

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :

3 055 337

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

16 57906

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 N 1/06** (2017.01), C 12 N 9/00, C 12 P 21/00,
G 01 N 1/28, 24/08

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 24.08.16.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 02.03.18 Bulletin 18/09.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES Etablis-
sment public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : GANS PIERRE, AWAD RIDA, BOIS-
BOUVIER JEROME, HAMELIN OLIVIER et KERFAH
RIME.

⑦3 Titulaire(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES Etablis-
sment public.

⑦4 Mandataire(s) : GEVERS & ORES Société anonyme.

⑤4 METHODE DE PREPARATION DE MILIEUX DE CULTURE RICHES POUR LE MARQUAGE D'ACIDES AMINES
INCORPORES DANS DES PROTEINES.

⑤7 La présente invention concerne une méthode de pré-
paration d'un hydrolysate de microorganisme dont au moins
un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est mar-
qué, comprenant une étape de d'obtention d'un hydrolysate
de microorganisme en solution dans lequel tous les acides
aminés se trouvent sous la forme libre, et une étape de rem-
placement dans cet hydrolysate d'au moins un acide aminé et
son cétoacide s'il est présent par le même acide aminé mais
sous une forme marquée ou par son précurseur marqué. La
présente invention concerne également des mélange d'en-
zymes pour mettre en oeuvre cette méthode.

FR 3 055 337 - A1



Méthode de préparation de milieux de culture riches pour le marquage d'acides aminés incorporés dans des protéines

La présente invention concerne la préparation de milieux de culture riche et leur utilisation pour le marquage des protéines produites *in vitro* par une cellule procaryote ou eucaryote, ou dans un système acellulaire, notamment le marquage spécifique des groupements méthyles des acides aminés à chaîne ramifiée de ces protéines.

L'étude des protéines de taille supérieure à plusieurs kilodaltons par résonance magnétique nucléaire (RMN) nécessite le remplacement des atomes de carbone-12, hydrogène, azote-14 par des isotopes qui ne sont pas naturellement abondants, tels que les isotopes carbone-13 (^{13}C), hydrogène-2 (^2H ou D) et azote-15 (^{15}N).

Le marquage isotopique spécifique des atomes de carbone et d'hydrogène des groupements méthyles des acides aminés à chaîne ramifiée dans le contexte de la production *in vitro* de protéines entièrement deutérées est réalisé principalement selon deux méthodes. Selon une première méthode, un milieu de culture minimum (milieu minimum), qui ne comprend que du glucose deutéré comme source carboné et du sulfate (ou chlorure) d'ammonium comme source d'azote dans du D_2O , est utilisé. A ce milieu perdeutééré est additionné soit l'acide aminé marqué sur au moins un groupement méthyle soit un précurseur métabolique de cet acide aminé également marqué sur au moins un groupement méthyle. Selon une deuxième méthode, à ce milieu de culture est ajouté un mélange d'acides aminés deutérés issu de l'hydrolyse d'organismes unicellulaires tels que microalgues, bactéries ou levures et auquel sont additionnés les acides aminés souhaités marqués sur au moins un groupement méthyle.

L'inconvénient majeur des méthodes de marquage en milieu de culture minimum est que certaines protéines, en particulier celles d'origine eucaryote, ne sont que très faiblement exprimées voire ne sont pas exprimées du tout par les cellules bactériennes. Ces faibles niveaux de production empêchent alors l'étude de ces protéines. L'utilisation de milieux de culture riches - obtenus à partir d'un hydrolysate de microorganisme - avec addition d'acides aminés marqués présente l'inconvénient majeur que pour obtenir un enrichissement en acides aminés marqués à plus de 90 % de la protéine produite, compatible avec certaines expériences de RMN, telles que les expériences NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), il faut que l'acide aminé non marqué présent dans le milieu soit dilué au moins d'un facteur 10 par l'ajout de précurseur ou d'acide aminé marqués. Dans ce cas, par exemple, l'utilisation d'un gramme d'hydrolysate d'algues

ou de levures nécessitera au moins de l'ordre de 200 milligrammes d'isoleucine (Ile) marqué pour un marquage isotopique de l'isoleucine, de l'ordre de 500 mg de valine (Val) marqué pour un marquage isotopique de la valine et pour la leucine (Leu) de l'ordre de 600 mg pour un marquage isotopique de la leucine. Dans le cas de la valine, la leucine et de l'isoleucine, des acides aminés marqués stéréo- ou régio-sélectivement comme leurs cétoacides associés sont très coûteux. Pour l'alanine par exemple, l'utilisation d'1 gramme d'hydrolysats, en tant que supplémentation pour un milieu de culture riche, nécessitera de l'ordre du gramme d'alanine (Ala) marqué pour un marquage isotopique de l'alanine à plus de 90 % de marquage, ce qui est également coûteux. Le coût des acides aminés marqués nécessaires rend donc cette méthode extrêmement onéreuse. De plus, l'utilisation de précurseurs d'acide aminé marqués, du type acétolactate ou 2-cétobutyrate, utilisé dans des milieux minimum, ne permet pas, dans des milieux supplémentés avec des hydrolysats issus de microorganismes, d'obtenir des marquages à plus de 50 % quelle que soit la quantité de précurseurs utilisée. Enfin, constituer un mélange d'acides aminés deutérés en y rajoutant soit l'acide aminé marqué soit le précurseur marqué diminuerait le coût en l'acide aminé marqué mais cela serait compensé par celui des acides aminés deutérés. En outre, la plupart des autres acides aminés (que valine, leucine et isoleucine) ne sont pas ou entièrement deutérés ou disponibles.

Dans le cadre de leurs travaux, les Inventeurs se sont donnés pour objectif de diminuer le coût de préparation des milieux de culture deutérés supplémentés avec des hydrolysats de microorganisme (*e.g.*, microalgues, bactéries ou levures) pour permettre le marquage spécifique de groupements méthyle dans le contexte de production *in vitro* de protéines entièrement deutérées, tout en augmentant le rendement de production (d'expression) des protéines perdeutérées et marquées stéréo-spécifiquement ou régio-sélectivement $^{13}\text{C},\text{H}$ sur les méthyles des acides aminés à chaîne ramifiée et l'alanine.

Les Inventeurs ont utilisé comme source d'acides aminés pour les milieux de culture riche, un hydrolysats perdeutééré issu de la culture de microalgues en milieu deutéré. Ils ont ensuite éliminé de cet hydrolysats les acides aminés leucine, valine, isoleucine d'une part ou alanine d'autre part, pour les remplacer par les acides aminés Leu, Val, Ile, Ala spécifiquement marqués ou par leurs précurseurs. Pour cela, plusieurs étapes ont été effectuées :

- conversion totale de l'hydrolysats en acides aminés libres,

- dégradation des acides aminés méthylés Leu, Val, Ile d'une part ou Ala d'autre part présents dans cet hydrolysate ou de leur combinaison en leurs cétoacides associés par l'utilisation d'enzymes spécifiques,

5 - élimination de ces cétoacides par conjugaison enzymatique, décarboxylation enzymatique ou spontanée ou par réduction chimique en hydroxyacides,

- complémentation du milieu constitué avec cet hydrolysate en l'acide aminé désiré (ou le précurseur) convenablement marqué, à un taux d'enrichissement supérieur à 50 % ou en une combinaison de ces acides aminés marqués (ou des précurseurs).

10 Le milieu marqué ainsi préparé permet d'une part, de produire en culture cellulaire (*e.g.*, culture bactérienne) des protéines marquées de façon stéréo- ou régio-spécifique sur les groupements méthyle des chaînes ramifiées des acides aminés Leu, Val, Ile et Ala dont l'expression dans la fraction soluble est très faible sinon nulle en milieu minimum, et d'autre part, d'obtenir en général de meilleurs rendements d'expression et donc à production égale de baisser le coût de la préparation comme de supprimer les phases d'adaptation des bactéries en milieu
15 minimum deutéré et donc de raccourcir le temps nécessaire à la production des protéines.

La présente invention a par conséquent pour objet une méthode de préparation d'un hydrolysate de microorganisme dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué, comprenant les étapes suivantes :

20 a) obtenir un hydrolysate de microorganisme en solution dans lequel tous les acides aminés se trouvent sous la forme libre,

b) remplacer dans l'hydrolysate obtenu à l'étape a) au moins un acide aminé sous la forme L et son cétoacide s'il est présent par le même acide aminé mais sous une forme marquée ou par son précurseur marqué.

25 Selon un mode de mise en œuvre avantageux de la méthode de préparation d'un hydrolysate de microorganisme, l'étape b) peut être mise en œuvre selon les étapes suivantes :

b1) appauvrir l'hydrolysate obtenu à l'étape a) en au moins un acide aminé sous la forme L et son cétoacide s'il est présent, par élimination de l'hydrolysate dudit acide aminé et de son cétoacide, et

30 b2) ajouter à l'hydrolysate appauvri obtenu à l'étape b1) ledit acide aminé éliminé mais sous une forme marquée et/ou son précurseur marqué.

La présente invention a aussi objet une méthode de préparation d'un milieu de culture riche, de préférence un milieu de culture riche pour la culture bactérienne, dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué, comprenant les étapes suivantes :

- 5 i) préparer un hydrolysate de microorganisme dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué selon l'une des deux méthodes de l'invention décrites ci-dessus, et
- j) constituer un milieu de culture riche comprenant l'hydrolysate appauvri obtenu à l'étape i) et un milieu de culture minimum.

La présente invention a aussi objet une méthode de préparation d'un milieu de culture riche dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué, comprenant les étapes suivantes :

- a) obtenir un hydrolysate de microorganisme en solution dans lequel tous les acides aminés se trouvent sous la forme libre,
- 15 b1) appauvrir l'hydrolysate obtenu à l'étape a) en au moins un acide aminé sous la forme L et son cétoacide s'il est présent, par élimination de l'hydrolysate dudit acide aminé et de son cétoacide,
- c) constituer un milieu de culture comprenant l'hydrolysate appauvri obtenu à l'étape b1) et un milieu de culture minimum, mais ne contenant pas ledit acide aminé et son cétoacide éliminés,
- 20 d) ajouter au milieu de culture obtenu à l'étape c) ledit acide aminé éliminé mais sous une forme marquée et/ou son précurseur marqué de manière à obtenir ledit milieu de culture riche.

On entend par « milieu de culture riche » ou « milieu riche » au sens de la présente invention, un milieu liquide ou solide qui contient tous les éléments nécessaires à la croissance d'une cellule, notamment à la croissance de la plupart des bactéries. Le milieu de culture riche contient une source de carbone qui est généralement du glucose ou de l'acétate ou du glycérol, une source d'azote généralement sous forme minérale, de l'eau, des sels minéraux nécessaires pour la croissance de la cellule (e.g. la croissance bactérienne) et une source d'acides aminés. Le milieu de culture riche permet la culture de cellules procaryote ou eucaryote, telles que les cellules de bactérie, levure, champignon, cellules d'insecte ou de mammifères. La source d'acides aminés du milieu de culture riche peut être un hydrolysate de levure, d'algues ou de bactéries, de

préférence un hydrolysate d'algues. Par extension, on entend également par « milieu de culture riche » ou « milieu riche » au sens de la présente invention, un milieu liquide ou solide qui contient tous les éléments nécessaires à la production *in vitro* d'une protéine recombinante dans un système acellulaire.

5 On entend par « milieu de culture minimum » ou « milieu minimum » au sens de la présente invention, un milieu liquide ou solide qui contient uniquement les éléments essentiels à la croissance d'une cellule, *c.à.d.* une source de carbone qui est généralement du glucose (ou de l'acétate ou du glycérol), une source d'azote généralement sous forme minérale, de l'eau et des sels minéraux nécessaires pour la croissance de la cellule (*e.g.* la croissance bactérienne).
10 Avantageusement, le milieu minimum est le milieu M9 (Sambrook *et al.*, 1989) ou un milieu similaire, tel que ceux connus de l'homme de l'art ([#Notion de milieu minimum](https://wikipédia.org/wiki/milieu_de_culture)).

On entend par un « hydrolysate de microorganisme en solution » un hydrolysate obtenu par hydrolyse des protéines d'une culture de microorganisme. Le microorganisme peut être une
15 levure, une algue, ou une bactérie, de préférence une algue.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de la méthode, l'hydrolysate de microorganisme en solution obtenu à l'étape a) est perdeutééré et/ou enrichi en carbone-13 (¹³C) et/ou en azote-15 (¹⁵N), c'est-à-dire qu'au moins 90%, et par ordre de préférence croissant au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% et 99%, et de préférence encore 100% des
20 atomes d'hydrogène (H) dudit hydrolysate sont remplacés par des atomes de deutérium (D) et/ou au moins 90%, et par ordre de préférence croissant au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% et 99%, et de préférence encore 100% des atomes de carbone dudit hydrolysate sont des atomes ¹³C et/ou au moins 90%, et par ordre de préférence croissant au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% et 99%, et de préférence encore 100% des atomes d'azote sont des
25 atomes ¹⁵N respectivement.

L'obtention d'hydrolysates de microorganisme perdeutéérés et/ou enrichis en carbone-13 et/ou en azote-15 est bien connue de l'homme du métier. Ces hydrolysates de microorganisme sont généralement obtenus par culture d'un microorganisme sur un milieu deutéré et/ou enrichi en carbone-13 et/ou en azote-15, et hydrolyse des microorganismes ainsi produits. Des
30 hydrolysates pour les milieux riches perdeutéérés sont disponibles commercialement, tels que les

hydrolysats Celtone® (Cambridge Isotop Laboratories), Isogro® (Sigma-Aldrich) et OD® media (Silantes).

Lorsqu'un hydrolysate perdeutééré et/ou enrichi en carbone-13 et/ou en azote-15 est utilisé à l'étape a) alors l'acide aminé est remplacé à l'étape b) ou d) par un acide aminé ou son précurseur qui est marqué différemment que par un deutérium, carbone-13 et/ou en azote-15 respectivement.

En d'autres termes, lorsque l'hydrolysate utilisé à l'étape a) est perdeutééré (et donc les acides aminés ou leurs précurseurs contenus dans cet hydrolysate sont perdeutéérés) l'acide aminé ajouté à l'étape b) est marqué différemment de l'acide aminé présent à l'étape a) et enlevé (remplacé).

Un hydrolysate dans lequel tous les acides aminés se trouvent sous la forme libre, est un hydrolysate dans lequel au moins 90%, et par ordre de préférence croissant au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% et 99%, et de préférence encore 100% des acides aminés se trouvent sous la forme libre.

Les hydrolysats de microorganisme disponibles commercialement sont généralement issus d'une hydrolyse incomplète des protéines et peptides de microorganismes et peuvent comprendre, outre des acides aminés sous la forme libre, des oligopeptides. Ces oligopeptides peuvent présenter l'inconvénient qu'ils pourraient être pris en charge par les machineries de dégradation cellulaire, conduisant à la libération d'acides aminés à l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme pourrait alors conduire à la dilution du marquage des acides aminés lors de la synthèse *in vitro* des acides aminés.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de la méthode, l'hydrolysate de microorganismes en solution est traité par un mélange de protéases préalablement à l'étape b), de manière à hydrolyser complètement les protéines et peptides dudit milieu (c'est-à-dire au moins 90% des acides aminés se trouvant sous la forme libre après hydrolyse) tout en évitant la racémisation des acides aminés. Le mélange de protéases comprend avantageusement une protéase neutre, une chymotrypsine, une trypsine, une carboxypeptidase, une aminopeptidase, ainsi que des phosphatases neutres et alcalines. Un exemple d'un tel mélange de protéases est la Pronase® (Sigma-Aldrich), qui est issue des fluides extracellulaires de *Streptomyces griseus*, disponible commercialement. L'utilisation du mélange Pronase® pour hydrolyser complètement les protéines et peptides d'un milieu est décrite par D'Aniello *et al.*, 1993.

Le mélange de protéases (*e.g.*, la Pronase®) est ensuite inactivée et/ou éliminée de l'hydrolysats traité. L'inactivation du mélange de protéases présent dans l'hydrolysats traité et son élimination de l'hydrolysats traité peuvent être effectuées par toute méthode connues de l'homme du métier. L'hydrolysats traité peut subir un choc thermique de manière à inactiver le mélange de protéases, par exemple, pendant une demi-heure à une température de 85°C puis centrifugation. L'élimination du mélange de protéases peut être aussi effectuée par centrifugation sur une membrane d'ultrafiltration.

Un cétoacide est un composé organique portant à la fois une fonction carboxylique et une fonction cétone. On entend par un « cétoacide d'un acide aminé », le 2-cétoacide qui est associé à un acide aminé, où la fonction cétone est portée par le carbone voisin de celui portant la fonction carboxylique. A titre d'exemple, le cétoacide de la L-leucine est le 4-méthyl-2-oxopentanoate ou cétoisocaproate (KIC), le cétoacide de la L-valine est le 3-méthyl-2-oxobutanoate ou cétoisovalérate (KIV), le cétoacide de la L-isoleucine est le 3-méthyl-2-oxopentanoate (MOP), le cétoacide du L-glutamate est l'oxoglutarate, le cétoacide de la L-alanine est le pyruvate.

On entend par un « précurseur d'un acide aminé », un précurseur métabolique d'un acide aminé. Un précurseur d'un acide aminé est un composé organique apparaissant préalablement à l'acide aminé dans sa chaîne de biosynthèse et converti en cet acide aminé par une succession de réactions enzymatiques. Par exemple, le pyruvate est le précurseur pour l'alanine, qui est converti en l'alanine en une seule réaction enzymatique. L'acétolactate, le dihydroisovalérate ou le cétoisovalérate (3-méthyl-2-oxobutanoate) sont des précurseurs pour la valine et la leucine.

On entend par « appauvrir un hydrolysats en au moins un acide aminé et son cétoacide », un hydrolysats dans lequel au moins 90%, et par ordre de préférence croissant au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% et 99%, et de préférence encore 100% d'un acide aminé et de son cétoacide ont été éliminés.

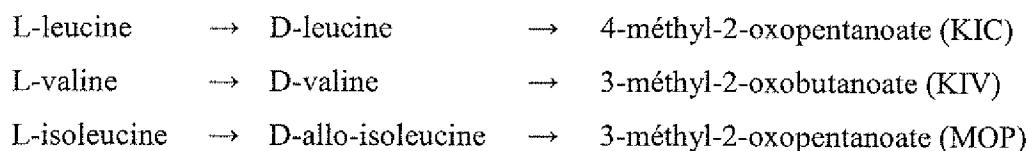
L'appauvrissement d'un hydrolysats en au moins un acide aminé et éventuellement de son cétoacide selon l'étape b1) de la méthode selon la présente invention peut être effectué par différentes méthodes bien connues de l'homme du métier, telles que par chromatographie liquide puis reconstitution de l'hydrolysats appauvri en excluant un ou plusieurs acides aminés.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la méthode, l'hydrolysats obtenu à l'étape a) est appauvri en L-leucine, L-valine, L-isoleucine et leurs cétoacides respectifs s'ils sont présents

(i.e., 4-méthyl-2-oxopentanoate, 3-méthyl-2-oxobutanoate et 3-méthyl-2-oxopentanoate respectivement).

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de ce mode de mise en œuvre préféré, l'hydrolysats obtenu à l'étape a) est traité par un mélange de trois enzymes constitué d'une
 5 isoleucine 2-épimérase (EC 5.1.1.21), une D-aminoacide oxydase (EC 1.4.3.3) et une catalase (EC 1.11.1.6). Avantageusement, l'isoleucine 2-épimérase, la D-aminoacide oxydase et la catalase sont ajoutées au milieu de culture simultanément. Ces trois enzymes sont ensuite éliminées de l'hydrolysats traité, éventuellement en ayant été inactivées préalablement à leur élimination.

10 L'isoleucine 2-épimérase catalyse réversiblement la conversion de la L-isoleucine - forme (2S,3S) - en D-allo-isoleucine - forme (2R,3S) -, l'isoleucine présentant 2 carbones asymétriques en positions 2 et 3. Cette enzyme convertit également réversiblement les formes L de la leucine, la valine, la méthionine, la phénylalanine en formes D. La D-amino oxydase transforme les acides aminés de la forme D en leurs cétoacides avec production d'eau oxygénée. La catalase
 15 dismute l'eau oxygénée en oxygène moléculaire et en eau. Les réactions enzymatiques sont présentées ci-dessous :



Les D-aminoacide oxydases (EC 1.4.3.3) et catalases (EC 1.11.1.6) sont bien connues de l'homme du métier. Elles peuvent être d'origine procaryote - par exemple bactérienne - ou eucaryote, de préférence eucaryote. La D-AAO et la catalase sont disponibles commercialement.
 20 L'isoleucine 2-épimérase (EC 5.1.1.21) appartient à la famille des racémases dont le mode d'action est bien connu de l'homme du métier (Mutaguchi *et al.*, 2013). Les réactions enzymatiques de ces enzymes sont également bien connues de l'homme du métier et dépendent de cofacteurs et d'effecteurs également bien connues de l'homme du métier : pyridoxal 5'-phosphate (PLP), flavine adénine dinucléotide (FAD), pH généralement 7,5, tampon (e.g.,
 25 tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane ; Tris), température généralement 37°C.

L'isoleucine 2-épimérase peut être choisie parmi celles qui ont été identifiées chez les Lactobacillus, les Leuconostoc, les Oenococcus, les Weissella, les enterocoques et les streptocoques. Selon un mode de mise en œuvre préféré, l'isoleucine 2-épimérase est celle de

Lactobacillus buchneri JCM 1115, décrite par Mutaguchi *et al.* 2013, et dont la séquence d'acides aminés est disponible dans la base de données UniProt sous le numéro d'accèsion M1GRN3.

5 La D-amino oxydase peut être choisie parmi les différentes protéines possédant une activité D-amino acide oxydase et issues d'organismes procaryotes ou eucaryotes (Pollegioni, L. *et al.* « Physiological functions of D-amino oxidases : from yeast to humans » Cell. Mol. Life Sci (2007) 64: 1373). Selon un mode de mise en œuvre préféré, la D-amino oxydase est celle issue du rein de porc dont la séquence d'acides aminés est disponible dans la base de données UniProt sous le numéro d'accèsion P00371, et qui est également disponible commercialement.

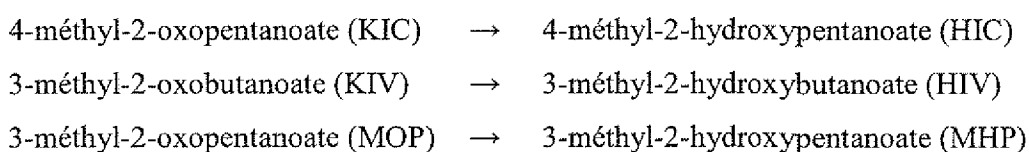
10 La catalase peut être choisie parmi les trois familles de protéines possédant une activité catalase et issues d'organismes procaryotes (bactéries et archées) ou eucaryotes (Archives of Biochemistry and Biophysics. Volume 525, Issue 2, Pages 93-222 (2012). Catalasas and Hydrogen Peroxide Metabolism. (Special Issue). Edited by Christian Obinger). La première famille est mono-fonctionnelle, dont le cofacteur est un hème et qui se trouve chez les eucaryotes
15 (voir la base de données InterPro, numéro d'accèsion IPR018028). La seconde a comme cofacteur un hème et présente des activités peroxydase/catalases (voir la base de données InterPro, numéro d'accèsion IPR000763). Ces enzymes sont proches des peroxydases de plantes. La troisième contient du manganèse non-hémique et est trouvée chez les bactéries (voir la base de données InterPro, numéro d'accèsion IPR007760). Selon un mode de mise en œuvre
20 préféré, la catalase est une catalase de la famille IPR018028. Selon un mode de mise en œuvre plus particulièrement préféré, la catalase est celle issue du foie de bœuf dont la séquence d'acides aminés est disponible dans la base de données UniProt sous le numéro d'accèsion P00432, et qui est également disponible commercialement.

25 L'inactivation d'enzymes présentes dans l'hydrolysate et leur élimination de cet hydrolysate peuvent être effectuées par toute méthode connue de l'homme du métier. L'hydrolysate peut subir un choc thermique de manière à inactiver les enzymes, par exemple, pendant une demi-heure à une température de 85°C. L'élimination des enzymes peut être effectuée par centrifugation sur membrane d'ultrafiltration.

30 Les cétoacides présents dans l'hydrolysate obtenu à l'étape a) et/ou produits lors du traitement enzymatique de l'hydrolysate peuvent être éliminés selon plusieurs méthodes bien

connues de l'homme du métier, telles que par dérivatisation chimique (Pailla et al., 2000), réduction chimique (Saegusa et al., 1977) ou décarboxylation enzymatique (Smit *et al.*, 2005).

De préférence, les cétoacides sont éliminés de l'hydrolysats par réduction chimique des cétoacides en hydroxyacides par du borohydrure de sodium. Ce réactif est couramment utilisé pour ce type de réaction de réduction, et présente l'avantage qu'il est peu coûteux et qu'en outre la quantité nécessaire à la réduction des cétoacides présents n'est pas suffisamment importante pour diluer le marquage deutérium de façon significative. Les réductions chimiques sont présentées ci-dessous :



Selon un autre mode de mise en œuvre préféré de la méthode, l'hydrolysats obtenu à l'étape a) est appauvri en L-alanine et son cétoacide s'il est présent.

Une méthode pour éliminer l'alanine d'un milieu liquide est décrite dans la Demande de Brevet CN 101824443.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de ce mode de mise en œuvre préféré, l'hydrolysats obtenu à l'étape a) est traité par un mélange de quatre enzymes constitué d'une alanine racémase (EC 5.1.1.1), une D-amino acide oxydase (D-AAO ; EC 1.4.3.3), une catalase (EC 1.11.1.6) et une acétohydroxyacide synthase (EC 2.2.1.6). L'alanine racémase, la D-amino acide oxydase et la catalase sont ajoutées simultanément. L'acétohydroxyacide synthase peut être ajoutée simultanément ou postérieurement aux 3 autres enzymes.

L'alanine racémase (EC 5.1.1.1) convertit la L-alanine en D-alanine. La D-alanine est ensuite désaminée et transformée en pyruvate par une D-amino acide oxydase (EC 1.4.3.3). Le pyruvate formé est ensuite condensé en acétolactate par l'acétohydroxyacide synthase (ou acétolactate synthase ; AHAS II) (EC 2.2.1.6). Enfin, l'acétolactate formé est éliminé, par exemple par chauffage - entre 35°C et 55°C, de préférence à 40°C - en se transformant en acétoïne (3-hydroxybutanone) ou en diacétyl (butane-2,3-dione). Les réactions catalysées par la D-AAO produisant du peroxyde d'hydrogène, une catalase (EC 1.11.1.6) est ajoutée au milieu pour l'éliminer.

Les enzymes ajoutées sont ensuite éliminées du milieu de culture traité, éventuellement en ayant été inactivées préalablement à leur élimination, tel que décrit ci-dessus.

Les alanine racémases (EC 5.1.1.1), D-amino acide oxydases (EC 1.4.3.3), catalases (EC 1.11.1.6) et acétohydroxyacide synthases (EC 2.2.1.6) sont bien connues de l'homme du métier. Elles peuvent être d'origine procaryote - par exemple bactérienne - ou eucaryote, de préférence procaryote pour l'alanine racémase et l'acétohydroxyacide synthase, de préférence eucaryote pour la D-amino acide oxydase et la catalase. La D-amino acid oxydase et la catalase sont disponibles commercialement. Les réactions enzymatiques de ces enzymes sont également bien connues de l'homme du métier et dépendent de cofacteurs et d'effecteurs également bien connues de l'homme du métier : pyridoxal phosphate, thiamine pyrophosphate, flavine adénine dinucléotide, pH généralement 7,5, tampon (*e.g.*, tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane ; Tris), température généralement 37°C.

