(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 656 531**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **89 17467**

(51) Int Cl[5] : A 61 K 37/50; C 12 N 15/53, 15/81//(C 12 N 15/81)(C 12 R 1/865)

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 29.12.89.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** 05.07.91 Bulletin 91/27.

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

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *SANOFI Société Anonyme* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** Leplatois Pascal, Loison Gérard, Pessegue Bernard et Shire David.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire :** Cabinet Beau de Loménie.

(54) Promoteur artificiel pour l'expression de protéines dans le levure.

(57) L'invention concerne un promoteur artificiel pour l'expression de protéines dans la levure qui comporte:

- une sous-séquence en amont de l'élément TATA de la séquence du promoteur du gène GAL7 de Saccharomyces cerevisiae, qui comporte les séquences d'activation amont UAS1 et UAS2.
- une sous-séquence de la séquence d'un promoteur ADH_2 comportant l'élément TATA et la région d'initiation de la transcription.

Application: Obtention de protéines notamment, d'urate oxydase.

FR 2 656 531 - A1

Promoteur artificiel pour l'expression de protéines dans la levure

La présente invention concerne un nouveau promoteur artificiel pour l'expression dans la levure de protéines, en particulier des protéines hétérologues, un vecteur d'expression de celles-là portant celui-ci, les souches de levure et notamment de Saccharomyces cerevisiae transformées par ce vecteur d'expression, ainsi qu'un procédé de production d'une protéine recombinante à l'aide de ces souches.

La levure, et en particulier Saccharomyces cerevisiae, microorganisme non pathogène dont la génétique a été étudiée en détail, est un hôte eucaryote de choix pour l'expression des protéines, notamment des protéines hétérologues. Il est donc important de découvrir ou de construire de nouveaux promoteurs pour l'expression de celles-là, plus intéressants que les promoteurs connus.

La structure d'un promoteur de levure, séquence d'ADN située en amont d'un gène et responsable de la transcription de celui-ci, commence à être partiellement connue et comprise. On sait qu'il comporte un élément TATA situé dans une zone riche en AT, une région d'initiation de la transcription en aval de celui-ci et éventuellement en amont de ce dernier des séquences, dites séquences d'activation amont UAS (Upstream Activating Sequence) ou de répression amont URS (Upstream Repressing Sequence), qui règlent la force du promoteur sous l'effet d'un inducteur ou d'un répresseur.

La demanderesse a construit un nouveau promoteur hybride à partir de deux promoteurs connus : le promoteur du gène GAL7 de Saccharomyces cerevisiae (TAJIMA et al., 1986, Molecular cellular Biology, 6, 246-256) et un promoteur de séquence proche de celle du promoteur ADH_2 naturel (région 5' flanquante du gène ADH_2 décrite par RUSSEL et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674-2682) appelé, dans cette demande, un promoteur ADH_2. Elle a ensuite inséré ce nouveau promoteur et à, titre comparatif, le promoteur ADH_2 qui a servi à le construire dans un vecteur d'expression pour une nouvelle protéine recombinante : l'urate oxydase d'A. flavus, et

dans un vecteur d'expression pour la β-galactosidase, a transformé des souches de levure à l'aide de ces vecteurs, cultivé ces dernières dans différentes conditions et dosé, après lyse de ces cellules, la quantité de la protéine d'intérêt exprimée. Elle a ainsi constaté que le nouveau promoteur permet un niveau maximal d'expression élevé parfois supérieur à celui du promoteur ADH_2, et une régulation du niveau d'expression à plusieurs niveaux.

L'invention concerne donc un nouveau promoteur artificiel pour l'expression de protéines dans la levure, caractérisé en ce qu'il comporte :

- une sous-séquence en amont de l'élément TATA de la séquence du promoteur du gène GAL7 de Saccharomyces cerevisiae, qui comporte les séquences d'activation amont UAS1 et UAS2.
- une sous-séquence de la séquence d'un promoteur ADH_2 comprenant l'élément TATA et la région d'initiation de la transcription.

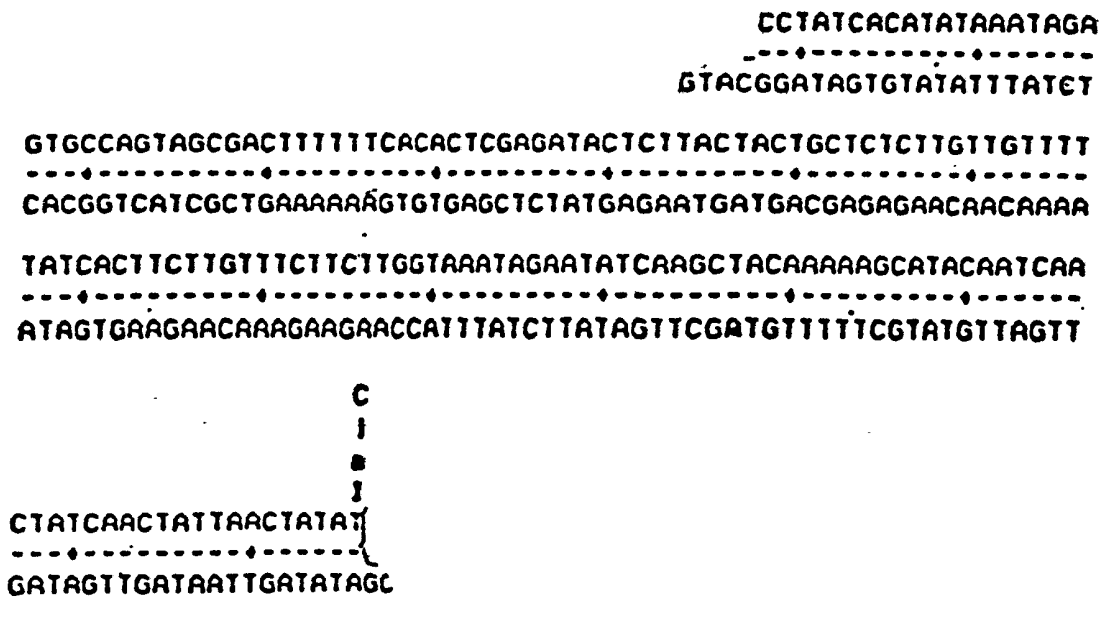
De préférence, la sous-séquence en amont de l'élément TATA du promoteur du gène GAL7 de Saccharomyces cerevisiae est une sous-séquence de la séquence suivante :

```
                                                    M
                                                    l
                                                    u
                                                    l
CGCGTCTATACTTCGGAGCACTGTTGAGCGAAGGCTCATTAGATATATTTTCTGTCAT
--+---------+---------+---------+---------+---------+---------+-----
    AGATATGAAGCCTCGTGACAACTCGCTTCCGAGTAATCTATATAAAAGACAGTA
TTTCCTTAACCCAAAAATAAGGGAGAGGGTCCAAAAAGCGCTCGGACAACTGTTGACCGT
----+---------+---------+---------+---------+---------+---------+-----
AAAGGAATTGGGTTTTTATTCCCTCTCCCAGGTTTTTCGCGAGCCTGTTGACAACTGGCA

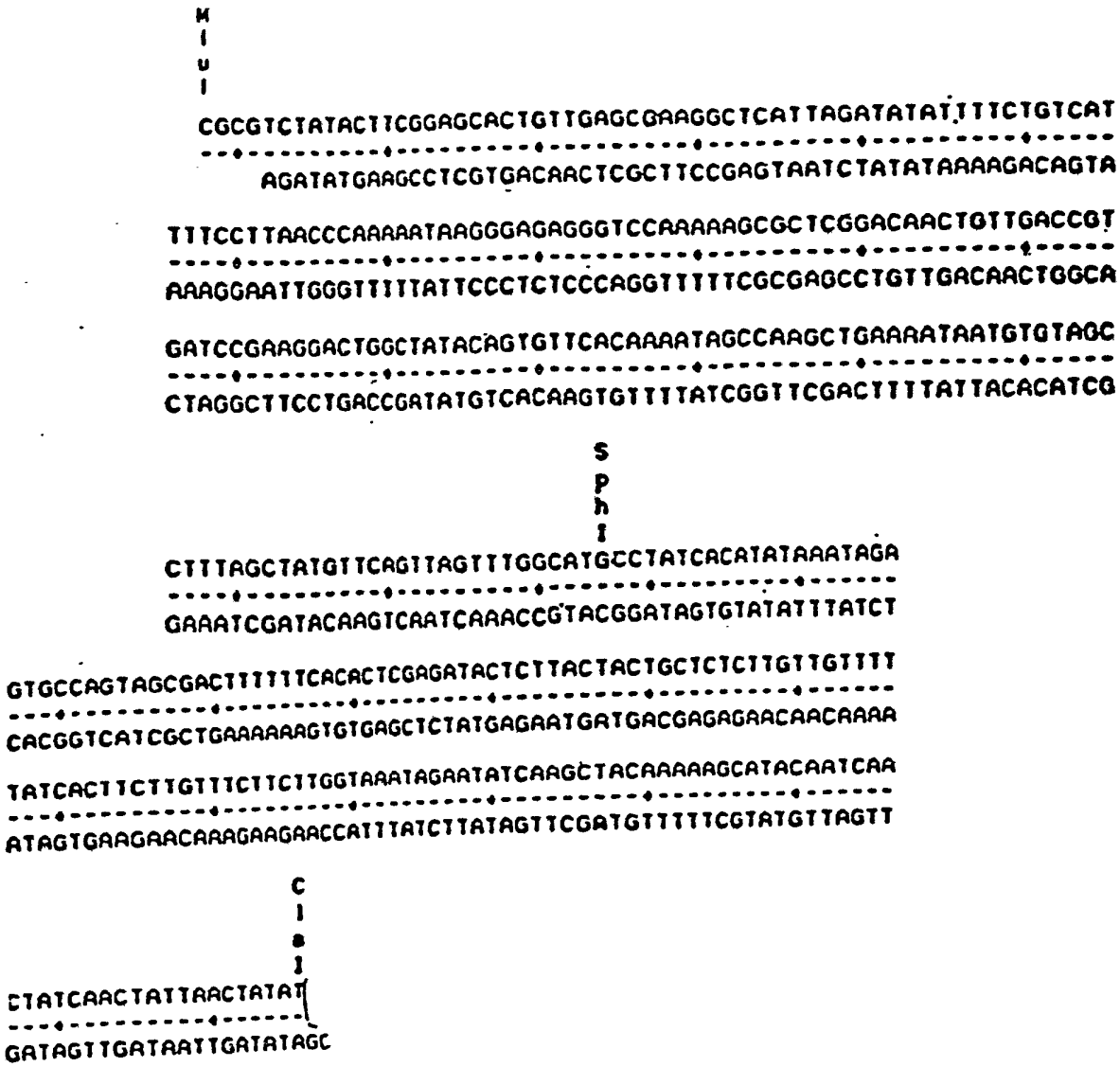
GATCCGAAGGACTGGCTATACAGTGTTCACAAAATAGCCAAGCTGAAAATAATGTGTAGC
----+---------+---------+---------+---------+---------+---------+-----
CTAGGCTTCCTGACCGATATGTCACAAGTGTTTTATCGGTTCGACTTTTATTACACATCG

                                        S
                                        p
                                        h
                                        I.
CTTTAGCTATGTTCAGTTAGTTTGGCATG
----+---------+---------+----
GAAATCGATACAAGTCAATCAAACC
```

On apprécie que la sous-séquence de la séquence d'un promoteur ADH_2 comprenant l'élément TATA et la région d'initiation de la transcription soit choisie parmi les sous-séquences de la séquence ci-après :



Un promoteur particulièrement intéressant est celui qui comprend la séquence suivante :


M
l
u
l
CGCGTCTATACTTCGGAGCACTGTTGAGCGAAGGCTCATTAGATATATTTTCTGTCAT
AGATATGAAGCCTCGTGACAACTCGCTTCCGAGTAATCTATATAAAAGACAGTA
TTTCCTTAACCCAAAAATAAGGGAGAGGGTCCAAAAAGCGCTCGGACAACTGTTGACCGT
AAAGGAATTGGGTTTTTATTCCCTCTCCCAGGTTTTTCGCGAGCCTGTTGACAACTGGCA
GATCCGAAGGACTGGCTATACAGTGTTCACAAAATAGCCAAGCTGAAAATAATGTGTAGC
CTAGGCTTCCTGACCGATATGTCACAAGTGTTTTATCGGTTCGACTTTTATTACACATCG
S
p
h
l
CTTTAGCTATGTTCAGTTAGTTTGGCATGCCTATCACATATAAAATAGA
GAAATCGATACAAGTCAATCAAACCGTACGGATAGTGTATATTTATCT
GTGCCAGTAGCGACTTTTTTCACACTCGAGATACTCTTACTACTGCTCTCTTGTTGTTTT
CACGGTCATCGCTGAAAAAAGTGTGAGCTCTATGAGAATGATGACGAGAGAACAACAAAA
TATCACTTCTTGTTTCTTCTTGGTAAATAGAATATCAAGCTACAAAAAGCATACAATCAA
ATAGTGAAGAACAAAGAAGAACCATTTATCTTATAGTTCGATGTTTTTCGTATGTTAGTT
C
l
a
l
CTATCAACTATTAACTATAT
GATAGTTGATAATTGATATAGC

Le promoteur de l'invention présente des avantages importants par rapport aux promoteurs connus et en particulier par rapport au promoteur ADH_2 et celui du gène GAL7.

Il permet un niveau maximal de transcription et donc d'expression élevée, en particulier pour l'urate oxydase d'A. flavus, et offre la possibilité de réguler celui-là à trois niveaux :

- en présence de glucose et en absence de galactose niveau nul : on ne détecte pas d'expression, résultat identique à celui publié pour le promoteur du gène GAL7 dans une souche de Saccharomyces cerevisiae poussant dans ces conditions (TAJIMA et al., 1986, Molecular cellular Biology, 6, 246-256). Le promoteur ADH_2 présente un niveau d'expression faible mais détectable dans ces conditions.
- en l'absence de glucose et de galactose niveau de fond : il y a une expression faible, résultat intermédiaire entre celui observé pour le promoteur ADH_2 (niveau maximal) et celui publié pour le promoteur du gène GAL7 (niveau nul : TAJIMA et al., 1986, Molecular cellular Biology, 6, 246-256).
- en l'absence de glucose et en présence de galactose niveau d'expression maximal.

L'intérêt, pour l'expression de protéines hétérologues dans la levure, de disposer d'un promoteur présentant un niveau nul dans certaines conditions est d'avoir la possibilité d'éviter toute pression de sélection qui favoriserait les cellules les moins productrices pendant la propagation de la souche. Ceci est particulièrement important dans le cas où la protéine est toxique pour la cellule hôte.

L'avantage d'un promoteur à deux niveaux d'expression : l'un de fond (non induit) et l'autre maximal (induit) réside dans la faculté de choisir un niveau intermédiaire en jouant sur la concentration de l'inducteur.

L'invention a également trait à un vecteur d'expression pour la levure portant un gène d'intérêt avec les moyens nécessaires à son expression, sa réplication et la sélection des

cellules transformées, caractérisé en ce que le gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur précédemment défini.

L'invention concerne également les souches de levure, en particulier de Saccharomyces cerevisiae, transformées par le vecteur d'expression précédent, ainsi qu'un procédé de production d'une protéine d'intérêt qui comprend la culture de ces dernières en présence de galactose.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples ci-après :

EXEMPLE 1 : Détermination de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase d'A. flavus

1) Isolement des ARN messagers d'Aspergillus flavus

La souche d'A. flavus productrice d'urate oxydase a été cultivée dans des conditions de production d'urate oxydase, c'est-à-dire dans un milieu contenant de l'acide urique de composition suivante : glucose 15 g/l, $MgSO_4,7H_2O$ 1 g/l, KH_2PO_4 0,75 g/l, $CaCO_3$ 1,2 g/l, acide urique 1,2 g/l, KOH 0,5 g/l, huile de soja 0,66 ml/l, $FeSO_4,7H_2O$ 10 mg/l, $CuSO_4,5H_2O$ 1 mg/l, $ZnSO_4,7H_2O$ 3 mg/l, $MnSO_4,H_2O$ 1 mg/l. Le milieu est ajusté à pH 7 avec H_2SO_4 1M et est stérilisé à 120°C pendant 80 min.

Dans un erlenmeyer de 5 l on ensemence 1,5 l de milieu avec environ 1 à 3.10^7 spores.

La culture est incubée pendant environ 40 h à 30°C sous agitation (120 tr/min). Le mycélium est récupéré par filtration sur gaze, lavé avec de l'eau et congelé dans l'azote liquide.

15 g de mycélium (poids humide) sont décongelés et resuspendus dans 45 ml de tampon de lyse puis repris dans un même volume de billes (0,45 µm de diamètre). Le tampon de lyse est constitué de thiocyanate de guanidine 4 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 10 mM, β-mercaptoéthanol 50 ml/l. La suspension mycélienne est broyée au broyeur Zellmühler (vibrogène) pendant 5 min.

Le broyat est récupéré et les billes décantées. Le surnageant est prélevé (environ 45 ml) et ramené à 3 M final en chlorure de lithium et conservé à 0°C.

Après deux jours, on le centrifuge pendant 60 min à 10 000 tr/min. Le surnageant est écarté et le culot est repris dans 40 ml de LiCl 3M et recentrifugé à 10 000 tr/min pendant 1 h 30.

On ajoute la protéinase K (SIGMA) 40 µg/ml du SDS (0,1 % P/V) et de l'EDTA à 20 mM. On incube à 37°C pendant 3 h. On précipite avec 2 volumes d'éthanol, puis on effectue un lavage à l'éthanol 70 %. On reprend le culot dans 0,5 ml de tampon TE (tris HCl 10 mM EDTA, 1 mM pH 7,5), on extrait 2 fois au chloroforme, on précipite à l'éthanol. Les ARN sont conservés à -80°C dans l'alcool.

2) Purification de la fraction poly A^+ des ARN

Environ 1 mg d'ARN est précipité 20 min à 4°C (15 000 tr/min) puis lavé avec de l'éthanol 70 % puis séché. Le culot est repris dans 1 ml de tampon TE et resuspendu par agitation au vortex. L'oligo dT-cellulose type 3 (commercialisé par Collaborative Research Inc, Biomedicals Product Division) est préparé suivant les recommandations du fabricant. L'ARN est déposé sur l'oligo dT, agité doucement pour remettre en suspension les billes, puis chauffé pendant 1 min à 65°C.

