le vecteur contenant le fragment d'ADN correspondant à l'ovalbumine est donc approprié à l'insertion dans son génome d'un ADN correspondant à la protéine recherchée (somatostatine ou autre protéine). L'expression du vecteur ainsi modifié entraîne par conséquent la libération de la protéine hybride exprimée, contenant notamment la protéine recherchée, dans une partie de la bactérie (espace péri-plasmique) à partir de laquelle elle est aisément récupérée.

On peut donc utiliser d'une façon générale tout vecteur recombinant comportant dans son génome une séquence d'ADN codant la majeure partie de l'ovalbumine. De préférence, cette séquence d'ADN correspondant à l'ovalbumine dans le vecteur en question est liée à une séquence d'ADN correspondant à au moins une partie de l'opéron lactose, y inclus le promoteur et une partie du gène Z qui lui est associée, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un nombre entier de triplets choisis parmi ceux qui ne sont pas susceptibles d'interrompre la traduction. Le vecteur recombinant selon l'invention comprend de préférence le fragment d'ADN préféré comportant la séquence correspondant aux huit premiers acides aminés de la β -galactosidase et, liée directement à celle-ci, la séquence apte à coder la majeure partie de l'ovalbumine, éventuellement à l'excepti-

tion des premiers aminoacides de celle-ci, notamment des cinq premiers aminoacides.

De préférence, la séquence d'ADN correspondant à l'ovalbumine est constituée par l'ADN résultant de la transcription enzymatique de l'ARN messager correspondant au gène de l'ovalbumine dans les cellules-hôtes naturels.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés; elle en embrasse au contraire toutes les variantes, en particulier celle où l'on a recours à d'autres plasmides que ceux qui ont été plus particulièrement décrits dans ce qui précède, en particulier le plasmide pSOM1 visé dans l'article déjà mentionné de Keiichi Itakura et coll., dans la mesure où notamment l'ovalbumine exprimée peut être considérée comme n'étant pas sensible à l'action des enzymes protéolytiques endogènes de la bactérie-hôte. On peut aussi recourir à des plasmides modifiés, dans lesquels le fragment d'opéron, au lieu d'être originaire de l'opéron lactose, provient d'un autre opéron, tel qu'un opéron galactose ou un opéron tryptophane; en ce qui concerne ce dernier, on rappelle en effet que la construction d'un recombinant d'un phage λ et d'un opéron tryptophane a été décrite notamment par Anne Moir et W.J. Brammar dans l'article intitulé «The use of specialised transducing phages in the amplification of enzyme production» (L'utilisation de phages transducteurs spécialisés pour l'amplification de la production d'enzymes) [«Molec. Genet.», 149, 87-99 (1976)].

Fig.1.

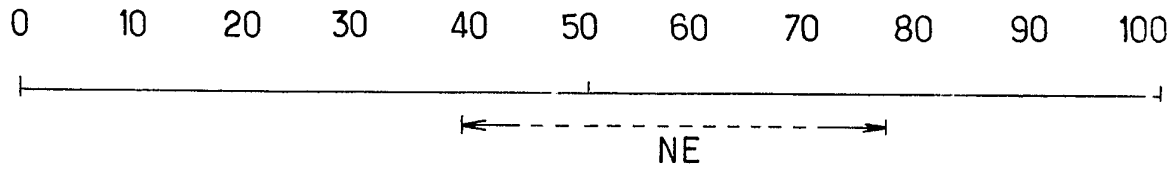


Fig.2.

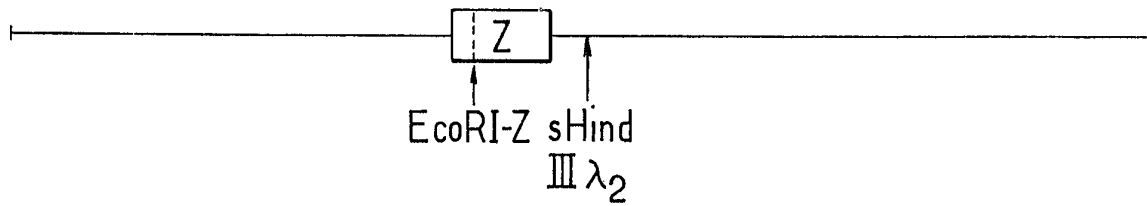


Fig.3a.