L'alanine racémase peut être choisie parmi la famille des alanines racémases disponibles dans la base de données InterPro sous le numéro d'accèsion IPR00082. Selon un mode de mise en œuvre préféré, l'alanine racémase est celle de *Geobacillus stearothermophilus* (Shaw *et al.*, 1997), dont la séquence d'acides aminés est disponible dans la base de données UniProt sous le numéro d'accès P10724.

La D-amino acide oxydase peut être choisie parmi la famille des D-amino acide oxydases disponibles dans la base de données InterPro sous le numéro d'accèsion IPR023209. Selon un mode de mise en œuvre préféré, la D-amino acide oxydase provient du rein de porc, dont la séquence d'acides aminés est disponible dans la base de données UniProt sous le numéro d'accès P0037, qui est disponible commercialement.

L'acétohydroxyacide synthase peut être choisie parmi la famille des acétohydroxyacide synthases disponibles dans la base de données InterPro sous le numéro d'accèsion IPR012846. Selon un mode de mise en œuvre préféré, l'acétohydroxyacide synthase est l'acétohydroxyacide synthase de type II d'*Escherichia coli* (Barack *et al.*, 1987), dont la séquence d'acides aminés est disponible dans la base de données UniProt sous le numéro d'accès P00892.

La catalase est décrite ci-dessus.

Aux étapes b), b2) et d) de la méthode selon la présente invention, l'acide aminé (sous forme L) et éventuellement son cétoacide éliminés sont remplacés par le même acide aminé mais sous une forme marquée ou par son précurseur marqué.

On entend par « acide aminé sous une forme marquée » (ou acide aminé marqué) ou par « précurseur marqué » au sens de la présente invention, un acide aminé ou un précurseur d'un

acide aminé qui est enrichi en un isotope du carbone, hydrogène et/ou azote, tel que par exemple les isotopes carbone-13 (^{13}C), hydrogène-2 (^2H) et azote-15 (^{15}N).

Les acides aminés marqués et leurs précurseurs marqués sont bien connus de l'homme du métier (Gardner et Kay, 1998 ; Ruschak et Kay, 2010 ; Kerfah *et al.*, 2015). Ils sont disponibles
5 commercialement. Des procédés pour marquer les groupements méthyle des valine, leucine et isoleucine sont décrits dans la Demande Internationale WO 2011/083356. Des procédés pour marquer des dérivés cétoacides alpha-hydroxy sont décrits dans la Demande Internationale WO 2014/024151.

Selon un mode de mise en œuvre particulier, les acides aminés et précurseurs comprenant
10 un groupement méthyle sont marqués $^{13}\text{C},\text{H}$ sur un groupement méthyle soit ($^{13}\text{CH}_3$, $^{13}\text{CH}_2\text{D}$, $^{13}\text{CHD}_2$ et $^{13}\text{CD}_3$).

Lorsque plusieurs acides aminés et éventuellement leurs cétoacides ont été éliminés de l'hydrolysate, un ou plusieurs acides aminés marqués correspondant aux acides aminés éliminés et/ou leurs précurseurs marqués peuvent être ajoutés à l'hydrolysate ou au milieu de culture
15 constitué. Les acides aminés éliminés de l'hydrolysate qui ne sont pas remplacés par le même acide aminé mais sous une forme marquée ou par son précurseur marqué, sont remplacés par le même acide aminé non marqué et/ou son précurseur non marqué. Par exemple, lorsque la L-leucine, la L-valine et la L-isoleucine et leurs cétoacides respectifs sont éliminés de l'hydrolysate, alors ces trois acides aminés sous une forme marquée et/ou leurs précurseurs marqués peuvent
20 être ajoutés à l'hydrolysate ou au milieu de culture constitué, ou bien seule l'isoleucine marquée et/ou son précurseur marqué sont ajoutés et la L-leucine et la L-valine non marqués sont également ajoutées, ou bien la L-isoleucine non marquée est ajoutée et la L-leucine et la L-valine marquées et/ou leurs précurseurs marqués sont également ajoutés.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, lorsque l'hydrolysate obtenu à l'étape
25 a) est appauvri en L-isoleucine et son cétoacide, le milieu appauvri obtenu à l'étape b1) ou le milieu de culture obtenu à l'étape c), de préférence le milieu de culture obtenu à l'étape c), est additionné d'un précurseur de l'isoleucine choisi parmi le 2-oxobutanoate (pour le marquage des méthyles delta-1), le 2-hydroxy-2-éthyl-3-oxobutanoate (pour le marquage des méthyles gamma-2 ou pour le marquage des méthyles delta-1), le 2,3-dihydroxy-3-méthylpentanoate (pour le
30 marquage des méthyles gamma-2 ou pour le marquage des méthyles delta-1) et/ou le 3-méthyl-2-oxopentanoate (pour le marquage des méthyles gamma-2 ou pour le marquage des méthyles

delta-1). Le milieu de culture obtenu à l'étape c) peut aussi être additionné d'isoleucine marquée. Il peut également être additionné de L-isoleucine marquée pour le marquage des méthyles delta-1 ou gamma-2.

5 Selon un autre mode de réalisation particulier, lorsque l'hydrolysate obtenu à l'étape a) est appauvri en L-leucine et L-valine, le milieu appauvri à l'étape b1) ou le milieu de culture obtenu à l'étape c), de préférence le milieu de culture obtenu à l'étape c), est additionné d'un précurseur de la leucine et de la valine, choisi parmi le 2-hydroxy-2-méthyl-3-oxobutanoate (pour le marquage stéréospécifique des méthyles proR, proS), le 3-hydroxy-3-méthyl-2-oxobutanoate, le 2,3-dihydroxy-3-méthylbutanoate et/ou le 3-méthyl-2-oxobutanoate (cétisovalérate) (pour un
10 marquage astéréospécifique des méthyles), en présence ou non de L-leucine deutérée si le marquage des méthyles des valines est uniquement souhaité. Ce milieu peut être additionné de 4-méthyl-2-oxopentanoate (cétisocaproate) pour le marquage uniquement des leucines. Ce milieu peut aussi être additionné de valine ou de leucine marquées. Il peut également être additionné de L-Valine et/ou L-Leucine marquée(s) pour le marquage des méthyles proS ou proR.

15 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, lorsque l'hydrolysate obtenu à l'étape a) est appauvri en L-alanine et son cétoacide, le milieu appauvri obtenu à l'étape b1) ou le milieu de culture obtenu à l'étape c), de préférence le milieu de culture obtenu à l'étape c), est additionné L-alanine marquée par le carbone-13 sur le groupement méthyle.

20 La quantité optimale d'acide aminé ou de précurseur marqués nécessaire pour obtenir une incorporation à plus de 90 % dans une protéine exprimée *in vitro* par une cellule peut être déterminée par une série de cultures dans lesquelles des quantités croissantes de cet acide aminé ou précurseur marqué sont ajoutées une heure avant induction pour des concentrations finales de 0, 100, 300, 400, 600, et 800 mg/L. Le niveau d'incorporation peut être estimée dans la protéine purifiée par des expériences 2D ¹³C-HSQC.

25 A l'étape j) de la méthode selon l'invention, le milieu de culture riche peut être sous la forme liquide ou lyophilisée. L'hydrolysate appauvri obtenu à l'étape i) sous une forme lyophilisée peut être ajouté à un milieu minimum sous la forme liquide ou lyophilisée. L'hydrolysate appauvri obtenu à l'étape i) sous une forme liquide peut aussi être ajouté à un milieu minimum sous une forme liquide ou lyophilisée.

30 La présente invention concerne également un hydrolysate de microorganisme ou un milieu de culture riche comprenant un hydrolysate de microorganisme, dans lequel au moins un acide

aminé et son cétoacide s'il est présent sont remplacés à au moins 90%, et par ordre de préférence croissant au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% et 99%, et de préférence encore 100%, par le même acide aminé ou son précurseur mais sous une forme marquée, tels que défini ci-dessus. Ledit hydrolysats ou milieu est susceptible d'être obtenu par les méthodes de
5 préparation d'un hydrolysats de microorganisme ou d'un milieu de culture riche dont au moins un acide aminé et/ou son précurseur est marqué telles que décrites ci-dessus.

L'hydrolysats ou milieu riche selon la présente invention peut être conservé congelé ou lyophilisé (sous la forme de poudre).

La présente invention concerne également une méthode de marquage d'une protéine par
10 culture d'une cellule procaryote ou eucaryote, comprenant la culture de ladite cellule sur un milieu de culture riche susceptible d'être obtenu selon la présente invention dans lequel au moins un acide aminé et son cétoacide s'il est présent sont remplacés à au moins 90%, et par ordre de préférence croissant au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% et 99%, et de préférence encore 100%, par le même acide aminé mais sous une forme marquée ou par son
15 précurseur marqué, tel que défini ci-dessus.

La cellule où se fait la production de la protéine peut être choisie parmi une cellule procaryote, de préférence une cellule bactérienne, telle qu'une cellule d'*Escherichia coli*. La cellule eucaryote peut être choisie parmi une cellule de levure, de champignon, de micro-algue, une cellule d'un animal, telle qu'une cellule de mammifère ou une cellule d'insecte.

La présente invention concerne également une méthode de marquage d'une protéine
20 recombinante dans un système acellulaire comprenant un milieu réactionnel, dans lequel le milieu réactionnel comprend un hydrolysats de microorganisme dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué selon la présente invention.

La présente invention concerne également une méthode pour appauvrir en L-leucine, L-
25 valine et L-isoleucine un milieu liquide, de préférence un hydrolysats de microorganisme en solution, comprenant de la L-leucine, L-valine, L-isoleucine sous forme libre, comprenant les étapes suivantes :

- traitement dudit milieu par un mélange de trois enzymes constitué d'une isoleucine 2-
épimérase (EC 5.1.1.21), une D-aminoacide oxydase (EC 1.4.3.3) et une catalase (EC 1.11.1.6)
30 telles que définies ci-dessus, et éventuellement

- élimination de ces trois enzymes du milieu traité, éventuellement lesquelles enzymes ont été inactivées préalablement à leur élimination, telle que décrite ci-dessus, de préférence par un choc thermique de manière à inactiver les enzymes, suivi d'une centrifugation, et/ou

5 - élimination des cétoacides produits, telle que décrite ci-dessus, de préférence par réduction chimique des cétoacides en hydroxyacides par du borohydrure de sodium.

Avantageusement, ces trois enzymes sont ajoutées à l'hydrolysat simultanément.

La présente invention concerne également une méthode pour appauvrir en L-alanine un milieu liquide, de préférence un hydrolysate de microorganisme en solution, comprenant de la L-alanine sous forme libre, comprenant les étapes suivantes :

10 - traitement dudit milieu liquide par un mélange de quatre enzymes constitué d'une alanine racémase (EC 5.1.1.1), une D-amino acide oxydase (EC 1.4.3.3), une catalase (EC 1.11.1.6) et une acétohydroxyacide synthase (EC 2.2.1.6), telles que définies ci-dessus, et éventuellement

15 - élimination de l'acétolactate formé, par exemple par chauffage - entre 35°C et 55°C, de préférence à 40°C - en se transformant en acétoïne (3-hydroxybutanone) ou en diacétyle (butane-2,3-dione), et/ou

20 - élimination de ces quatre enzymes du milieu traité, éventuellement lesquelles enzymes ont été inactivées préalablement à leur élimination, telle que décrite ci-dessus, de préférence par un choc thermique de manière à inactiver les enzymes, suivi d'une centrifugation, et/ou

- élimination des cétoacides produits, telle que décrite ci-dessus, de préférence par réduction chimique des cétoacides en hydroxyacides par du borohydrure de sodium.

25 La présente invention concerne également un mélange d'enzymes choisi parmi un mélange d'enzymes constitué ou comprenant une isoleucine 2-épimérase (EC 5.1.1.21), une D-aminoacide oxydase (EC 1.4.3.3) et une catalase (EC 1.11.1.6) telles que définies ci-dessus, et un mélange d'enzymes constitué ou comprenant une alanine racémase (EC 5.1.1.1), une D-amino acide oxydase (EC 1.4.3.3), une catalase (EC 1.11.1.6) et optionnellement une acétohydroxyacide synthase (EC 2.2.1.6) telles que définies ci-dessus.

La présente invention concerne également un kit comprenant :

- un hydrolysats susceptible d'être obtenu à l'étape b1), dans lequel au moins un acide aminé et son cétoacide s'il est présent est éliminé, ou un milieu de culture susceptible d'être obtenu à l'étape c), dans lequel au moins un acide aminé et son cétoacide s'il est présent est éliminé, et

5 - ledit acide aminé éliminé mais sous une forme marquée et/ou son précurseur marqué, tels que définis ci-dessus.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la méthode objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés :

Figure 1 : Extraits des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles. Gauche : 10 mélange des 6 acides aminés purs. Les acides aminés sont à l'abondance naturelle. Droit : hydrolysats de microalgues (milieu Isogro®, Sigma-Aldrich) enrichi ^{13}C , les régions correspondant à chaque méthyle des acides aminés isoleucine, leucine, valine, thréonine, alanine et méthionine sont indiquées en pointillé. Les spectres ^{13}C C-HSQC ont été obtenus grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

15 **Figure 2** : Extraits des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles. Gauche : Isogro® enrichi ^{13}C , les régions correspondant à chaque acide aminé sont indiquées en pointillé ; Droit : après traitement à la pronase. Seuls les signaux correspondant aux 6 acides aminés libres sont alors présents (voir Figure 1). Les spectres ^{13}C -HSQC ont été obtenus grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

20 **Figure 3** : Extrait des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles d'une solution d'isoleucine, leucine, valine, thréonine, alanine et méthionine en présence de leucine déshydrogénase de *Bacillus cereus* commerciale. La position des méthyles des cétoacides associés est indiquée en a : 3-méthyl-2-oxopentanoate (MOP), en b : 3-méthyl-2-oxobutanoate (cétoisovalérate : KIV), en c : 4-méthyl-2-oxopentanoate (cétoisocaproate : KIC). L'attribution 25 des résonances des cétoacides d'après les données bmse000319, bmse000383 et bmse000101 de la *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB, <http://www.bmrb.wisc.edu>). Les spectres ^{13}C -HSQC ont été obtenus grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

30 **Figure 4** : Extrait des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles d'une solution de mélange d'acides aminés méthylés (A, T, M, I, L et V). Gauche: Témoin; Droite: en présence de 10 mg d'extrait bactérien de *E. coli* exprimant de la BCAT. Les conditions sont les

suivantes: Tris 20mM pH 7.5, oxoglutarate 350mM, chaque acide aminé est à 35mM. La solution est incubée 4 H à 37°C. La position des méthyles des cétoacides associés est indiquée en a : 3-méthyl-2-oxopentanoate (MOP), en b : 3-méthyl-2-oxobutanoate (KIV), en c : 4-méthyl-2-oxopentanoate (KIC). L'attribution des résonances des cétoacides d'après les données
 5 bmse000319, bmse000383 et bmse000101 de la *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB, <http://www.bmrb.wisc.edu>). Les spectres ^{13}C -HSQC ont été obtenus grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

Figure 5 : Activité de l'isoleucine 2-épimérase. Gauche : Extrait correspondant à la zone des méthyles du spectre ^{13}C -HSQC d'une solution d'isoleucine en présence d'isoleucine
 10 épimérase. L'attribution des résonances de la D-allo-isoleucine est faite d'après les données HMDB00557 de l'Human Metabolome Database (HMDB, <http://www.hmdb.ca>). Droit : Variation en fonction du temps de la concentration en L-isoleucine et en D-allo-isoleucine en présence d'isoleucine épimérase. L'équilibre s'établit à un rapport 6/4 comme décrit dans la littérature, les formes (2S,3S) et (2R,3S) n'étant pas équivalentes. Les spectres ^{13}C -HSQC ont été
 15 obtenus grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

Figure 6 : Extraits des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles. Gauche : milieu Isogro® hydrolysé, les corrélations de chaque méthyle sont annotées. Droit : après traitement avec le mélange (système enzymatique) isoleucine-2-épimérase/D-amino acide
 20 oxydase/catalase. Les signaux correspondant aux méthyles des trois acides aminés Ile, Leu et Val ont disparu alors qu'apparaissent des signaux aux déplacements chimiques proton et carbone attendus pour les cétoacides associés. 3-méthyl-2-oxobutanoate (KIV); 3-méthyl-2-oxopentanoate (MOP), 4-méthyl-2-oxopentanoate (KIC); n.i. : composé non identifié. Les spectres ^{13}C -HSQC ont été obtenus grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz
 25 proton et équipé d'une cryosonde.

Figure 7 : Extraits des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles. Gauche : après traitement avec le mélange (système enzymatique) isoleucine-2-épimérase/D-amino acide oxydase/catalase, les corrélations de chaque méthyle sont annotées. Droit : après traitement au NaBH_4 . Les signaux de l'alanine et de la thréonine ne sont pas affectés par ces traitements. Par
 30 contre, ceux correspondant aux méthyles des trois cétoacides ont disparu alors qu'apparaissent des signaux aux déplacements chimiques proton et carbone attendus pour les hydroxyacides

associés. HIV : 3-méthyl-2-hydroxybutanoate ou hydroxyisovalerate; MHP : 3-méthyl-2-hydroxypentanoate, HIC : 4-méthyl-2-hydroxypentanoate ou hydroxyisocaproate ; n.i . compose non identifié. L'attribution des résonances des hydroxyacides est faite d'après l'« *Human Metabolome Database* » N° HMDB00407 (hydroxyisovalerate) et HMDB00746 (hydroxyisocaproate). Les signaux du 3-méthyl-2-hydroxypentanoate (présent sous ses formes (3S,2S et 3S,2R), ont été déterminé expérimentalement par déamination de l'isoleucine puis réduction au NaBH₄. Les spectres ¹³C-HSQC ont été obtenus grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

Figure 8 : Extraits des spectres 1D-deuterium correspondant à la zone des méthyles. Gauche : milieu Celtone® hydrolysé perdeutééré issu de l'étape A, les corrélations de chaque méthyle sont annotées. Droit : après traitement avec le mélange (système enzymatique) isoleucine-2-épimerase/D-amino acide oxydase/catalase. Les positions des fréquences des méthyles des différents acides aminés sont indiquées dans chaque spectre par des pointillés. Les signaux correspondant aux méthyles des valines, isoleucines et leucines ont disparu après traitement. Le spectre 1D-deutérium a été obtenu grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

Figure 9 : Histogramme des quantités d'acides aminés dans l'hydrolysats deutéré après traitement avec le mélange (système enzymatique) isoleucine 2-épimerase/D-AAO/catalase. Les résultats sont exprimés en pourcentage des quantités d'acides aminés dans l'hydrolysats avant traitement.

Figure 10 : A : Evolution du rapport des intensités des signaux des méthyles delta-1 des isoleucines et des méthyles epsilon des méthionines en fonction de la concentration en précurseur des isoleucines ajoutée dans le milieu. Carré : dans un milieu de culture riche non appauvri ; rond : dans un milieu de culture riche appauvri et additionné avec un précurseur. Le précurseur utilisé est du 2-oxobutanoate. La concentration en méthionine dans les cultures est de 200 mg/L. **B :** Evolution du rapport des intensités des signaux des méthyles des valines et des méthyles epsilon des méthionines en fonction de la concentration en précurseur des valines ajoutée dans le milieu. Carré : dans un milieu de culture riche non appauvri ; rond : dans un milieu culture riche appauvri et additionné avec un précurseur. Le précurseur utilisé est du 2-hydroxy-2-méthyl-3-oxobutanoate. La concentration en méthionine dans les cultures est de 200 mg/L. Les spectres

^{13}C -HSQC ont été obtenus à 30°C sur un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz et équipé d'une cryosonde.

Figure 11 : Analyse par Gels SDS-page de l'expression en milieu minimum et en milieu riche appauvri et reconstitué des protéines PBP_{K15} et LDT_{MT1}. Expression de PBP_{K15} par *E. coli* dans des milieux deutérés (partie gauche de la figure). M: marqueurs de masse moléculaire, A1 : fraction soluble de *E. coli* en milieu minimum après dialyse, A2 : fraction insoluble (précipité) de *E. coli* en milieu minimum après dialyse, A3 : fraction soluble de *E. coli* en milieu riche hydrolysé après dialyse, A4 : fraction insoluble(précipité) de *E. coli* en milieu riche hydrolysé après dialyse, A5 : PBP_{K15} exprimée en milieu minimum (issu de la fraction insoluble), A6 : PBP_{K15} exprimée en milieu riche hydrolysé (issu de la fraction soluble). Expression de LDT_{MT1} en *E. coli* dans des milieux deutérés (partie droite de la Figure). M: marqueurs de masse moléculaire, B1 : fraction soluble de *E. coli* en milieu minimum, B2 : fraction insoluble de *E. coli* en milieu minimum, B3 : fraction soluble de *E. coli* en milieu riche hydrolysé, B4 : fraction insoluble de *E. coli* en milieu riche hydrolysé, B5 : fraction soluble de *E. coli* en milieu riche hydrolysé appauvri puis reconstitué, B6 : fraction insoluble de *E. coli* en milieu riche hydrolysé appauvri puis reconstitué.

Figure 12 : Extrait de la région des méthyles du spectre ^{13}C -HSQC d'un échantillon marqué de LDT_{MT1}. Le spectre ^{13}C -HSQC a été obtenu grâce un spectromètre Avance III Bruker opérant à 600 MHz proton et équipé d'une cryosonde.

Figure 13 : Extraits des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles d'une part et à la région des protons alpha d'autre part. Gauche : mélange de méthionine et d'alanine, les corrélations correspondant à chaque acide aminé sont annotées ; Droit : après traitement avec le mélange (système enzymatique) alanine racémase/D-amino acide oxydase/catalase/acétolactate synthase et passage à 37°C pendant 24 heures. Seuls les signaux correspondant à la méthionine sont encore présents. La position des corrélations de l'alanine est indiquée par des rectangles en pointillé. Les signaux signalés par des astérisques correspondent aux produits issus de la dégradation de l'acétolactate.

Figure 14 : Extraits des spectres ^{13}C -HSQC correspondant à la zone des méthyles. Gauche : milieu commercial hydrolysé, les corrélations de chaque méthyle sont annotées. Droit : après traitement avec le mélange (système enzymatique) alanine racémase/D-amino acide oxydase/catalase/acétolactate synthase et passage à 37°C pendant 24 heures. Seul le signal

correspondant au méthyle de l'alanine a disparu. La position de ce méthyle est indiquée par un rectangle en pointillé. Les signaux signalés par des astérisques correspondent aux produits issus de la dégradation de l'acétolactate.

Figure 15 : Extraits des spectres 1D-deuterium correspondant à la zone des méthyles. Gauche : hydrolysats commerciaux perdeutérés après traitement avec de la Pronase®, les corrélations de chaque méthyle sont annotées. Droit : après traitement avec le mélange (système enzymatique) alanine racémase/D-amino acide oxydase/catalase/acétolactate synthase et passage à 37°C pendant 24 heures. Les fréquences des méthyles des différents acides aminés sont indiquées dans chaque spectre par le code de l'acide aminé à part celle de l'alanine qui l'est par une ligne pointillée. Seul le signal correspondant au méthyle de l'alanine a disparu après traitement.

Figure 16 : Histogramme des quantités d'acides aminés dans l'hydrolysats deutérés après traitement avec de l'alanine racémase/D-AAO/catalase. Les résultats sont exprimés en % des quantités d'acides aminés dans l'hydrolysats avant traitement.

Figure 17 : Evolution du rapport des intensités des signaux des méthyles beta de l'alanine et des méthyles epsilon des méthionines en fonction de la concentration en alanine ajoutée dans le milieu. Carré : dans un milieu de culture riche non appauvri ; cercle : dans un milieu de culture riche appauvri en alanine et additionné avec de l'alanine marquée. La concentration en méthionine dans les cultures est de 200 mg/L.

EXEMPLE : METHODE DE PREPARATION DE MILIEUX RICHES POUR LE MARQUAGE SPECIFIQUE DES METHYLES DANS LES PROTEINES POUR LES ETUDES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE BIOMOLECULAIRE

A) Obtention d'un milieu de culture riche dans lequel tous les acides aminés se trouvent sous la forme libre

Les sources d'acides aminés perdeutérés, Isogro® (Sigma-Aldrich) ou Celtone® (Cambridge Isotop Laboratories), disponibles commercialement ont été utilisés. Ces milieux sont des hydrolysats d'algues. Les résultats sont semblables pour les deux hydrolysats commerciaux. Comme le montre la Figure 1, l'hydrolysats commercial présente pour chaque résonance des méthyles des Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine et Thréonine des résonances associées indiquant l'existence de ces acides aminés engagés dans d'autres formes que ces acides aminés libres.

Traitement de l'hydrolysats commercial par la pronase.

1g de hydrolysats commercial Isogro® a été dissout dans 20ml de tampon Tris 20mM pH7, 5. Il a ensuite été incubé avec 31 mg de Pronase® commerciale (Sigma-Aldrich) sur la nuit à 37°C sous agitation. La solution a subit ensuite un choc thermique à 95°C pendant 30 min puis a été centrifugée à 40000g pendant 30min. 450 uL de la solution ont été additionnés de 50 uL D₂O et ensuite le mélange a directement été analysé par résonance magnétique nucléaire grâce a une expérience de type 13C-HSQC.

Le traitement de ce milieu commercial avec la Pronase® permet de faire disparaître toutes les formes d'acides aminés autres que les acides aminés libres, comme le montre la Figure 2.

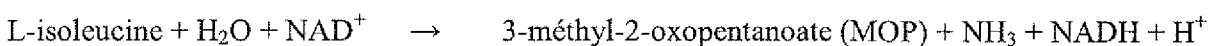
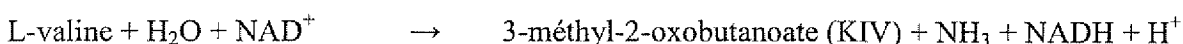
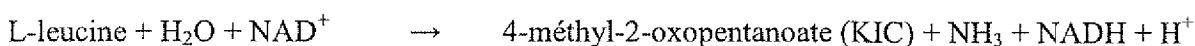
B) Remplacement dans l'hydrolysats obtenu à l'étape A) des acides aminés Leucine, Valine et Isoleucine et de leurs cétoacides par les précurseurs marqués de ces acides aminés.

1. Appauvrissement de l'hydrolysats obtenu à l'étape A) en acides aminés à chaîne ramifiée Isoleucine, Leucine et Valine

L'élimination des acides aminés doit répondre à deux critères : le premier est une conversion complète (*i.e.*, au moins 90%) des acides aminés, le second est que le produit final de la conversion ne soit pas recyclable dans le métabolisme du microorganisme (*e.g.*, bactérie) cultivé sur le milieu marqué.

a) Essai avec l'alanine déshydrogénase

La leucine déshydrogénase convertit *in vivo* la leucine, la valine et l'isoleucine en les cétoacides associés selon les réactions enzymatiques suivantes :



Un mélange de 6 acides aminés a été préparé à des concentrations semblables à celles de l'Isogro® (isoleucine 2,6mg/mL, leucine 5,2mg/mL, valine 3,9mg/mL, thréonine 3,2mg/mL, méthionine 1,95mg/mL et alanine 8,45mg/mL). 100 µl ont été incubés avec 1 unité de leucine déshydrogénase en présence de 10mM β-NAD pour un volume final de 500 ul en tampon 20mM Tris pH 9 pendant 12 heures à 30°C. Le mélange a été ensuite directement analysé par résonance magnétique nucléaire grâce a une expérience de type 13C-HSQC.