La suspension est ajustée à 0,5 M NaCl puis mise à agiter doucement pendant 10 min. La suspension est alors centrifugée pendant 1 min à 1 000 tr/min, le surnageant est éliminé, le culot est lavé 2 fois avec 1 ml de tampon TE contenant 0,5 M NaCl. Les surnageants sont éliminés. L'élution de la fraction polyadénylée des ARN (constituée des ARN messagers) est obtenue par suspension des billes dans 1 ml de tampon TE, puis chauffage de cette suspension à 60°C pendant 1 min, suivie d'une agitation pendant 10 min sur plaque basculante. On centrifuge ensuite 1 min à 1 000 tr/min, ce qui permet de récupérer d'une part le surnageant contenant des ARNm libres en solution et d'autre part le culot de billes de cellulose. L'ensemble des opérations ci-dessus (à partir de l'élution) est répété. Les surnageants ainsi obtenus sont rassemblés, on élimine l'excès de billes par centrifugation et on précipite le surnageant à l'éthanol contenant du NaCl suivant les techniques habituelles. (Maniatis : op. prec.).

3) Constitution de la banque des ADNc

A partir des ARN messagers isolés comme décrit dans l'exemple précédent, on a réalisé une banque d'ADNc dans le vecteur pTZ19R (commercialisé par PHARMACIA). Ce vecteur est un plasmide comprenant un polylinker contenant des sites uniques de restriction.

La technique de clonage utilisée est celle décrite par Caput et al, (technique de l'amorce-adapteur (Primer-adapter) : (Caput et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) (1986) 83, 1670-1674)).

Elle consiste d'une part à digérer le vecteur par Pst1, ajouter une queue de polydC sur l'extrémité 3' protubérante, puis à digérer les plasmides ainsi obtenus par BamHI. Le fragment correspondant au vecteur est purifié sur colonne de Sépharose CL4B (Pharmacia). Il comprend donc une queue polydC à une extrémité, l'autre extrémité étant cohésive, du type BamHI. D'autre part, les ARN messagers sont soumis à la transcription inverse à partir d'une amorce dont la séquence est la suivante 5'<GATCCGGGCCCT$_{(12)}$)<3. Ainsi, les ADNc présentent-ils à leur extrémité 5' la séquence GATCC complémentaire de l'extrémité cohésive BamHI.

Les hybrides ARN-ADN obtenus par action de la transcriptase inverse sont soumis à une hydrolyse alcaline qui permet de se débarrasser de l'ARN. Les ADNc simple brin sont alors purifiés par 2 cycles sur colonne de Sépharose CL4B et soumis à un traitement à la terminal transférase de façon à ajouter des polydG en 3'. Les ADNc sont insérés sous forme simple brin dans le vecteur préparé comme décrit plus haut. Un second oligonucléotide "l'adapter" complémentaire de l'amorce est nécessaire pour générer un site BamHI "ouvert" à l'extrémité 5' des ADNc. Après hybridation du vecteur, de l'ADNc et de l'"adapter", les molécules recombinantes sont circularisées par l'action de la ligase du phage T4. Les régions simple brin sont alors réparées grâce à l'ADN polymérase du phage T4.

Le pool de plasmides ainsi obtenu sert à transformer la souche MC 1061 pour la résistance à l'ampicilline (Casabadan Chou et Cohen J. Bact. (1980) 143 pages 9971-980).

4) Détermination de la séquence partielle de l'urate oxydase

Une préparation d'urate oxydase d'A. flavus (SIGMA) a été repurifiée par chromatographie sur une colonne Red-agarose 120 (SIGMA), suivie d'une filtration sur un gel acrylamide-agarose Ultrogel Aca 44 (IBF).

Afin d'obtenir des informations sur la séquence des acides aminés de l'urate oxydase purifiée, permettant la synthèse des sondes nécessaires au clonage de l'ADNc, un séquençage amino-terminal direct de la protéine a été tenté. Ce dernier n'a pas abouti, probablement à cause d'un blocage amino-terminal de la protéine.

La stratégie ci-après a donc été développée pour l'obtention de la séquence partielle de l'urate oxydase :

- coupure de la protéine par des enzymes protéolytiques (à l'aide des enzymes trypsine et protéase V8 de Staphylococcus aureus)
- séparation des polypeptides obtenus par HPLC phase inverse
- séquençage des peptides purifiés.

1) Hydrolyse de l'urate oxydase par la trypsine, purification et séquençage des peptides :

l'urate oxydase à 9 mg/ml dans un tampon de carbonate d'ammonium 100 mM pH 8,9 a été digéré par la trypsine (Worthington, TPCK) avec un rapport urate oxydase/trypsine de 30/1 en poids à 30°C pendant 24 h. Après l'hydrolyse tryptique, 60 µg d'urate oxydase digérée ont été directement injectés sur une colonne HPLC phase inverse de silice greffée Brownlee G18 (colonne 10 x 0,2 cm), équilibrée en acétonitrile 1 % (v/v), acide trifluoro-acétique 0,1 % (v/v) dans l'eau. Les peptides ont été ensuite élués par un gradient linéaire d'acétonitrile dans une solution d'acide trifluoroacétique (0,1 % v/v) dans l'eau variant de 1 % à 60 % d'acétonitrile en 60 min, avec un débit de 150 µl/min. Les peptides à la sortie de la colonne ont été détectés par mesure de la densité optique à 218 nm.

Le profil d'élution est présenté dans la figure 1, dans laquelle les numéros suivant la lettre T (Trypsine) correspondent aux pics identifiés.

Chaque pic a été collecté et conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse sur un séquenceur de protéines (le modèle 470 A d'Applied Biosystems), équipé d'un chromatographe (modèle 430 A d'Applied Biosystems) qui analyse en continu les dérivés phénylthiohydantoïques formés, après chaque cycle de dégradation.

Le tableau (1) ci-après présente les séquences peptidiques des 9 pics identifiés.

2) Hydrolyse de l'urate oxydase par la protéase V8, purification et séquençage des peptides :

L'urate oxydase, à une concentration de 2 mg/ml dans un tampon acétate d'ammonium 100 mM pH 6,8, a été digérée par la protéase V8 de Staphylococcus aureus (Boehringer-Mannheim) avec un rapport urate oxydase/protéase V8 de 60/1 à 30°C pendant 72 h. 160 µg d'urate oxydase digérée ont ensuite été injectés sur une colonne HPLC phase inverse de silice greffée Brownlee G18 (colonne 10 x 0,2 cm) ; particules (7 x 0,03 µm) équilibrée en acétonitrile 1 %, acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v) dans l'eau. Les peptides ont ensuite été élués par un gradient linéaire d'acétonitrile dans une solution d'acide trifluoroacétique dans l'eau (0,1 % (v/v)) variant de 1 % à 60 % d'acétonitrile en 60 min, avec un débit de 150 µl/ml. Les peptides à la sortie de la colonne ont été détectés par mesure de la densité optique à 218 nm.

Le profil d'élution est présenté dans la figure 2, dans laquelle les numéros suivant la lettre V (protéase V8) correspondent aux pics identifiés.

Chaque pic a été collecté et conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse sur le séquenceur de protéines déjà mentionné.

Le tableau (1) ci-après présente les séquences peptidiques des 5 pics identifiés.

TABLEAU (1)

	Séquençage des produits obtenus par hydrolyse	
A l'aide de la trypsine	T 17	Asn - Val - Gln - Val - Asp - Val - Val - Glu - Gly - Lys
	T 20	Asn - Phe - Ser - Gly - Leu - Gln - Glu - Val
	T 23	Phe - Asp - Ala - Thr - Trp - Ala
	T 27	His - Tyr - Phe - Glu - Ile - Asp - Leu - Ser
	T 28	Ile - Leu - Ser - Thr - Asp - Val - Asp - Ala - Thr - Trp - Gln - Trp - Lys
	T 29	His - Tyr - Phe - Glu - Ile - Asp - Leu - Ser - Trp - His - Lys
	T 31	Ser - Thr - Asn - Ser - Gln - Phe - Trp - Gly - Phe - Leu - Arg
	T 32	Gln - Asn - Pro - Val - Thr - Pro - Pro - Glu - Leu - Phe - Gly - Ser - Ile - Leu - Gly - Thr
	T 33	Gln - Asn - Pro - Val - Thr - Pro - Pro - Glu - Leu - Phe - Gly - Ser - Ile - Leu - Gly - Thr
A l'aide de la protéase V8	V 1	Tyr - Ser - Leu - Pro - Asn - Lys - His - Tyr - Phe - Glu - Ile - Asp - Leu - Ser - Trp - His - Lys
	V 2	Val - Thr - Leu - Lys - Thr - Phe - Ala - Glu - Asp - Asn - Ser - Ala - Ser - Val - Gln - Ala
	V 3	Thr - Ser - Tyr - Thr - Lys - Ala - Asp - Asn - Ser - Val - Ile - Val - Asp - Thr - Asp - Ser - Ile - Lys - Asn - Thr - Ile - Tyr - Ile - Thr
	V 5	Gly - Lys - Gly - Ile - Asp - Ile - Lys - Ser - Ser - Leu - Ser - Gly - Leu - Thr - Val - Leu - Lys - Ser - Thr - Asn - Ser - Gln - Phe - Trp - Gly - Phe - Leu - Arg
	V 6	Gly - Lys - Gly - Ile - Asp - Ile - Lys - Ser - Ser - Leu - Ser - Gly - Leu - Thr - Val - Leu - Lys

2656531

5) Criblage des bactéries

1) Préparation des sondes marquées :

Deux pools de sondes déduites de séquences en aminoacides de la protéine ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biosearch 4600. Le premier pool correspond à la séquence de résidus His-Tyr-Phe-Glu-Ile-Asp (partie de la séquence de T 27), soit de 5' vers 3' :

```
      A     T     G     G     G
T C G A T   T C   A A   T A   T G
      T     C     A     A     A
```

Ce pool est en fait constitué de $2^4 \times 3 = 48$ oligonucléotides différents représentant toutes les combinaisons possibles.

Le deuxième pool correspond à la séquence en résidus aminoacides Gln-Phe-Trp-Gly-Phe-Leu (partie de la séquence de V5), soit de 5' vers 3' :

```
   GG  A     G  T
A  AAGCCCCA AA TG
   AA  C     A  C
       T
```

Ce pool est constitué de $2^4 \times 4 = 64$ combinaisons.

Les sondes sont marquées à la terminale désoxynucléotide transférase (TdT) (commercialisé par IBI, Inc).

La réaction s'effectue sur 100 ng d'un mélange d'oligonucléotides en solution (100 mg/ml) dans du tampon de réaction "Cobalt" (fourni 10 fois concentrée par IBI inc. : 1,4 M de cacodylate de potassium-pH 7,2, 300 mM de dithiothréitol, 1 µl d'enzyme désoxynucléotidyl-terminal-transférase (IBI Inc) et 50 µCi de désoxycytidyltriphosphate dCTP marqué au P32.

La réaction se fait à 37°C pendant 10 min puis est arrêtée en ajoutant 1 µl d'EDTA 0,5 M.

On extrait au phénol et on dialyse sur colonne de polyacrylamide Biogel P 10 (Biorad : 150-1050).

2) Hybridation et détection des colonies contenant l'ADNc de l'urate oxydase :

Environ 40 000 colonies sont criblées par la technique d'hybridation in situ mise au point par Grunstein et Hogness (1975, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 72 3961). Environ 6 000 bactéries sont étalées sur boîtes de Pétri de façon à obtenir des colonies isolées. Après incubation pendant 24 h à 37°C, chaque boîte est repliquée sur 2 filtres, chaque filtre étant destiné à être traité avec un des 2 pools de sondes, de façon que toutes les colonies obtenues soient testées avec les 2 pools de sondes en parallèle.

Les filtres sont mis à hybrider avec un des 2 pools de sondes dans un tampon contenant 6 x SSC, 10 x Denhardt's et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé (SIGMA). La température d'hybridation est de 42°C et la durée de 16 h. La solution 6 x SSC s'obtient par dilution d'une solution 20 x SSC. La préparation du tampon 20 x SSC est décrite dans Maniatis, Fritsch et Sambrook (op. cité). En résumé, ce tampon contient 175,3 g/l de NaCl ; 88,2 g/l de citrate de sodium et est ajusté à pH 7 par quelques gouttes de NaOH 10N. La solution 10 x Denhardt's contient 1 g de Ficoll, 1 g de polyvinylpyrrolidone, 1 g de sérum-albumine humaine pour 500 ml de volume final.

Après lavage dans la solution 6 x SSC à 42°C (3 h avec 5 changements de bain), les filtres sont essuyés au papier Joseph et mis en autoradiographie. Les filtres sont révélés après 16 h. Il est apparu qu'une fraction d'environ 0,5 % des colonies hybridait avec les 2 pools de sondes.

5 colonies parmi celle-ci ont été reprises et purifiées. On a préparé l'ADN plasmidique de chacune de ces colonies, et l'on a analysé cet ADN par digestion avec soit BamHI, soit HindIII, soit à la fois BamHI et HindIII.

Après analyse sur gel d'agarose, il est apparu que les 5 plasmides obtenus sont linéarisés par BamHI et par HindIII. Les doubles digestions permettent de libérer un fragment correspondant à l'intégralité de l'ADNc cloné. La taille de ce fragment est d'environ 1,2 Kb dans 3 cas, d'environ 0,9 Kb dans les 2 autres cas. Pour la détermination ci-après on a sélectionné un des

fragments de 0,9 Kb et un des fragments de 1,2 Kb qui ont été reclonés (voir exemple 6 ci-après).

6) Détermination de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase

On a recloné un des fragments de 0,9 Kb d'une part (clone 9A) et un des fragments de 1,2 Kb (clone 9C) d'autre part, dans l'ADN de la forme réplicative de phage simple-brin M13. L'ADN des clones M13 contenant d'une part le fragment de 0,9 Kb et d'autre part le fragment de 1,2 Kb a été soumis à une digestion exonucléasique de manière à générer une série de clones M13 chevauchants (procédure "Cyclone I Biosystem" de IBI). Ces derniers ont été séquencés par la méthode des didéoxyribonucléotides (Sanger et al, PNAS-U.S.A.-1977, 14, 5463-5467).

La séquence nucléotidique du clone 9C est représentée sur la figure 3 laquelle indique également par une flèche le début du clone 9A et par un symbole nucléotidique muni d'un astérisque * les nucléotides séquencés du clone 9A non identiques à ceux du clone 9C (quand on fait correspondre les deux séquences et les sites de restriction AccI et BamHI utilisés dans les constructions ultérieures (Cf. 2)).

On constate que :

- la séquence nucléotidique du fragment le plus long (clone 9C) recouvre celle du fragment le plus court (clone 9A), à deux différences près (v figure 3). Une des différences est silencieuse, l'autre correspond à un changement d'un résidu tryptophane en résidu glycine. Ces différences peuvent être dues, soit à des différences dans les ARN messagers isolés, (Cf. 2) ci-dessus), soit à des erreurs de la transcriptase inverse utilisée lors de la constitution de la banque des ADNc (Cf. 3) ci-dessus).

Dans le cas du fragment le plus long, un codon ATG (en position 109 sur la figure 3) ouvre une phase ouverte correspondant à un polypeptide de 302 aminoacides, de masse moléculaire voisine de 34240 Da, dont la séquence correspond à la séquence partielle de l'urate oxydase d'A. flavus purifiée (Cf. 4)).

On a représenté sur la figure 4 la séquence d'ADN ouverte par le codon ATG et le polypeptide codé, ainsi que par des flèches

en vis-à-vis avec le polypeptide codé les peptides séquencés (Cf. 4)) obtenus par hydrolyse de l'urate oxydase d'A. flavus à l'aide de la trypsine et de la protéase V8.

On constate que la séquence du polypeptide se termine par le triplet Ser-Lys-Leu, typique des enzymes à localisation peroxisomale (Gould S.J. et al, J. Cell, Biology 108 (1989) 1657-1664).

EXEMPLE 2 : Construction de trois vecteurs d'expression de l'ADNc de l'urate oxydase dans la levure, le plasmide pEMR469 porteur d'un promoteur ADH_2 et le plasmide pEMR473 ainsi que le plasmide pEMR515 porteurs du promoteur artificiel de l'invention

La stratégie mise en oeuvre fait appel à des fragments obtenus à partir de plasmides préexistants accessibles au public et à des fragments préparés par voie de synthèse selon les techniques maintenant couramment utilisées. Les techniques de clonage employées sont celles décrites par T. MANIATIS, EF. FRITSCH et J. SAMBROOK dans "Molecular Cloning, a laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1984). La synthèse des oligonucléotides est réalisée à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biosearch 4 600.

La description ci-après sera mieux comprise à la lecture des figures 5, 6 et 7 qui représentent respectivement des cartes de restriction du plasmide pEMR414, et des plasmides pEMR469 ainsi que pEMR473. Les symboles utilisés sur ces figures seront précisés dans l'exposé ci-après. Dans le cas où un site a été rendu franc par la polymérase de Klennow, il lui est affecté l'indice "^{o}" ; lorsque les sites ont été suprimés par ligation, ils sont indiqués entre parenthèses.