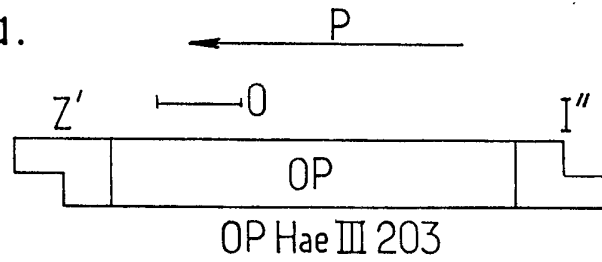


Fig.3b.

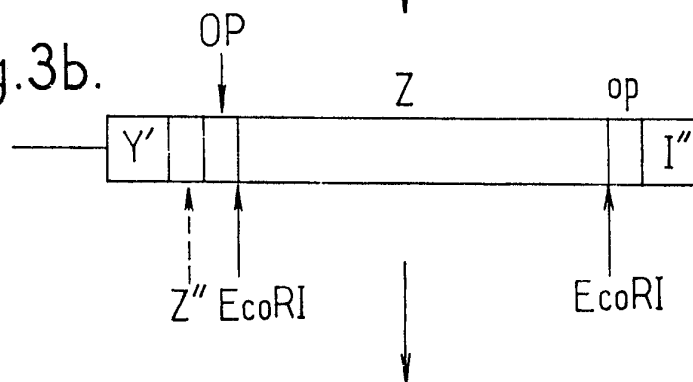


Fig.3c.

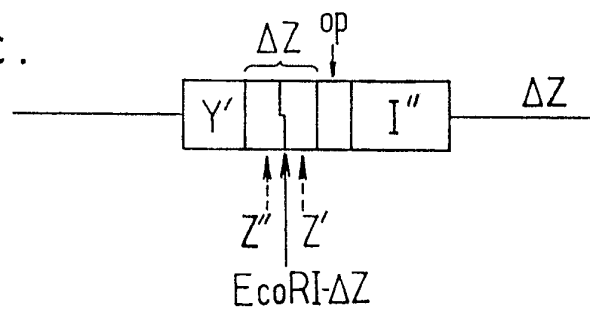


Fig.4.

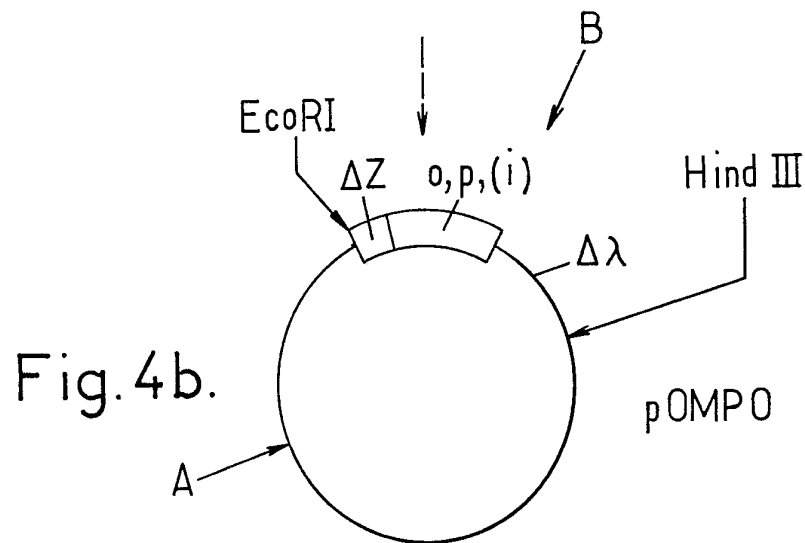
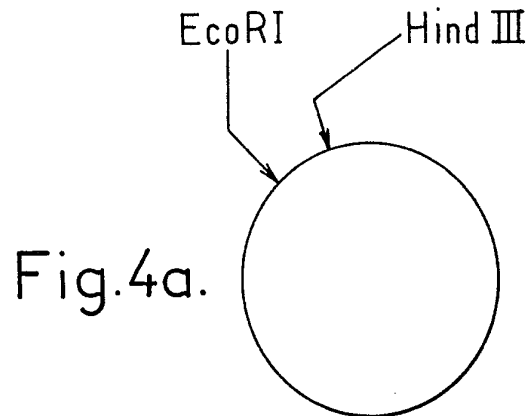


Fig.4c.