Comme le montre la Figure 3, le traitement d'un mélange des 6 acides aminés méthylés par la leucine déshydrogénase conduit à l'apparition des cétoacides associés à la leucine, valine et isoleucine mais en quantités extrêmement faibles. Il est envisageable que cela soit dû à un

recyclage du NADH en NAD⁺. L'importance d'un tel système de recyclage a été reconnu par Monti *et al.* (2011). Deux systèmes enzymatiques ont été décrits : les systèmes pyruvate/lactate déshydrogénase et 2-oxoglutarate/glutamate déshydrogénase mais chacun de ces systèmes conduit à introduire des composés non marqués dans le milieu, composés qui seraient réassimilables par les microorganismes cultivés et dilueraient les marquages. De plus, le pyruvate et le 2-oxoglutarate étant également des cétoacides, leur présence rendrait difficile l'élimination des cétoacides issus de l'Ile, Val et Leu.

Il a été testé des composés oxydants comme l'eau oxygénée ou le ferricyanure, des enzymes comme la flavine réductase de *Streptomyces coelicolor* mais quelles que soient les conditions expérimentales, les inventeurs n'ont pas réussi à obtenir une conversion significative des acides aminés en cétoacides. La leucine déshydrogénase n'a donc pas été retenue.

b) Essai de la voie « branched-chain amino acid » transaminase d'*Escherichia coli* qui catalyse le transfert d'azote d'un cétoacide à un autre

Les « branched-chain amino acid » transaminases (leucine transaminase et *branched chain aminotransferase* (BCAT)) convertissent *in vivo* la leucine, la valine et l'isoleucine en les cétoacides associés selon les réactions enzymatique suivantes :

L-leucine + 2-oxoglutarate → 4-méthyl-2-oxopentanoate (KIC) + glutamate

L-valine + 2-oxoglutarate → 3-méthyl-2-oxobutanoate (KIV) + glutamate

L-isoleucine + 2-oxoglutarate → 3-méthyl-2-oxopentanoate (MOP) + glutamate

30 mg d'Isogro® hydrolysé par la Pronase® ont été incubés avec 10 mg d'extrait brut de BCAT en présence d'une quantité d'oxoglutarate 10 fois égal au total des acides aminés hydrophobes Ile, Leu et Val présents dans le milieu. La BCAT a été obtenue par surexpression dans *E.coli*. Après une première centrifugation, les cellules ont été reprises par un tampon de lyse et cassées par sonication et centrifugées à 40000G pendant 30 minutes. Le surnageant contenant la BCAT a alors été recueilli puis lyophilisé et le lyophilisat utilisé sans autre purification. La réaction a été conduite pendant 4 heures à 37°C dans du 20mM Tris PH7,5. Le mélange a été ensuite directement analysé par résonance magnétique nucléaire grâce a une expérience de type ¹³C-HSQC.

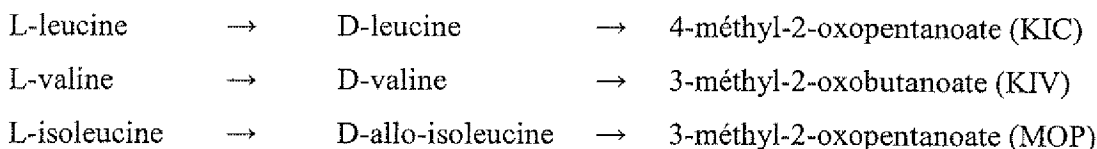
Comme le montre la Figure 4, la BCAT en présence d'une concentration en oxoglutarate de dix fois celle des acides aminés convertit une partie des leucines, valines et isoleucines en cétoacides associés. L'isoleucine est convertie à plus de 60 % comme l'est la leucine. Par contre

la valine est faiblement convertie (de l'ordre de moins de 10 %). Il apparaît que la thréonine est également transformée ; la résonance du méthyle gamma de cet acide aminé n'étant plus observé. La conversion n'est donc ni totale, même avec une quantité d'oxoglutarate dix fois supérieure à celle des acides aminés, ni spécifique, ce qui rend cette voie inutilisable. De plus, il est nécessaire par la suite d'éliminer les cétoacides produits. La présence en quantité importante d'oxoglutarate qui est le cétoacide associé au glutamate rendrait cette élimination difficile.

En conclusion, les possibilités de conversion suggérées par le métabolisme cellulaire *in vivo* ne s'avèrent pas directement utilisables.

10 c) Essai avec le mélange (système enzymatique) isoleucine 2-épimérase, D-aminoacide oxydase et catalase

L'isoleucine 2-épimérase catalyse la conversion de la L-isoleucine - forme (2S,3S) - en D-allo-isoleucine – forme (2R,3S) -, l'isoleucine présentant 2 carbones asymétriques en positions 2 et 3. Cette enzyme convertit d'après la littérature également les formes L de la leucine, la valine, la méthionine, la phénylalanine en formes D. La D-amino oxydase transforme les acides aminés de la forme D en leurs cétoacides avec production d'eau oxygénée. La catalase dismute l'eau oxygénée en oxygène moléculaire et en eau. Les réactions enzymatique sont les suivantes :



i. Obtention du gène codant l'épimérase. Culture, expression et purification de l'épimérase

Un gène optimisé codant l'épimérase a été fait synthétiser pour son expression dans *E. coli*. La séquence du gène de la 2-isoleucine épimérase de *L. buchneri* JCM 1115 (séquence primaire n° M1GRN3, UniProt), après synthèse chimique (GeneCust, Luxembourg) est sous clonée dans le vecteur Pet-28a (Novagen) en fusion avec un tag polyhistidine. *E. coli* BL21 et DE3 ont été transformées avec le plasmide correspondant puis mises en culture dans du milieu Luria Bertani en présence de kanamycine. Une fois atteint une DO de 0,7, l'expression de l'épimérase est induite par addition de 1 mM IPTG sur la nuit à 20°C.

25 Purification : Les cellules sont re-suspendues avec du tampon 50mM phosphate de sodium, 0,5M NaCl, 1mM B-mercapto-éthanol, 5mM imidazole, pH=8 (tampon A) en présence d'inhibiteurs de protéases. Les cellules sont alors lysées par trois cycles de sonication d'une minute puis centrifugées pendant 30 min à 40000g. La fraction soluble est recueillie et chargée

sur une résine Ni-NTA (Qiagen) prééquilibrée avec le tampon A. La colonne est alors rincée avec le tampon A à 20mM imidazole puis avec le tampon A additionné de 50mM imidazole. Finalement, la protéine est éluée avec le tampon A additionné de 500 mM imidazole. La protéine est ensuite purifiée par chromatographie d'exclusion de taille sur Superdex S200. La protéine est
5 éluée en un seul pic à un temps de rétention qui correspond à une protéine de 200 Kda.

La protéine obtenue est fonctionnelle comme le montre la Figure 5 et permet de convertir l'isoleucine en D-allo-isoleucine (la réaction étant réversible) comme montré ci-après (ii).

ii. Conversion de l'isoleucine en D-allo-isoleucine

Un volume de 0,5ml d'isoleucine à 50mM est incubé avec 6,5 ug/ml d'isoleucine 2-
10 épimérase en présence de pyridoxal phosphate (Sigma) (0,1mM) dans le tampon 20mM Tris pH7,5 à 37°C.

iii. Conversion de l'isoleucine, leucine et valine en leurs cétoacides

L'utilisation du mélange (système enzymatique) isoleucine 2-épimérase/D-AAO(D-acid
amino oxydase)/catalase conduit à la conversion totale de l'isoleucine seule en le cétoacide
15 associé : le 3-méthyl-2-oxopentanoate. (résultat non montré).

En mélange, les trois acides aminés isoleucine, leucine et valine sont également totalement convertis par le mélange (système enzymatique) isoleucine 2-épimérase/D-AAO/catalase en leurs cétoacides associés (résultat non montré).

L'hydrolysate obtenu à l'étape A) ci-dessus, une fois traité avec le mélange des 3 enzymes
20 isoleucine 2-épimérase/D-AAO/catalase, a également été totalement épuisé en ces trois acides aminés comme le montre la Figure 6 où les pics caractéristiques des méthyles des Ile, Leu, Val disparaissent et qu'apparaissent les signaux des cétoacides associés.

Après traitement par le mélange (système enzymatique) isoleucine 2-épimérase/D-
AAO/catalase, le milieu de culture riche a subi un choc thermique d'une demi-heure à 85°C puis
25 une centrifugation pour éliminer les enzymes. Aucune activité résiduelle de conversion des acides aminés n'est alors observée (résultat non montré).

iv. Elimination des cétoacides produits

De nombreuses voies d'élimination des cétoacides sont envisageables, par extraction, par
dérivatisation chimique, par réduction ou par décarboxylation enzymatique. La voie choisie ici
30 est une réduction chimique des cétoacides en hydroxyacides par du borohydrure de sodium (NaBH₄). 2g de milieu de culture riche Celtone ® hydrolysé préalablement par de la Pronase®

contiennent l'équivalent de 3 mMoles de cétoacides issus de Leu, Val, Ile. Il faut 110 mg de NaBH₄ pour réduire ces 3 mMoles, soit 11 mMoles d'H par rapport à 100 Moles de D dans un litre de D₂O. Les réductions chimiques des cétoacides s'effectuent selon les réactions suivantes :

4-méthyl-2-oxopentanoate (KIC) → 4-méthyl-2-hydroxypentanoate (HIC)

3-méthyl-2-oxobutanoate (KIV) → 3-méthyl-2-hydroxybutanoate (HIV)

3-méthyl-2-oxopentanoate (MOP) → 3-méthyl-2-hydroxypentanoate (MHP)

Les résultats sont montrés à la Figure 7 Les signaux correspondant aux méthyles des trois cétoacides ont disparu alors qu'apparaissent des signaux aux déplacements chimiques proton et carbone attendus pour les hydroxyacides associés indiquant la conversion totale des cétoacides présents dans la solution. Par contre, les signaux de l'alanine et de la thréonine ne sont pas affectés par ces traitements.

v. *Appauvrissement de l'hydrolysate obtenu à l'étape A) en isoleucine, leucine et valine et leurs cétoacides, par élimination dans cet hydrolysate de ces acides aminés et de leurs cétoacides*

1 g d'hydrolysate perdeutééré Isogro® préalablement traité par de la Pronase® a été incubé dans 20ml de tampon Tris 20mM pH7,5 avec 16ug/ml d'isoleucine 2-épimerase, 250unités de D-AAO(D-acid amino oxydase), 250 unités de catalase, 1mM FAD et 1mM PLP pendant 24H à 37°C. Le milieu a subi ensuite un choc thermique pendant 30 minutes à 95°C puis a été centrifugé pendant 30 min à 40000g. Le milieu a ensuite été réduit avec du NaBH₄ 40 mM final afin de transformer les cétoacides en les hydroxyacides correspondants.

La substitution des protons par des deutériums peut théoriquement modifier l'activité des enzymes. Comme le montre la Figure 8, le mélange (système enzymatique) isoleucine 2-épimerase/D-AAO/catalase permet également l'élimination complète de la leucine, valine et isoleucine dans un hydrolysate perdeutééré en solution dans du D₂O. Ce mélange (système enzymatique) n'est donc pas affecté par le deutérium.

Pour vérifier que le traitement n'affecte essentiellement que la leucine, la valine et l'isoleucine, la concentration des différents acides aminés a été mesurée avant et après traitement. En effet, d'après Mutaguchi *et al.* (2013), la L-phénylalanine et la L-méthionine sont racémisées par l'isoleucine 2-épimerase mais avec une moindre activité. Comme attendu (voir Figure 9), l'isoleucine et la leucine sont pratiquement entièrement convertis (> 95 %). La valine est également convertie à plus de 90 %. De même, plus de 80 % de la phénylalanine et de la

méthionine ont été transformés. La quantité de L-tryptophane était nulle dans l'hydrolysat d'algues perdeutééré Isogro® initial; celui-ci étant détruit lors de l'hydrolyse des microorganismes.

2. Ajout au l'hydrolysat appauvri obtenu à l'étape B1) des précurseurs marqués de l'isoleucine, leucine et valine et incorporation des acides aminés marqués isoleucine, leucine et valine dans les protéines exprimées par des bactéries cultivée sur le milieu de culture ainsi obtenu

Le milieu de culture constitué par du milieu minimum M9 additionné de l'hydrolysat appauvri en acides aminés contient des hydroxyacides dérivés des acides aminés. La viabilité d'une culture de *E. coli* et l'expression des protéines ont été testées dans ces conditions. Aucune différence significative de croissance de la culture bactérienne n'est observée entre le milieu constitué de milieu M9 (contenant deux grammes de glucose, un gramme de chlorure d'ammonium et d'oligoéléments) et de deux grammes de l'hydrolysat traité selon la présente Invention et donc appauvri en isoleucine, valine, leucine, phénylalanine et méthionine et ce même milieu M9 additionné de deux grammes de hydrolysat commercial (Celtone® ou Isogro®) (résultat non montré). Cela confirme l'innocuité du traitement selon l'invention. Par rapport au milieu M9, l'augmentation de la masse cellulaire obtenue par addition de l'hydrolysat traité selon la présente invention est de l'ordre d'un tiers par rapport à celle obtenue dans un milieu M9 seul. Le niveau d'expression après induction d'une protéine témoin (ubiquitine) dans le milieu constitué de milieu M9 et de l'hydrolysat traité selon l'invention n'est pas modifié en comparaison d'un milieu riche classique constitué de milieu M9 additionné d'une source d'acides aminés commerciale - hydrolysat Celtone® ou Isogro® (résultat non montré).

L'hydrolysat appauvri obtenu à l'étape B1) ou le milieu de culture riche issu de l'ajout de cet hydrolysat à un milieu minimum de type M9 est ensuite additionné soit d'un précurseur de l'isoleucine choisi parmi le 2-oxobutanoate pour le marquage des méthyles delta-1 et le 2-hydroxy-2-éthyl-3-oxobutanoate pour celui des méthyles gamma-2, soit d'un précurseur de la leucine et la valine choisi parmi le 2-hydroxy-2-méthyl-3-oxobutanoate, pour le marquage stéréospécifique des méthyles proR, proS et le 3-méthyl-2-oxobutanoate (ketoisovalerate) pour un marquage astéréospécifique des méthyles, en présence ou non de leucine deutérée si le marquage des méthyles des valines est uniquement souhaité.

Il a ensuite été comparé le niveau d'incorporation des précurseurs dans une protéine témoin avec un milieu riche classique et avec le milieu appauvri selon l'invention puis reconstitué avec le précurseur approprié. Comme le montre la Figure 10A, le niveau d'incorporation des

précurseurs reste faible – inférieur à une soixantaine de pour cent - dans un milieu riche classique même à des concentrations élevées de précurseurs. Il est en particulier impossible d'obtenir des taux de marquage de plus de 90 % (nécessaires par exemple à des expériences de type NOESY). La culture et l'expression dans le milieu appauvri puis reconstitué selon l'invention permet
5 d'obtenir un tel niveau et cela pour des concentrations en précurseur proches de celles requises pour un milieu minimum M9, *i.e.*, de l'ordre de 60 mg/L pour le 2-oxobutanoate et 300 mg/L pour les acétolactates (voir Figure 10B). Sans appauvrissement du milieu, le pourcentage d'incorporation est limité à 30 % pour la même quantité de précurseur et l'incorporation maximum observée en excès de précurseurs testées (oxobutyrate : 200mg ou 800 mg pour
10 acétolactate) ne dépasse pas 50%.

Optimisation de l'incorporation des précurseurs dans les protéines

Le niveau d'incorporation du 2-oxobutanoate a été évalué en utilisant l'ubiquitine comme système modèle. Des cellules de la souche BL21(DE3) de *E. coli* ont été transformées avec le plasmide pET41c (Novagen) comprenant un gène codant pour l'ubiquitine humaine précédée d'un
15 tag polyhistidine (pET41c-His-Ubi). Ces cellules ont d'abord été adaptées en milieu deutéré. Pour cela, les cellules sont tout d'abord mises à pousser dans 5 ml de milieu de culture Luria-Bertani sur la journée. Elles sont ensuite transférées en milieu minimum M9/H₂O. Le lendemain matin, les cellules sont de nouveau transférées dans du milieu minimum M9/50%D₂O:50%H₂O et finalement le soir dans du milieu minimum M9/100%D₂O. Elles sont alors transférées dans un
20 milieu M9/D₂O contenant 1 g/L ¹⁵ND₄Cl, 2 g/L U-[²H], U-[¹³C] glucose et 2 g/L d'hydrolysats deutérés traités par de la Pronase® (étape A) puis appauvri en Ile, Val et Leu avec au départ une densité optique de 0,3 ; le volume utilisé correspond à 70 % du volume total de la culture. Quand la densité optique à 600 nm a atteint 1, une solution contenant le précurseur a été ajoutée. Après 1
25 heure, l'expression de la protéine a été induite par l'addition d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à une concentration de 1 mM. L'induction a été faite pendant 3 heures à 37°C. L'ubiquitine a été purifiée par chromatographie sur colonne Ni-NTA (Qiagen).

La quantité optimale de 2-oxobutanoate nécessaire pour obtenir une incorporation quasi complète dans la protéine surexprimée a été déterminée par une série de cultures (25 mL chacune) dans lesquelles des quantités croissantes de ce précurseur marqué ¹³C,H sur un méthyle
30 sont ajoutées une heure avant induction pour des concentrations finales de 0,10, 20, 30, 50, 75, 100 et 200 mg/L. Le niveau d'incorporation a été estimé dans la protéine purifiée par des

expériences 2D ^{13}C -HSQC. La quantification a été effectuée en mesurant le rapport de la moyenne de l'intégrale du signal des méthyles des isoleucines à la moyenne de l'intégrale du signal des méthyles des méthionines. L'addition de 100 mg de 2-oxobutanoate par litre de milieu épuisé permet une incorporation de plus de 90 % dans les chaînes latérales des isoleucines sans fuite détectable dans d'autres acides aminés.

Pour l'acétolactate, les cellules de la souche BL21(DE3) de *E. coli* ont été transformées avec le plasmide pET41c comprenant un gène codant pour l'ubiquitine humaine précédée d'un tag polyhistidine (pET41c-His-Ubi). Ces cellules ont d'abord été adaptées en milieu deutéré comme décrit ci-dessus puis transférées dans un milieu M9/D₂O contenant 1 g/L $^{15}\text{ND}_4\text{Cl}$, 1.5 g/L U-[^2H], U-[^{13}C] glucose. Quand la densité optique à 600 nm a atteint 1,5, une solution contenant 1,5 g/L de d'hydrolysate deutéré traité par de la Pronase® (étape A) puis appauvri en Ile, Val et Leu est ajoutée avec l'acétolactate. Après 1 heure, l'expression de la protéine a été induite par l'addition d'IPTG à une concentration de 1 mM. L'induction a été faite pendant 3 heures à 37°C. L'ubiquitine a été purifiée par chromatographie sur colonne Ni-NTA (Qiagen).

La quantité optimale d'acétolactate nécessaire pour obtenir une incorporation à plus de 90 % dans la protéine surexprimée a été déterminée par une série de cultures (20 mL chacune) dans lesquelles des quantités croissantes de ce précurseur marqué $^{13}\text{C},\text{H}$ sur un méthyle sont ajoutées une heure avant induction pour des concentrations finales de 0, 100, 300, 400, 600, et 800 mg/L. Le niveau d'incorporation a été estimée dans la protéine purifiée par des expériences 2D ^{13}C -HSQC. La quantification a été effectuée en mesurant le rapport de la moyenne de l'intégrale du signal des méthyles des valines à la moyenne de l'intégrale du signal des méthyles des méthionines. L'addition de 300 mg d'acétolactate par litre de milieu appauvri permet une incorporation de plus de 90 % dans les chaînes latérales des valines sans fuite détectable dans d'autres acides aminés.

3. Expression de protéines non exprimables en milieu minimum par des bactéries

L'utilisation d'un milieu de culture riche obtenu à partir d'un hydrolysate appauvri puis reconstitué en acides aminés marqués selon l'invention permet d'obtenir des augmentations de rendement en protéine soluble (en mg par litre) par rapport aux cultures en milieu minimum équivalentes à celles obtenues avec un milieu riche. Ces augmentations sont dues à soit une plus grande densité cellulaire lors de l'induction et donc une plus grande quantité de protéine produite, soit une augmentation de la fraction soluble de la protéine. Ces deux cas peuvent être rencontrés

comme l'illustre la Figure 11 où sont présentés les résultats obtenus pour l'expression dans *E. coli* de deux protéines LDT_{MT1} - une transpeptidase de *Mycobacterium* - et PBP_{K15} - une *penicillin-binding-protein* issue de *Streptomyces* K15.

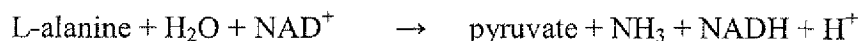
Pour le milieu PBP_{K15}, le milieu riche obtenu à partir d'un hydrolysats appauvri en isoleucine, leucine et valine par traitement avec le système enzymatique épimerase/D-AAO/catalase puis réduction par le borohydrure selon l'invention, a été reconstitué avec de la phénylalanine protonée, de l'oxoisovalérate et de la leucine deutérée et du 2-oxobutanoate marqué ¹³C,H en position 4. On observe (voir Figure 11) que, produite en milieu minimum, après dialyse de la fraction soluble contre le tampon sans sel, étape nécessaire pour la purification de la protéine, la quasi totalité de PBP_{K15} précipite alors que, produite en milieu riche, la protéine se retrouve uniquement dans la fraction soluble (il n'y a aucune précipitation après dialyse).

Pour LDT_{MT1}, le milieu riche obtenu à partir d'un hydrolysats appauvri en isoleucine, leucine et valine par traitement avec le système enzymatique épimerase/D-AAO/catalase puis réduction par le borohydrure selon l'invention, a été reconstitué avec de la phénylalanine protonée, de l'oxoisovalérate et de la leucine deutérée, de la méthionine deutérée et marquée ¹³C,H en position ε et du 2-oxobutanoate marqué ¹³C,H en position 4. On observe (voir Figure 11) que l'expression de LDT_{MT1} dans le milieu riche appauvri puis reconstitué est deux fois plus grande : 10,5 mg/L qu'en milieu minimum : 5,1 mg/L. Elle est équivalente à celle en milieu riche : 12 mg/L. Dans ces conditions, le marquage de LDT_{MT1} produite dans le milieu riche appauvri puis reconstitué a été analysé par résonance magnétique nucléaire. Comme l'illustre la Figure 12, il a été observé uniquement le marquage des positions δ1 des isoleucines et des méthionines sans fuite d'isotope vers d'autres acides aminés.

C) Remplacement dans le milieu de culture obtenu à l'étape A) de l'alanine et de son par un précurseur marqué.

25 a) Essai avec l'alanine déshydrogénase

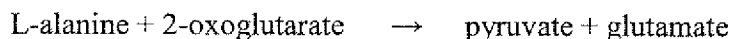
Il a été testé l'élimination de l'alanine par l'utilisation de l'alanine déshydrogénase qui devrait la convertir en pyruvate selon :



La conversion en pyruvate mesurée par la disparition des signaux de l'alanine est très faible quelles que soient les conditions utilisées (résultats non montrés). Cette voie a donc été abandonnée.

b) Essai avec la glutamate-pyruvate transaminase

Il a été testé l'utilisation de la glutamate-pyruvate transaminase de *E. coli* qui catalyse le transfert d'azote de l'alanine à l'oxoglutarate selon :

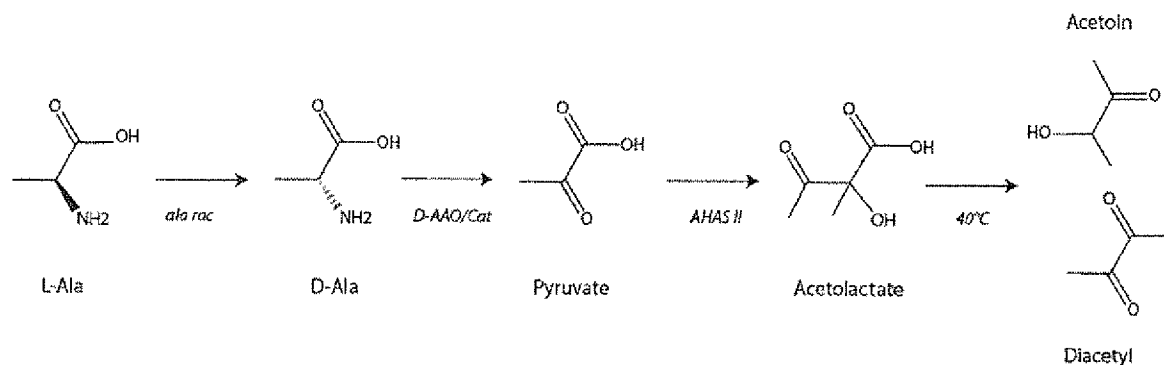


Pour les mêmes raisons que pour la conversion des acides aminés à chaîne ramifiée (excès de cétoacides, réaction à l'équilibre) décrites ci-dessus, cette voie a été également abandonnée.

c) Essai avec le mélange (système enzymatique) alanine racémase/D-amino acide oxydase/catalase/acétolactate synthase

Il a été développé un système enzymatique *in vitro* basé sur le schéma réactionnel suivant (Schema 1 ci-dessous) : la L-alanine est convertie en D-alanine par l'alanine racémase de *Bacillus stearothermophilus* disponible commercialement (Sigma-Aldrich). La D-alanine est ensuite désaminée et transformée en pyruvate par la D-amino acide oxydase de rein de porc disponible commercialement (Sigma-Aldrich). Le pyruvate formé est alors condensé en acétolactate par la AHAS II (acétohydroxyacide synthase ou acétolactate synthase) de *E. coli*. L'acétolactate formé est éliminé par chauffage à 40°C en se transformant en acétoïne (3-hydroxybutanone) ou en diacétyl (butane-2,3-dione). Les réactions catalysées par la D-AAO produisant du peroxyde d'hydrogène, de la catalase est ajoutée au milieu pour l'éliminer.

Schéma 1 : Schéma réactionnel pour l'élimination de l'alanine. *ala rac* : alanine racemase; *D-AAO* : D-amino acid oxidase ; *AHAS II* : acétohydroxyacide synthase II ; *cat* : catalase



500 μ l d'une solution d'alanine et de méthionine (20mM respectivement) est incubée avec 3 unités de D-AAO (Sigma-Aldrich), 3 unités de catalase (Sigma-Aldrich), 1mg d'Acetolactate synthase, 6 unités d'alanine racémase (Sigma-Aldrich), 1mM FAD (Flavine adénine dinucléotide), 1mM PLP (pyridoxal phosphate), 1mM ThPP (thiamine pyrophosphate) dans du Tris 20mM pH 7,5 pendant 24 Heures à 30°C. Le mélange est ensuite directement analysé par résonance magnétique nucléaire grâce à une expérience de type ^{13}C -HSQC.

Comme la montre la Figure 13, la L-alanine a été convertie *in vitro* en produit de dégradation de l'acétolactate par le mélange (système enzymatique) *ala rac*/D-AAO/cat/AHASII de façon totale.

10 5,9 mg d'Isogro ou Celtone® ^{13}C sont incubés avec 6 unités d'alanine racémase (Sigma-Aldrich), 3 unités de D-AAO (Sigma-Aldrich), 1 mg d'acétolactate synthase, 5 unités de catalase (Sigma-Aldrich), 1mM FAD (Flavine adénine dinucléotide), 1mM PLP (pyridoxal phosphate), 1mM ThPP (thiamine pyrophosphate) dans 500 μ l de tampon 20mM Tris pH 7,5 pendant 24 Heures à 30°C. Le mélange est ensuite directement analysé par résonance magnétique nucléaire
15 grâce à une expérience de type ^{13}C -HSQC.

De la même façon, la L-alanine présente dans l'hydrolysate d'algue commercial (Celtone® ou Isogro®) a été éliminée par transformation en pyruvate puis en produits de dégradation de l'acétolactate par ce système, comme le montre la Figure 14.