1) Construction du plasmide pEMR469 :

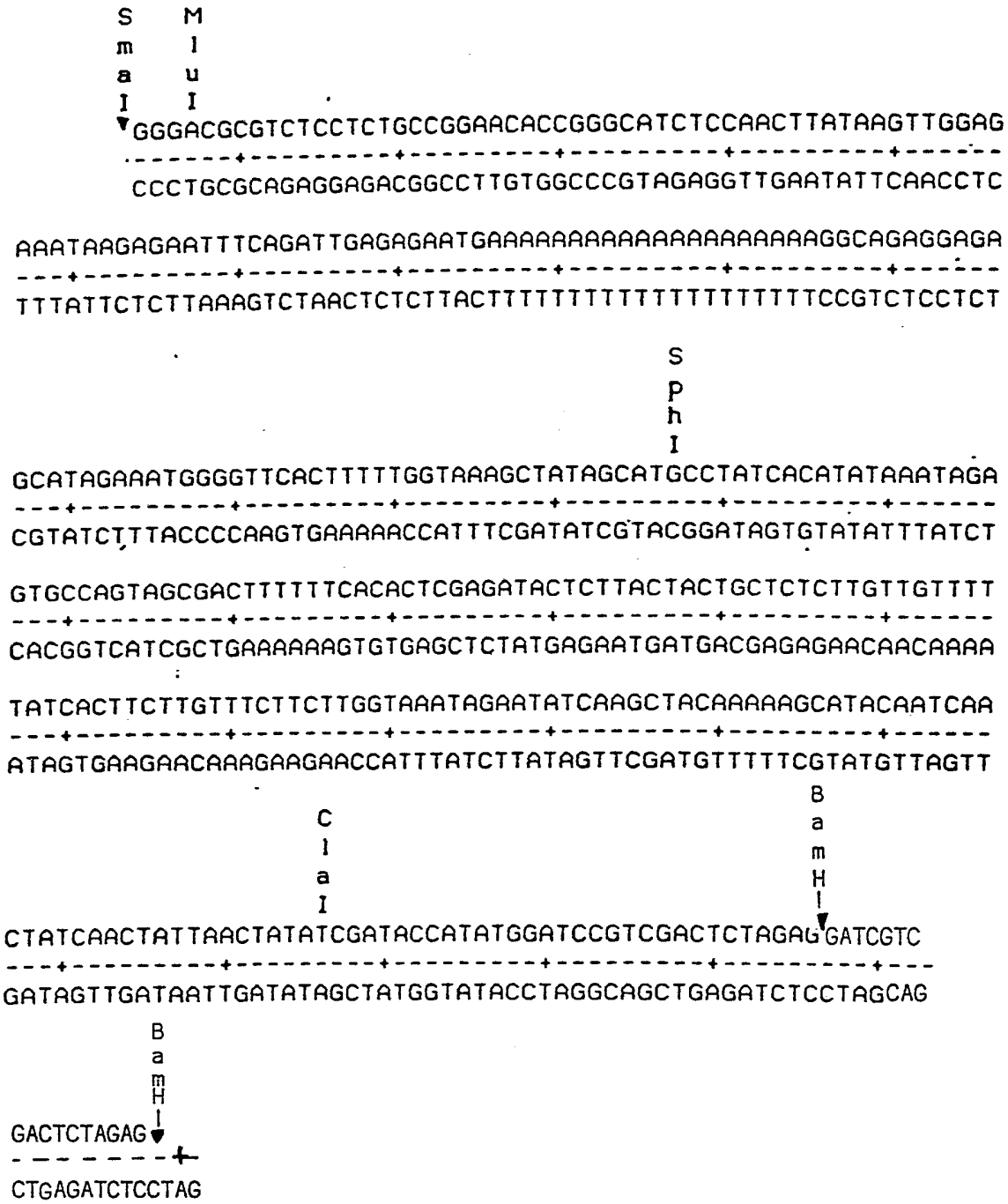
Ce plasmide a été construit à partir du vecteur navette E. coli-levure pEMR414, construit par ligations successives des éléments ci-après :

- le fragment PstI-HindIII^{o} - symbolisé par ++++ sur la figure 5 - du plasmide pJDB207 (BEGGS, 1978 : Gene cloning in yeast-p. 175-203 dans : Genetic Engineering vol 2 - WILLIAMSON - Academic Press - London UK) comprenant la partie amont du gène de résistance à l'ampicilline Amp^{R} de pBR322 (Sutcliffe 1979 Cold

Spring Symp. Quart. Biol. 43, 779) et un fragment de 2 µ endogène forme B portant le gène LEU2 de S. cerrevisiae partiellement délété de son promoteur (appelé LEU2d), le locus STB (REP3) et l'origine de réplication du 2 µ (HARTLEY et DONELSON, 1980, Nature, 286, 860-865). L'extrémité HindIII de ce fragment a été rendue franche par action de la polymérase de Kleenow. Elle est notée HindIII^{o} sur la figure 5.

- le fragment HindIII-SmaI - représenté par ////// sur la figure 5 - du chromosome V de levure contenant le gène URA3 avec son promoteur (ROSE et al., 1984, Gene, 29, p. 113-124). Ce fragment HindIII-SmaI provient du plasmide pFL1 (CHEVALLIER et al., 1980, Gene 11, 11-19)). L'extrémité HindIII de ce plasmide a été rendue franche par l'action de la polymérase de Kleenow.

- un fragment SamI-BamhI - symbolisé par ——— sur la figure 5 - contenant une version synthétique du promoteur du gène ADH2 ne différant de la version naturelle décrite par RUSSEL et SMITH (RUSSEL et al., 1983). J. Biol. Chem. 258, 2674-2682) que par quelques paires de bases destinées à introduire des sites de restriction. (La séquence naturelle pourrait être utilisée avec des résultats peu différents). La séquence de ce fragment est donnée ci-après :


S m a I
M l u I
GGGACGCGTCTCCTCTGCCGGAACACCGGGCATCTCCAACTTATAAGTTGGAG
CCCTGCGCAGAGGAGACGGCCTTGTGGCCCGTAGAGGTTGAATATTCAACCTC
AAATAAGAGAATTTCAGATTGAGAGAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCAGAGGAGA
TTTATTCTCTTAAAGTCTAACTCTCTTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCGTCTCCTCT
S P h I
GCATAGAAATGGGGTTCACTTTTTGGTAAAGCTATAGCATGCCTATCACATATAAATAGA
CGTATCTTTACCCCAAGTGAAAAACCATTTCGATATCGTACGGATAGTGTATATTTATCT
GTGCCAGTAGCGACTTTTTTCACACTCGAGATACTCTTACTACTGCTCTCTTGTTGTTTT
CACGGTCATCGCTGAAAAAAGTGTGAGCTCTATGAGAATGATGACGAGAGAACAACAAAA
TATCACTTCTTGTTTCTTCTTGGTAAATAGAATATCAAGCTACAAAAAGCATACAATCAA
ATAGTGAAGAACAAAGAAGAACCATTTATCTTATAGTTCGATGTTTTTCGTATGTTAGTT
C l a I
B a m H I
CTATCAACTATTAACTATATCGATACCATATGGATCCGTCGACTCTAGAGGATCGTC
GATAGTTGATAATTGATATAGCTATGGTATACCTAGGCAGCTGAGATCTCCTAGCAG
B a m H I
GACTCTAGAG
CTGAGATCTCCTAG

- le fragment BglII-HindIII - symbolisé par [redacted] sur la figure 5 - portant l'extrémité 3' du gène PGK de levure. Ce fragment provient de la digestion complète à l'aide de BglII du fragment HindIII de l'ADN chromosomique de levure, portant le gène PGK décrit par HITZEMAN et al. (1982 Nucleic Acids Res., 10, 7791-7808) lequel ne présente qu'un site BglII. Cette digestion permet d'obtenir deux fragments HindIII-BglII, dont le plus petit d'environ 0,4 Kb, qui porte l'extrémité 3' du gène PGK de levure est retenu. La séquence de ce dernier fragment est décrite par HITZEMANN et al. (référence citée ci-dessus). Le site BglII est cloné dans le site BamHI du fragment précédent (les sites BamHI et BglII disparaissent donc) et le site HindIII, rendu franc par action de la polymérase de Kleenow, est cloné dans le site PvuII du fragment de PvuII-PstI pBR322 décrit ci-après.

- le fragment PvuII-PstI - symbolisé par XXX sur la figure 5 - de pBR322 contenant l'origine de réplication et la partie aval du gène de résistance à l'ampicilline Amp^R.

Le plasmide pEMR414 ainsi constitué comporte donc les éléments suivants :

- une origine de réplication et un gène de résistance à l'ampicilline Amp^R permettant la réplication et la sélection du plasmide dans les cellules E. coli. Ces éléments permettent la transformation dans les cellules de E. coli.

- une origine de réplication pour la levure (ARS), le locus STB et le gène LEU2 de S. cerevisiae sans promoteur et le gène URA3 avec son promoteur de S. cerevisiae. Ces éléments permettent la réplication et la sélection du plasmide dans les cellules de S. cerevisiae ainsi qu'une efficacité de partition suffisante dans les cellules contenant le plasmide 2μ endogène.

Le plasmide pEMR414 a été soumis à une digestion complète par les enzymes de restriction NheI et ClaI. Le petit fragment NheI-ClaI contenant le gène URA3, appelé ci-après fragment A, a été purifié.

Le plasmide pEMR414 a été soumis à une digestion complète par les enzymes NheI et BamHI. Le grand fragment NheI-BamHI conte-

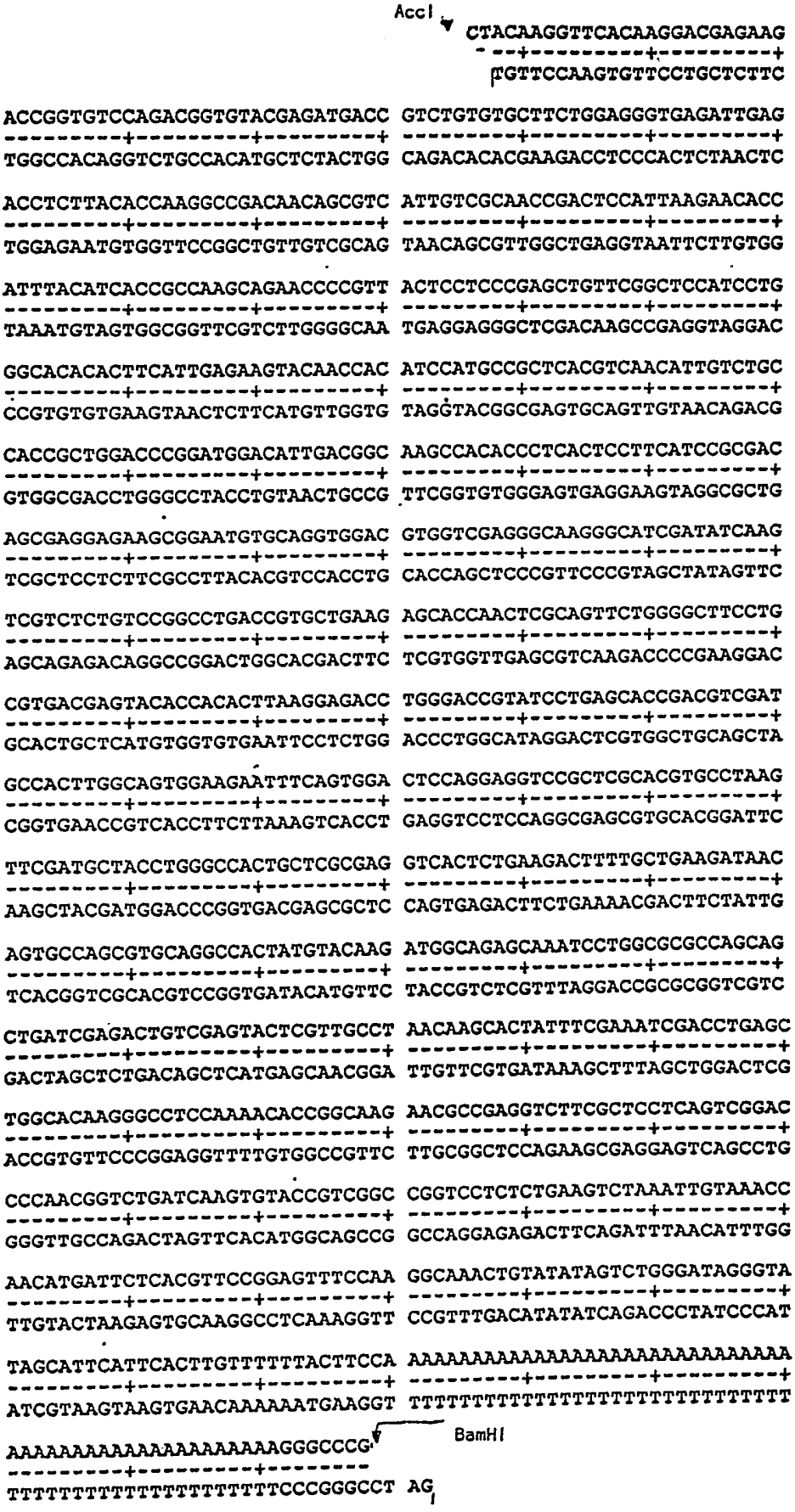
nant notamment le gène LEU2d et l'origine de réplication du plasmide pBR322, appelé ci-après fragment B, a été purifié.

On a préparé d'autre part le fragment synthétique ClaI-AccI contenant le début d'un gène codant pour la protéine déduite de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase (clone 9C). Ce fragment comporte des modifications par rapport au clone 9C, introduites dans le but de mettre en place des codons usuels dans la levure (Cf. SHARP et al., 1986, Nucl. Ac. Res. Vol. 14, 13, pp. 5125-5143) sans changement des acides aminés codés. La séquence de ce fragment, dénommé ci-après fragment C, est la suivante (les nucléotides soulignés sont ceux modifiés par rapport au clone 9C).

```
C                                                    A
l                                                    c
a                                                    c
I                                                    I

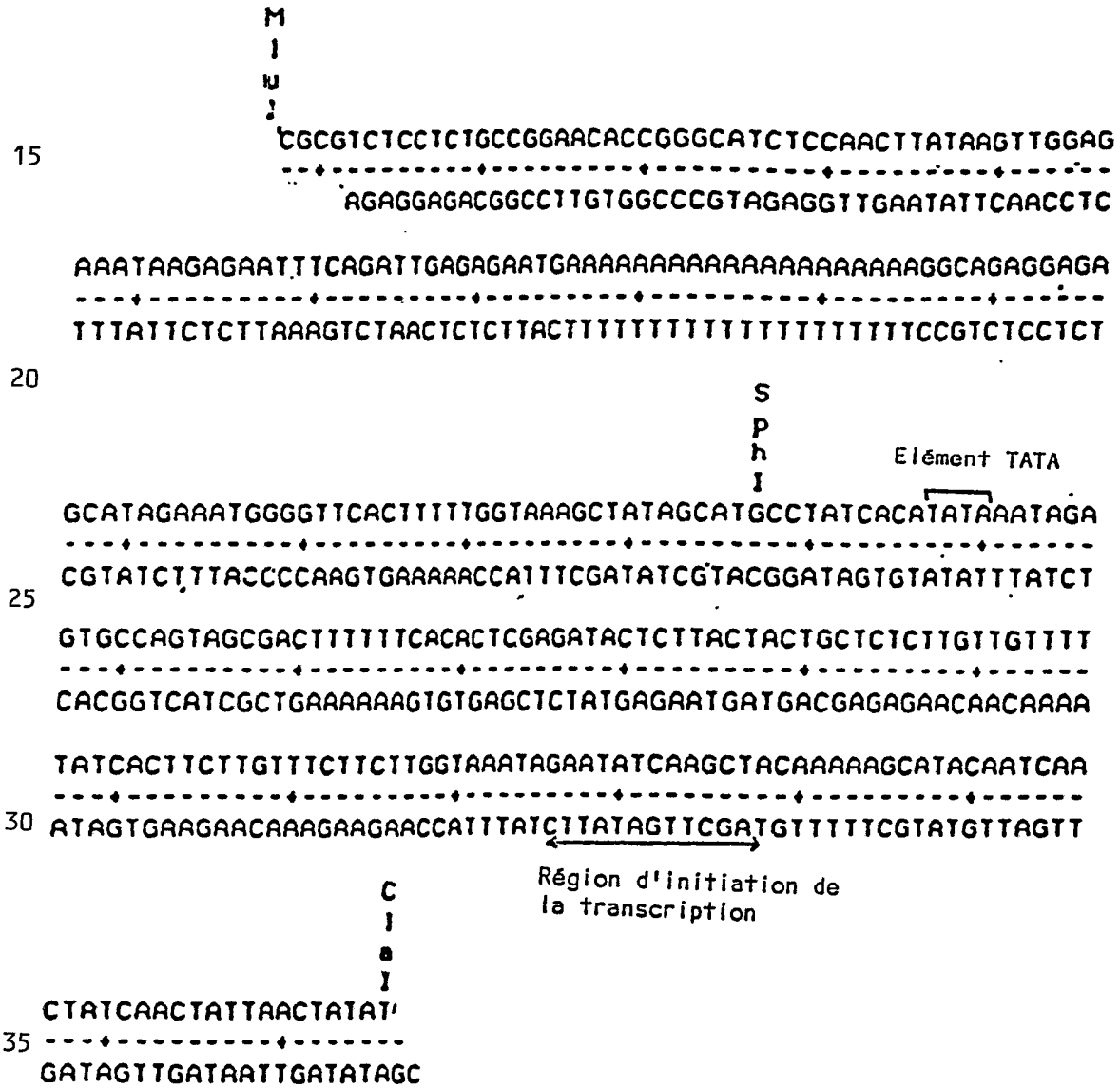
CGATATACACAATGTCTGCTGTTAAGGCTGCTAGATACGGTAAGGACAACGTTAGAGT
---+---------+---------+---------+---------+---------+---------+----
  TATATGTGTTACAGACGACAATTCCGACGATCTATGCCATTCCTGTTGCAATCTCAGA
```

On a soumis le plasmide du clone 9C (Cf. figure 3) à une digestion par les enzymes AccI et BamHI. Le fragment AccI-BamHI qui contient la fin de l'ADNc de l'urate oxydase, ci-après appelé fragment D, a été purifié. Ce fragment a la séquence suivante :


AccI
CTACAAGGTTCACAAGGACGAGAAG
GTTCCAAGTGTTCCTGCTCTTC
ACCGGTGTCCAGACGGTGTACGAGATGACC GTCTGTGTGCTTCTGGAGGGTGAGATTGAG
TGGCCACAGGTCTGCCACATGCTCTACTGG CAGACACACGAAGACCTCCCACTCTAACTC
ACCTCTTACACCAAGGCCGACAACAGCGTC ATTGTCGCAACCGACTCCATTAAGAACACC
TGGAGAATGTGGTTCCGGCTGTTGTCGCAG TAACAGCGTTGGCTGAGGTAATTCTTGTGG
ATTTACATCACCGCCAAGCAGAACCCCGTT ACTCCTCCCGAGCTGTTCGGCTCCATCCTG
TAAATGTAGTGGCGGTTCGTCTTGGGGCAA TGAGGAGGGCTCGACAAGCCGAGGTAGGAC
GGCACACACTTCATTGAGAAGTACAACCAC ATCCATGCCGCTCACGTCAACATTGTCTGC
CCGTGTGTGAAGTAACTCTTCATGTTGGTG TAGGTACGGCGAGTGCAGTTGTAACAGACG
CACCGCTGGACCCGGATGGACATTGACGGC AAGCCACACCCTCACTCCTTCATCCGCGAC
GTGGCGACCTGGGCCTACCTGTAACTGCCG TTCGGTGTGGGAGTGAGGAAGTAGGCGCTG
AGCGAGGAGAAGCGGAATGTGCAGGTGGAC GTGGTCGAGGGCAAGGGCATCGATATCAAG
TCGCTCCTCTTCGCCTTACACGTCCACCTG CACCAGCTCCCGTTCCCGTAGCTATAGTTC
TCGTCTCTGTCCGGCCTGACCGTGCTGAAG AGCACCAACTCGCAGTTCTGGGGCTTCCTG
AGCAGAGACAGGCCGGACTGGCACGACTTC TCGTGGTTGAGCGTCAAGACCCCGAAGGAC
CGTGACGAGTACACCACACTTAAGGAGACC TGGGACCGTATCCTGAGCACCGACGTCGAT
GCACTGCTCATGTGGTGTGAATTCCTCTGG ACCCTGGCATAGGACTCGTGGCTGCAGCTA
GCCACTTGGCAGTGGAAGAATTTCAGTGGA CTCCAGGAGGTCCGCTCGCACGTGCCTAAG
CGGTGAACCGTCACCTTCTTAAAGTCACCT GAGGTCCTCCAGGCGAGCGTGCACGGATTC
TTCGATGCTACCTGGGCCACTGCTCGCGAG GTCACTCTGAAGACTTTTGCTGAAGATAAC
AAGCTACGATGGACCCGGTGACGAGCGCTC CAGTGAGACTTCTGAAAACGACTTCTATTG
AGTGCCAGCGTGCAGGCCACTATGTACAAG ATGGCAGAGCAAATCCTGGCGCGCCAGCAG
TCACGGTCGCACGTCCGGTGATACATGTTC TACCGTCTCGTTTAGGACCGCGCGGTCGTC
CTGATCGAGACTGTCGAGTACTCGTTGCCT AACAAGCACTATTTCGAAATCGACCTGAGC
GACTAGCTCTGACAGCTCATGAGCAACGGA TTGTTCGTGATAAAGCTTTAGCTGGACTCG
TGGCACAAGGGCCTCCAAAACACCGGCAAG AACGCCGAGGTCTTCGCTCCTCAGTCGGAC
ACCGTGTTCCCGGAGGTTTTGTGGCCGTTC TTGCGGCTCCAGAAGCGAGGAGTCAGCCTG
CCCAACGGTCTGATCAAGTGTACCGTCGGC CGGTCCTCTCTGAAGTCTAAATTGTAAACC
GGGTTGCCAGACTAGTTCACATGGCAGCCG GCCAGGAGAGACTTCAGATTTAACATTTGG
AACATGATTCTCACGTTCCGGAGTTTCCAA GGCAAACTGTATATAGTCTGGGATAGGGTA
TTGTACTAAGAGTGCAAGGCCTCAAAGGTT CCGTTTGACATATATCAGACCCTATCCCAT
TAGCATTCATTCACTTGTTTTTTACTTCCA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ATCGTAAGTAAGTGAACAAAAAATGAAGGT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
BamHI
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCCCG
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCGGGCCT AG

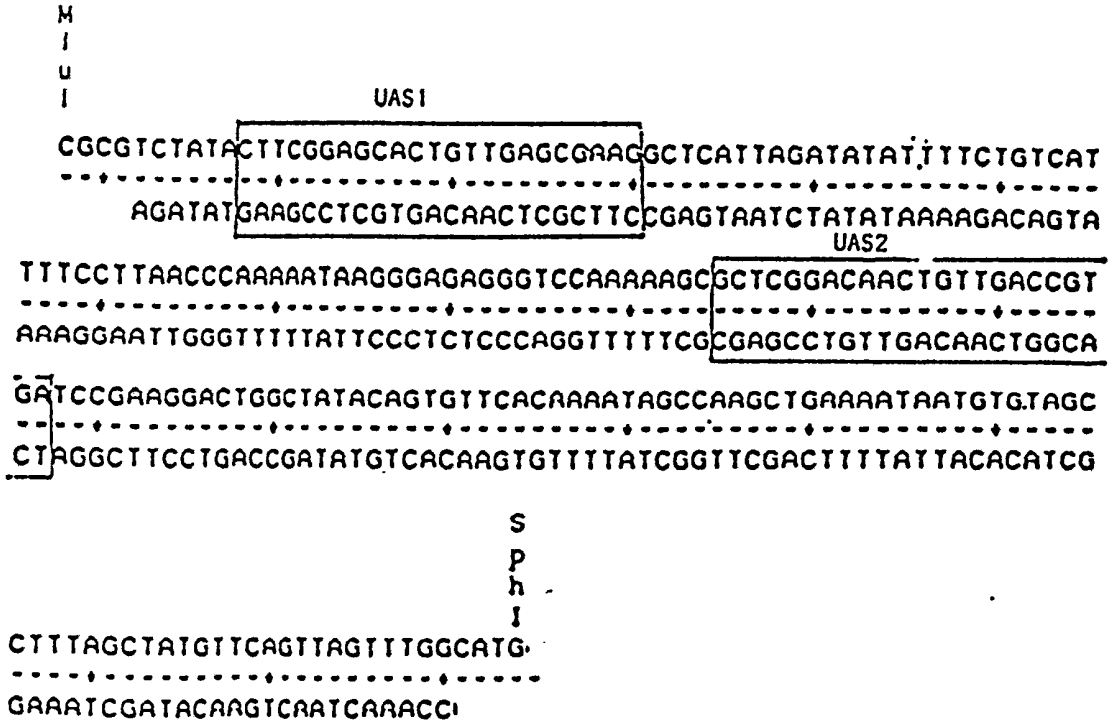
Les fragments A, B, C et D ont été ligués de manière à obtenir le plasmide pEMR469 représenté sur la figure 6, dans laquelle les symboles ont la même signification que sur la figure 5, les nouveaux fragments ClaI-AccI et AccI-BamHI étant symbolisés par ⁞⁞⁞⁞⁞

Le plasmide pEMR469 est porteur d'une séquence codant pour la protéine déduite de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase, sous le contrôle d'un promoteur appelé promoteur ADH_2, proche du promoteur ADH_2 naturel, comprenant la séquence :



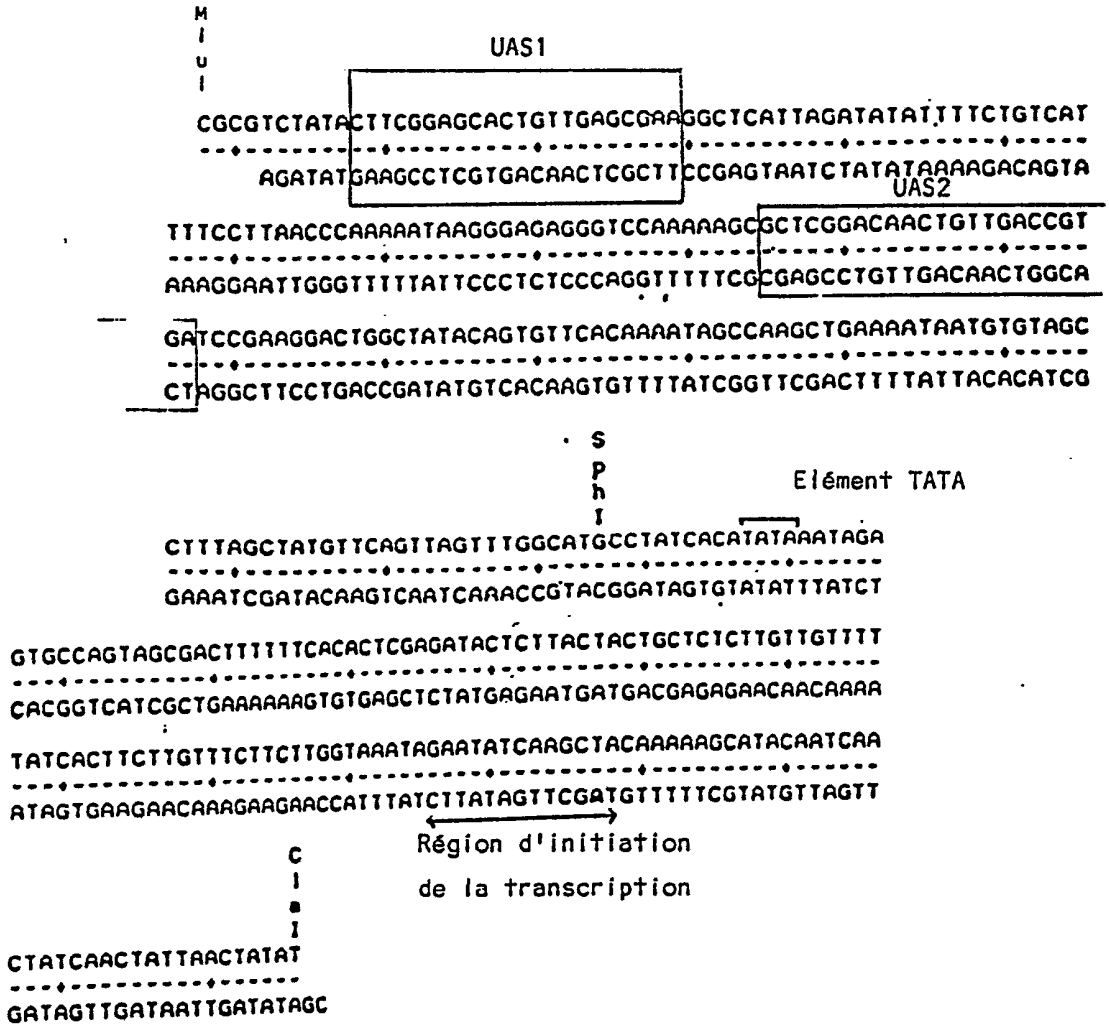
2) Construction du plasmide pEMR473 :

Le plasmide pEMR469 a été soumis à une digestion complète par les enzymes MluI et SphI. Le grand fragment MluI-SphI contenant le gène de l'urate oxydase a ensuite été ligué au fragment synthétique, de séquence donnée ci-après, correspondant à une partie (200 pb) de la séquence en amont de l'élément TATA du promoteur GAL 7 de S. cerevisiae, laquelle comprend deux séquences d'activation amont de haute affinité appelées UAS1 et UAS2, encadrées ci-dessous (Cf. R. J. BRAM et al. (1986) EMBO J. vol. 5 n° 3, p. 603-608).



Le plasmide pEMR473 ainsi obtenu est représenté sur la figure 7, dans laquelle les symboles ont la même signification que dans la figure 6, le nouveau fragment MluI-SphI introduit étant symbolisé par

Le plasmide pEMR473 est donc porteur d'une séquence codant pour la protéine déduite de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase, sous le contrôle du promoteur artificiel de l'invention, lequel comprend la séquence :



3) Construction du plasmide pEMR515 :

Le plasmide pEMR473 a été soumis à une digestion partielle par l'enzyme XbaI et à une digestion totale par l'enzyme MluI. Le grand fragment XbaI-MluI a été purifié. Ce fragment contient notamment les séquences de l'origine de réplication et le locus STB du 2µ, le gène LEU2d, le gène de résistance à l'ampicilline Amp^R, l'origine de réplication du pBR322 et la cassette d'expression de l'urate oxydase. Il ne contient en revanche ni le gène URA3, ni la partie du 2µ comprise entre lessites XbaI et NheI.

Le grand fragment XbaI-MluI a été recircularisé via l'adaptateur de séquence suivant comportant des extrémités cohésives XbaI modifié et MluI :

XbaI modifié

▼CTAGGCTAGCGGGCCCGCATGCA

CGATCGCCCGGGCGTACGTGCGC▼

MluI

Le plasmide pEMR515 ainsi obtenu ne possède qu'un seul des trois éléments du site FRT cible de la recombinase codée par le gène FLP du 2µ.

Le plasmide pEMR515 est donc porteur d'une séquence codant pour la protéine déduite de la séquence de l'ADNc de l'urate oxydase sous le contrôle du promoteur artificiel de l'invention.

EXEMPLE 3 : Transformation de la souche de levure EMY761, par les plasmides pEMR469, pEMR473 et pEMR515 - Transformation des souches de levures EMY500 et GRF18 par le plasmide pEMR515 - Transformation avec sélection pour la prototrophie de leucine

On a utilisé comme souches réceptrices trois souches de Saccharomyces cerevisiae non isogéniques :

- la souche EMY761 (Matα, leu2, ura3, his3, gal)
- la souche EMY500 (Mata, leu2, ura3, pep4)
- la souche GRF18 (Matα, leu2, his3);

La souche GRF18 est bien connue de l'homme de l'art (Gerry FINK, MIT, USA). Les souches EMY761 et EMY500 sont apparentées à la souche GRF18. Elles ont été obtenues par croisements successifs de la souche GRF18 avec une souche ura3 dérivée de la souche FL100 (déposée à l'ATCC sous le n° 28 383) et avec la souche 20B12 (Matα, tsp1, pep4) décrite par E.W. JONES (E.W. JONES et al. (1977) Genetics, 85, 23).

On peut obtenir la souche GRF18 par curage du plasmide pEMR515 de la souche GRF18 pEMR515 (leu^+) déposée à la CNCM sous la référence n° I-920, le 28 décembre 1989 et la souche EMY500 par curage du plasmide pEMR515 de la souche EMY500 pEMR515 (leu^+) déposée à la CNCM sous la référence n° I-919, le 28 décembre 1989.

Ces souches contiennent des mutations (Leu2 et ura3), susceptibles d'être complémentées par le marqueur de sélection défectif LEU2d et le marqueur de sélection URA3, présents dans chacun des plasmides pEMR469 et pEMR473.

La technique de transformation utilisée est une variante de celle décrite par Beggs et al. (Beggs et al. (1978), Nature 275, 104-109). Elle consiste à soumettre les levures à un traitement de protoplastisation en présence d'un stabilisant osmotique, le sorbitol en concentration 1 M.

Le protocole précis de transformation est précisé ci-après :

a) 200 ml du milieu YPG liquide (Cf. tableau I) sont inoculés avec environ 5×10^6 cellules d'une culture en phase stationnaire et la culture ainsi inoculée est placée une nuit sous agitation à 30°C.

b) Lorsque la culture atteint environ 10^7 cellules par ml, les cellules sont centrifugées à 4 000 tr/min pendant 5 min et le culot est lavé avec du sorbitol 1 M.

c) Les cellules sont suspendues dans 5 ml de solution de sorbitol 1 M contenant 25 mM EDTA et 50 mM de dithiothréitol et incubées pendant 10 min à 30°C.

d) Les cellules sont lavées une fois avec 10 ml de sorbitol 1 M et suspendues dans 20 ml de sorbitol. De la zymolase-100T (préparation obtenue par purification partielle sur colonne

d'affinité du surnageant de culture d'Arthobacter luteus et contenant de la β-1,3-glucane-laminaripentahydrolase, commercialisée par SEYKAGAKU KOGYO Co. Ltd) est ajoutée à une concentration finale de 20 µg/ml et on incube la suspension à température ambiante pendant environ 15 min.

e) Les cellules sont resuspendues dans 20 ml d'un milieu contenant du sorbitol appelé milieu YPG sorbitol (Cf. tableau I ci-après) et incubées pendant 20 min à 30°C sous agitation douce.

f) On centrifuge pendant 3 min à 2 500 tr/min.

g) On resuspend dans 9 ml de tampon de transformation (sorbitol 1 M, tris-HCl de pH 7,5 10 mM et $CaCl_2$ 10 mM).

h) On ajoute 0,1 ml de cellules et 5 µl de solution d'ADN (environ 5 µg) et on laisse la suspension obtenue pendant 10 à 15 min à température ambiante.

i) On ajoute 1 ml de la solution : polyéthylène glycol PEG 4000 20 %, tris-HCl de pH 7,5 10 mM et $CaCl_2$ 10 mM.

j) On verse 0,1 ml de la suspension obtenue en 9) dans un tube contenant du milieu solide de régénération sans leucine (Cf. tableau I ci-après) préalablement fondu et maintenu liquide à environ 45°C. On verse la suspension sur une boîte de Pétri contenant une couche solidifiée de 15 ml de milieu de régénération solide sans leucine.

k) On répète l'étape j) avec le reste de la suspension cellulaire obtenue en 9 h).

Les transformés commencent à apparaître au bout de trois jours.

On a ainsi retenu un transformé EMY761 pEMR469 (leu^+), et trois transformés EMY761 pEMR473 (leu^+) (clones 1, 2 et 3), un transformé EMY761 pEMR515 (leu^+), un transformé EMY500 pEMR515 (leu^+) et un transformé GRF18 pEMR515 (leu^+).

TABLEAU I

Principaux milieux utilisés dans les exemples 3, 4, 4bis, 6 et 7

- milieu solide sans uracile

6,7 g de base azotée de levure sans acides aminés (Yeast nitrogen base without Amino Acids de DIFCO)
5,0 g d'hydrolysat de caséine (Casamino acids de DIFCO)
10 g de glucose
20 g d'agar
mélanger tous les ingrédients dans de l'eau distillée, compléter le volume final à 1 l avec de l'eau distillée. Autoclaver 15 min à 120°C.

- milieu liquide sans uracile

Utiliser la formule du milieu solide sans uracile en omettant l'agar - Autoclaver 15 min à 120°C.

- milieu solide sans leucine

6,7 g de base azotée de levure sans acides aminés (Yeast nitrogen base without Amino Acids de DIFCO)
20 mg d'adénine
20 mg d'uracile
20 mg de l-tryptophane
20 mg de l-histidine
20 mg de l-arginine
20 mg de l-méthionine
30 mg de l-tyrosine
30 mg de l-isoleucine
30 mg de l-lysine
50 mg de l-phénylalanine
100 mg de l-acide glutamique
150 mg de l-valine

400 mg de l-leucine
20 g de glucose
20 g d'agar
mélanger tous les ingrédients dans l'eau distillée. Compléter le volume final à 1 l avec de l'eau distillée - Autoclaver 15 min à 120°C. Après autoclavage, ajouter 200 mg de l-thréonine et 100 mg d'acide l-aspartique.