20 Ce procédé a finalement été appliqué à un hydrolysate commercial d'algues entièrement deutéré (Celtone® ou Isogro®) et préalablement traité par de la Pronase. La deutériation complète des acides aminés pouvant influencer sur l'affinité ou la cinétique de la réaction enzymatique, il était nécessaire de vérifier que ce procédé s'appliquait également.

0,5 g de hydrolysats commercial deutéré préalablement traité par de la pronase est incubé dans 20ml de tampon Tris 20mM pH 7,5 en présence de 3,2 mg d'alanine racémase, 100 unités de D-AAO (D-acid amino oxydase, Sigma-Aldrich), 100 unités de catalase (Sigma-Aldrich), 7,5 mg ALS (acétolactate synthase), 1mM FAD (Flavine adénine dinucléotide), 1mM PLP (pyridoxal phosphate), 1mM ThPP (thiamine pyrophosphate) pendant 24H à 37°C. Le milieu a subi ensuite un choc thermique pendant 30 minutes à 95 degrés puis est centrifugé pendant 30 min à 40000g. Le mélange a été ensuite directement analysé par résonance magnétique nucléaire grâce à une expérience de type 1d-deuterium.

Comme le montre la Figure 15 où sont présentés les spectres 1D-deuterium du milieu deutéré contrôle et du milieu deutéré traité, le signal correspondant au méthyle de l'alanine a disparu alors que les autres signaux des méthyles ne sont pas affectés.

Pour vérifier que le traitement n'affecte essentiellement que l'alanine, la concentration des différents acides aminés a été mesurée avant et après traitement. Comme le montre la Figure 16, l'alanine est totalement éliminée du milieu. Seuls deux autres acides aminés sont faiblement convertis par le traitement : la L-serine et la L-cystéine dont les quantités initiales diminuent de 25 % à 35 %. En effet, une faible activité serine racémase a été rapportée pour l'alanine racémase de *B. stearothermophilus* (Patrick *et al.*, 2002). La quantité de tryptophane est nulle dans l'hydrolysats initial; celui-ci étant détruit lors de l'hydrolyse des microorganismes.

d) Ajout au milieu de culture appauvri obtenu à l'étape c) de l'alanine marquée et incorporation de l'alanine marquée dans les protéines exprimées par des bactéries cultivées sur le milieu de culture ainsi obtenu

De la même façon que pour le milieu riche obtenu à partir d'un hydrolysats appauvri en isoleucine, leucine et valine, ci-dessus, aucune différence de croissance significative de la culture bactérienne n'a été observée entre un milieu M9 additionné de deux grammes d'hydrolysats commercial (Celtone® ou Isogro®) et le même milieu additionné de deux grammes d'hydrolysats commercial (Celtone® ou Isogro®) appauvri en alanine (résultat non montré). Le niveau d'expression après induction d'une protéine témoin (ubiquitine) n'a pas été modifié en comparaison d'un milieu riche classique (résultat non montré).

Le niveau d'incorporation de l'alanine $3\text{-}^{13}\text{CH}_3$ a été évalué en utilisant l'ubiquitine comme système modèle. Des cellules de la souche BL21(DE3) de *E. coli* ont été transformées avec un plasmide pET41c (Novagen) portant le gène codant pour l'ubiquitine humaine précédée d'un tag

polyhistidine (pET41c-His-Ubi). Ces cellules ont d'abord été adaptées en milieu deutéré comme décrit précédemment puis transférées dans un milieu M9/D₂O contenant 1 g/L ¹⁵ND₄Cl, 2 g/L of U-[²H], U-[¹²C], glucose et 2 g/L de hydrolysats deutérés hydrolysés riches ou appauvris en alanine (le volume utilisé correspond à 70 % du volume total). Quand la densité optique à 600 nm atteint 1.5, le précurseur est dilué dans le volume restant du milieu puis ajouté à la culture. Après 1 heure, l'expression de la protéine est induite par l'addition d'IPTG à une concentration de 1 mM pendant 3 heures à 37°C. L'ubiquitine est ensuite purifiée par chromatographie sur colonne Ni-NTA (Qiagen).

La quantité optimale de d'alanine 3-¹³CH₃ nécessaire pour obtenir une incorporation quasi complète dans la protéine surexprimée a été déterminée par une série de cultures dans lesquelles des quantités croissantes de ce précurseur marqué ¹³C,H sur un méthyle sont ajoutées une heure avant induction pour des concentrations finales de (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 et 1400 mg/L pour le milieu M9 additionné d'hydrolysats commerciaux non traités) et de (0, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150 et 250 mg/l pour le milieu M9 additionné d'hydrolysats appauvris en alanine). Pour chaque culture, de la méthionine deutérée et marquée ¹³CH₃ sur le méthyle ε a été ajoutée à 200 mg/L.

Le milieu ainsi appauvri a été ensuite additionné de 3-¹³CH₃-alanine. Il a été ensuite comparé le niveau d'incorporation de l'alanine dans l'ubiquitine avec un milieu M9 additionné de deux grammes d'hydrolysats commerciaux (Celtone® ou Isogro®) et avec le milieu M9 additionné de deux grammes d'hydrolysats commerciaux (Celtone® ou Isogro®) appauvris puis reconstitués avec l'alanine marquée (Figure 17). Le niveau d'incorporation de l'alanine marquée dans un milieu riche classique nécessite pour atteindre 90 % une quantité de l'ordre du gramme d'alanine par litre. Dans un milieu minimum additionné d'hydrolysats appauvris puis reconstitués, il ne faut que 300 mg/L d'alanine pour atteindre un tel niveau de marquage, une quantité proche de celle requise pour un milieu minimum M9.

REFERENCES

- Barak Z. *et al.*, 1987, *J Bacteriol.* 169:3750-6.
- D'Aniello A., *et al.*, 1993, *Analytical Biochemistry*, 213:290-295.
- Gardner K.H. and Kay L.E., 1998, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 27:357-406.
- Kerfah R., *et al.*, 2015, *J. Curr Opin Struct Biol.* 32:113-22.

- Monti D., *et al.*, 2011, *Chemical Reviews*, 111:4111-4140.
- Mutaguchi Y., *et al.*, 2013, *Journal of Bacteriology*, 195:5207-5215.
- Pailla K., *et al.*, 2000, *Clinical Chemistry*, 46:848-853.
- Patrick W.M., *et al.*, 2002, *ChemBioChem*, 3:789-792.
- 5 Ruschak A.M. and Kay L.E., 2010, *J Biomol NMR*. 46:75-87.
- Saegusa *et al.*, 1977, *The Journal of Organic Chemistry*, 42:2797-2798.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shaw J.P. *et al.*, 1997, *Biochemistry*, 36:1329-42.
- 10 Smit B.A., *et al.*, 2005, *Appl Environ Microbiol*. 71:303-11.

REVENDICATIONS

1. Méthode de préparation d'un hydrolysat de microorganisme dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué, comprenant les étapes suivantes :

5 a) obtenir un hydrolysat de microorganisme en solution dans lequel tous les acides aminés se trouvent sous la forme libre,

b) remplacer dans l'hydrolysat obtenu à l'étape a) au moins un acide aminé sous la forme L et son cétoacide s'il est présent, par le même acide aminé mais sous une forme marquée ou par son précurseur marqué.

10

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'étape b) comprend les étapes suivantes :

b1) appauvrir l'hydrolysat obtenu à l'étape a) en au moins un acide aminé sous la forme L et son cétoacide s'il est présent, par élimination de l'hydrolysat dudit acide aminé et de son cétoacide, et

15

b2) ajouter à l'hydrolysat appauvri obtenu à l'étape b1) ledit acide aminé éliminé mais sous une forme marquée et/ou son précurseur marqué.

3. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que ledit acide aminé remplacé est choisi parmi la L-leucine, la L-valine et la L-isoleucine.

20

4. Méthode selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisée en ce que ledit acide aminé remplacé est choisi parmi la L-leucine, la L-valine et la L-isoleucine et en ce que l'étape b1) comprend les étapes suivantes :

25 - traitement de l'hydrolysat obtenu à l'étape a) par un mélange de trois enzymes constitué d'une isoleucine 2-épimérase (EC 5.1.1.21), une D-aminoacide oxydase (EC 1.4.3.3) et une catalase (EC 1.11.1.6), et

- élimination de l'hydrolysat traité desdites 3 enzymes et des cétoacides produits lors du traitement enzymatique de l'hydrolysat.

30

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit acide aminé et son cétoacide s'il est présent sont remplacés par le même acide aminé mais marqué par au moins un isotope choisi par le carbone-13, l'hydrogène-2 et l'azote-15.

5 6. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que :

- la L-isoleucine et son cétoacide s'il est présent sont remplacés par la L-isoleucine marquée, le 2-oxobutanoate marqué, le 2-hydroxy-2-éthyl-3-oxobutanoate marqué, le 2,3-dihydroxy-3-méthylpentanoate marqué et/ou le 3-méthyl-2-oxopentanoate marqué, et/ou

10 - la L-leucine et L-valine et leurs cétoacides s'ils sont présents sont remplacés par la L-leucine marquée, la L-valine marquée, le 2-hydroxy-2-méthyl-3-oxobutanoate marqué, le 3-hydroxy-3-méthyl-2-oxobutanoate marqué, le 2,3-dihydroxy-3-méthylbutanoate marqué, le 3-méthyl-2-oxobutanoate marqué et/ou le 4-méthyl-2-oxopentanoate marqué.

15 7. Méthode de préparation d'un milieu de culture riche, dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué, comprenant les étapes suivantes :

i) préparer un hydrolysât de microorganisme dont au moins un acide aminé et/ou un précurseur d'acide aminé est marqué selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, et

j) constituer un milieu de culture riche comprenant l'hydrolysât obtenu à l'étape i) et un milieu de culture minimum.

20

8. Milieu de culture riche comprenant un hydrolysât de microorganisme ledit hydrolysât étant susceptible d'être obtenu selon la revendication 1 à 6.

25 9. Méthode de marquage d'une protéine par culture d'une cellule procaryote ou eucaryote, comprenant la culture de ladite cellule sur un milieu de culture riche selon la revendication 8.

10. Méthode de marquage d'une protéine recombinante dans un système acellulaire comprenant un milieu réactionnel, caractérisée en ce que le milieu réactionnel comprend un hydrolysât de microorganisme obtenu selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

30

11. Kit comprenant :

- un hydrolysate appauvri susceptible d'être obtenu à l'étape b1) de la revendication 2, dans lequel au moins un acide aminé et son cétoacide s'il est présent est éliminé, ou un milieu de culture riche comprenant ledit hydrolysate appauvri et un milieu minimum, et

- ledit acide aminé éliminé mais sous une forme marquée et/ou son précurseur marqué.

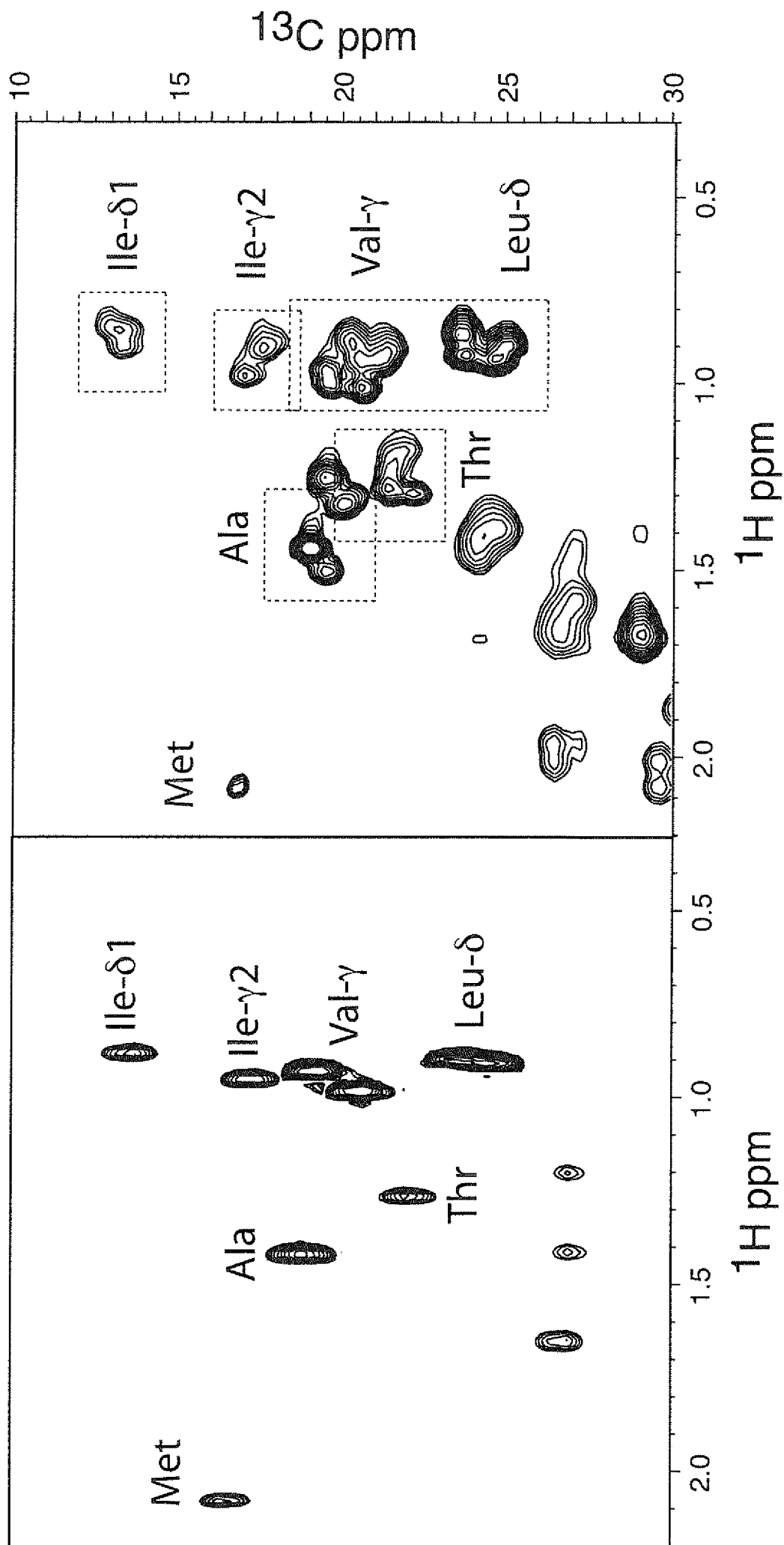


Figure 1

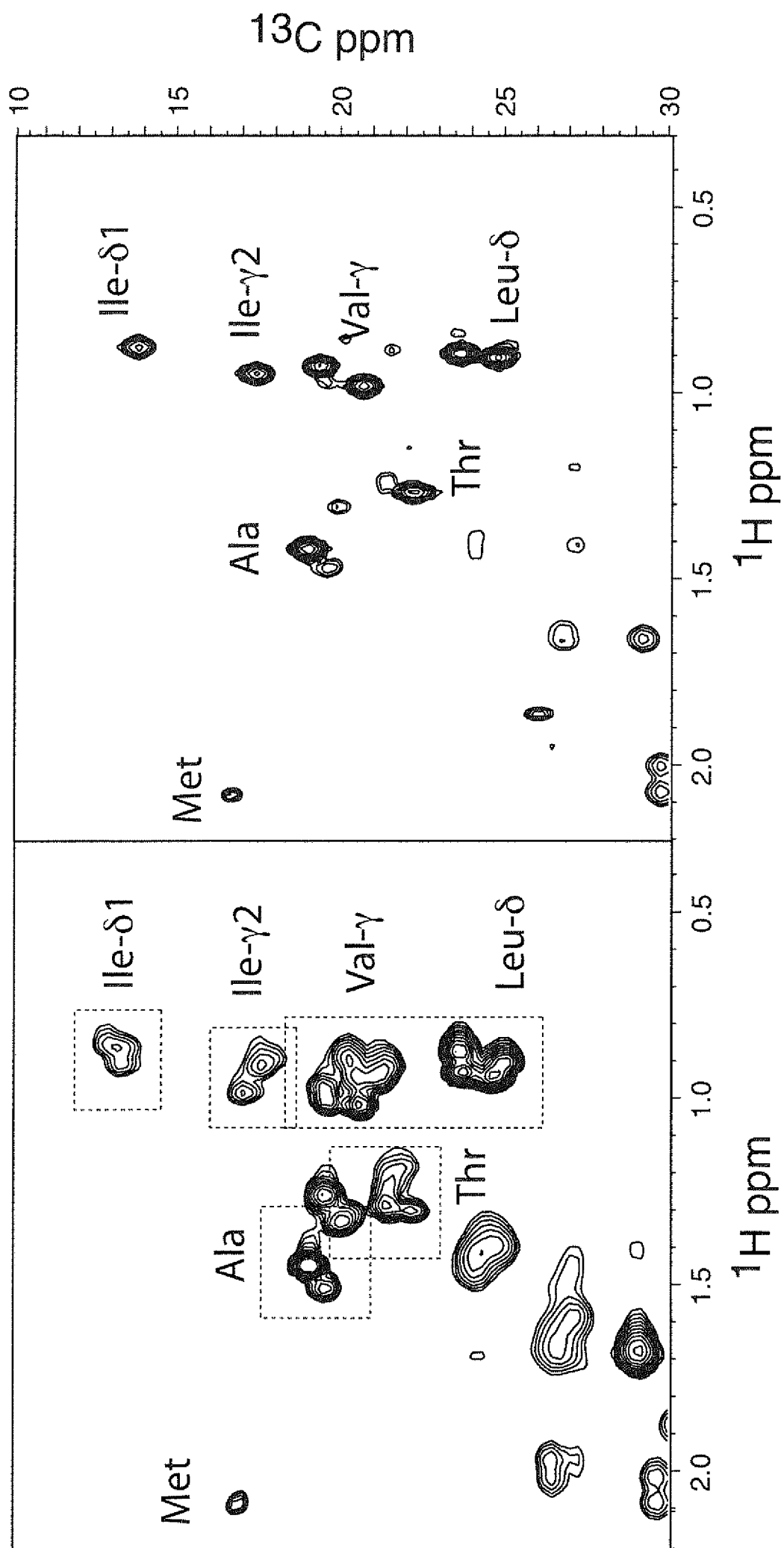


Figure 2

Figure 3

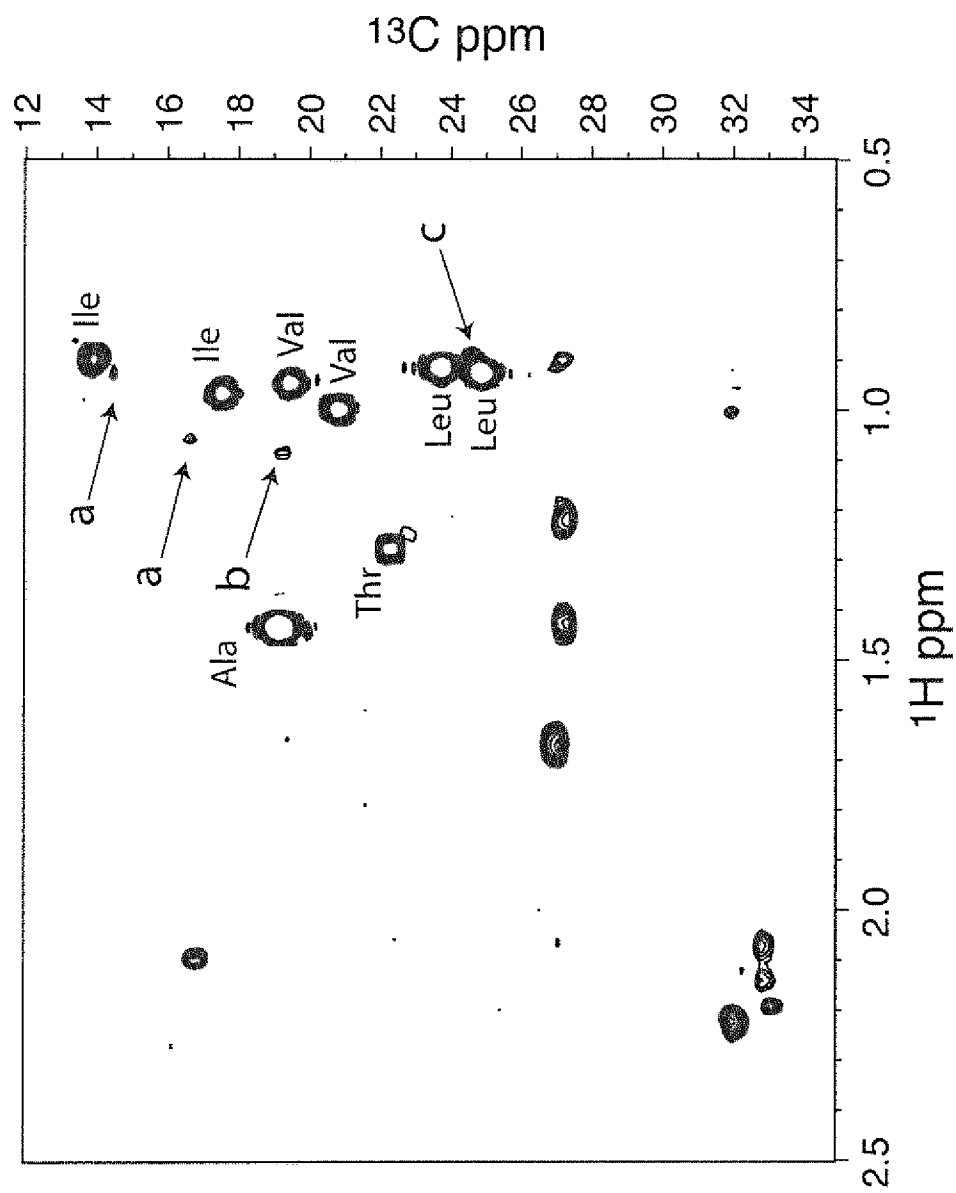
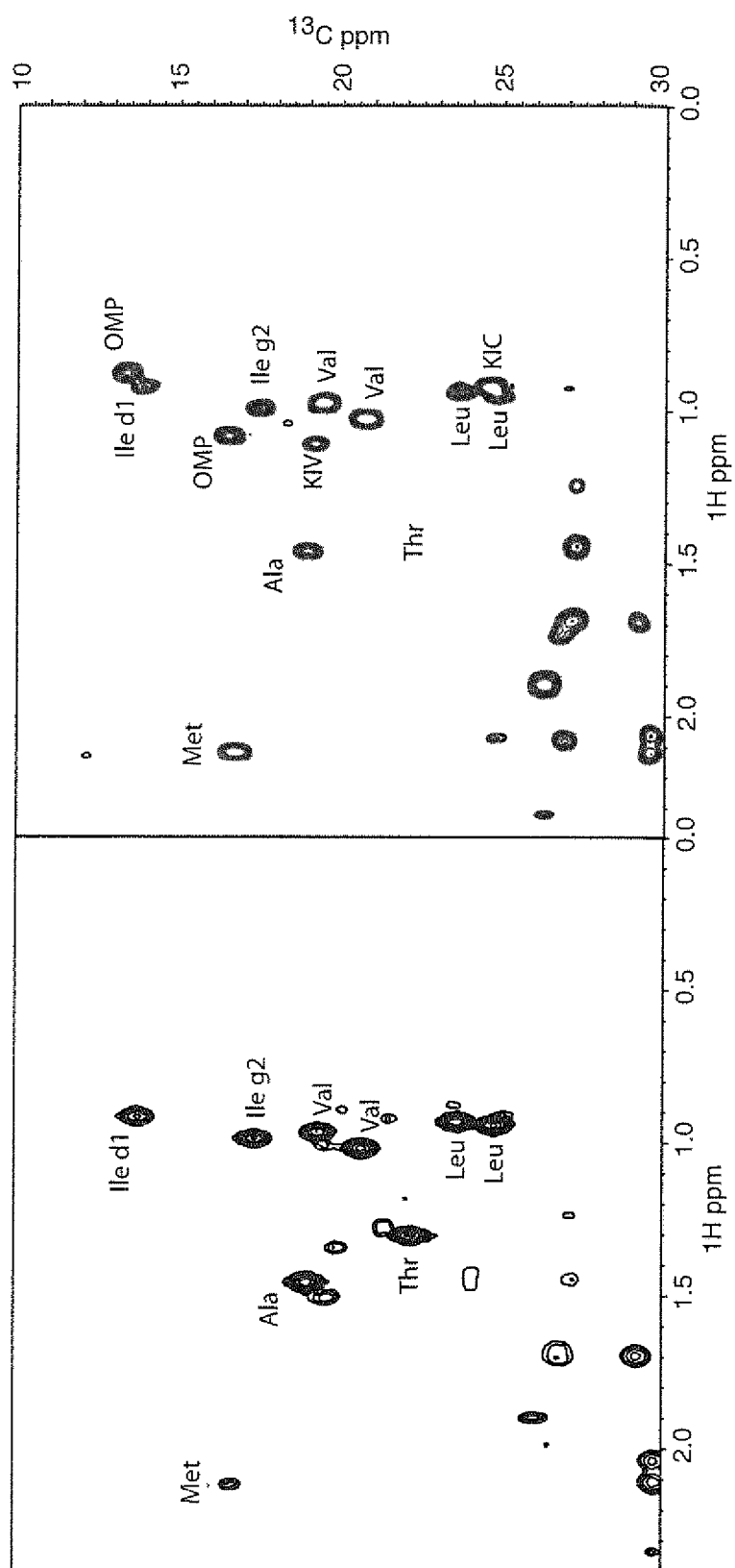