- milieu solide de régénération sans leucine
utiliser la formule du milieu solide sans leucine en mélangeant 30 g d'agar au lieu de 20 et en ajoutant au mélange 182 g de sorbitol.

- milieu liquide sans leucine
utiliser la formule du milieu solide sans leucine en omettant l'agar - Autoclaver 15 min à 120°C. Après autoclavage, ajouter 200 mg de l-thréonine et 100 mg d'acide l-aspartique.

- milieu YP liquide
10 g d'extrait de levure (Bacto-yeast extract de DIFCO)
20 g de peptone (Bacto-peptone de DIFCO)
mélanger les ingrédients dans de l'eau distillée. Compléter le volume final à 1 l avec de l'eau distillée - Autoclaver 15 min à 120°C.

- milieu YPG liquide
utiliser la formule du milieu YP liquide auquel on ajoute, après autoclavage, du glucose à une concentration de 20 g/l.

- milieu YPG sorbitol

utiliser la formule du milieu YPG liquide auquel on ajoute, après autoclavage, du sorbitol à une concentration de 1 M.

- milieu YP éthanol-glycérol

utiliser la formule du milieu YP liquide. Après autoclavage, ajouter 10 ml d'éthanol 100 % (1 % final) et 30 g de glycérol.

- milieu YP éthanol-glycérol-galactose

utiliser la formule du milieu YP liquide. Après autoclavage, ajouter 10 ml d'éthanol 100 %, 30 g de glycérol et 30 g de galactose.

EXEMPLE 4 : Expression de l'urate oxydase par les souches EMY761 pEMR469 (leu^+) et EMY761 pEMR473 (leu^+) (clones 1, 2 et 3) - Immunodétection par Wester Blot, dosage de l'activité urate oxydase et des protéines solubles

1) Expression de l'urate oxydase :

a) Souches transformées

Dans un premier temps, une colonie de chacune des souches EMY761 pEMR469 (leu^+) et EMY761 pEMR473 (leu^+) (clones 1, 2 et 3) a été mise en culture dans 25 ml de milieu liquide sans leucine (Cf. tableau I, exemple 3). Ceci a permis d'obtenir et de maintenir un nombre de copies de plasmides élevé en pratiquant la sélection pour la complémentation de la mutation Leu2 par le gène LEU2 porté par les plasmides pEMR469 et pEMR473.

Après 22 h à 30°C sous agitation, les deux cultures ont été centrifugées pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée stérile et de nouveau centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. L'expression de l'urate oxydase a été induite en reprenant les cellules dans 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol pour la souche EMY761 pEMR469 (leu^+) et 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol-galactose (Cf. tableau I,

exemple 3) pour la souche EMY761 pEMR473 (leu^+). Les cultures ont été replacées à 30°C sous agitation pendant 27 h.

c) Souche témoin

La souche EMY761 non transformée, c'est-à-dire sans plasmide, a été cultivée comme ci-dessus avec comme différence que la première culture a lieu dans le milieu YPG liquide. Elle a subi d'une part l'induction dans 10 ml de milieu liquide YP éthanol-glycérol et, d'autre part, l'induction dans 10 ml de milieu YP éthanol-glycérolgalactose.

2) Préparation des échantillons :

a) Les cellules cultivées en 1a), 1b) et 1c) ont été centrifugées et le surnageant a été éliminé. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée et centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ainsi lavés ont été repris dans environ 1 ml de tampon triéthylèneamine TEA de pH 8,9. Environ 300 µl de cellules ainsi reprises ont été lisées en présence de billes de verre (de 400 à 500 µm de diamètre) représentant environ la moitié du volume final. Ce mélange a été vortexé vigoureusement pendant 1 min, 4 fois, les échantillons étant placés pendant 30 s dans la glace entre chaque broyage. Le liquide a été retiré des tubes avec une pipette pasteur et transféré dans un microtube. Les billes de verre ont été lavées 1 fois avec environ 200 µl de tampon TEA de pH 8,9. Les billes ont été vortexées pendant 1 min, 1 fois, et le liquide a été retiré à la pipette pasteur pour être ajouté au lysat précédent. Le lysat a été ensuite centrifugé dans un microtube pendant 5 min à 7 000 tr/min. Le surnageant a été précautionneusement retiré et conservé à -20°C pour le Western Blot, le dosage de l'activité urate oxydase et le dosage des protéines totales solubles. Le culot des cellules lysées a été conservé séparément à -20°C pour le Western Blot (Cf. 3) ci-dessous).

D'autre part, des prélèvements des cultures réalisées en 1a) et 1b) ont été réalisés comme suit avant l'induction : 2 ml de culture ont été centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans 500 µl d'eau distillée et de nouveau centrifugés pendant 5 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans environ 200 µl de tampon TEA de pH 8,9 et lysés comme

ci-dessus en présence de billes de verre. Les surnageants et les culots des cellules lysées ont été conservés à -20°C séparément. Le dosage de l'activité oxydase et le dosage des protéines totales solubles ont été effectués sur les surnageants.

3) Immunodétection de l'urate oxydase par Western Blot :

a) Mode opératoire

Les culots et les surnageants des différents échantillons ont été soumis à un Western Blot, technique bien connue de l'homme de l'art, qui comprend les étapes suivantes :

- solubilisation du culot par ébullition pendant 10 min dans un tampon dénommé tampon de charge constitué de tris-HCl 0,125 M pH 6,8 SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %, β-mercaptoéthanol 10 % (selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, Nature, 227 (1970), 680-685)), (étape mise en oeuvre uniquement pour les culots),
- séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisat selon le protocole décrit par LAEMMLI (U.K. LAEMMLI, Nature, 227 (1970), 680-685),
- transfert desdites protéines contenues dans le gel sur un filtre de nitrocellulose (selon la technique de H. TOWBIN et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4350-4354),

L'immunodétection, réalisée selon la technique de BURNETTE (W.W. BURNETTE Ana. Biochem. 112 (1981) 195-203), implique successivement :

- Le rinçage du filtre de nitrocellulose pendant 10 min avec un tampon A (tris-HCl 10 mM, NaCl 170 mM, Kl 1 mM).
- La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 30 min à 37°C avec un tampon B (tampon A additionné de sérum-albumine bovine à raison de 3 g pour 100 ml).
- La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 1 h à 37°C avec un immunsérum (des anticorps polyclonaux reconnaissant l'urate oxydase d'A. flavus).
- Le rinçage du filtre de nitrocellulose avec le tampon B.
- La mise en contact du filtre de nitrocellulose pendant 1 h à 37°C avec une solution de protéine G marquée à l'iode 125 à 0,1 microcurie/ml.

- Le rinçage du filtre avec le tampon A.
- Le séchage du filtre entre deux feuilles absorbantes.
- La mise en contact d'un film radiographique.
- La révélation du film.

b) Résultats

On constate que les souches EMY761 pEMR469 (leu^+) et EMY761 pEMR473 (leu^+) (clone 1) produisent une protéine de poids moléculaire apparent d'envron 33 KDa qui est reconnue par les anticorps dirigés contre l'urate oxydase d'A. flavus (préparés chez le lapin selon des techniques bien connues de l'homme de l'art : Cf. VAITUKAITIS et al. (1981) "Methods in enzymology" Academic Press, New York, vol. 73, p. 46) et qui est absente de la souche témoin.

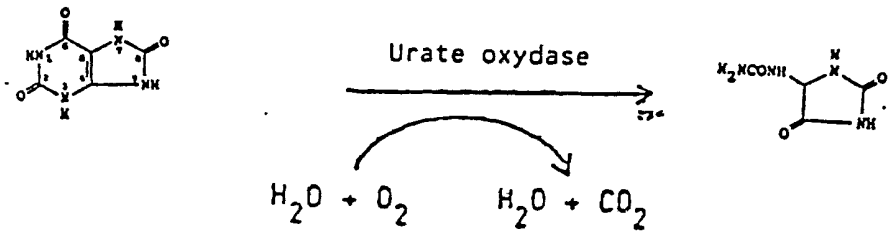
La comparaison entre les quantités de cette protéine pour les culots et les surnageants permet de déduire qu'environ 80 % de celle-ci est sous forme soluble dans le lysat.

4) Dosage de l'activité urate oxydase :

L'activité urate oxydase a été mesurée sur les surnageants des cellules lysées.

a) Principe

On suit la transformation de l'acide urique en allantoïne par la diminution de l'absorbance à 292 nm. La réaction est la suivante :



Acide urique

(absorbant à 292 nm)

Allantoïne

b) Réactifs

a) Tampon TEA 0,05 M pH 8,9/EDTA

- dissoudre 7,5 g de TEA (réactif pour analyse-Prolabo réf. 287.46.266) dans 400 ml d'eau distillée,
- dissoudre 0,372 g de Complexon III (Merck-réf. 8418) dans 50 ml d'eau distillée,
- réunir les deux solutions et compléter à 500 ml (solution 1),
- ajuster le pH de cette solution à 8,9 par HCl 0,2N,
- compléter à 1 000 ml avec de l'eau distillée (solution 2).

b) Acide urique Solution stock

- dissoudre 100 mg d'acide urique (Carbiochem réf. 6671) dans 50 ml de la solution 1,
- ajuster par HCl 0,2N à pH 8,9,
- compléter à 100 ml par de l'eau distillée.

La solution obtenue peut se conserver une semaine à $4^{o}C$.

c) Acide urique Solution Substrat

- prélever 1,5 ml de solution stock d'acide urique (carbiochem réf. 6671) et diluer à 100 ml avec du tampon TEA/réactif pour analyse-Prolabo réf. 287.46.266).

Cette solution doit être utilisée dans la journée.

c) Mode opératoire

On introduit dans la cuve de quartz d'un spectrophotomètre réglé à 292 nm et thermostaté à $30^{o}C$ les volumes suivants :

- 600 µl d'acide urique solution substrat (préchauffés à $30^{o}C$),
- 100 µl des surnageants ci-dessus auxquels ont été ajoutés 200 µl de TEA pH 8,9 (préchauffés à $30^{o}C$).

On mélange et on lit le changement de densité optique, ci-après parfois abrégé DO, toutes les 30 s pendant 5 min. On en déduit ΔE, variation de la densité optique par minute.

d) Expression des résultats

L'activité A enzymatique urate oxydase exprimée en U/ml est calculée à partir de la mesure de ΔE à l'aide de la formule :

$$A = \frac{\Delta E \times Vr \times d}{I \times V_{PE}}$$

dans laquelle les symboles Vr, d, I et V_{PE} représentent respectivement le volume réactionnel (0,9 ml), le taux de dilution (2), le coefficient d'extinction de l'acide urique à 292 nm (12,5) et le volume de la prise d'essai (0,1 ml).

5) Dosage des protéines totales solubles dans les lysats :

Le kit protein assay de BIORAD a été utilisé pour doser les protéines totales présentes dans le surnageant des cellules lysées. Il est basé sur l'observation que l'absorbance maximum pour une solution acide de bleu brillant de Coomassie g-250 passe de 465 nm à 595 nm lorsque des protéines viennent s'y fixer (Cf. Reisner et al., Anal Biochem, 64, 509-(1975)).

Mode opératoire

On introduit dans la cuve d'un spectrophotomètre réglé à 595 nm les volumes suivants :

- 10 µl d'échantillon auxquels ont été rajoutés 790 µl d'eau distillée
- 200 µl de "Dye reagent" concentré (Biorad).

On mélange et on lit la densité optique à 595 nm. Une gamme étalon avec des concentrations croissantes de BSA (Bovine Serum Albumine) a été réalisée ainsi. On lit la concentration inconnue des protéines totales des lysats sur la courbe étalon obtenue.

6) Résultats :

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau (II) ci-après. Celui-ci précise pour chaque souche le milieu de culture, la source de carbone et d'énergie de la culture, l'activité urate oxydase en U/ml, la quantité de protéines totales solubles en mg/ml et le pourcentage d'urate oxydase dans les protéines totales solubles. Ce dernier paramètre est calculé en supposant que l'activité spécifique de la protéine recombinante est identique à celle de l'urate oxydase obtenue à partir d'A. flavus : 30 U/mg.

TABLEAU II

souche	Milieu de culture au moment de la préparation d'échantillons	Source de carbone et d'énergie de la culture	Activité urate oxydase (U/ml)	Protéines totales solubles (mg/ml)	Pourcentage d'urate oxydase dans les protéines totales solubles
EMY761 pEMR469 (leu$^+$)	milieu liquide sans leucine	Glucose	0,04	4,9	0,03
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 1	milieu liquide sans leucine	Glucose	< 0,01	3,9	0,00
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 2)	milieu liquide sans leucine	Glucose	< 0,01	6,0	0,00
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 3)	milieu liquide sans leucine	Glucose	< 0,01	5,7	0,00
EMY761 non transformé	milieu YPG liquide	Glucose	< 0,01	4,5	0,00
EMY761 non transformé	milieu YPG éthanol/glycérol	Ethanol/glycérol	< 0,01	4,2	0,00
EMY761 pEMR469 (leu$^+$)	milieu YPG éthanol/glycérol	Ethanol/glycérol	8,5	2,0	14
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone3)	milieu YPG éthanol/glycérol	Ethanol/glycérol	0,05	3,1	0,05
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 1)	milieu YPG éthanol/glycérol	Ethanol/glycérol	0,05	3,1	0,05
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 2)	milieu YPG éthanol/glycérol	Ethanol/glycérol	0,05	3,1	0,05
EMY761 non transformé	milieu YP éthanol/glycérol/ galactose	Ethanol/glycérol/ galactose	< 0,01	5,6	0,00
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 1)	milieu YP éthanol/glycérol/ galactose	Ethanol/glycérol/ galactose	17,3	3,8	15
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 2)	milieu YP éthanol/glycérol/ galactose	Ethanol/glycérol/ galactose	36	5,7	21
EMY761 pEMR473 (leu$^+$) (clone 3)	milieu YP éthanol/glycérol galactose	Ethanol/glycérol/ galactose	22	4,0	18,2
EMY761 pEMR469 (leu$^+$)	milieu YP éthanol/glycérol/ galactose	Ethanol/glycérol/ galactose	10	2,4	13,5

2656531

Ce tableau montre :

a) en présence de glycose, le niveau ("réprimé") d'urate oxydase est non détectable dans le cas du promoteur artificiel de l'invention (souche EMY761 pEMR473 (leu^+) (clone 1, 2 ou 3)) alors qu'il l'est dans le cas du promoteur ADH_2 (souche EMY761 pEMR469 (leu^+)). Le promoteur artificiel permet donc, en présence de glucose, une meilleure répression que le promoteur ADH_2.

b) en absence de glucose, mais en présence d'éthanol/glycérol, le niveau d'urate oxydase est important pour le promoteur ADH_2 (environ 14 % des protéines totales solubles) et faible mais détectable pour le promoteur artificiel.

c) en absence de glucose mais en présence d'éthanol/glycérol/galactose, le niveau d'urate oxydase garde une valeur peu différente de celle du cas précédent pour le promoteur ADH_2 (environ 13,5 % des protéines totales solubles), mais atteint une valeur élevée (environ 18 % des protéines totales solubles) pour le promoteur artificiel.

Le promoteur artificiel de l'invention permet donc une production de protéine recombinante à un niveau élevé et présente trois niveaux d'expression :

- niveau nul a)
- niveau de fond b)
- niveau maximal c)

EXEMPLE 4bis : Expression en erlenmeyer de l'ADNc de l'urate oxydase par les souches EMY761 pEMR515 (leu^+), EMY500 pEMR515 (leu^+) et GRF18 pEMR515 (leu^+)

Une colonie de chacune des trois souches ci-dessus a été mise en culture dans 20 ml de milieu liquide sans leucine.

Après une nuit à 30°C sous agitation, les trois cultures ont été centrifugées pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots cellulaires ont été repris dans 10 ml d'eau distillée stérile et de nouveau centrifugés pendant 10 min. L'expression de l'urate oxydase a été induite en reprenant les cellules dans 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol-galactose (Cf. tableau I, exemple 8). Les cultures ont été replacées à 30°C sous agitation pendant environ 20 h. En

témoin, une culture de chaque souche hôte, non transformée, a été effectuée.

Les cellules de chacune des six cultures sont reculotées par centrifugation et le surnageant est éliminé. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée et centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ainsi lavés ont été repris dans environ 1 ml de tampon TEA de pH 8,9 et le broyage ainsi que l'élimination des particules par centrifugation ont été réalisés comme décrit dans l'exemple 9, 2). Le surnageant de chaque culture sert comme précédemment à un dosage de l'urate oxydase et des protéines totales. Les principaux résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI ci-après :

TABLEAU VI

Souche/conditions de culture	Activité urate oxydase (U/ml)	Protéines totales solubles (mg/ml)	% d'urate oxydase dans les protéines solubles
GRF18 pEMR515 (leu$^+$)/a)	$<0,1$	2,2	$<0,05$
EMY500 pEMR515 (leu$^+$)/a)	$<0,1$	0,9	$<0,05$
EMY761 pEMR515 (leu$^+$)/a)	$<0,1$	1,8	$<0,05$
GRF18 pEMR515 (leu$^+$)/b)	38	5,4	23 %
EMY500 pEMR515 (leu$^+$)/b)	20	2,5	26 %
EMY761 pEMR515 (leu$^+$)/b)	33	4,2	26 %

a) : les souches sont cultivées en présence de glucose (conditions de non-induction)

b) : les souches sont cultivées en absence de glucose et en présence de galactose (induction).

Le promoteur selon l'invention permet donc un niveau d'expression de l'urate oxydase dans trois souches non isogéniques.

EXEMPLE 5 : Construction de deux vecteurs d'expression de la β-galactosidase dans la levure : le plasmide pEMR429 porteur d'un promoteur ADH_2 et le plasmide pEMR437 porteur du promoteur artificiel de l'invention

La stratégie mise en oeuvre fait appel à des fragments obtenus à partir de plasmides préexistants accessibles au public et à des fragments préparés par voie de synthèse selon les techniques maintenant couramment utilisées. Les techniques de clonage employées sont celles décrites par T. MANIATIS EF, FRITSCH et J. SAMBROOK dans "Molecular Cloning, a laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1984). La synthèse des oligonucléotides est réalisée à l'aide d'un synthétiseur d'ADN Biosearch 4 600.