Figure-4



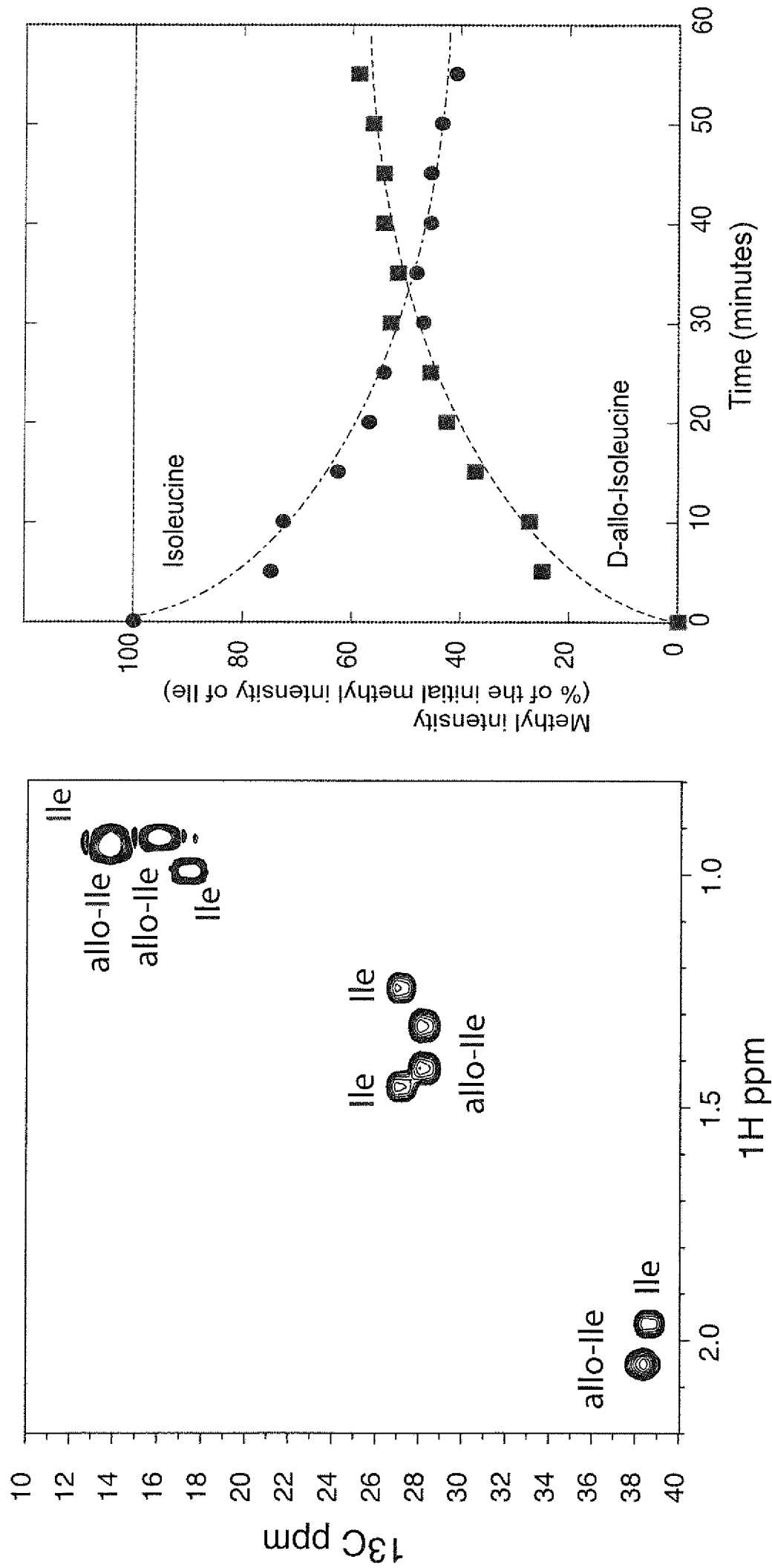


Figure 5

Figure 6

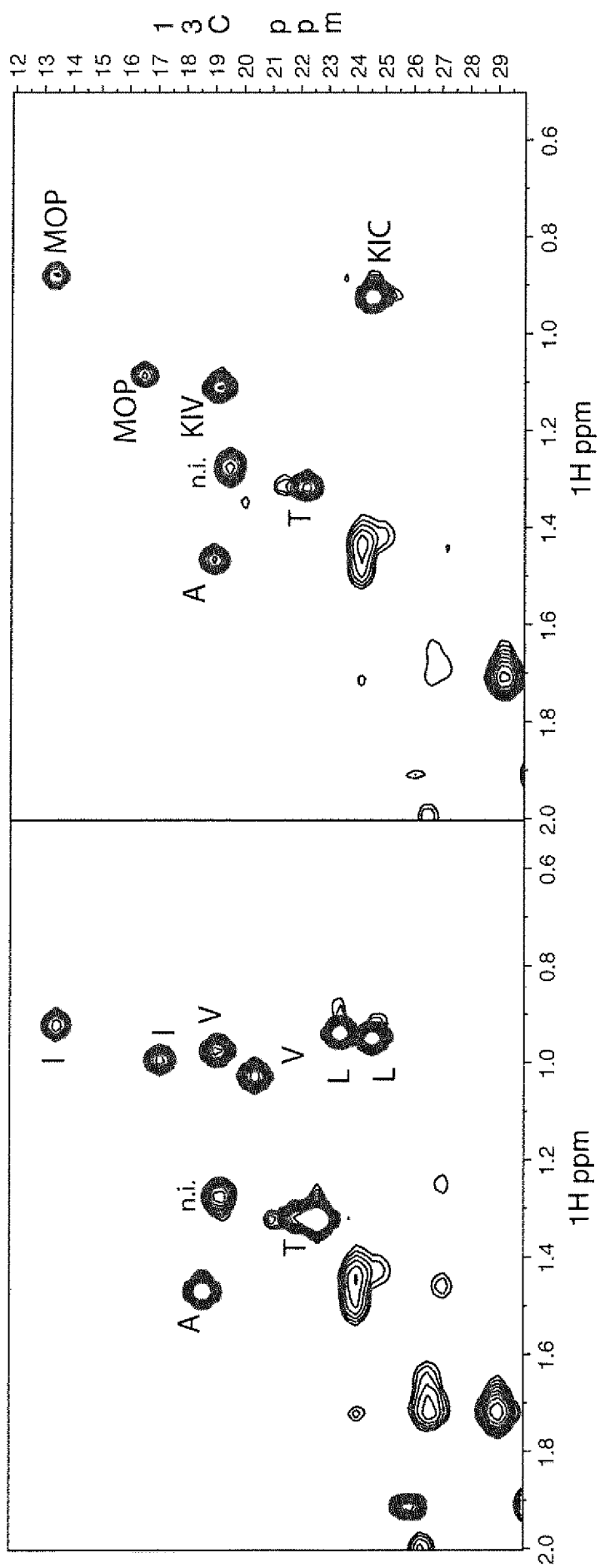


Figure 7

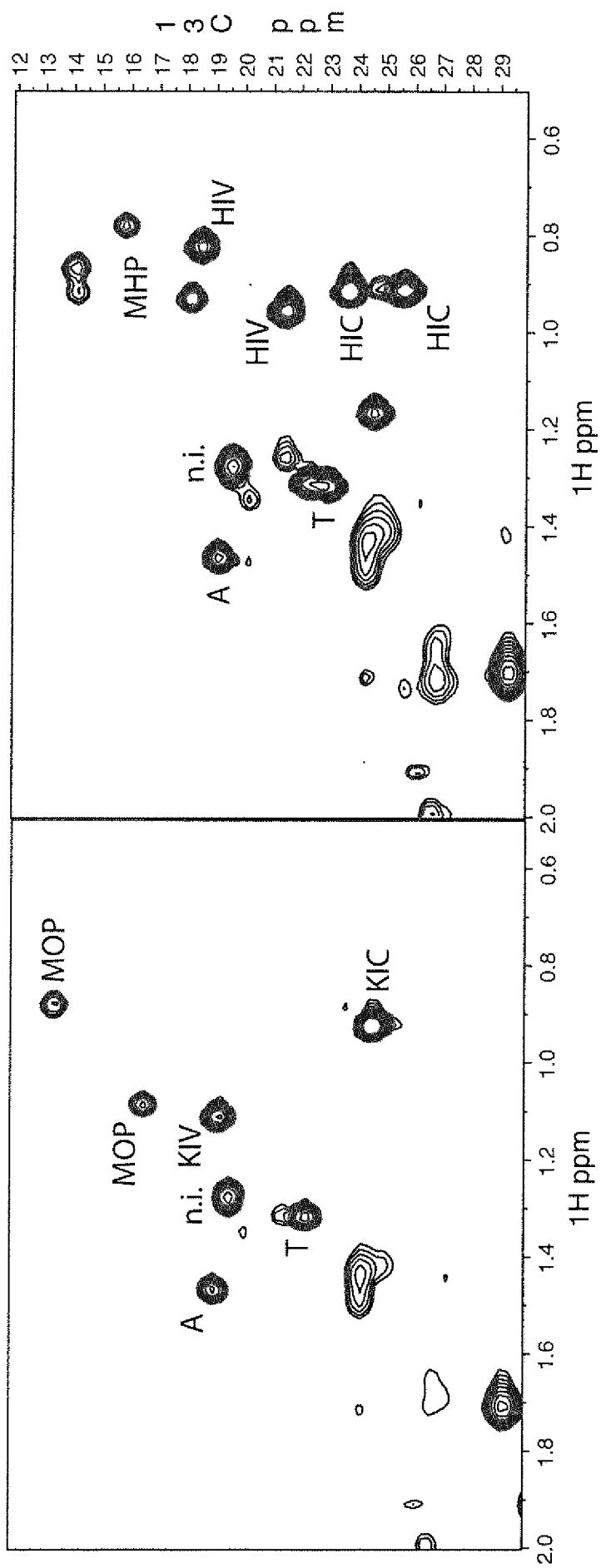


Figure 8

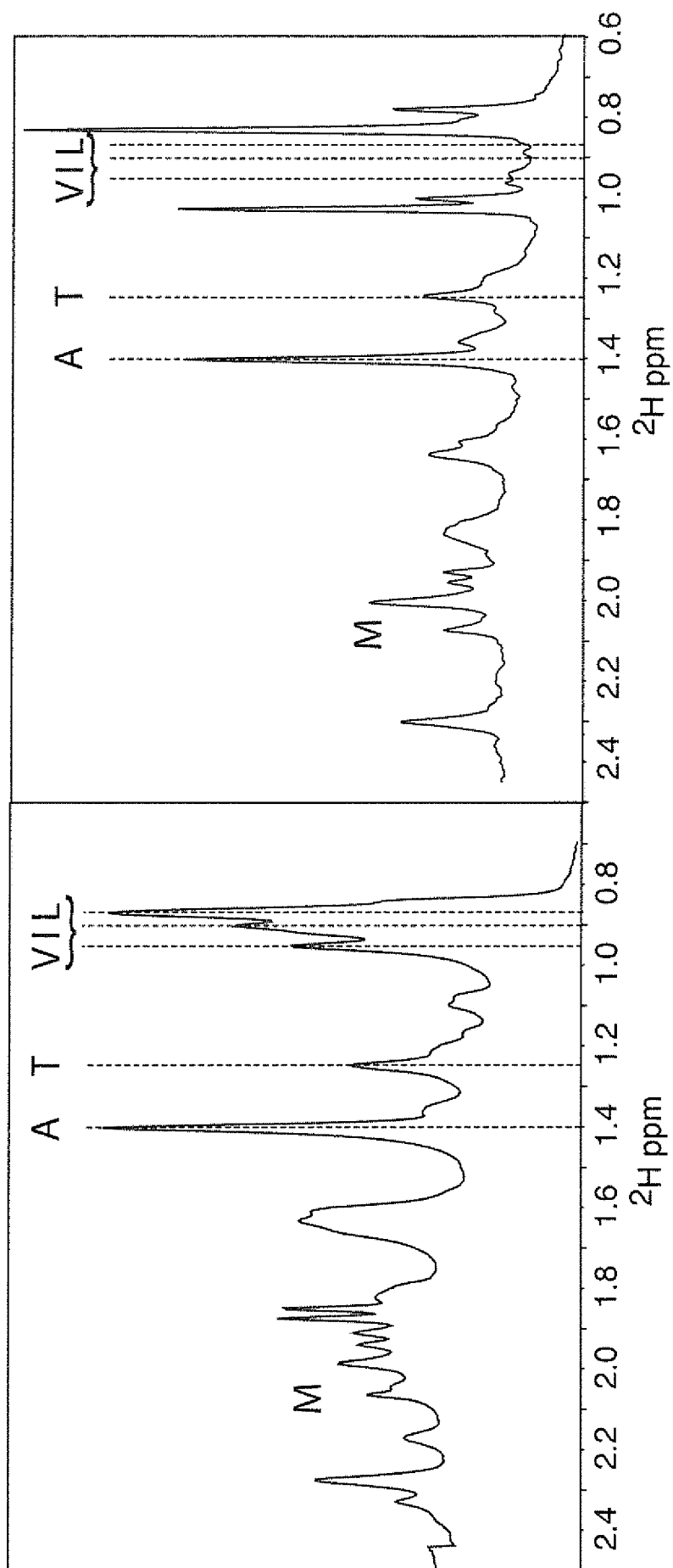


Figure 9

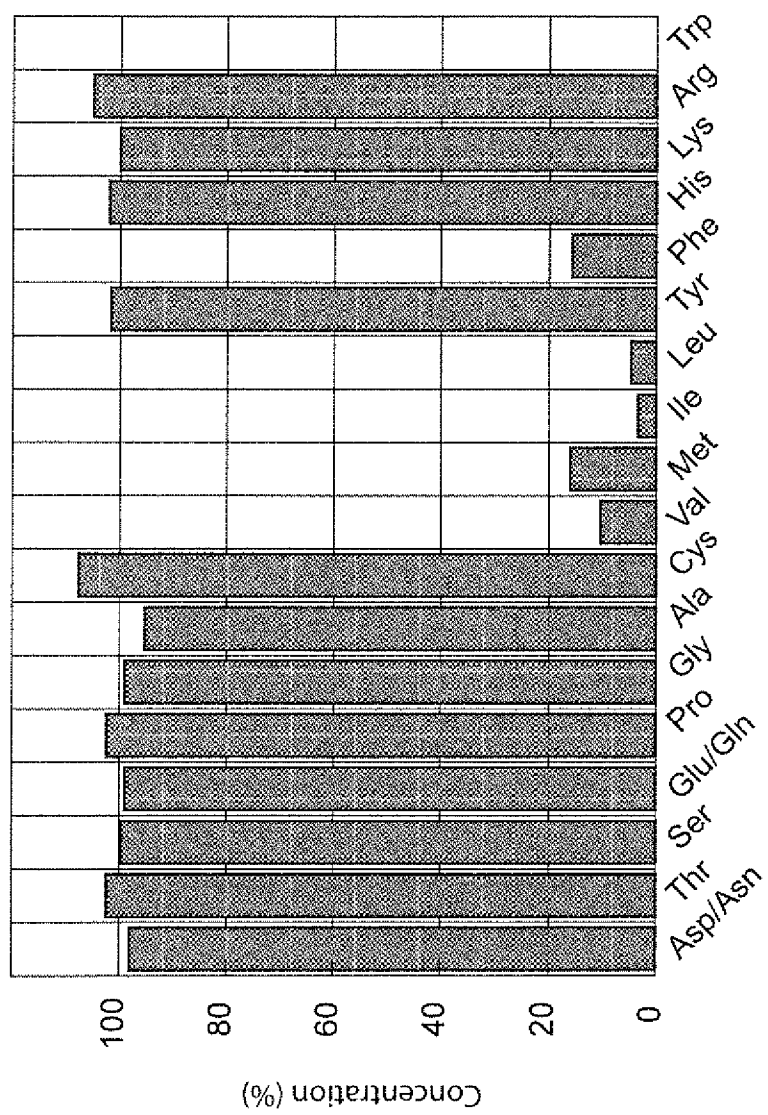


Figure 10

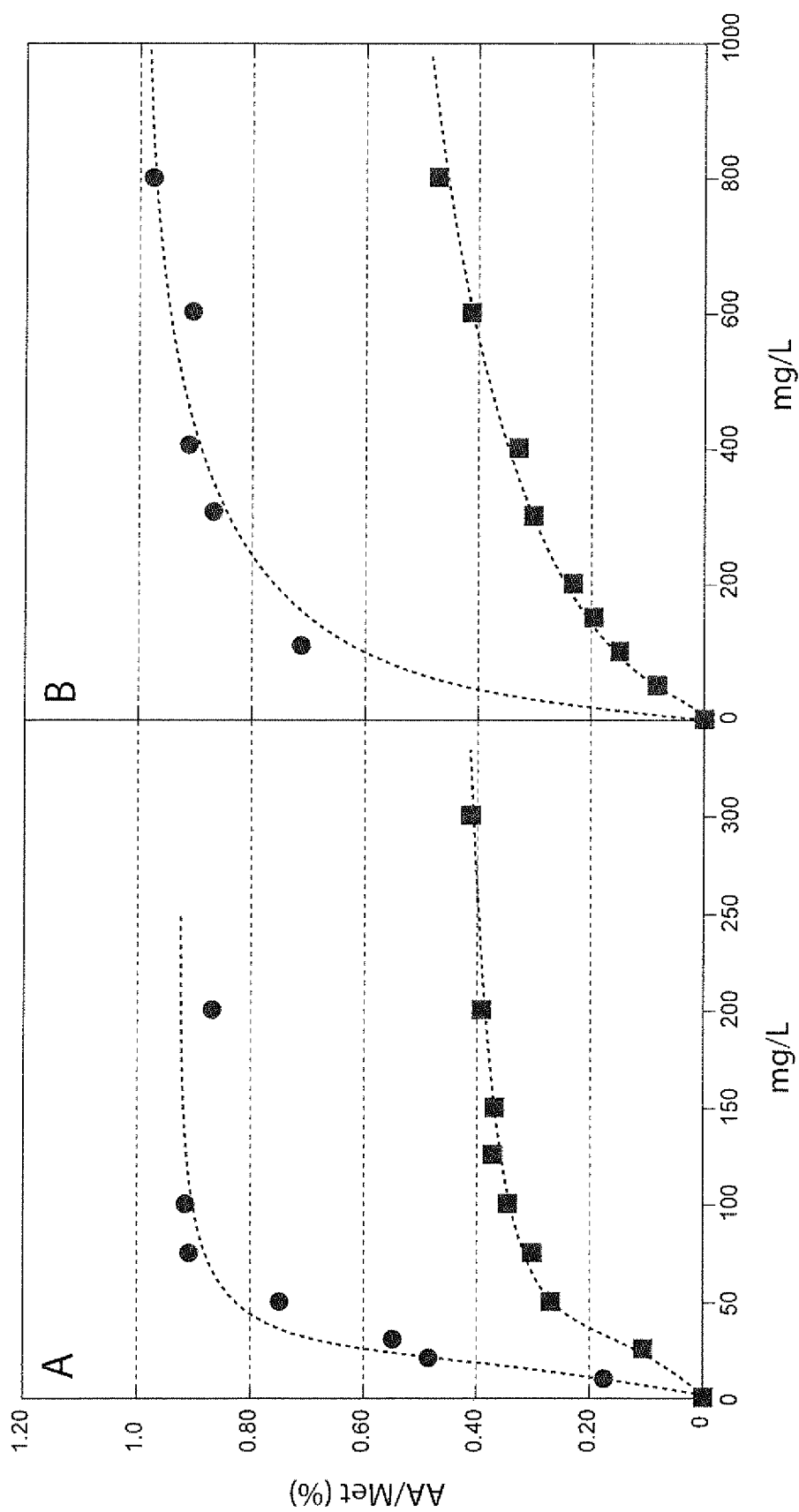
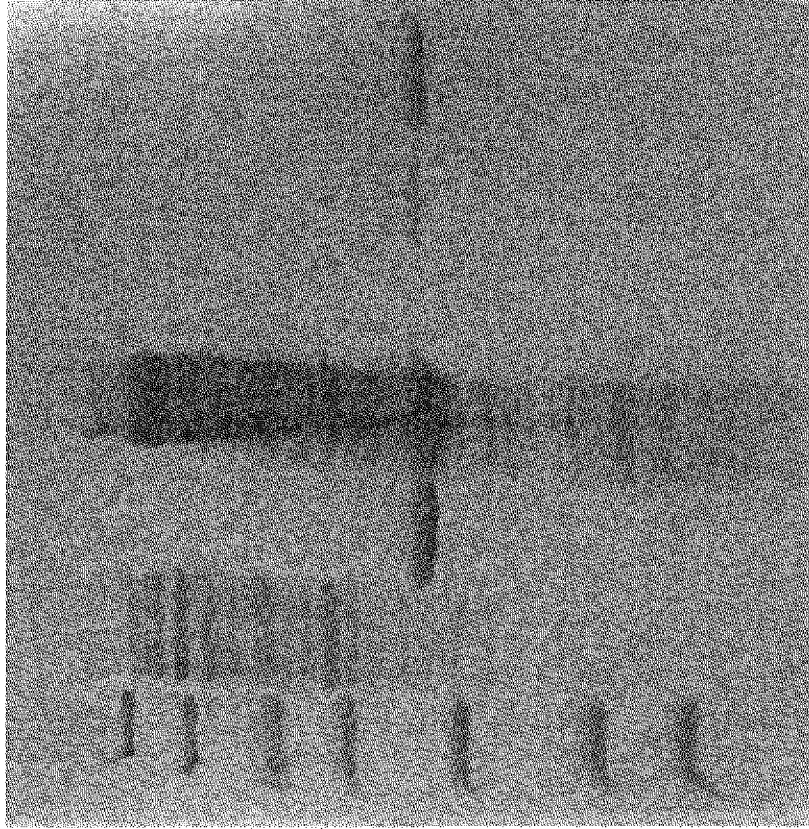