1) Construction du plasmide pEMR429 :

Le plasmide pEMR414 (Cf. figure 5) a été soumis à une digestion complète par l'enzyme de restriction BamHI. Le site BamHI, localisé entre les séquences promotrices (ADH_2) et terminatrices PGK) est unique. L'ADN linéraire du plasmide est purifié par élution d'un gel d'agarose après électrophorèse. Le plasmide pMC1403 (réf. Casadaban et al. (1980), J. Bactériol., 143, 971-980) a été soumis à une digestion complète par les enzymes BamHI et EcoRI, laquelle a permis de libérer un fragment d'ADN BamHI-EcoRI d'environ 3 Kb qui contient l'essentiel (partie amont) de la séquence codant pour la β-galactosidase d'E. coli. La séquence complète a été reconstituée à l'aide du fragment synthétique de séquence suivante :

```
                EcoRI
5'              ▼
     AATTTCAGCTGAGCGCCGGTCG
        AGTCGACTCGCGGCCAGC

CTACCATTACCAGTTGGTCTGGT
GATGGTAATGGTCAACCAGACCA

GTCAAAAATAATAATAAG
CAGTTTTTATTATTATTCCTAG▲
                     BamHI
```

Le fragment BamHI-EcoRI provenant de la double digestion de pMC1403 est ligué en EcoRI avec le fragment synthétique ci-dessus.

Le fragment BamHI-BamHI obtenu est ensuite ligué à l'ADN linéraire du plasmide pEMR414 digéré par BamHI de façon à obtenir le plasmide pEMR429, représenté sur la figure 8, dans laquelle les symboles ont la même signification que dans la figure 5, les fragments BamHI-EcoRI et IcoRI-BamHI introduits étant représentés par ▨

Dans ce plasmide, la séquence codant pour la β-galactosidase est sous le contrôle du promoteur ADH_2 décrit dans l'exemple 2 (Cf. p. 17).

2) Construction du plasmide pEMR461 :

Le plasmide pEMR429 a été soumis à une digestion complète par les enzymes MluI et SphI. Le grand fragment MluI-SphI contenant le gène de la β-galactosidase a ensuite été ligué au fragment synthétique, dont la séquence donnée ci-après comporte les séquences d'activation amont (Upstream Activation Séquence : UAS) du promoteur du gène Gal7 de S. cerevisiae et des extrémités cohésives MluI et SphI.

```
M
l
u
l
 CGCGTCTATACTTCGGAGCACTGTTGAGCGAAGGCTCATTAGATATATTTTCTGTCAT
 --+---------+---------+---------+---------+---------+---------+-----
     AGATATGAAGCCTCGTGACAACTCGCTTCCGAGTAATCTATATAAAAGACAGTA

TTTCCTTAACCCAAAAATAAGGGAGAGGGTCCAAAAAGCGCTCGGACAACTGTTGACCGT
----+---------+---------+---------+---------+---------+---------+-----
AAAGGAATTGGGTTTTTATTCCCTCTCCCAGGTTTTTCGCGAGCCTGTTGACAACTGGCA

GATCCGAAGGACTGGCTATACAGTGTTCACAAAATAGCCAAGCTGAAAATAATGTGTAGC
----+---------+---------+---------+---------+---------+---------+-----
CTAGGCTTCCTGACCGATATGTCACAAGTGTTTTATCGGTTCGACTTTTATTACACATCG

                              S
                              P
                              h
                              I
CTTTAGCTATGTTCAGTTAGTTTGGCATG
----+---------+---------+-----
GAAATCGATACAAGTCAATCAAACC
```

Le plasmide pEMR461 ainsi obtenu est représenté sur la figure 9, dans laquelle les symboles ont la même signification que dans la figure 8, le nouveau fragment MluI-SphI introduit étant symbolisé par 

Dans ce plasmide, la séquence codant pour la β-galactosidase est sous le contrôle du promoteur artificiel de l'invention décrit dans l'exemple 2 (Cf. p. 18).

EXEMPLE 6 : Transformation de la souche de S. cerevisiae DBY746 par les plasmides pEMR429 et pEMR461

Transformation avec sélection pour prototrophie de l'uracile :

Une colonie de la souche DBY746 qui est (Matα, his3, leu2, ura3, trp1, cyh^R) (ROSE et al. (1981), PNAS USA, 78, 2460-2464) a servi à ensemencer 100 ml d'un milieu appelé milieu YPG liquide (CF; tableau I de l'exemple 3). Lors de l'obtention d'une densité cellulaire de 10^7 cellules par ml, les cellules ont été traitées à l'acétate de lithium 0,2 M pour la transformation selon une technique bien connue de l'homme de l'art, décrite par ITO et al. (ITO et al., 1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Les cellules DBY746 ont été transformées en parallèle avec environ 1 µg de chacun des plasmides pEMR429 et pEMR461. Les cellules transformées sont sélectionnées pour le caractère d'auxotrophie d'uracile (ura^+) sur un milieu appelé milieu solide sans uracile, (Cf. tableau I de l'exemple 3). On a ainsi retenu un transformé DBY746 pEMR429 (ura^+) et un transformé DBY746 pEMR461 (ura^+).

EXEMPLE 7 : Production de β-galactosidase à l'aide des souches DBY746 pEMR429 (ura^+) et DBY746 pEMR461 (ura^+)

1) Expression de la β-galactosidase :

Une colonie transformée DBY746 pEMR429 (ura^+) et une colonie transformée DBY746 pEMR461 (ura^+) ont servi à ensemencer chacune 20 ml de milieu liquide sans uracile auquel on a préalablement ajouté du tryptophane (10 mg/l). Après une nuit à 30°C sous agitation, on ajoute 1 % de glucose et on laisse la culture se poursuivre pendant 4 h. On vérifie alors qu'il y a encore du

glucose dans les cultures. On prélève une fraction aliquote pour doser la β-galactosidase.

Après une nuit à 30°C sous agitation, les deux cultures ont été centrifugées pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée stérile et de nouveau centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. L'expression de β-galactosidase a été induite en reprenant les cellules dans 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol (Cf. tableau I, exemple 3) pour la souche DBY746 pEMR429 (ura^+) et 20 ml de milieu YP éthanol-glycérol-galactose (Cf. tableau I, exemple 3) pour la souche DBY746 pEMR461 (ura^+). Les cultures ont été replacées à 30°C sous agitation pendant une nuit.

2) Préparation des échantillons et dosage :

Les cellules cultivées ci-dessus ont été centrifugées et le surnageant a été éliminé. Les culots ont été repris dans 10 ml d'eau distillée et centrifugés pendant 10 min à 7 000 tr/min. Les culots ainsi lavés ont été repris dans environ 1 ml de tampon de dosage de la β-galactosidase (EDTA : 2×10^{-3} M ; Na_2HPO_4 7×10^{-2} M ; NaH_2PO_4 3×10^{-2} M ; $MgSO_4$ 10^{-3} M ; $MnSO_4$ 2×10^{-3} M). Environ 300 µl de cellules ainsi reprises ont été lysées en présence de billes de verre (de 400 à 500 µm de diamètre) représentant environ la moitié du volume final. Ce mélange a été vortexé vigoureusement pendant 1 min, 4 fois, les échantillons étant placés pendant 30 s dans la glace entre chaque broyage. Le liquide a été retiré des tubes avec une pipette pasteur et transféré dans un microtube. Les billes de verre ont été lavées 1 fois avec environ 200 µl de tampon TEA de pH 8,9. Les billes ont été vortexées pendant 1 min, 1 fois, et le liquide a été retiré à la pipette pasteur pour être ajouté au lysat précédent. Le lysat a été ensuite centrifugé dans un microtube pendant 5 min à 7 000 tr/min. Le surnageant a été précautionneusement retiré et conservé à -20°C pour le Western Blot, le dosage de l'activité urate oxydase et le dosage des protéines totales solubles. Le culot des cellules lysées a été conservé séparément à -20°C.

L'activité β-galactosidase a été dosée selon la technique de PARDEE (PARDEE et al., J. Mol. B. (1959), 1, 1656-178).

Les protéines totales solubles ont été d'autre part dosées à l'aide du kit protein essay de BIORAD, comme décrit dans l'exemple 4.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III ci-après :

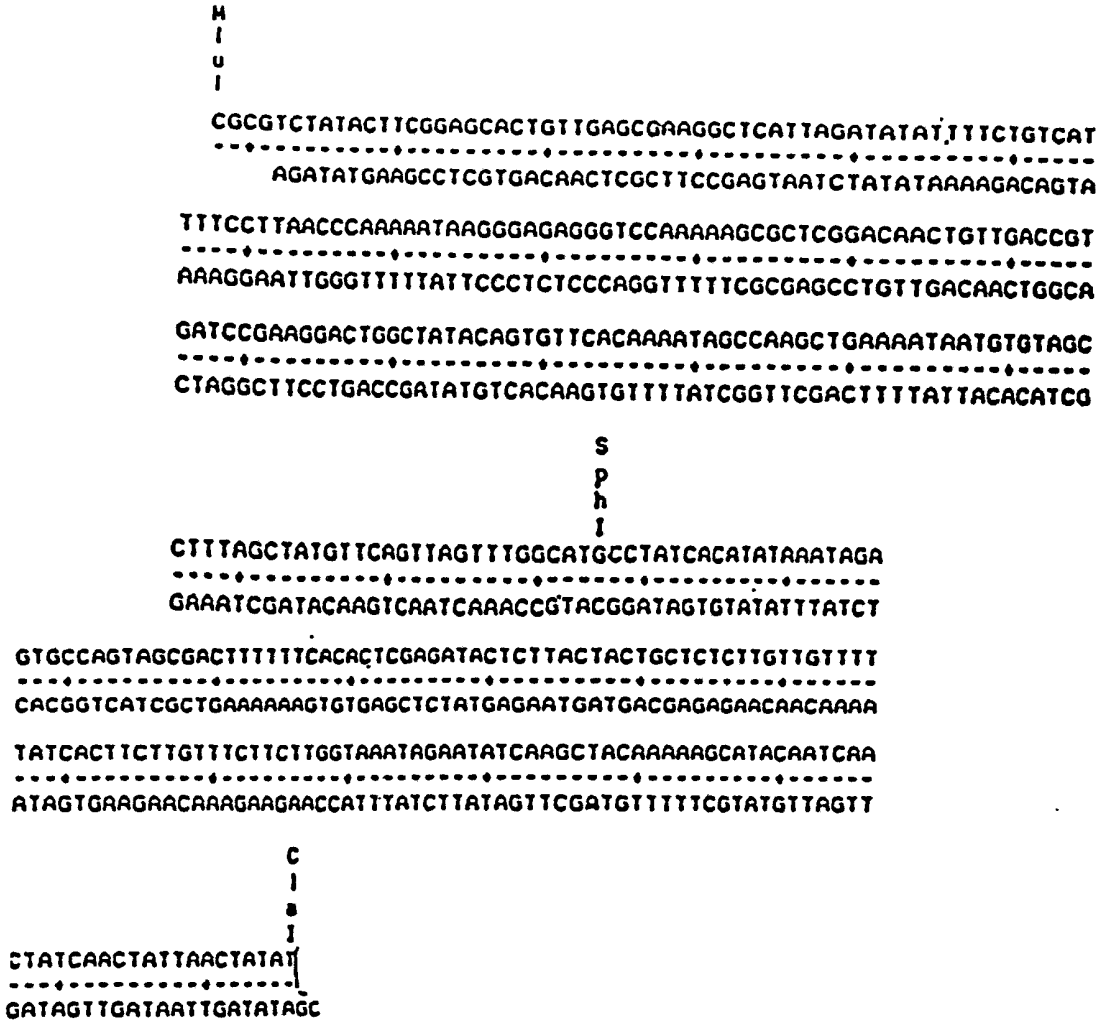
TABLEAU III

Souche	Source de carbone et d'énergie de la culture	Activité β-galactosidase µ/ml	Protéines totales solubles µg/ml	Milieu de culture
DBY746 pEMR429 (ura$^+$)	glucose	59	375	Milieu liquide dans uracile + tryptophane (10 mg/l) + glucose (1 %)
DBY746 pEMR429 (ura$^+$)	éthanol/ glycérol	6 500	1 700	Milieu YP éthanol-glycérol
DBY746 pEMR461 (ura$^+$)	glucose	0	350	Milieu liquide sans uracile/tryptophane (10 mg/l) + glucose (1 %)
DBY746 pEMR461 (ura$^+$)	éthanol/ glycérol/ galactose	480	520	Milieu YP éthanol-glycérol-galactose

Ce tableau montre :

- en présence de glucose, la souche EMY746 pEMR429 (ura$^+$) produit un peu de !-galactosidase alors que l'on ne détecte pas cette protéine pour la souche DBY746 pEMR461 (ura$^+$). Le promoteur artificiel de l'invention permet donc une meilleure répression que le promoteur ADH_2.

- en conditions d'induction, le promoteur artificiel conduit à un niveau d'expression élevé de β-galactosidase quoique, dans ces conditions, plus faible que le niveau obtenu avec le promoteur ADH_2.

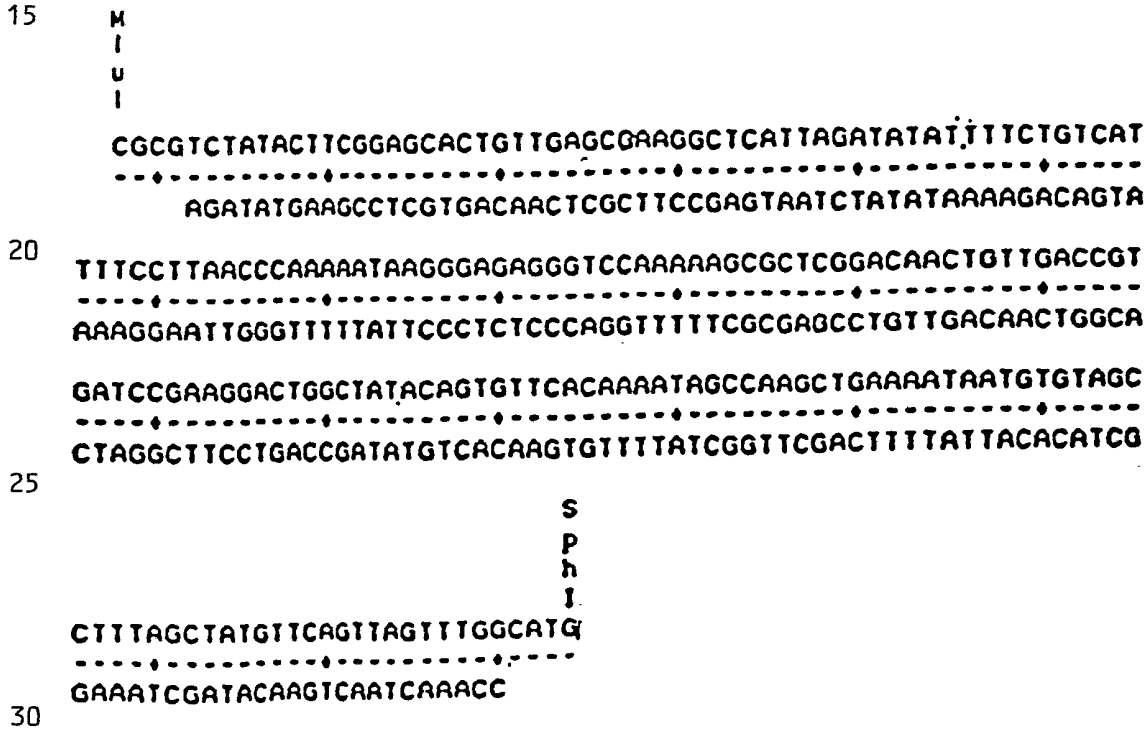


REVENDICATIONS

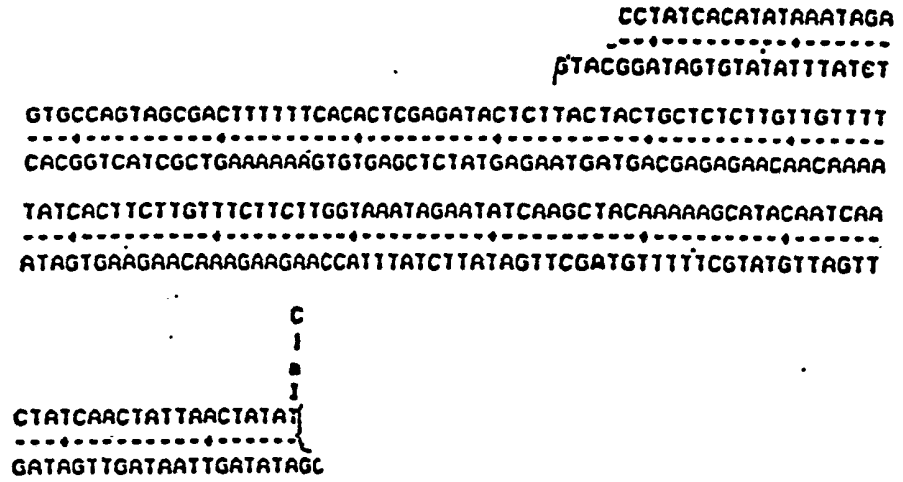
1. Promoteur artificiel pour l'expression de protéines dans la levure, caractérisé en ce qu'il comporte :

- une sous-séquence en amont de l'élément TATA de la séquence du promoteur du gène GAL7 de Saccharomyces cerevisiae, qui comporte les séquences d'activation amont UAS1 et UAS2 ;
- une sous-séquence de la séquence d'un promoteur ADH_2 comportant l'élément TATA et la région d'initiation de la transcription.

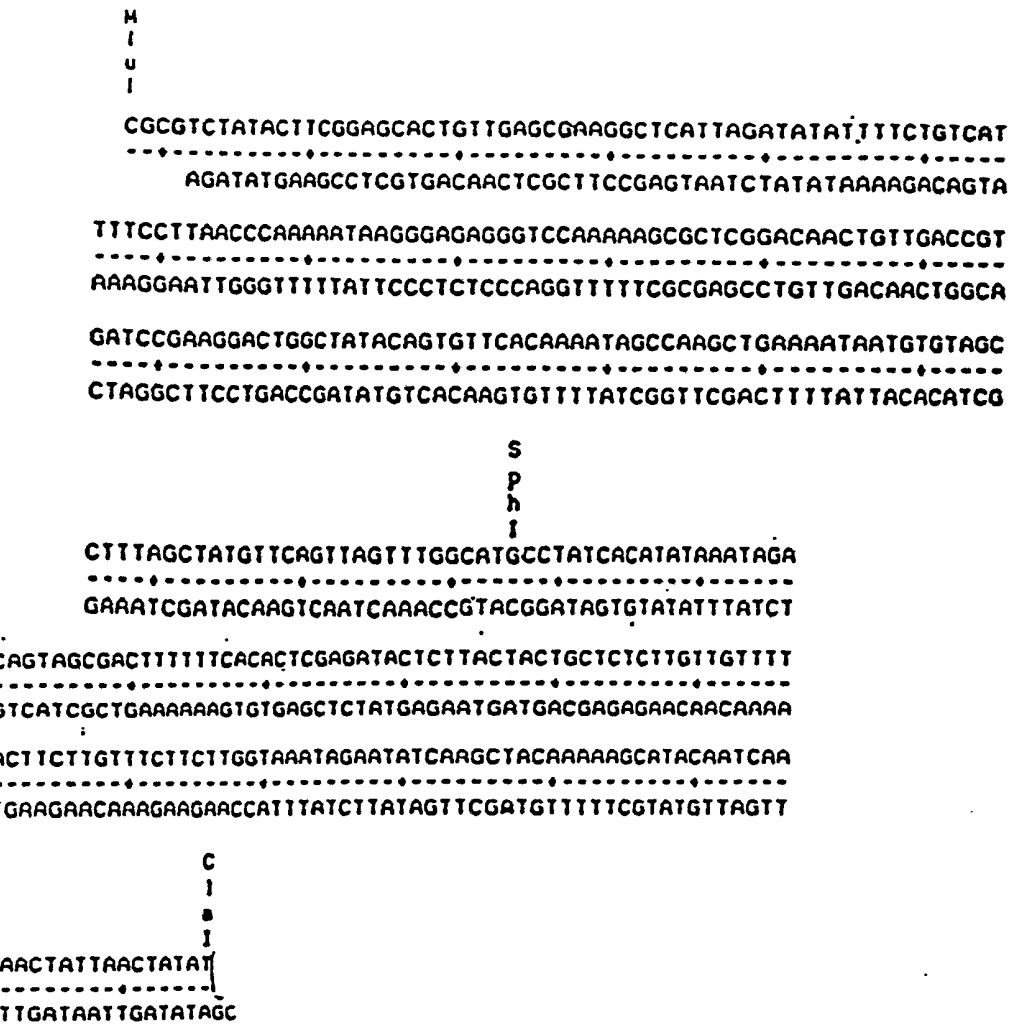
2. promoteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que la sous-séquence de la séquence du promoteur GAL7 de Saccharomyces cerevisiae est choisie parmi les sous-séquences de la séquence suivante :



3. Promoteur selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la sous-séquence de la séquence d'un promoteur ADH_2 comprenant l'élément TATA et la région d'initiation est choisie parmi les sous-séquences de la séquence ci-après :



4. Promoteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte la séquence suivante :



5. Vecteur d'expression pour la levure portant un gène d'intérêt avec les moyens nécessaires à son expression, sa réplication et la sélection des cellules transformées, caractérisé en ce que ce gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur selon l'une des revendications 1 à 4.

6. Vecteur d'expression selon la revendication 5, caractérisé en ce que le gène d'intérêt est un gène recombinant codant pour une protéine toxique pour la levure.

7. Vecteur d'expression selon la revendication 5, caractérisé en ce que le gène d'intérêt est un gène recombinant codant pour l'urate oxydase.

8. Souche de levure, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon l'une des revendications 6 et 7.

9. Souche de Saccharomyces cerevisiae, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon l'une des revendications 5 à 7.

10. Procédé de production d'une protéine d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend la culture d'une souche de Saccharomyces cerevisiae selon la revendicaton 9 en présence de galactose.

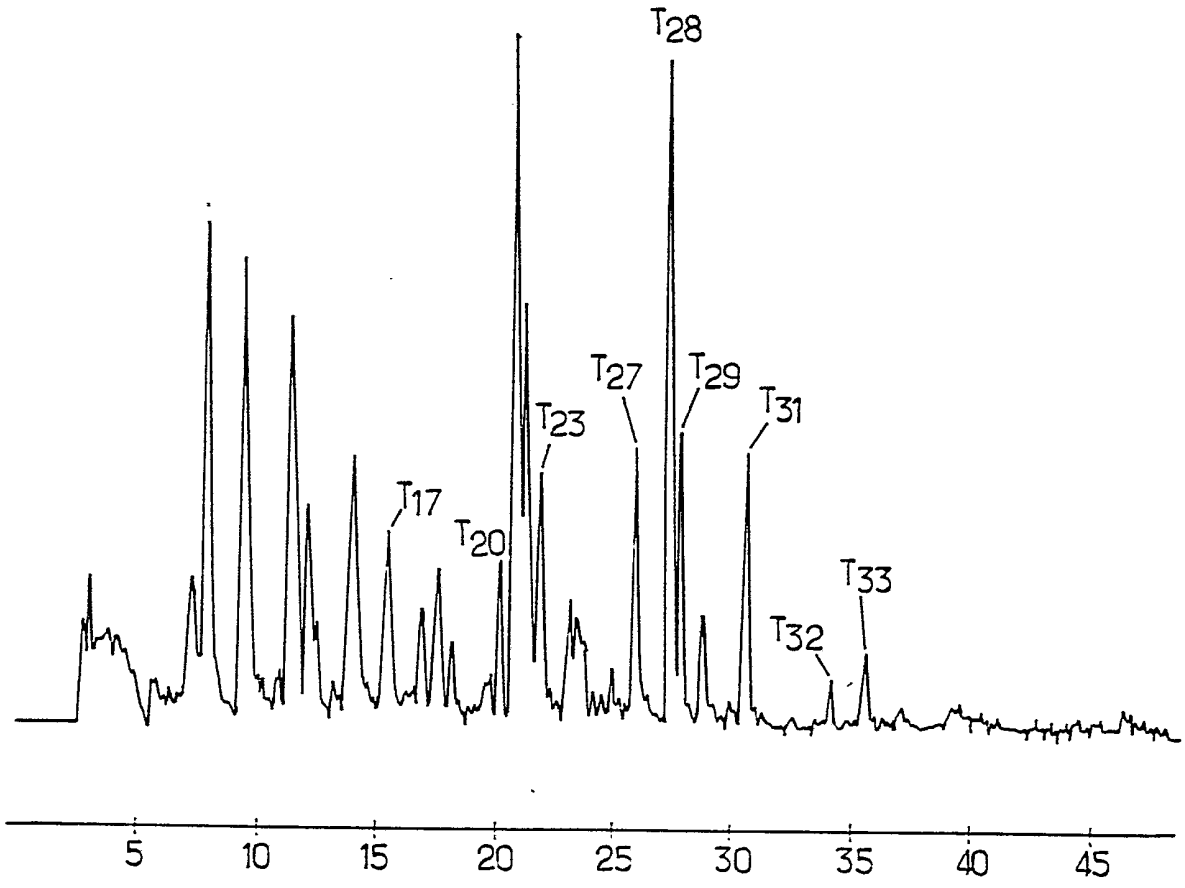


FIG. 1

Profil d'élution par mesure de la densité optique à 218 nm du produit de la digestion tryptique de l'urateoxydase

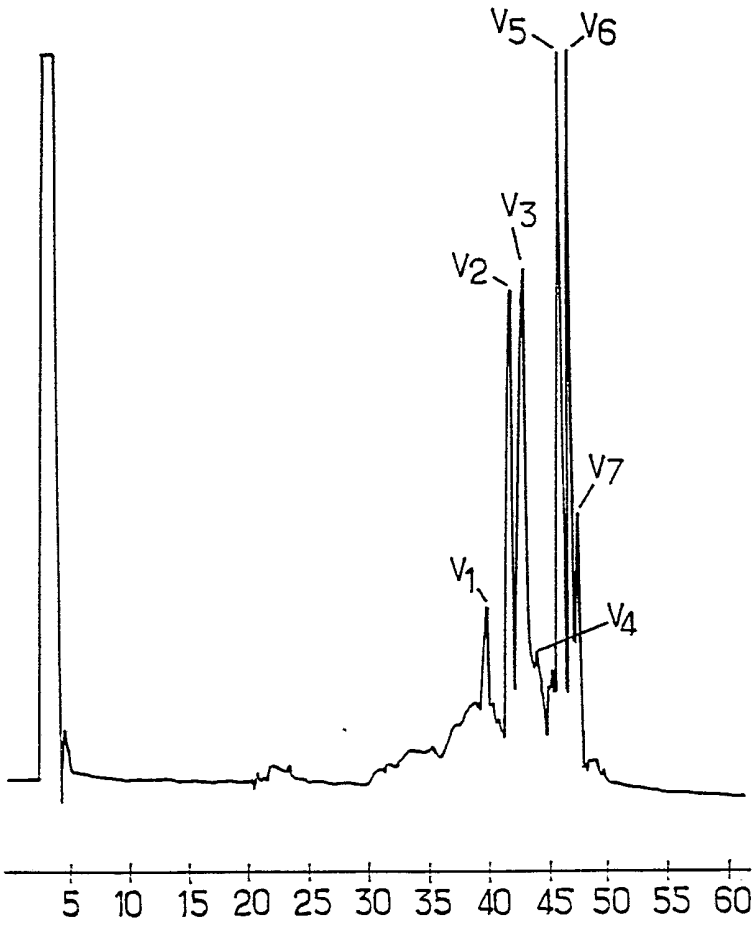


FIG. 2

Profil d'élution par mesure de la densité optique à 218 nm
du produit de la digestion par la protéase V8 de l'urate oxydase

```
   1  AAACCCTCACTGCCTCTCTCATTCCTTCCG GTGCCCCCGATCCTCAATCCAACTTGTACA   60
  61  TACTTCTCCCAACTCTCTGCTATATCCTTC ATATTCCCATACTACAAGATGTCCGCAGTA  120
 121  AAAGCAGCCCGCTACGGCAAGGACAATGTC CGCGTCTACAAGGTTCACAAGGACGAGAAG  180
 181  ACCGGTGTCCAGACGGTGTACGAGATGACC GTCTGTGTGCTTCTGGAGGGTGAGATTGAG  240
 241  ACCTCTTACACCAAGGCCGACAACAGCGTC ATTGTCGCAACCGACTCCATTAAGAACACC  300
 301  ATTTACATCACCGCCAAGCAGAACCCCGTT ACTCCTCCCGAGCTGTTCGGCTCCATCCTG  360
 361  GGCACACACTTCATTGAGAAGTACAACCAC ATCCATGCCGCTCACGTCAACATTGTCTGC  420
 421  CACCGCTGGACCCGGATGGACATTGACGGC AAGCCACACCCTCACTCCTTCATCCGCGAC  480
 481  AGCGAGGAGAAGCGGAATGTGCAGGTGGAC GTGGTCGAGGGCAAGGGCATCGATATCAAG  540
 541  TCGTCTCTGTCCGGCCTGACCGTGCTGAAG AGCACCAACTCGCAGTTCTGGGGCTTCCTG  600
 601  CGTGACGAGTACACCACACTTAAGGAGACC TGGGACCGTATCCTGAGCACCGACGTCGAT  660
 661  GCCACTTGGCAGTGGAAGAATTTCAGTGGA CTCCAGGAGGTCCGCTCGCACGTGCCTAAG  720
 721  TTCGATGCTACCTGGGCCACTGCTCGCGAG GTCACTCTGAAGACTTTTGCTGAAGATAAC  780
 781  AGTGCCAGCGTGCAGGCCACTATGTACAAG ATGGCAGAGCAAATCCTGGCGCGCCAGCAG  840
 841  CTGATCGAGACTGTCGAGTACTCGTTGCCT AACAAGCACTATTTCGAAATCGACCTGAGC  900
 901  TGGCACAAGGGCCTCCAAAACACCGGCAAG AACGCCGAGGTCTTCGCTCCTCAGTCGGAC  960
 961  CCCAACGGTCTGATCAAGTGTACCGTCGGC CGGTCCTCTCTGAAGTCTAAATTGTAAACC 1020
1021  AACATGATTCTCACGTTCCGGAGTTTCCAA GGCAAACTGTATATAGTCTGGGATAGGGTA 1080
1081  TAGCATTCATTCACTTGTTTTTTACTTCCA AAAAAAAAAAA...
```

FIG. 3

Séquence nucléotidique du clone 9C et d'une partie du clone 9A

↓ : début du clone 9A

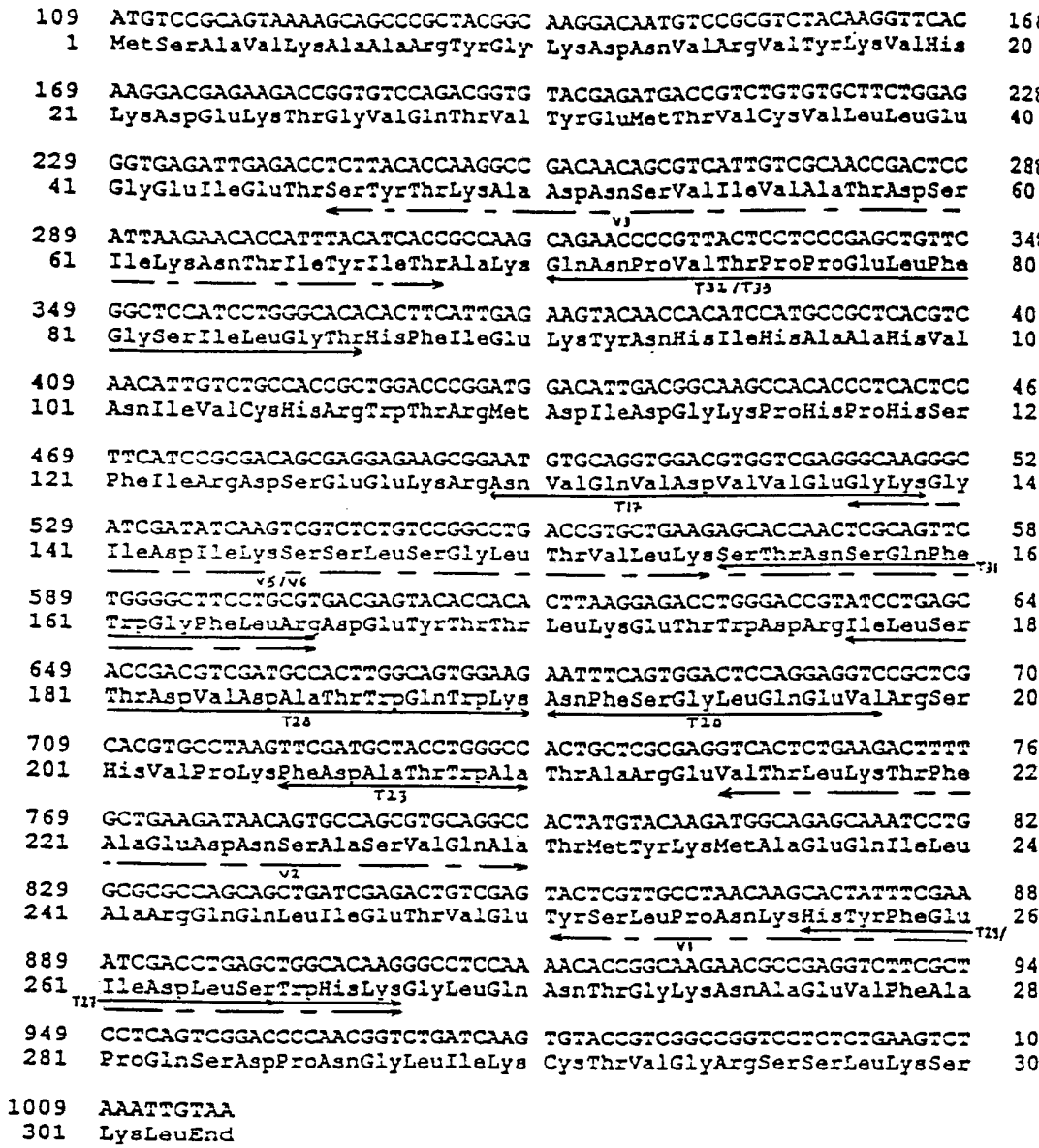
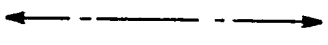


FIG. 4

Séquence d'ADN ouverte par l'ATG en position 109 sur la figure 3 et polypeptide codé.

Les peptides séquencés obtenus par hydrolyse de l'urate oxydase d'A. flavus à l'aide de la trypsine et de la protéase V8 sont représenté par des flèches en vis-à-vis du polypeptide codé selon

 : peptide tryptique

 : peptide obtenu par hydrolyse à l'aide de la protéase V8.