Figure 11

PBP_{K15}

M A1 A2 A3 A4 A5 A6



LDT_{MT1}

M B1 B2 B3 B4 B5 B6

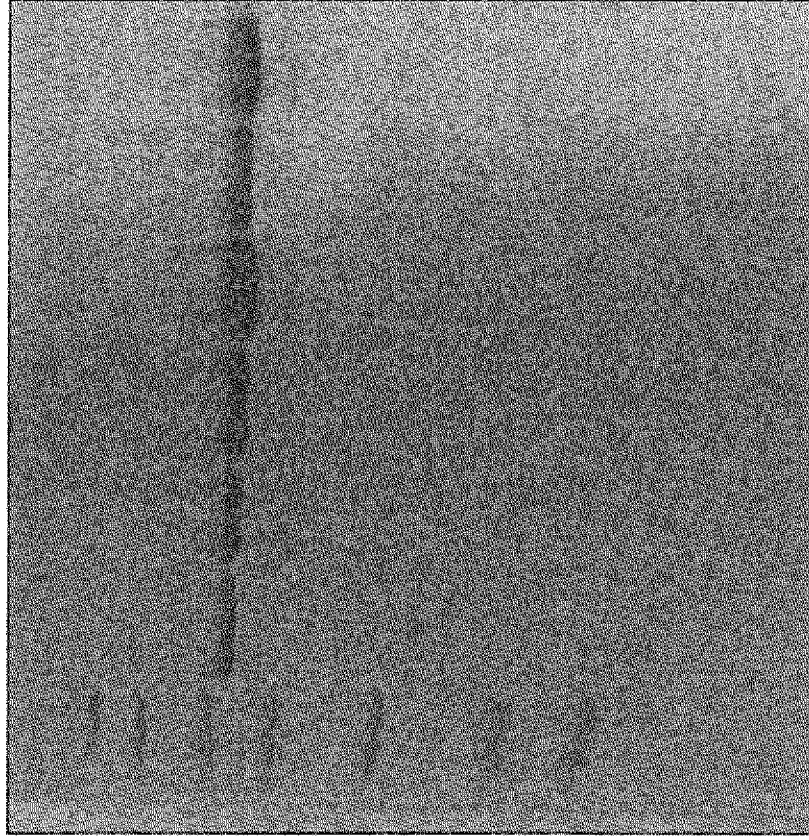


Figure 12

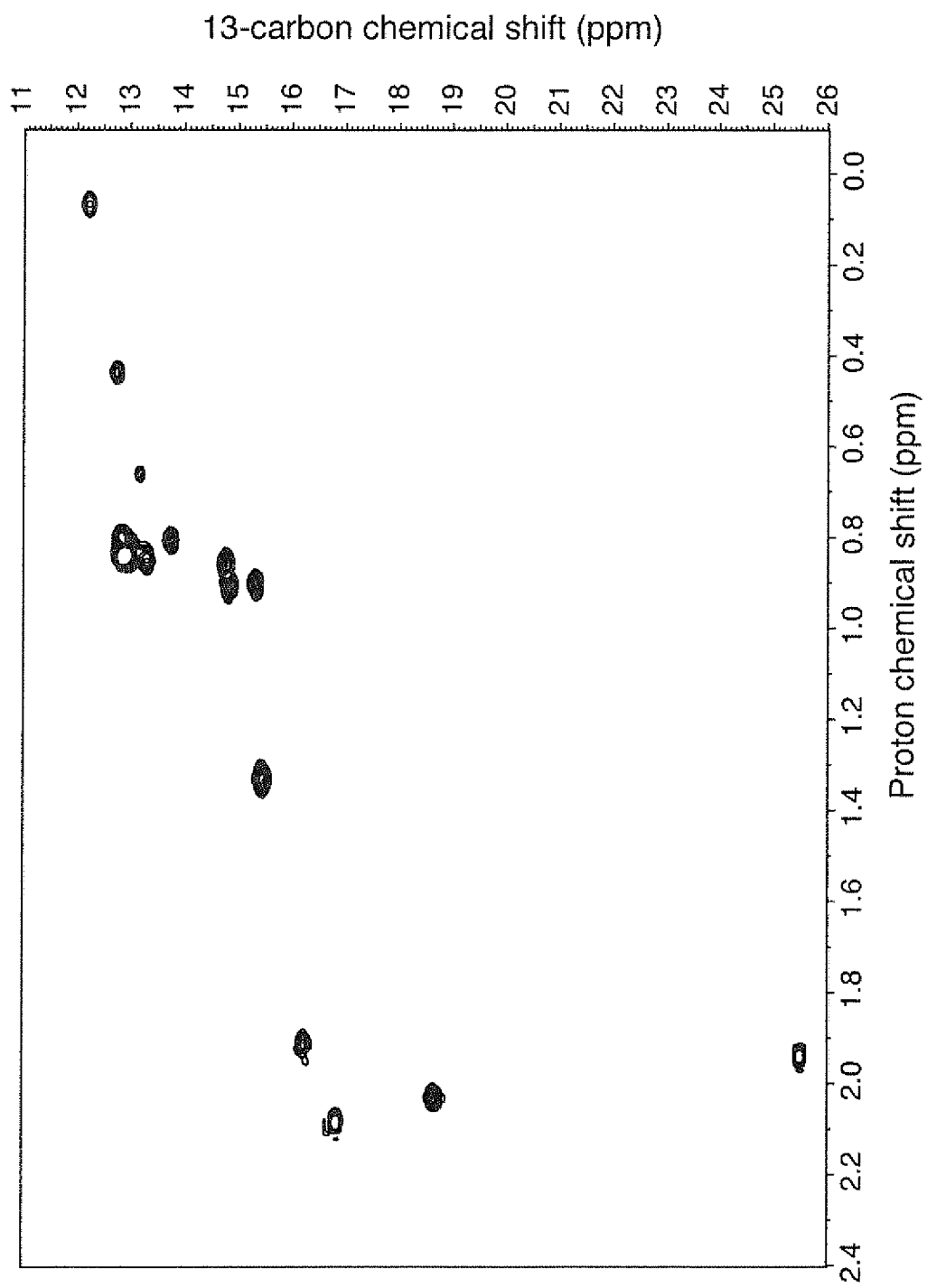


Figure 13

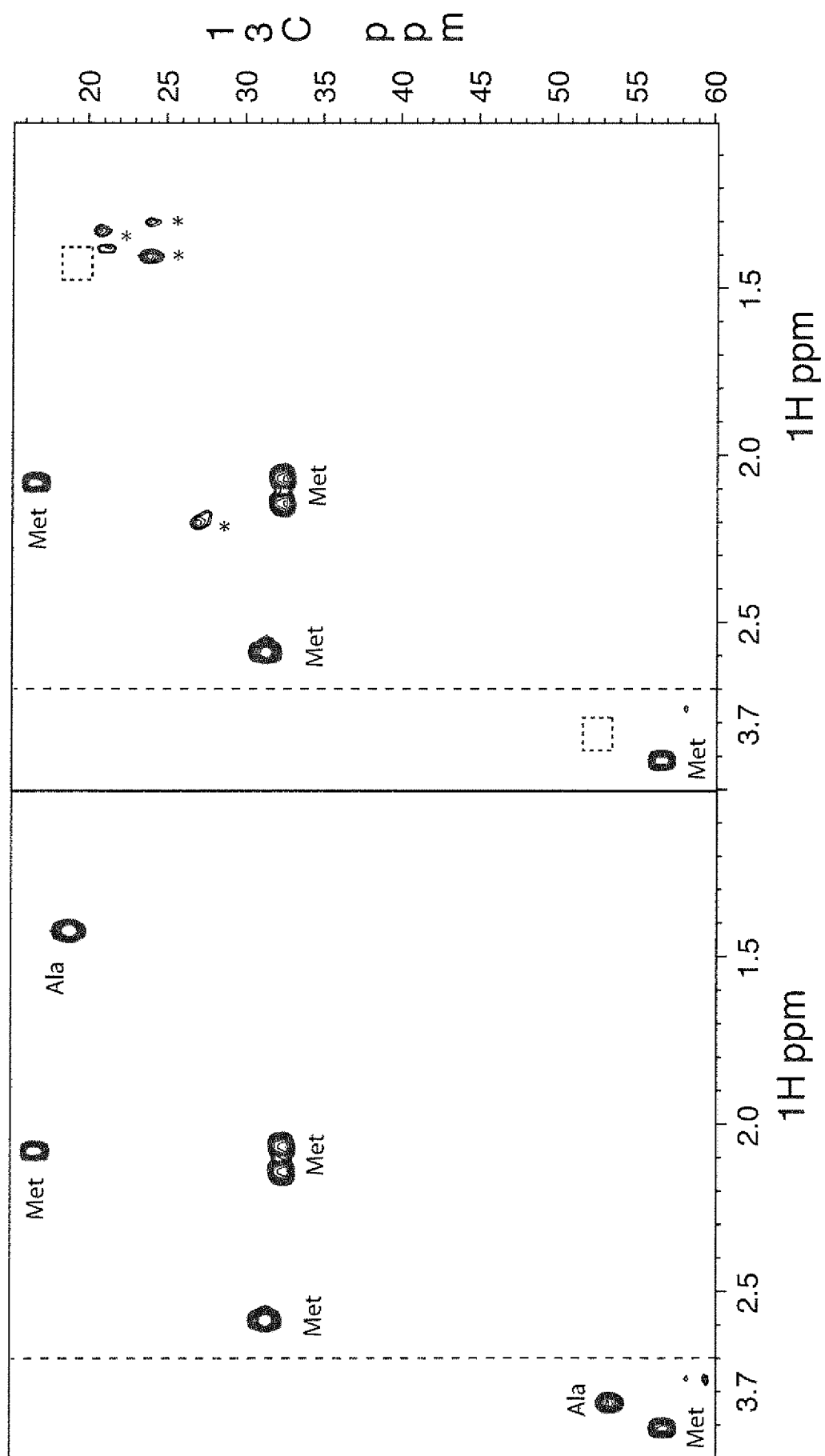


Figure 14

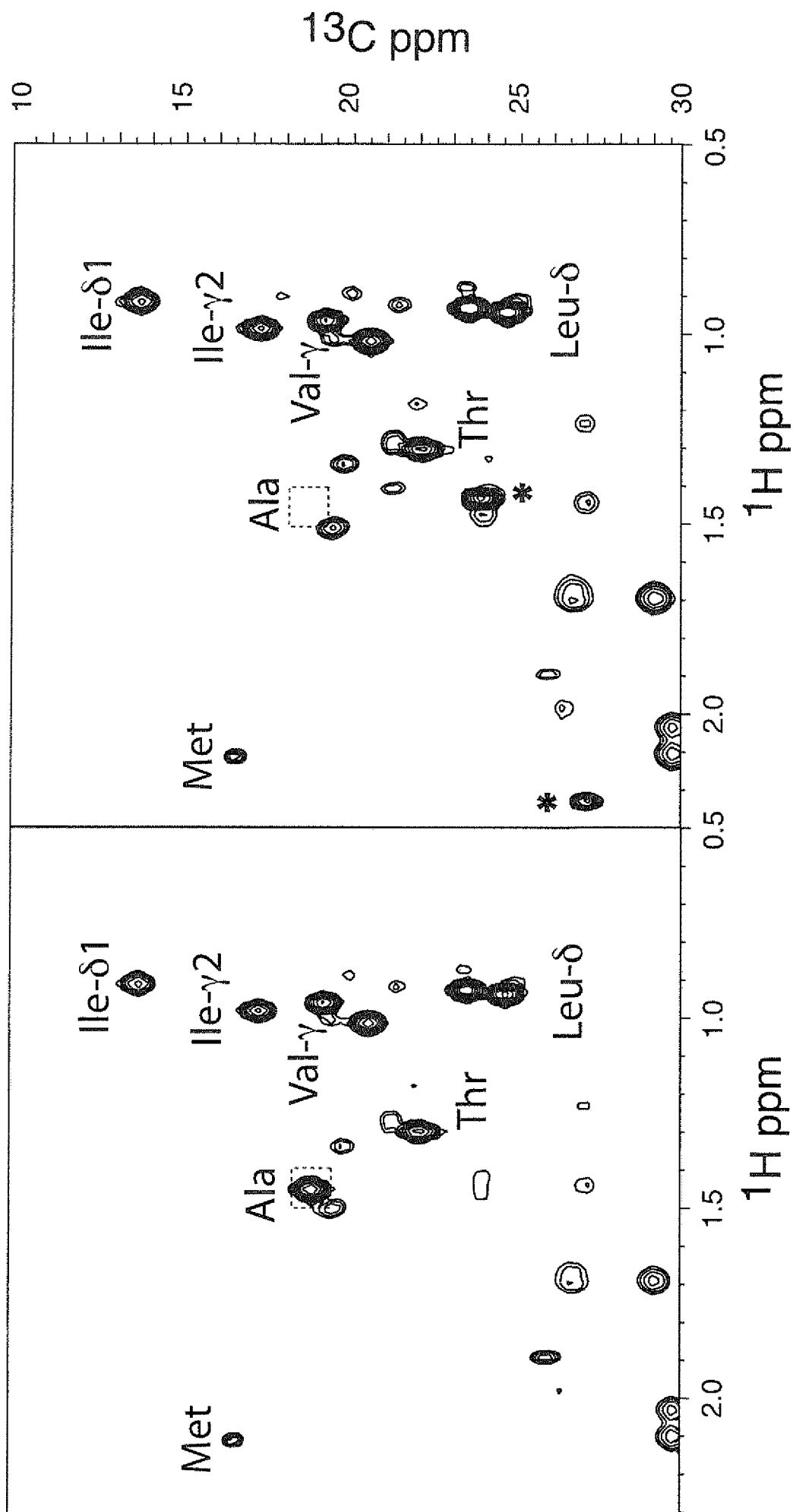


Figure 15

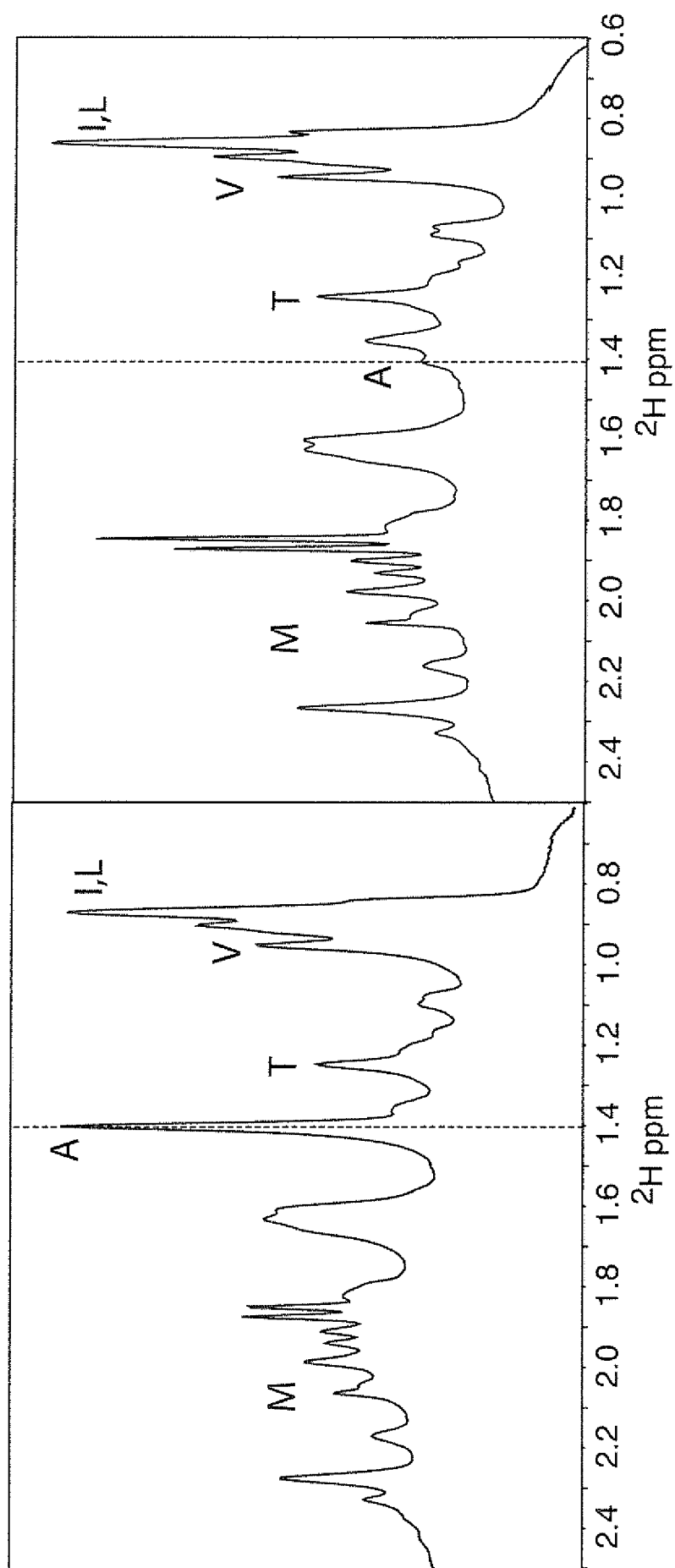


Figure 16

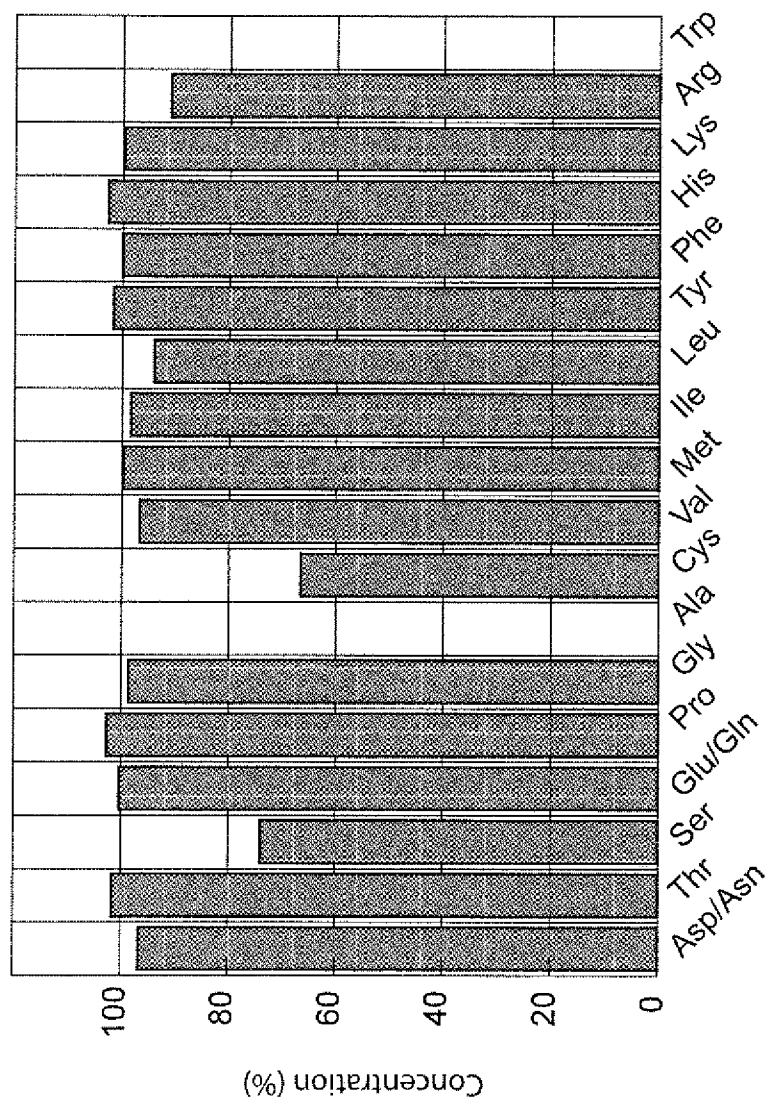
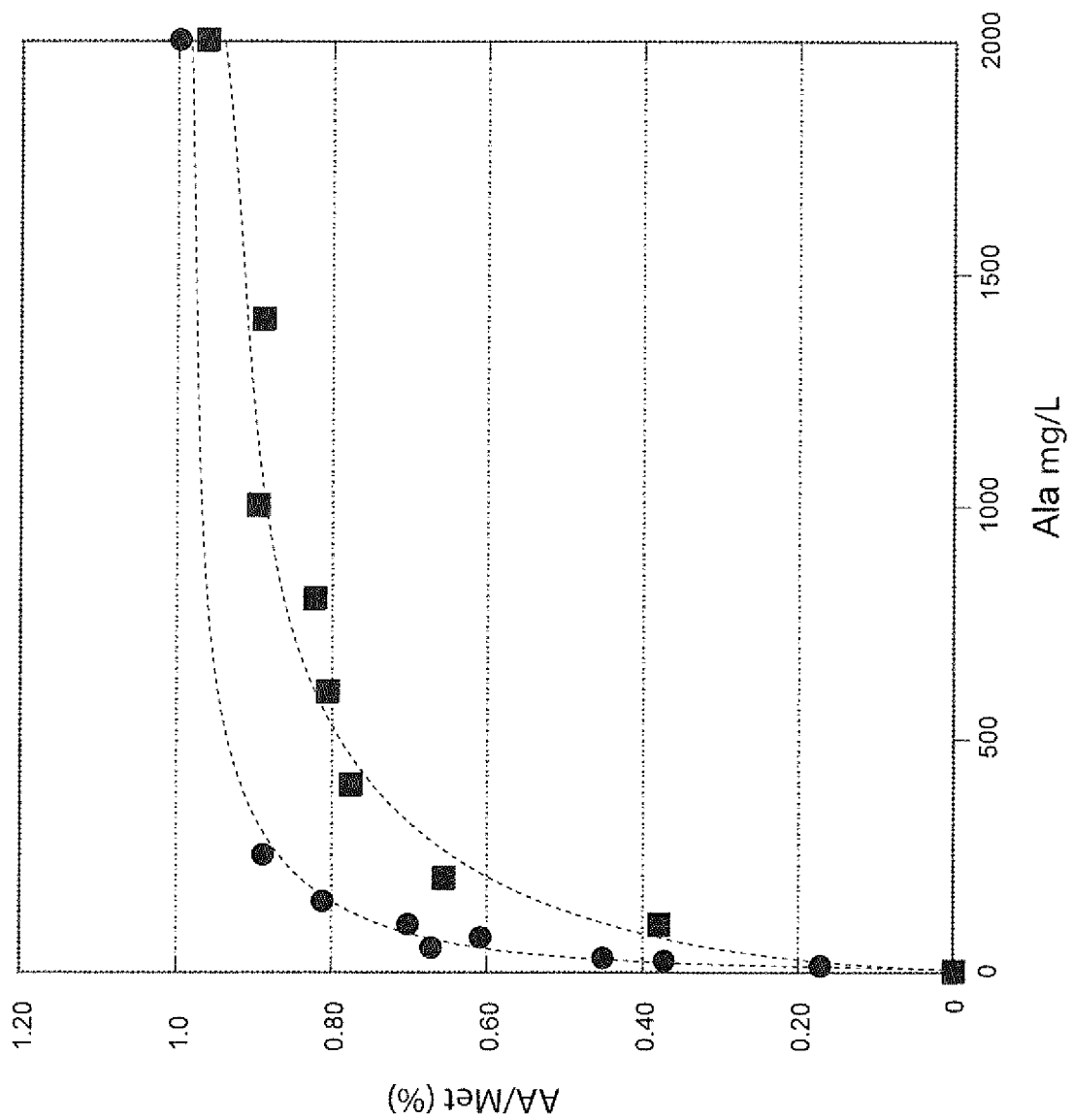


Figure 17



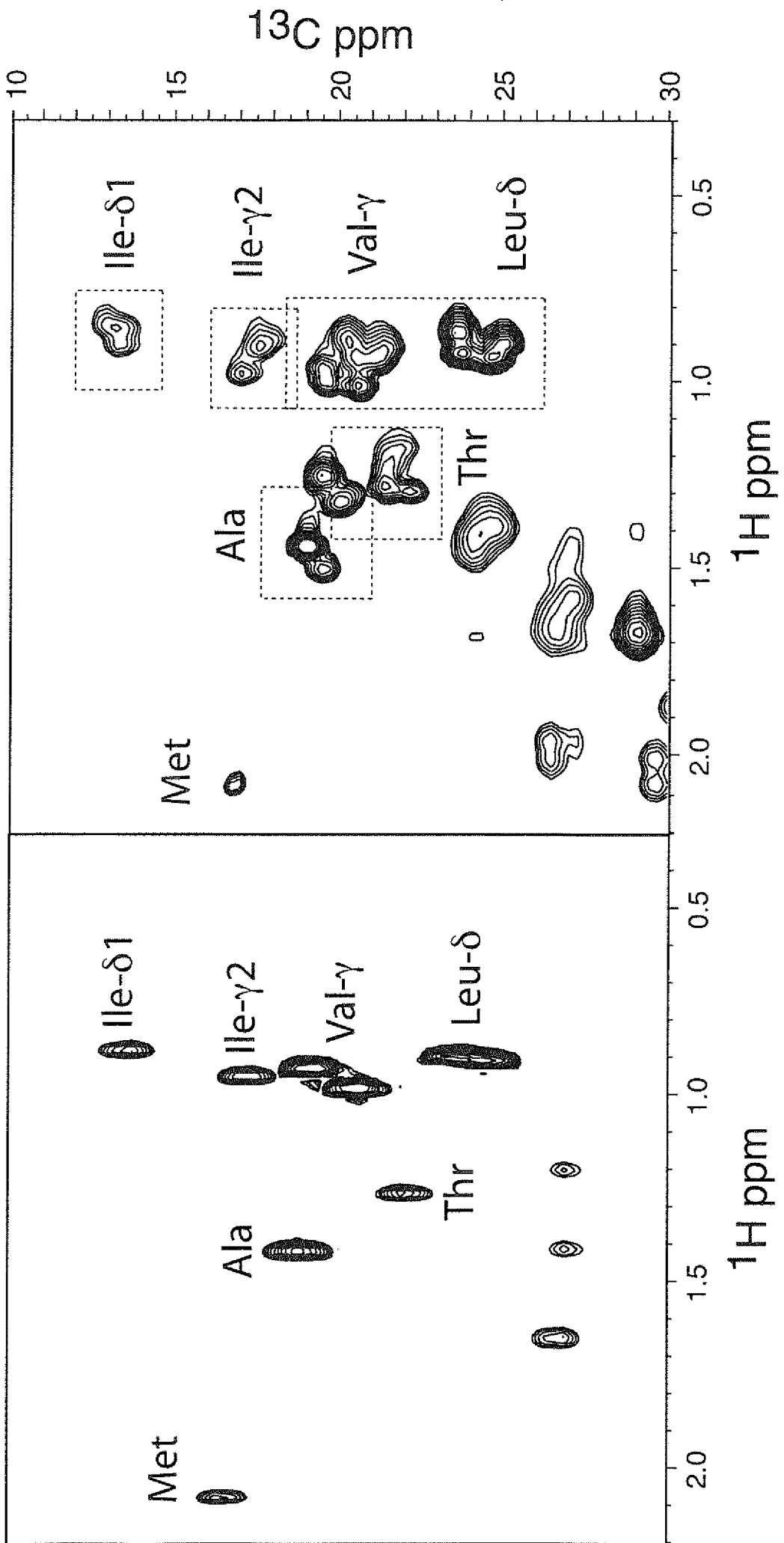


Figure 1

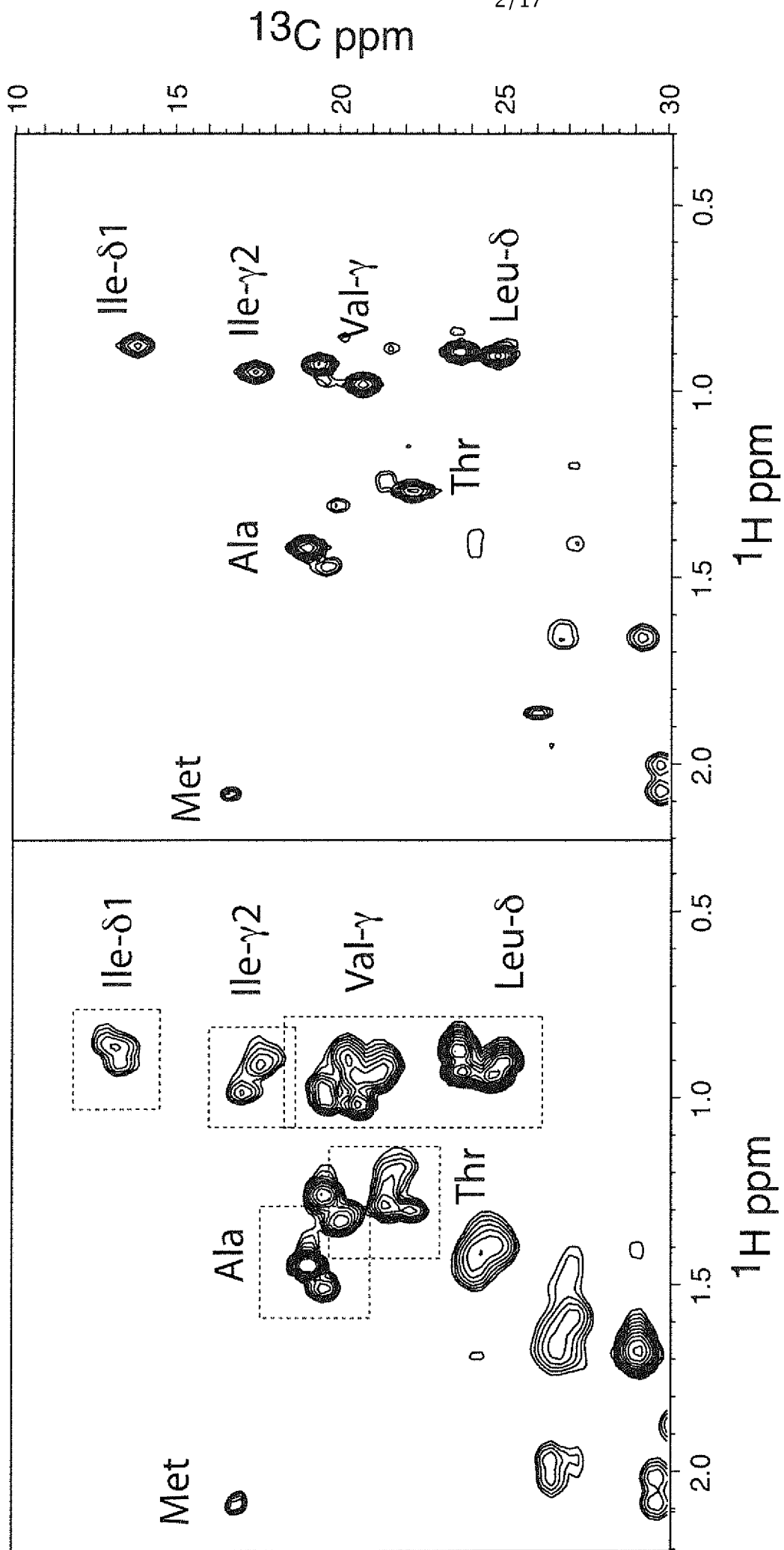


Figure 2

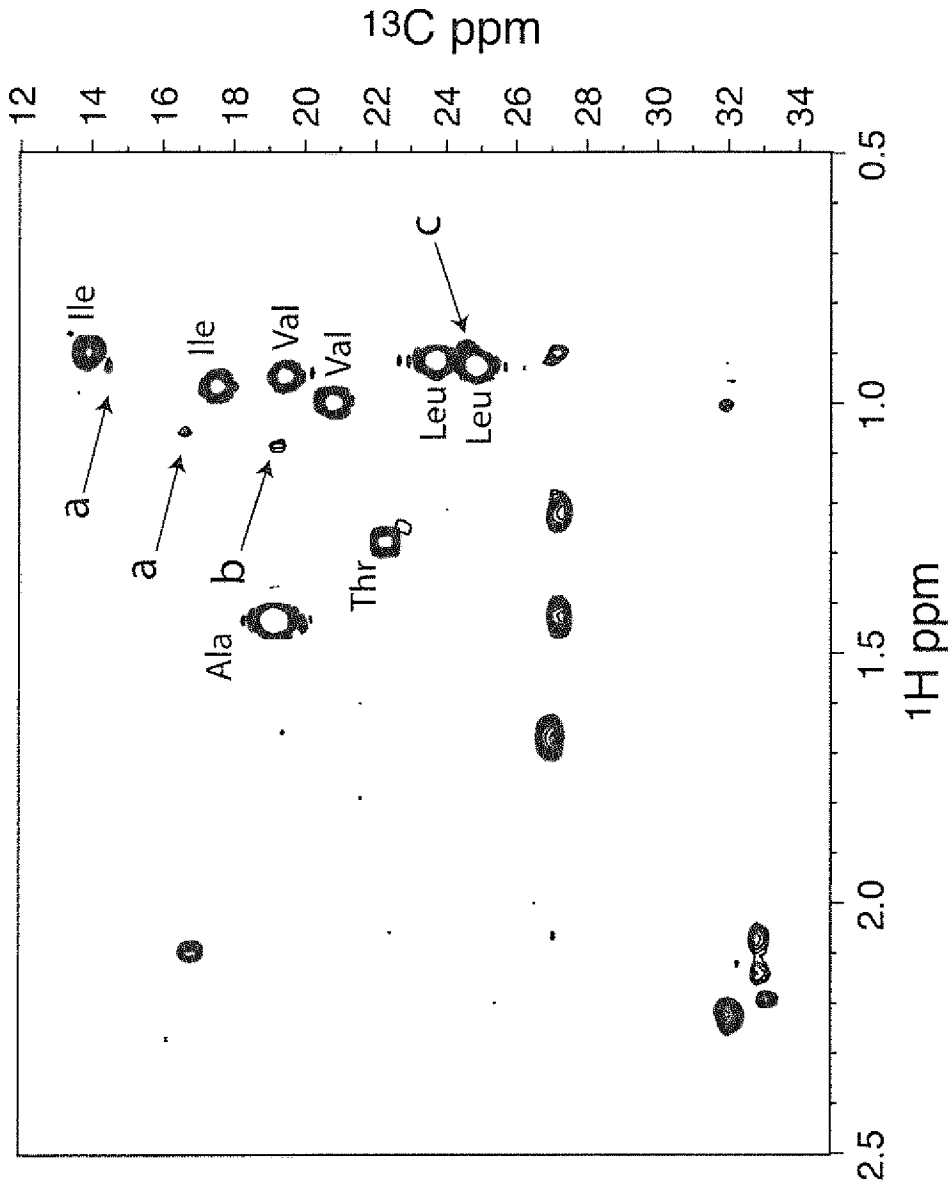
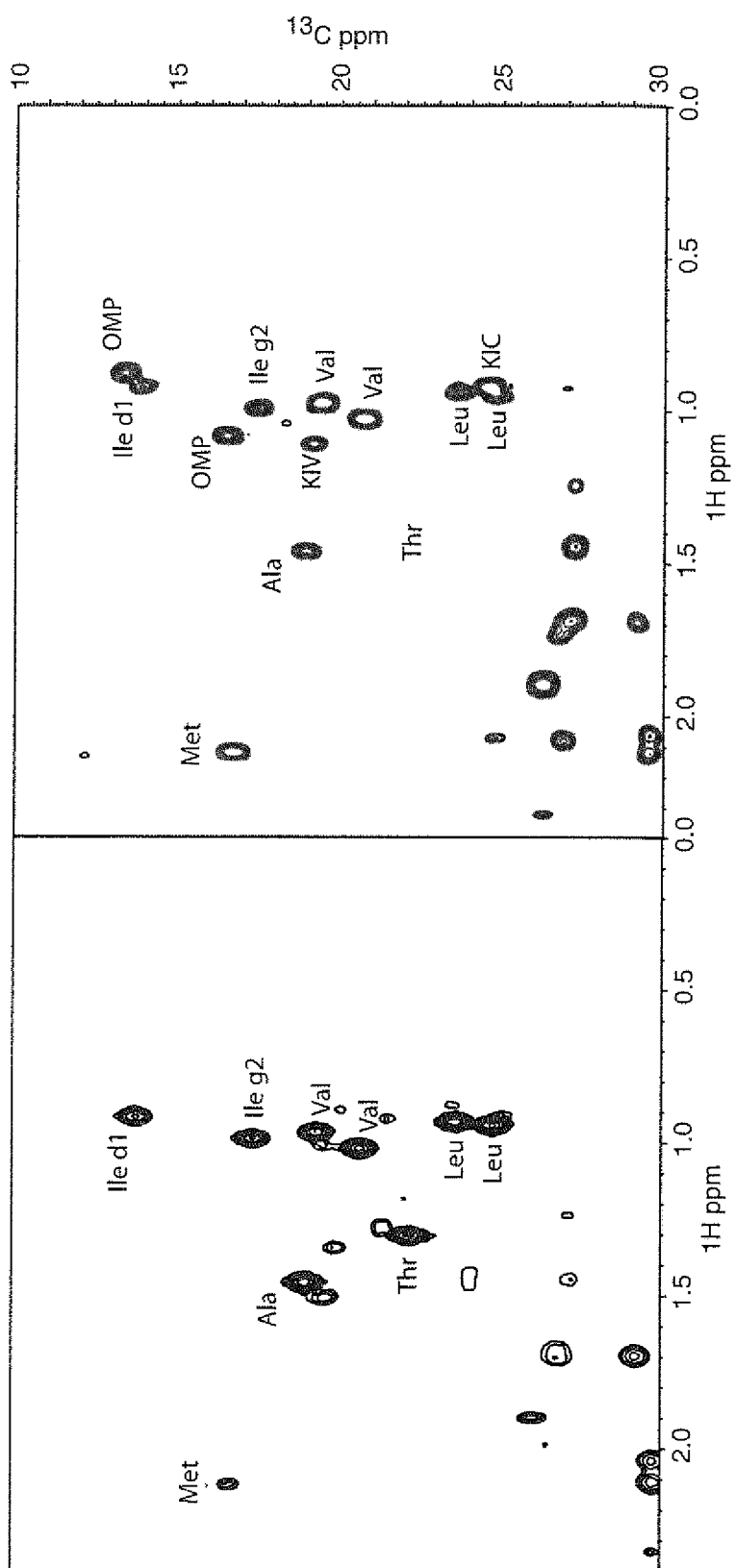