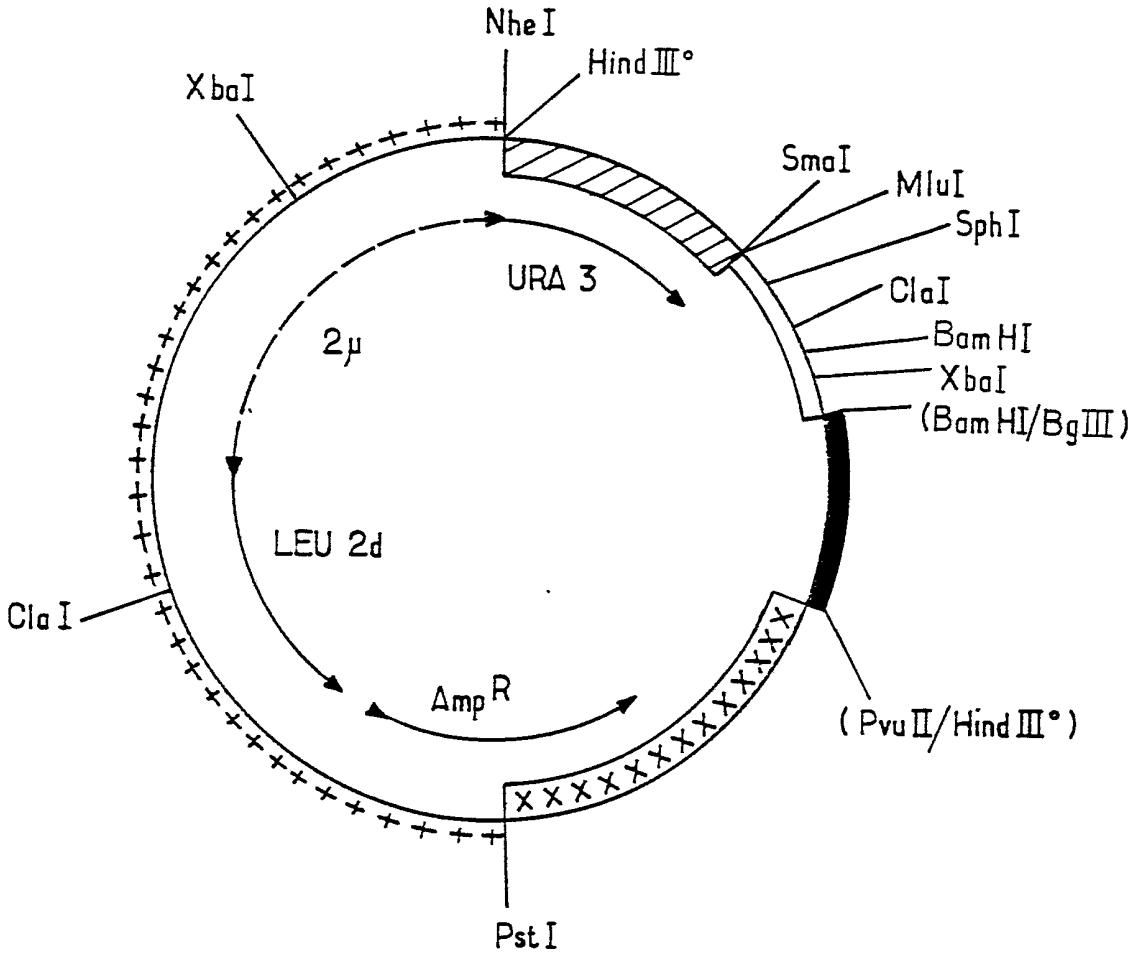


FIG. 5

Plasmide pEMR 414

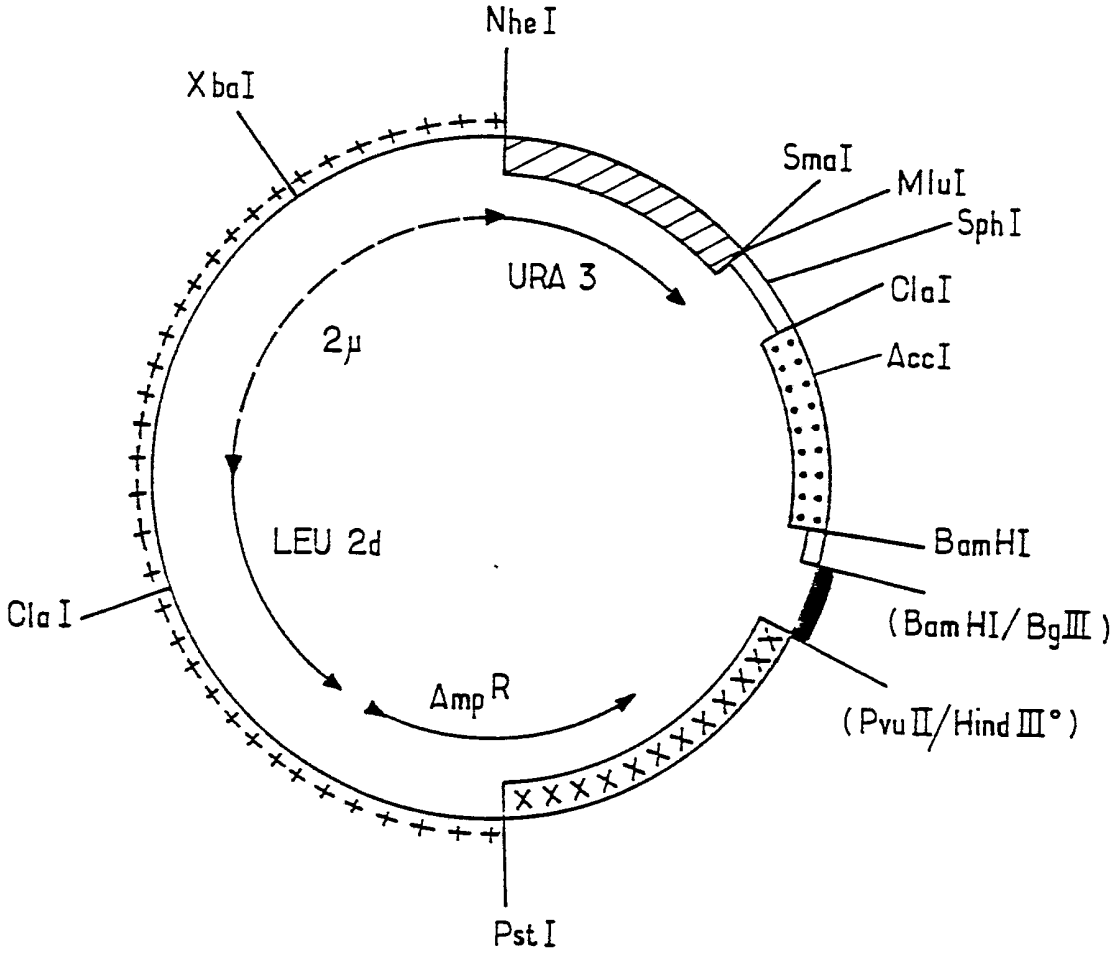


FIG.6

Plasmide pEMR 469

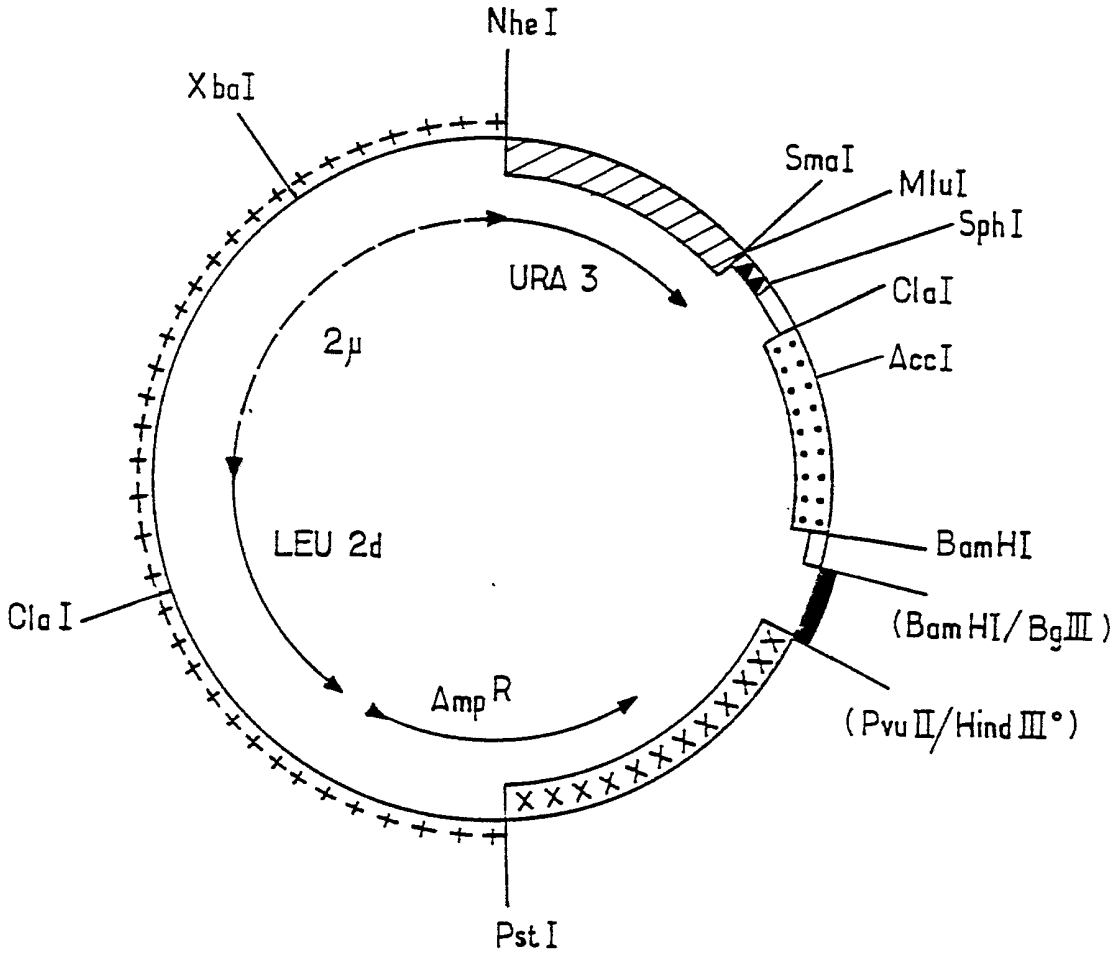


FIG. 7

Plasmide pEMR 473

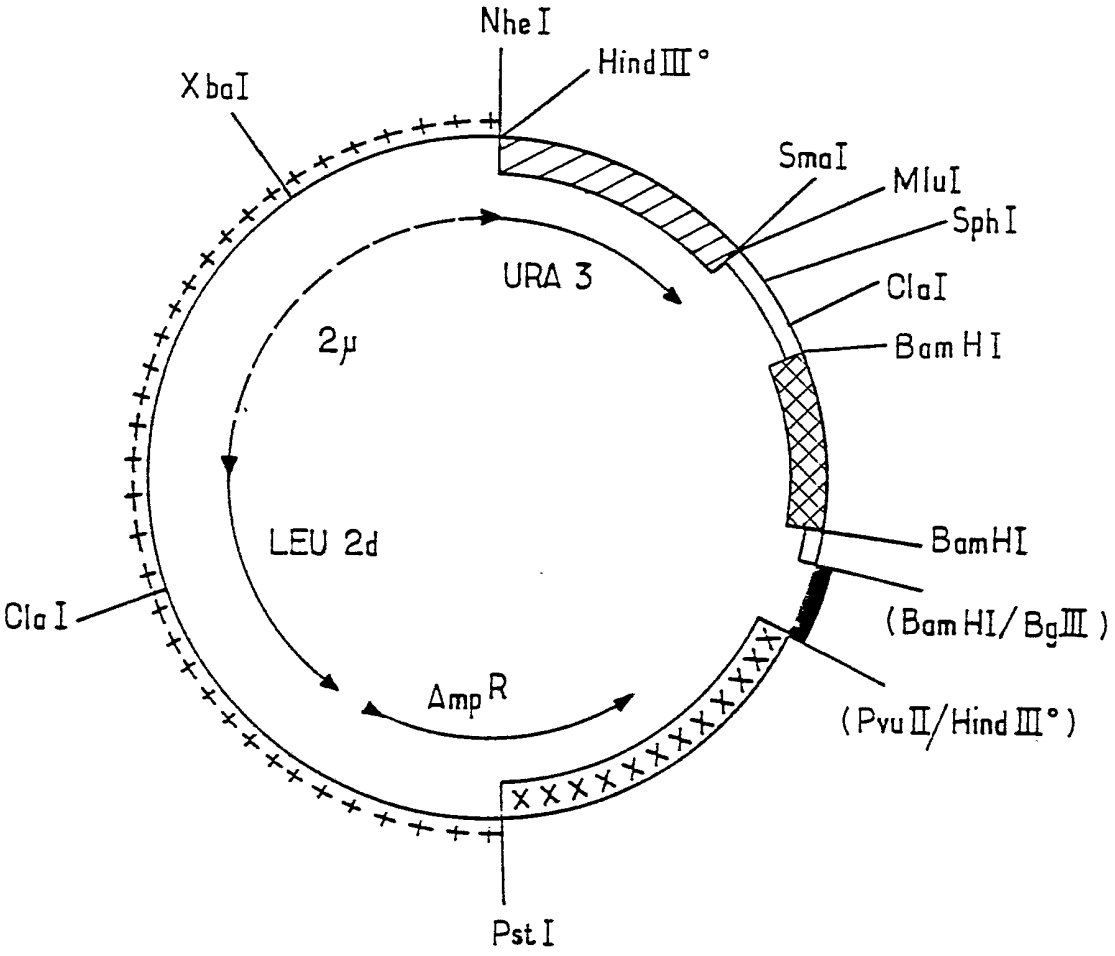


FIG.8

Plasmide pEMR 429

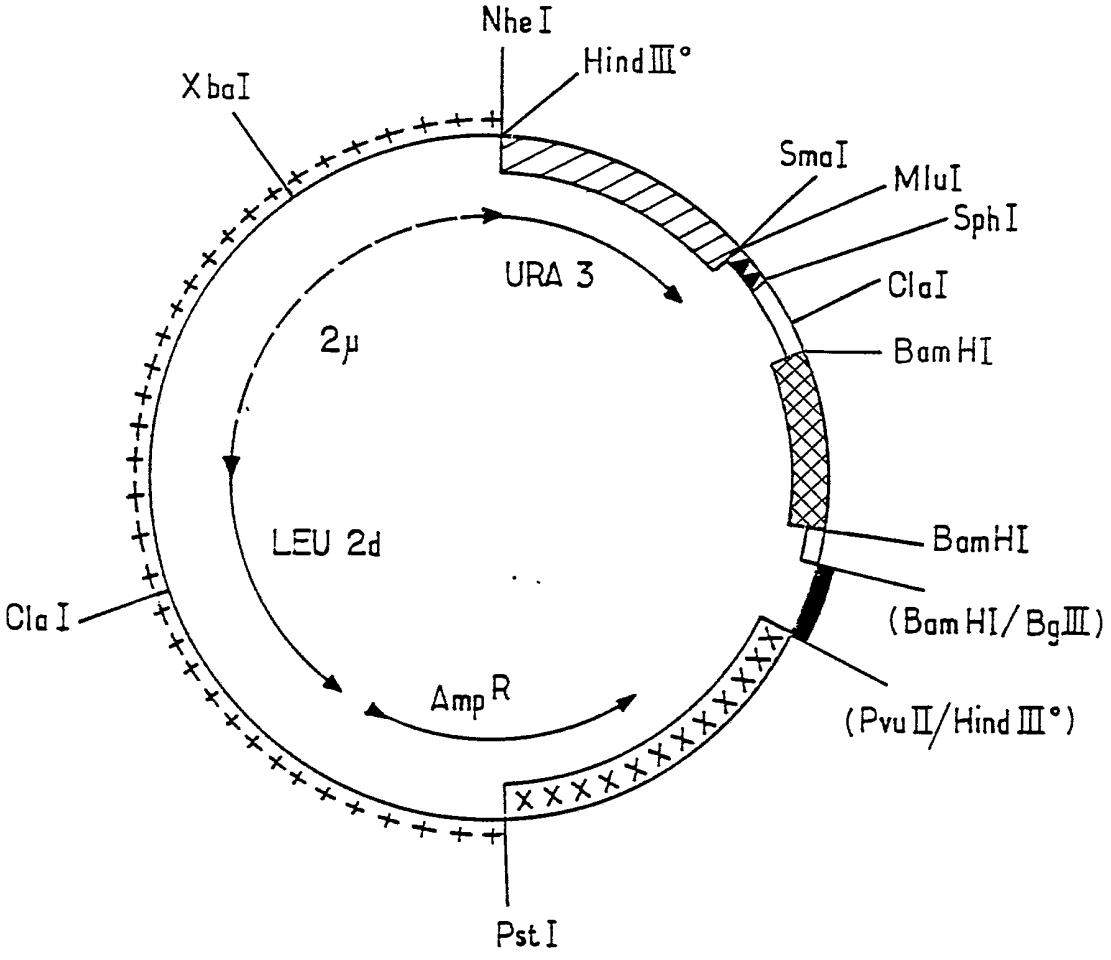


FIG. 9

Plasmide pEMR 461

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2656531

N° d'enregistrement national

INSTITUT NATIONAL de la PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

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

FR 8917467
FA 437073

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	J. MOL. BIOL. vol. 186, 1985, pages 821-824, London, GB; Y.LORCH et al.: "A Region Flanking the GAL7 Gene and a Binding Site for GAL4 Protein as Upstream Activating Sequences in Yeast" * document en entier *	1,5,8-10
Y	EP-A-0 164 556 (CHIRON CORPORATION) * abrégé; page 3, ligne 21 - page 10, ligne 30; revendications 1,3,7,9,10,12,14 *	1,5,8-10
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13, no. 238 (C-603)(3586), 5 juin 1989; & JP - A - 01 51089 (YAMASA SHOYU CO LTD) 27.02.1989	1,5
D,Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 6, no. 1, janvier 1986, pages 246-256, Washington, DC, US; M. TAJIMA et al.: "Duplicate Upstream Activating Sequences in the Promoter Region of the Saccharomyces cerevisiae GAL7 Gene" * abrégé; page 247, colonne 2; page 252, colonne 2 - page 253; figures 2,3,7 *	1,5,8-10
Y	EP-A-0 284 044 (ZYMOGENETICS INC.) * document en entier *	1,5,8-10
A	EP-A-0 174 585 (MILES LABORATORIES, INC.) * document en entier; en particulier page 5, lignes 3-19, page 13, ligne 19 - page 14, ligne 12 *	1,2
	-/-	

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)

C 12 N 15/81
C 12 N 15/53
C 12 N 15/62
C 12 N 9/06

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
31-08-1990	JULIA P.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

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

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

N° d'enregistrement national
FR 8917467
FA 437073

RAPPORT DE RECHERCHE

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

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 258, no. 4, 25 février 1983, pages 2674-2682, Baltimore, US; D.W. RUSSELL et al.: "Nucleotide Sequence of the Yeast Alcohol Dehydrogenase II Gene" * document en entier *	1,3
A	US-A-3 810 820 (P. LABOUREUR et al.) * document en entier *	7

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
31-08-1990	JULIA P.

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

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

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)