Figure 3

Figure-4



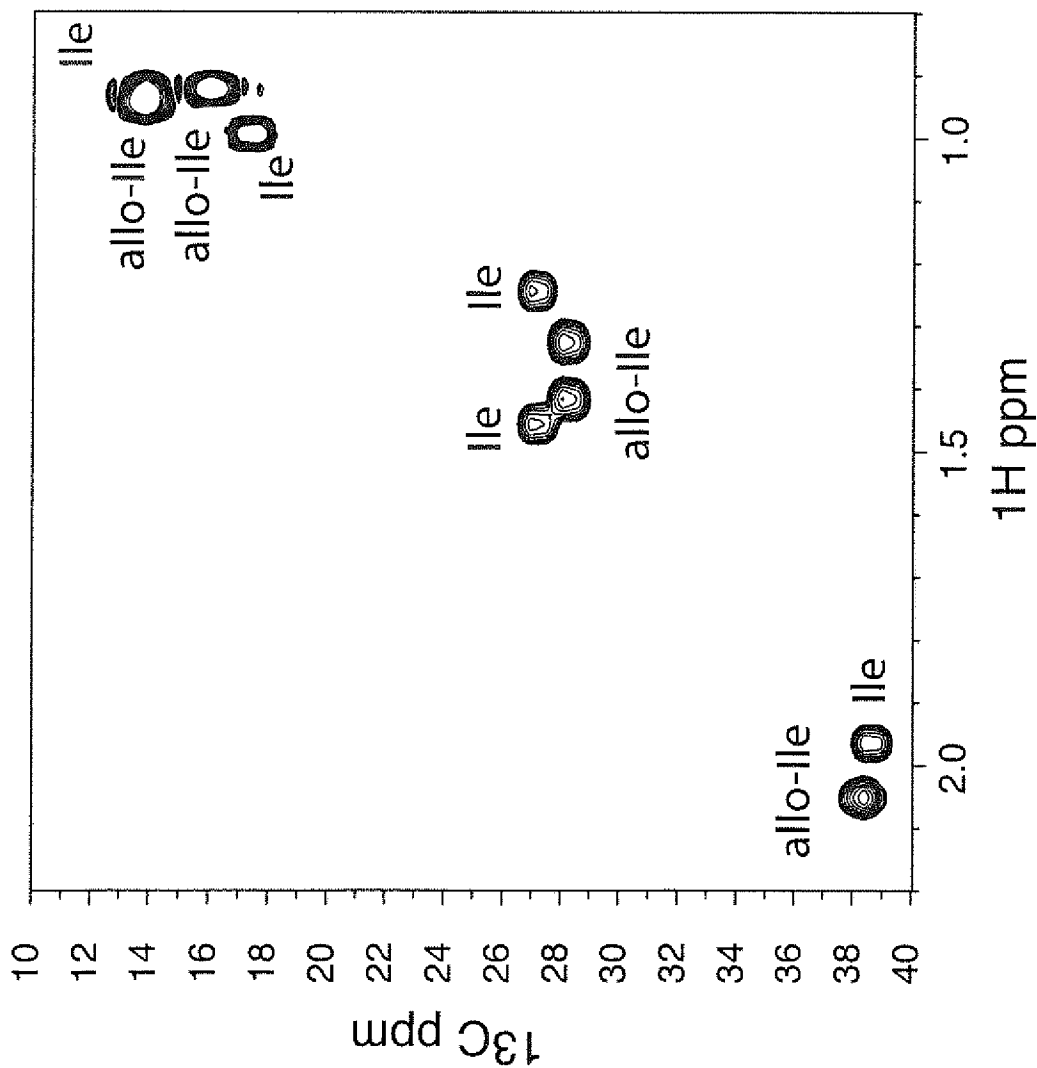
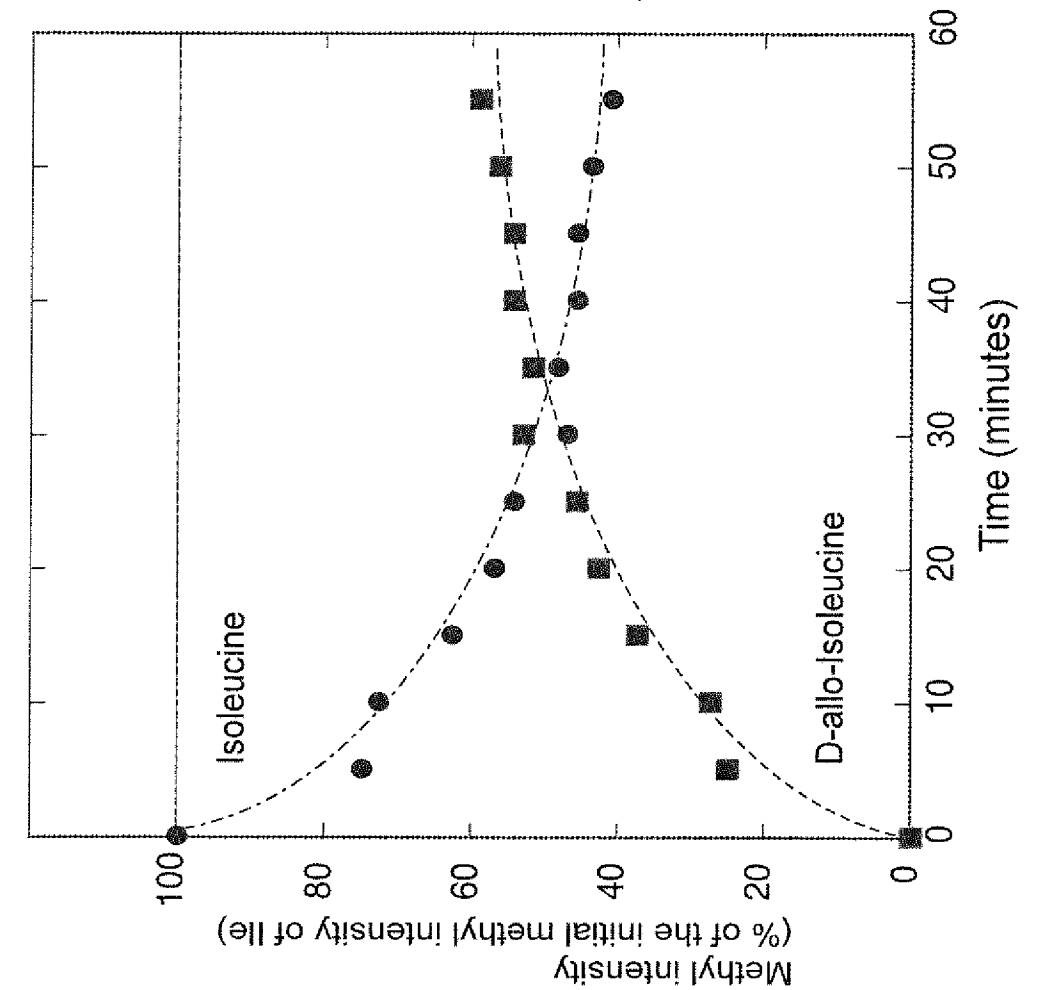


Figure 5

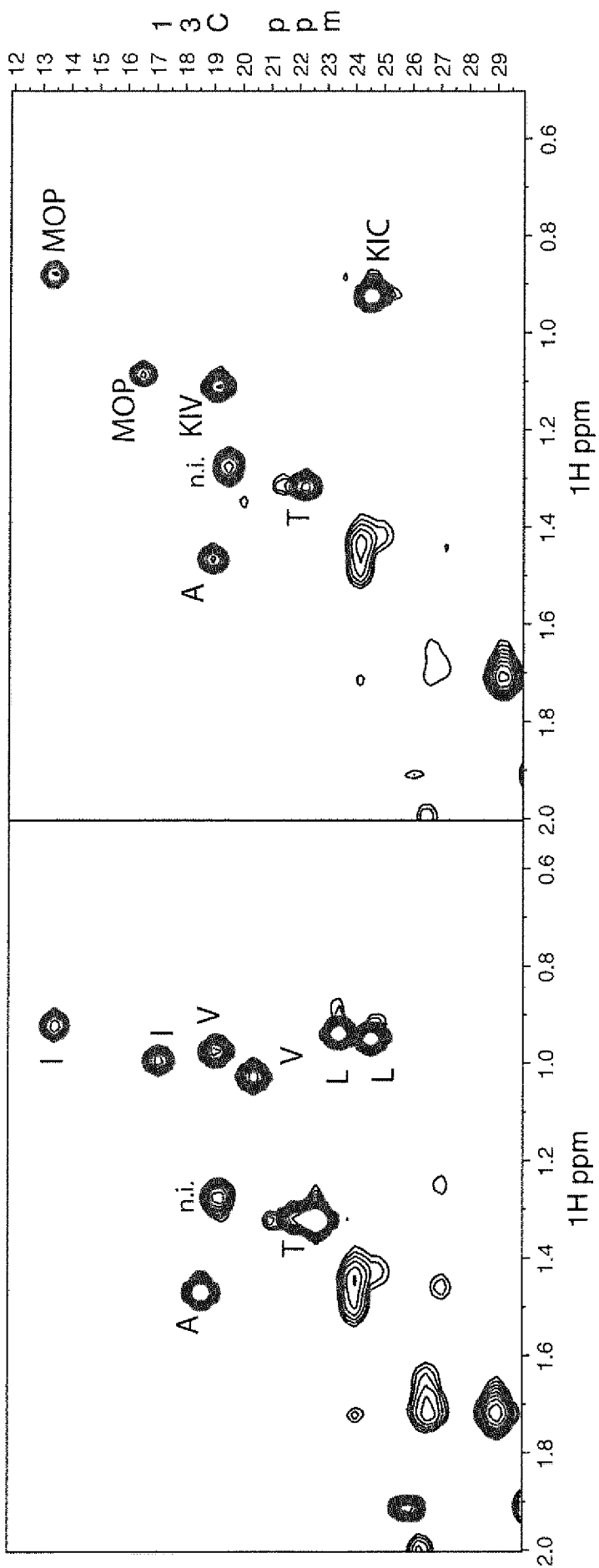


Figure 6

Figure 7

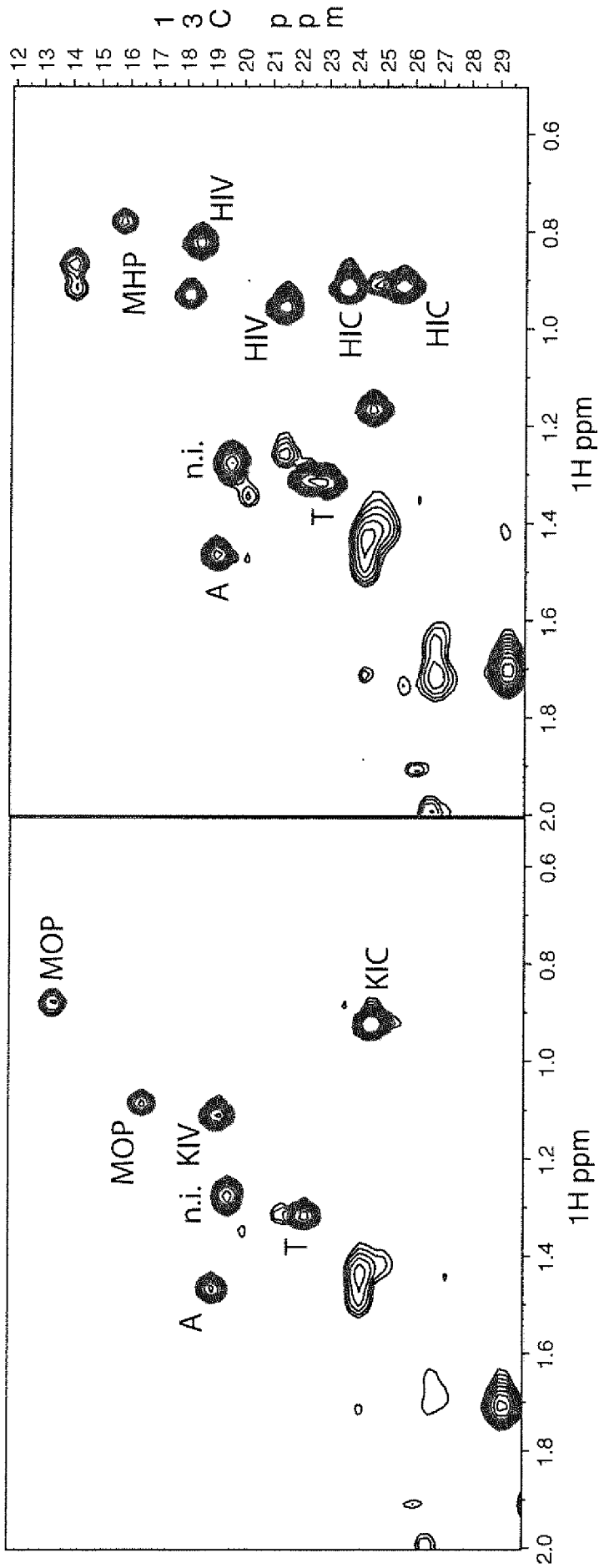


Figure 8

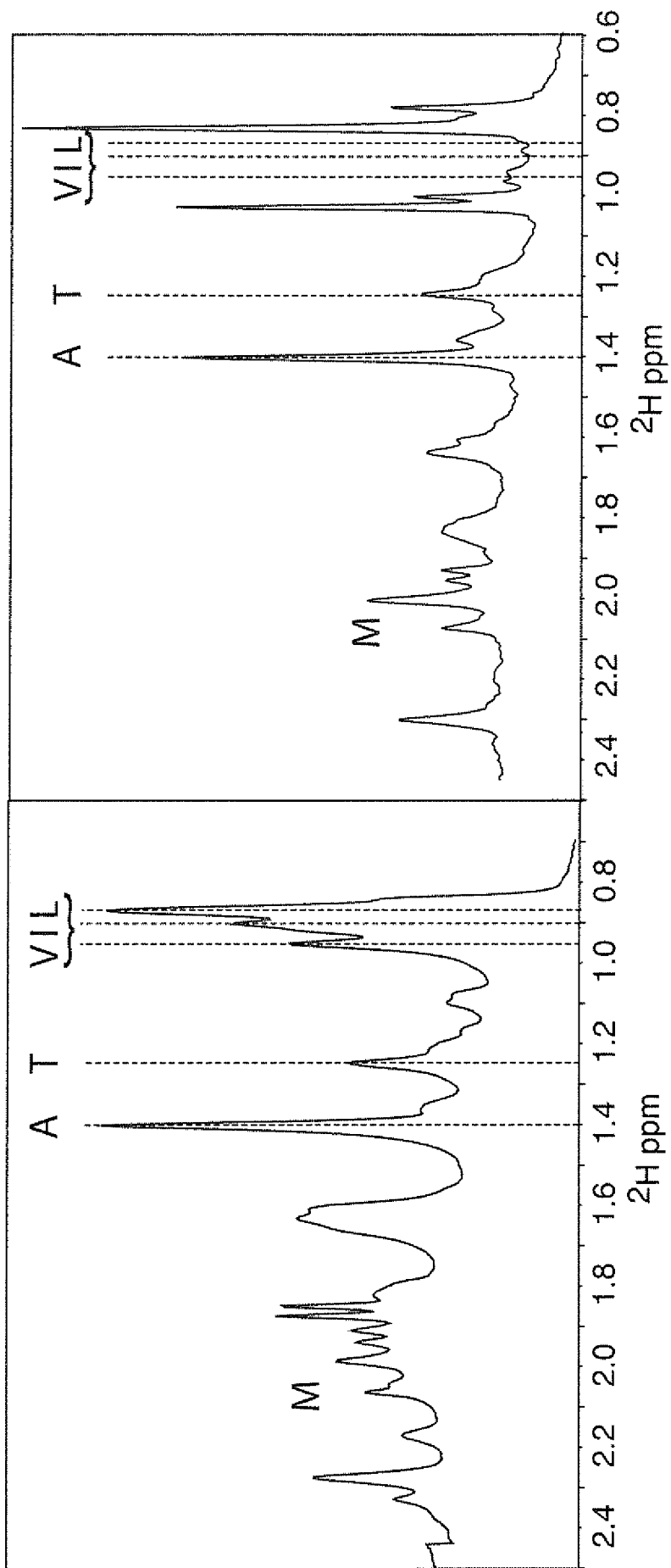
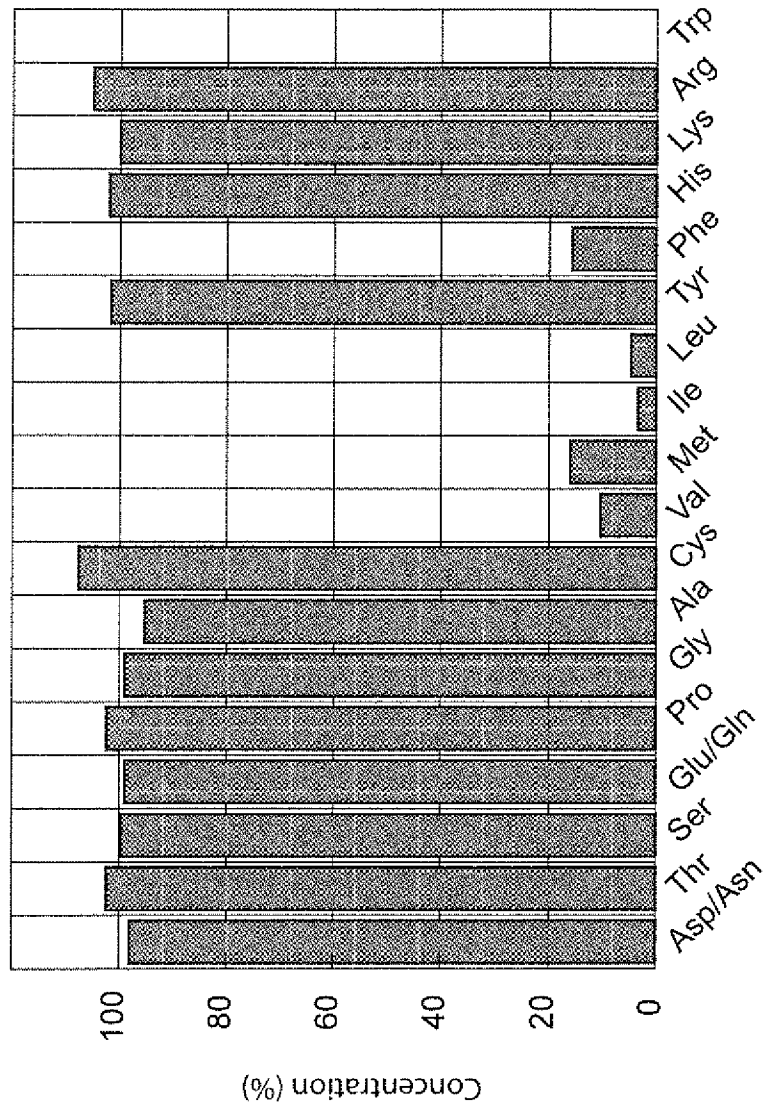


Figure 9



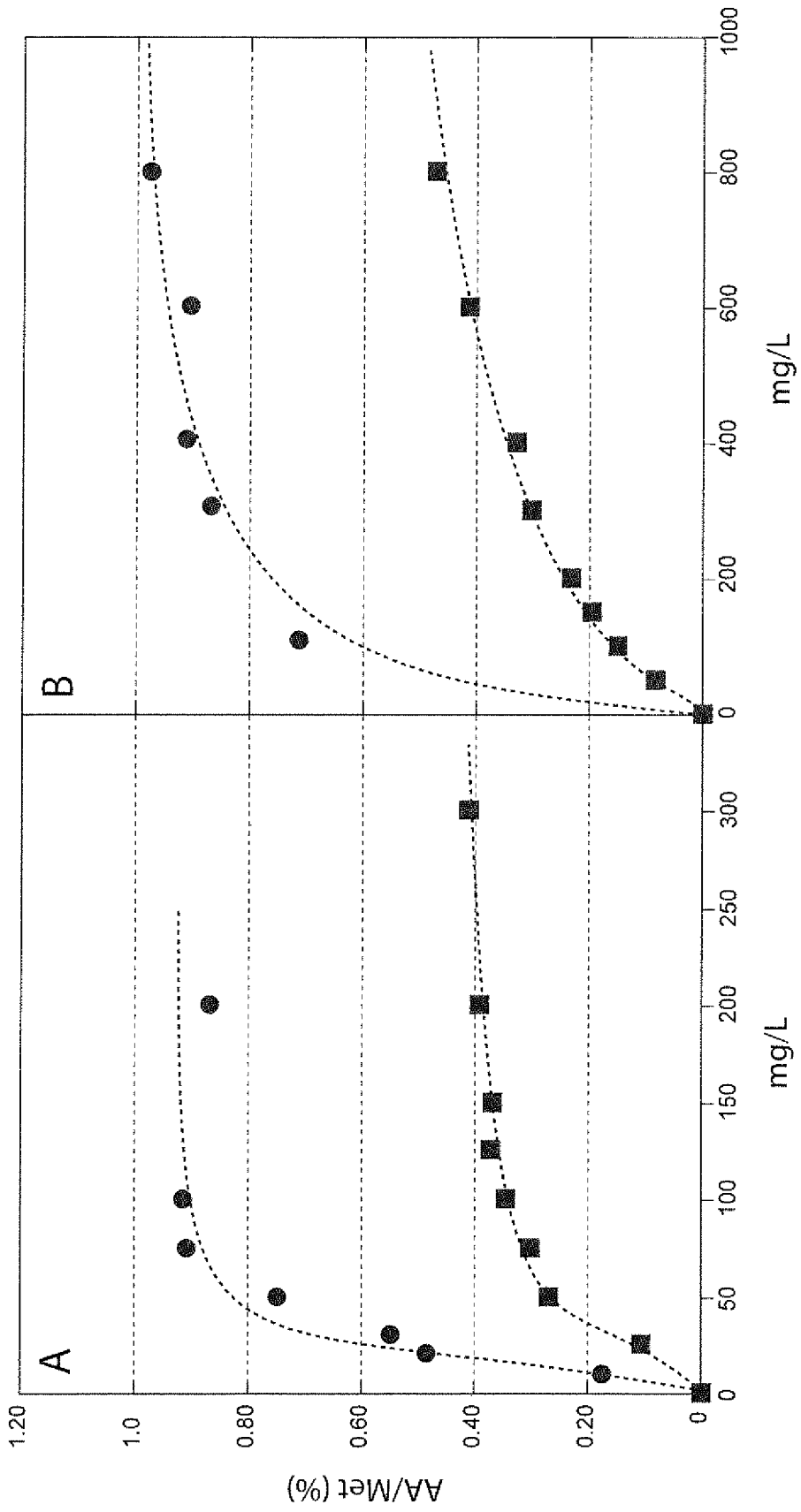
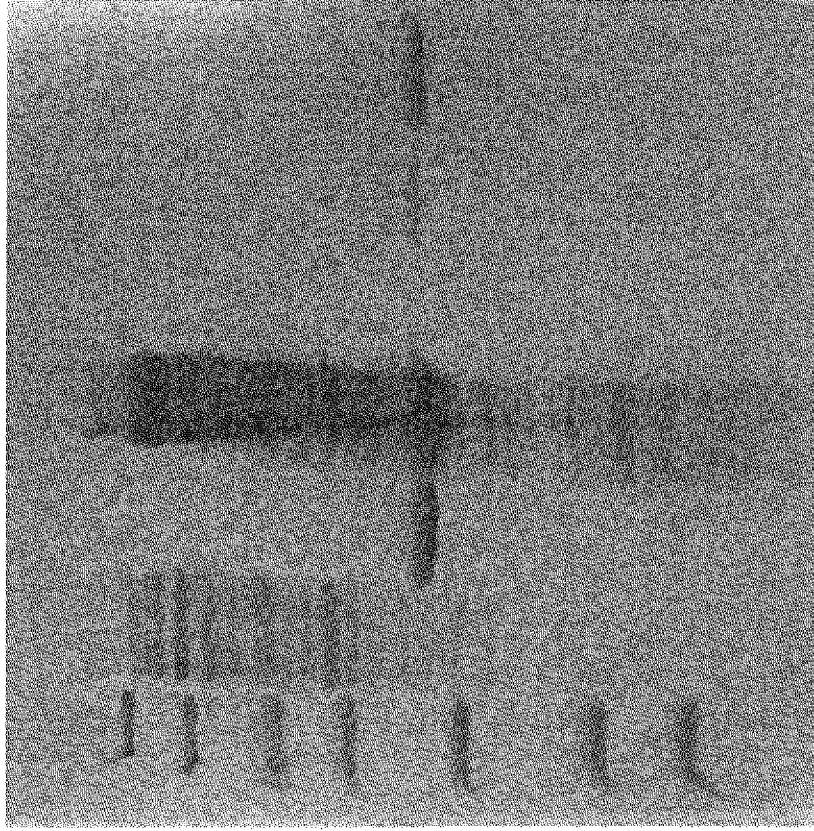


Figure 10

Figure 11

PBP_{K15}

M A1 A2 A3 A4 A5 A6



LDT_{MT1}

M B1 B2 B3 B4 B5 B6

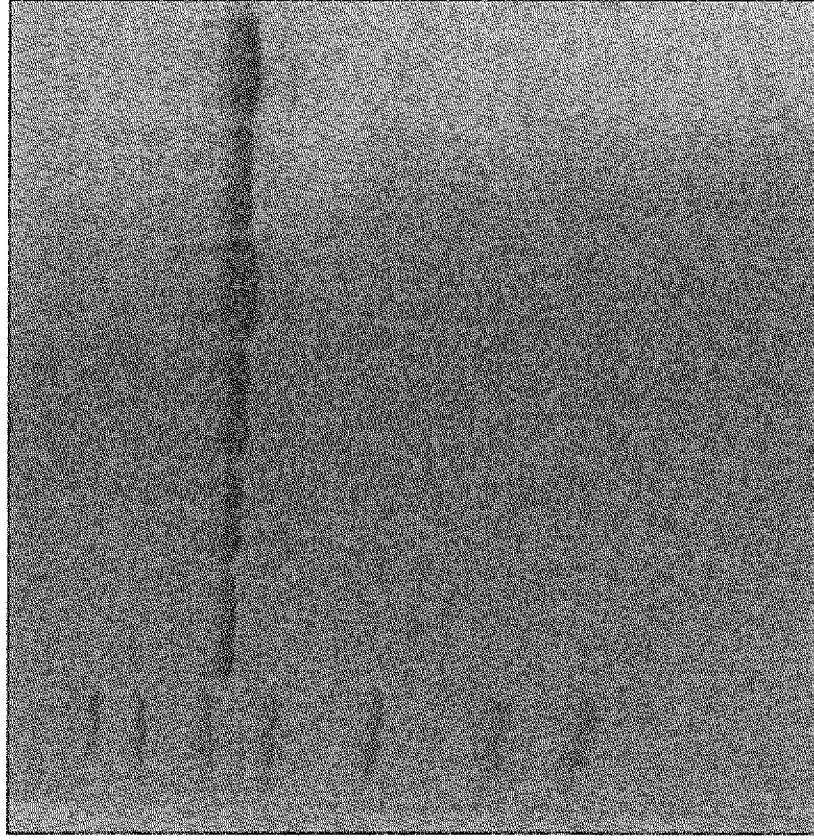


Figure 12

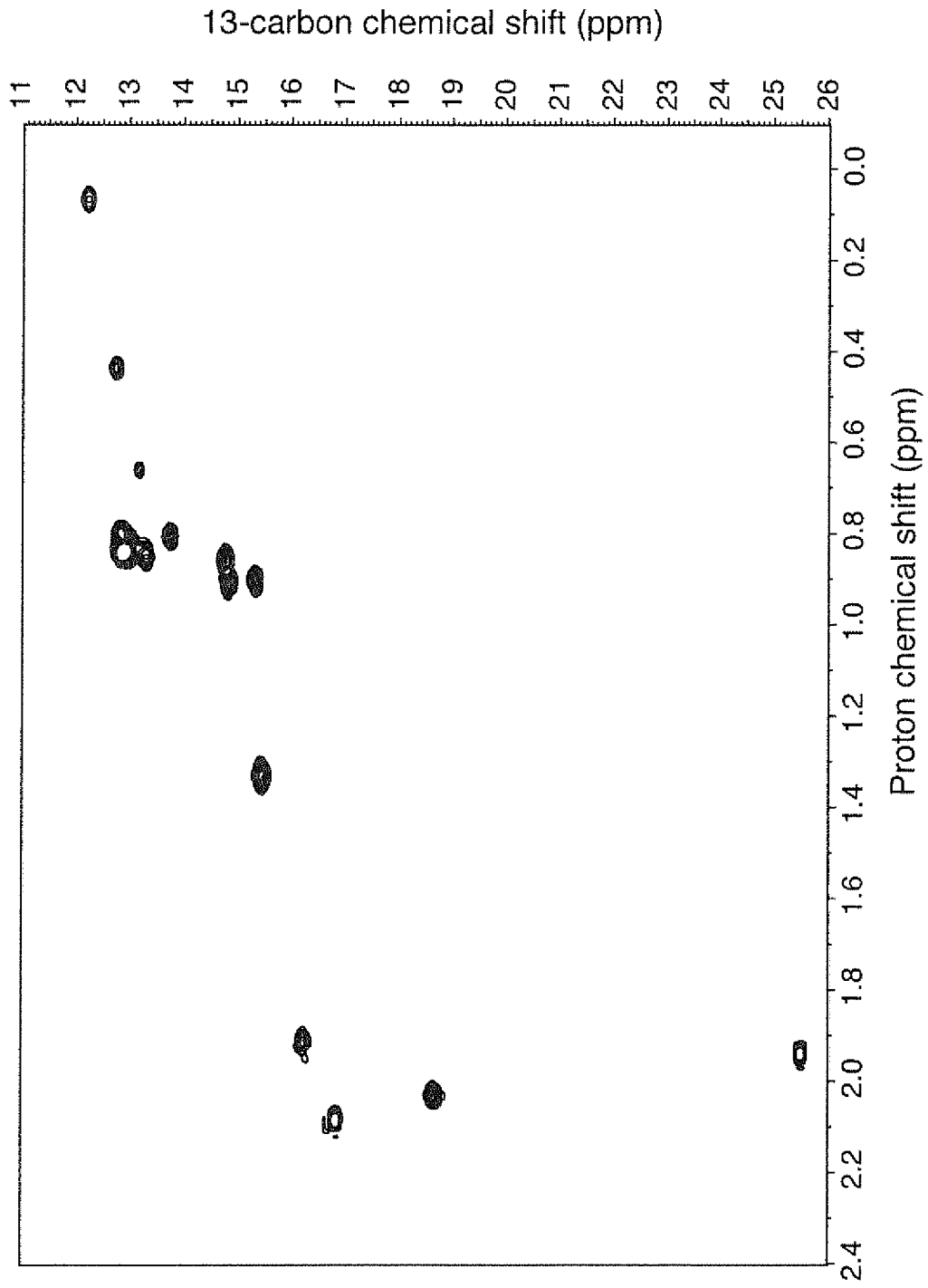
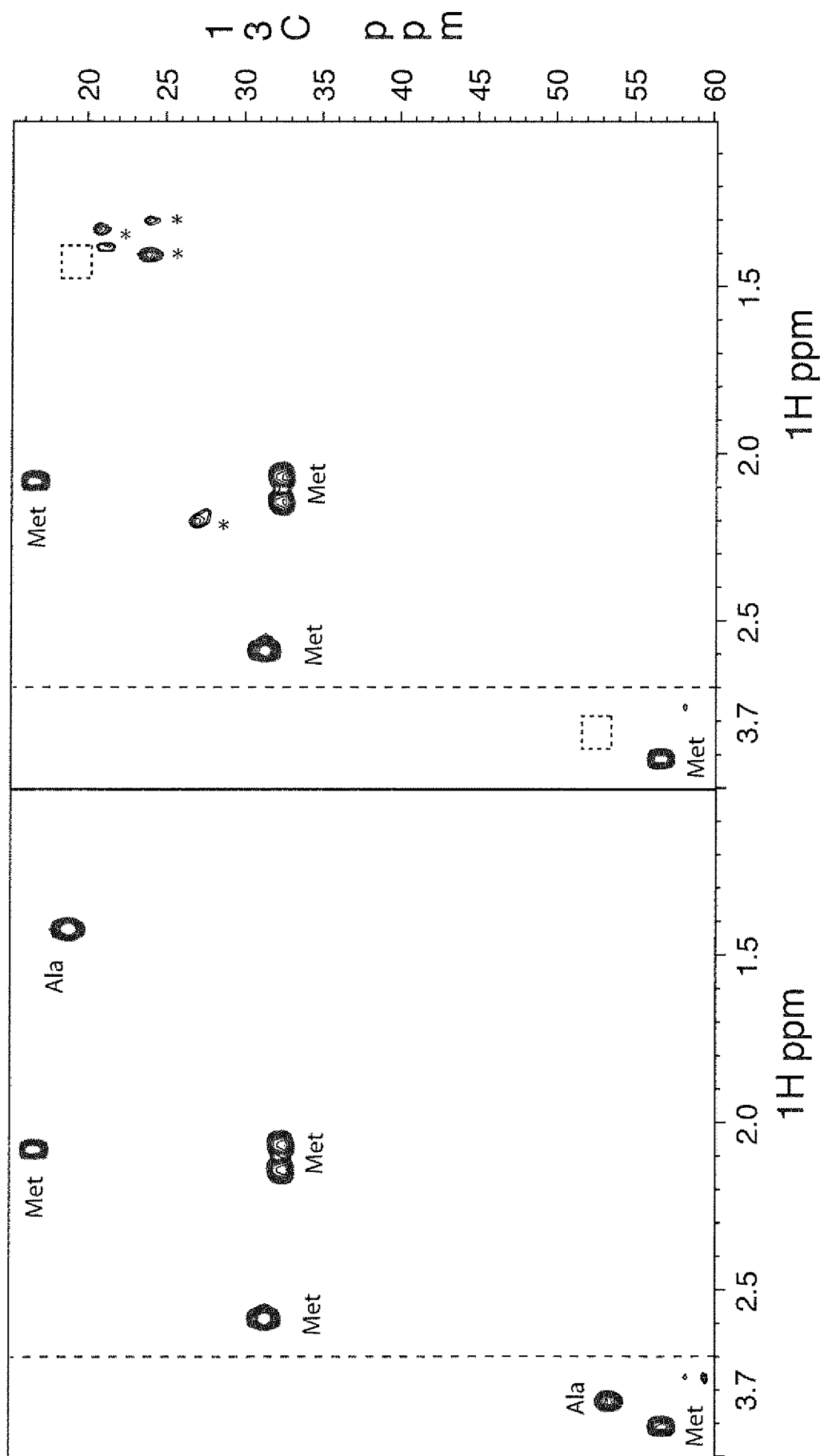


Figure 13



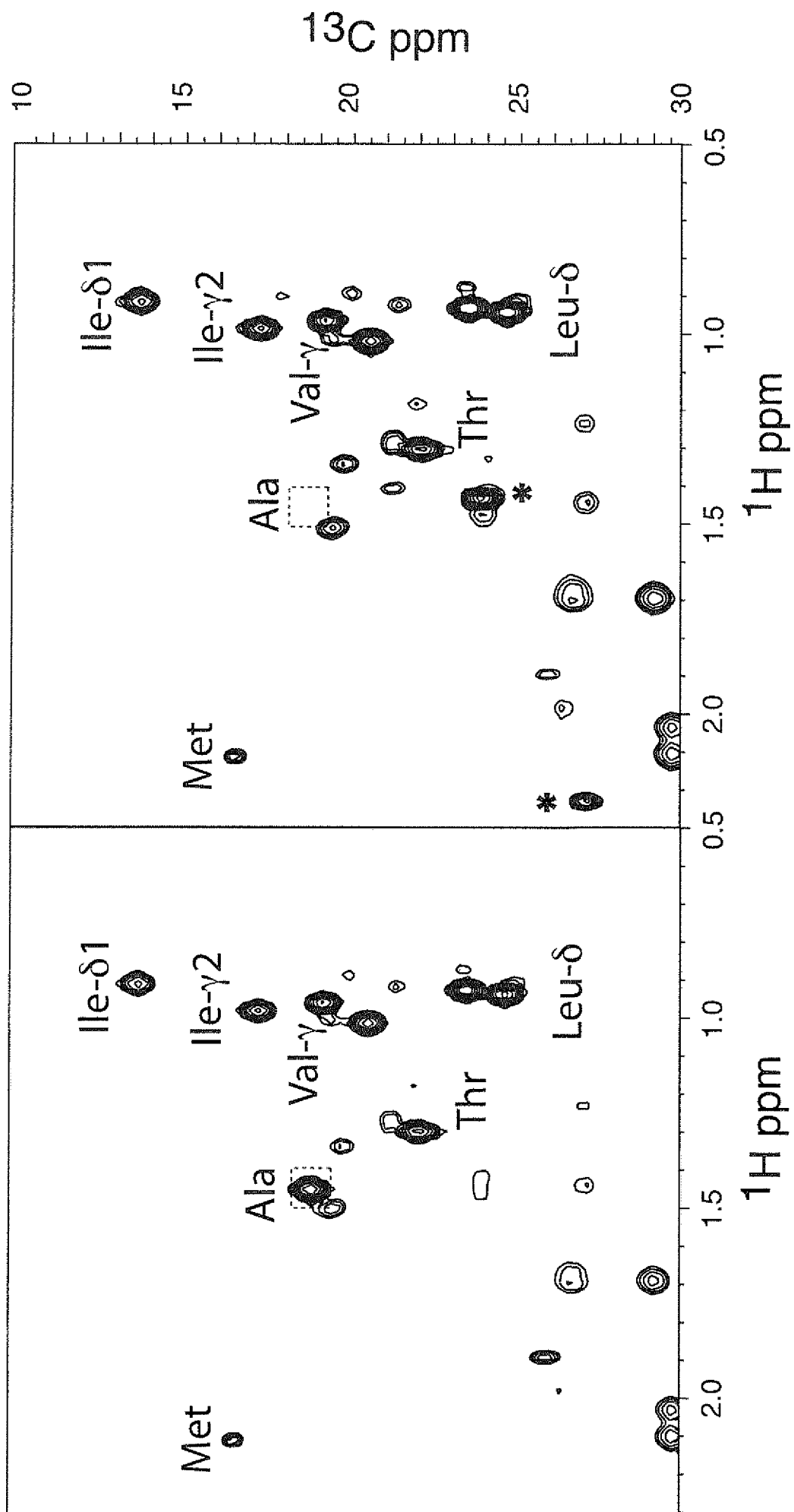


Figure 14

Figure 15

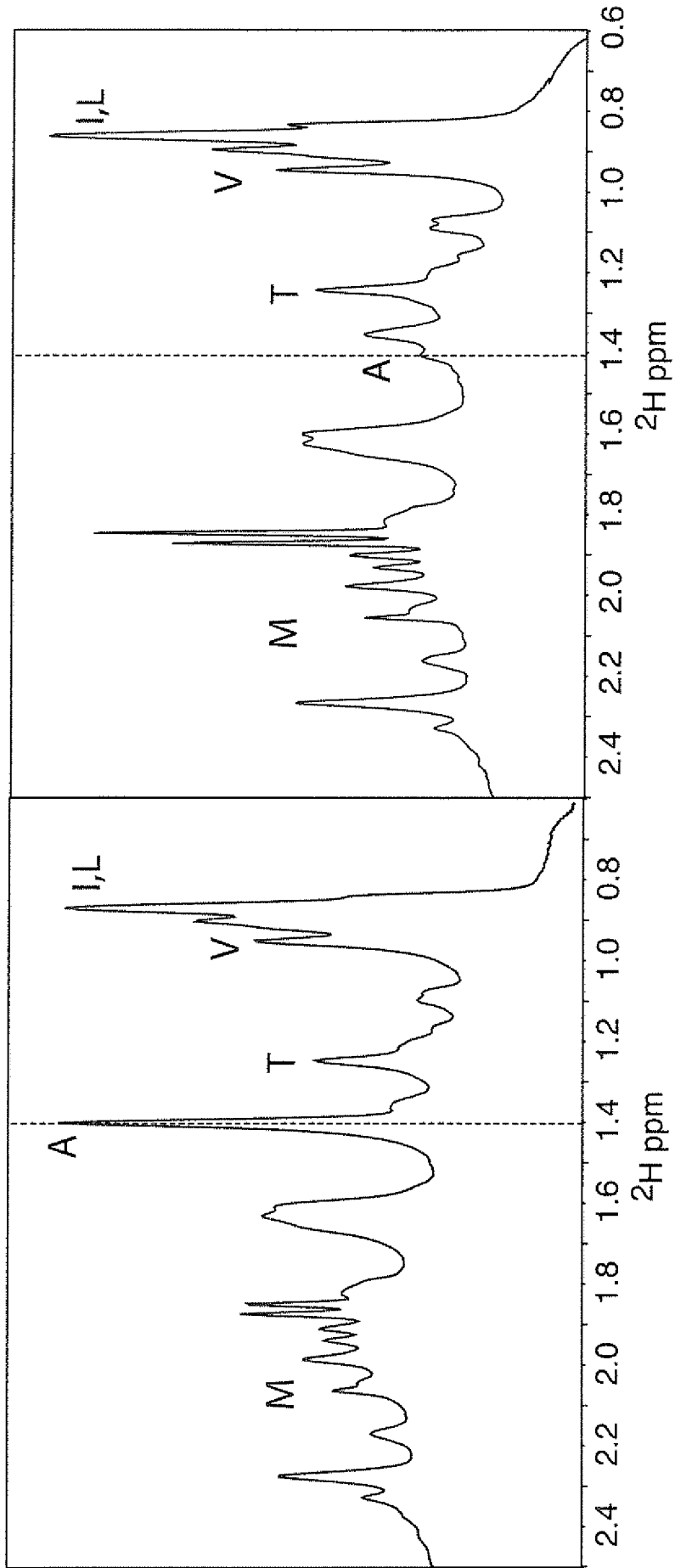


Figure 16

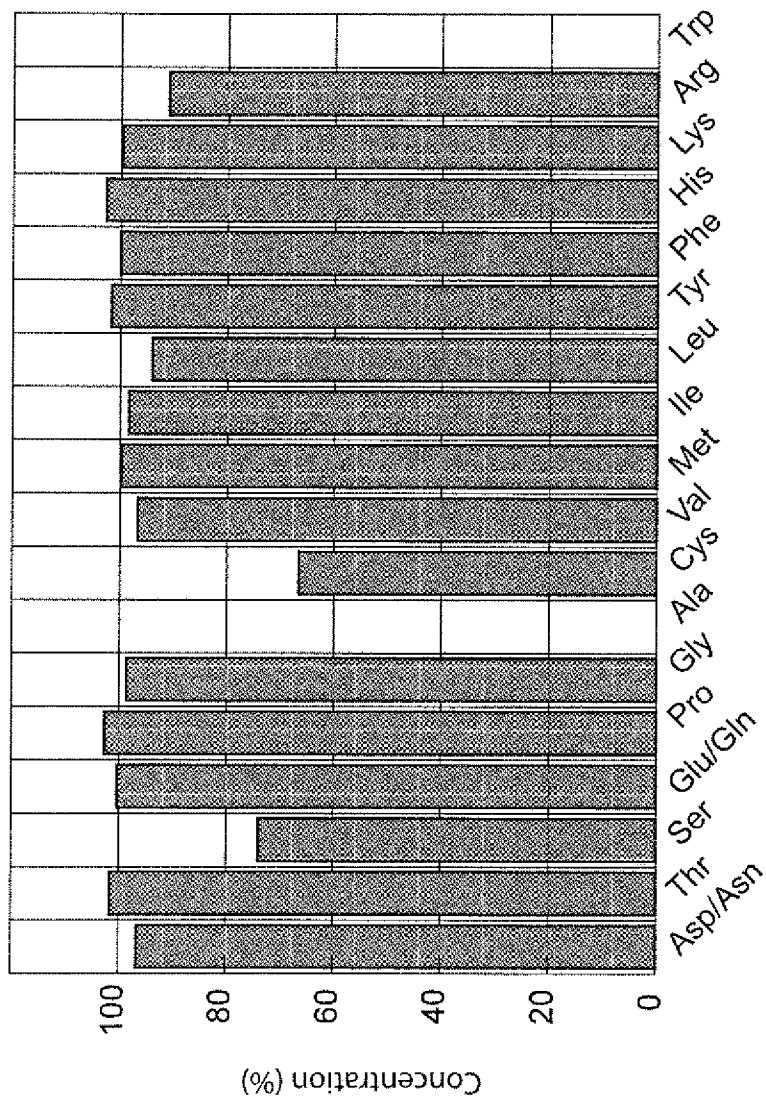
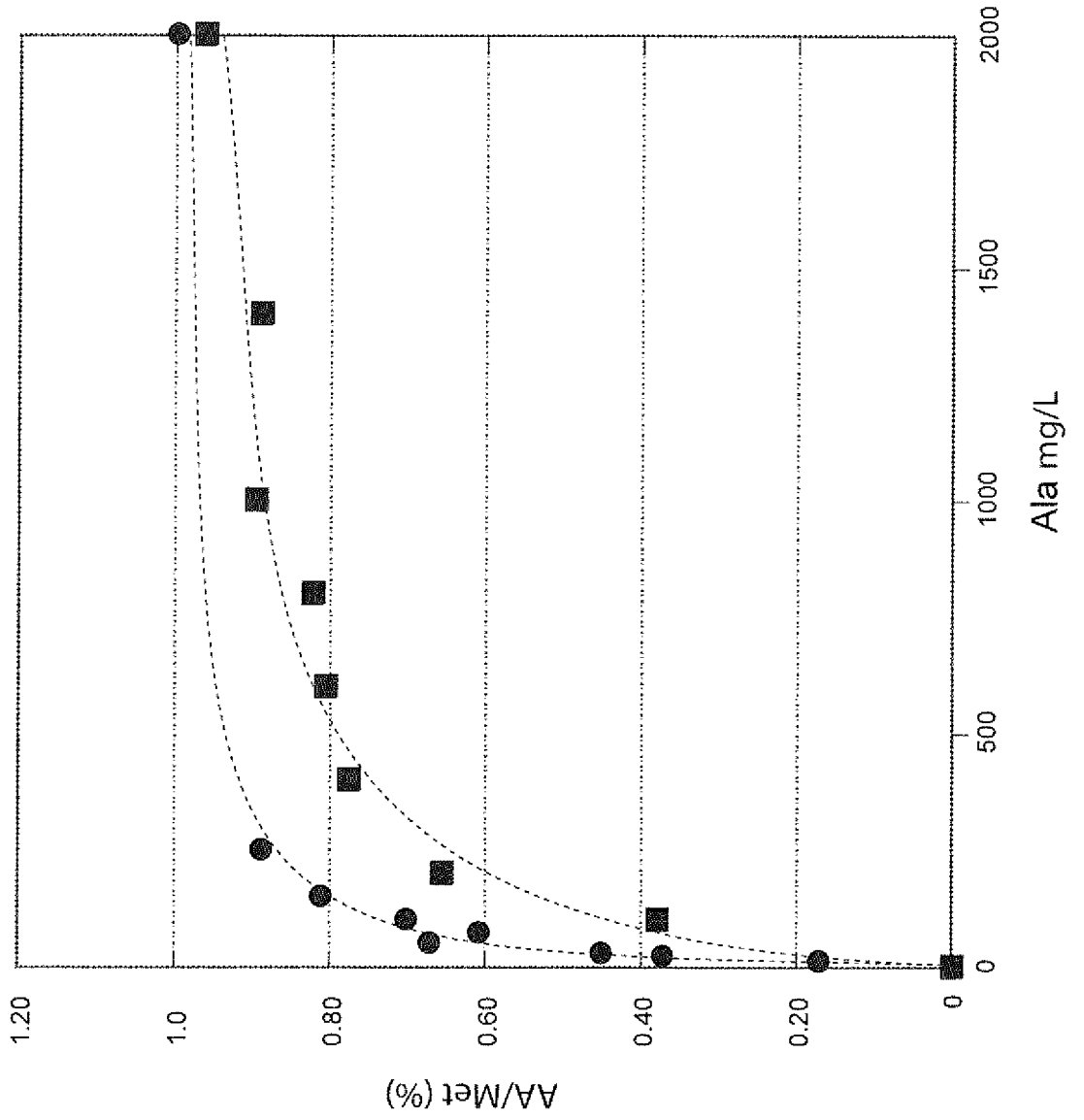


Figure 17





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

N° d'enregistrement
national

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

FA 830541
FR 1657906

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	RIME KERFAH ET AL: "Methyl-specific isotopic labeling: a molecular tool box for solution NMR studies of large proteins", CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 32, 1 juin 2015 (2015-06-01), pages 113-122, XP055346812, GB ISSN: 0959-440X, DOI: 10.1016/j.sbi.2015.03.009	8-11	C12N1/06 C12P21/00 C12N9/00 G01N1/28 G01N24/08
A	* abrégé * * page 115 - page 117; figure 2; tableau 1 *	1-7	
X	-----	8-11	
X	ISABEL AYALA ET AL: "An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein", JOURNAL OF BIOMOLECULAR NMR., vol. 43, no. 2, 1 février 2009 (2009-02-01), pages 111-119, XP055346837, NL ISSN: 0925-2738, DOI: 10.1007/s10858-008-9294-7	8-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12P C07K C07B
A	* le document en entier *	1-7	
X	-----	8-11	
X	KERFAH RIME ET AL: "Scrambling free combinatorial labeling of alanine-[beta], isoleucine-[delta]1, leucine-proS and valine-proS methyl groups for the detection of long range NOEs.", JOURNAL OF BIOMOLECULAR NMR JAN 2015, vol. 61, no. 1, janvier 2015 (2015-01), pages 73-82, XP002767379, ISSN: 1573-5001	8-11	
A	* abrégé * * Introduction *	1-7	
	----- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 février 2017		Ury, Alain	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		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	

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement
national

FA 830541
FR 1657906

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99/11589 A1 (MARTEK BIOSCIENCES CORP [US]; ANDERSON FRANK ELBERT III [US]; BROWN JO) 11 mars 1999 (1999-03-11)	8-11	
A	* page 5 - page 9; revendications 13-36 *	1-7	
X	WO 2011/083356 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV) 14 juillet 2011 (2011-07-14)	8-11	
A	* le document en entier *	1-7	
X	EP 2 695 873 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 12 février 2014 (2014-02-12)	8-11	
A	* le document en entier *	1-7	
A	CN 101 824 443 A (SHANGHAI RES AND DEV CT OF IND BIOTECHNOLOGY; HUZHOU IND BIOTECHNOLOGY) 8 septembre 2010 (2010-09-08)	1-11	
A	* le document en entier *	1-11	
A	EP 1 995 324 A1 (ETH ZUERICH [CH]) 26 novembre 2008 (2008-11-26)	1-11	
A	* le document en entier *	1-11	
Date d'achèvement de la recherche			Examineur
17 février 2017			Ury, Alain
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date	
autre document de la même catégorie		de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1657906 FA 830541**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **17-02-2017**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9911589	A1	11-03-1999	AT 420061 T	15-01-2009
			AU 754232 B2	07-11-2002
			CA 2301046 A1	11-03-1999
			EP 1009725 A1	21-06-2000
			EP 1889823 A1	20-02-2008
			HU 0003383 A2	28-02-2001
			JP 2001514239 A	11-09-2001
			NO 20001052 A	28-04-2000
			TW 581772 B	01-04-2004
			US 6111066 A	29-08-2000
			US 6335196 B1	01-01-2002
			US 6340578 B1	22-01-2002
			US 6376253 B1	23-04-2002
			WO 9911589 A1	11-03-1999
			ZA 9807975 B	21-01-2000

WO 2011083356	A1	14-07-2011	CA 2786272 A1	14-07-2011
			EP 2521704 A1	14-11-2012
			JP 5752147 B2	22-07-2015
			JP 2013516452 A	13-05-2013
			US 2013122598 A1	16-05-2013
			WO 2011083356 A1	14-07-2011

EP 2695873	A1	12-02-2014	CA 2880830 A1	13-02-2014
			EP 2695873 A1	12-02-2014
			JP 2015531757 A	05-11-2015
			US 2015212093 A1	30-07-2015
			WO 2014024151 A1	13-02-2014

CN 101824443	A	08-09-2010	AUCUN	

EP 1995324	A1	26-11-2008	EP 1995324 A1	26-11-2008
			WO 2008141795 A2	27-11-2008
