

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

**N° 81 00094**

---

⑮ Procédé de production de protéines par expression des gènes correspondants dans des bactéries et vecteurs susceptibles d'être mis en œuvre dans de tels procédés.

⑯ Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 N 15/00; C 12 P 21/00.

⑰ Date de dépôt..... 6 janvier 1981.

⑱ ⑳ ㉑ Priorité revendiquée :

㉒ Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 27 du 9-7-1982.

---

㉓ Déposant : INSTITUT PASTEUR et AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR), Etablissement public dit, résidant en France.

㉔ Invention de : Philippe Kourilsky et Odile Mercereau-Puijalon.

㉕ Titulaire : *Idem* ㉓

㉖ Mandataire : Cabinet Plasseraud,  
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

---

3° demande divisionnaire bénéficiant de la date de dépôt du 8 juin 1978, de la demande de brevet initiale n° 78 17221 (art. 14 de la loi du 2 janvier 1968 modifiée).

PROCEDE DE PRODUCTION DE PROTEINES PAR EXPRESSION DES  
GENES CORRESPONDANTS DANS DES BACTERIES ET VECTEURS  
SUSCEPTIBLES D'ETRE MIS EN OEUVRE DANS DE TELS PROCEDES

---

L'invention est relative à un procédé de produc-  
tion de protéines par des micro-organismes, notamment de  
protéines nutritives, par exemple du genre de celles qui  
comprennent la séquence d'acides aminés de l'ovalbumine,  
5 ce procédé mettant en jeu des plasmides génétiquement  
modifiés. Elle est également relative à ces plasmides gé-  
nétiquement modifiés eux-mêmes, ainsi qu'aux protéines  
produites.

On sait que l'on a déjà réussi l'insertion dans  
10 des vecteurs tels que des plasmides de recopies d'ARN  
messagers fonctionnels dans leurs cellules-hôtes naturels  
et s'exprimant sous la forme d'une protéine déterminée.  
Par exemple, Humphries et coll. (NUCLEIC ACIDS RESEARCH,  
1977, vol. 4, p. 2389) ont décrit l'insertion dans un  
15 plasmide (pCRI) d'un ADN à double brin provenant de la  
recopie d'un ARN messager purifié de l'ovalbumine de  
poulet. Le plasmide ainsi modifié pCRI ov 2-1 a pu être  
introduit dans des souches de *Escherichia coli* K12 par  
des méthodes de génie génétique devenues classiques. Au-  
20 cune synthèse d'ovalbumine n'a pu cependant être mise en  
évidence parmi les produits du métabolisme des souches  
bactériennes utilisées. A ce titre, cette expérience  
vient confirmer les difficultés rencontrées jusqu'à ce  
jour, et non encore vaincues dans la pratique, au niveau  
25 de l'expression d'un gène d'eucaryote supérieur dans des  
bactéries hébergeant un vecteur comportant un tel gène  
inséré dans son génome. Il faut souligner cependant une  
exception à ce bilan général encore négatif. Il s'agit de  
l'expression qui a été réalisée récemment de la somatos-  
30 tatine dans des bactéries *Escherichia coli* transformées  
par un plasmide comprenant dans son génome le produit de  
la fusion génétique d'un gène synthétique de la somatos-  
tatine et d'un gène de l'opéron lactose de *E. coli*. Les

expérimentations y relatives ont été décrites dans un article intitulé "Expression in *Escherichiacoli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin" (Expression dans *Escherichia coli* d'un gène produit par synthèse chimique pour l'hormone somatostatine), publié par Keiichi Itakura et coll. dans SCIENCE, vol. 198, pp. 1056-1063 du 9 décembre 1977.

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

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

Il en résulte que le fragment correspondant à la somatostatine ne représentait, dans les conditions expérimentales les plus favorables décrites par ces auteurs, qu'une faible partie de la protéine hybride exprimée, la plus grande partie de celle-ci consistant en un fragment ayant la séquence d'acides aminés de la  $\beta$ -galactosidase. On peut considérer que le fragment somatostatine se trouvait vis-à-vis de l'ensemble de la protéine hybride formée dans un rapport de l'ordre de 14 acides aminés (ceux de la somatostatine) à de l'ordre de 1000 acides aminés.

L'invention a pour but l'obtention d'un procédé de production d'une protéine, procaryote ou eucaryote, mettant en jeu l'expression d'un gène approprié de beau-

coup plus grande dimension que celle du gène synthétique sus-visé de la somatostatine, d'une plus grande efficacité économique en ce que la plus grande partie de la protéine exprimée sera constituée du fragment protéique recherché.

- 5 Elle a également pour but un procédé permettant l'expression par une bactérie soit d'un gène produit par synthèse enzymatique, notamment à partir d'un ARN, soit d'un gène naturel.

L'invention a également pour but la réalisation  
10 de vecteurs, plus particulièrement de type plasmide, auxquels peuvent être incorporés des fragments de gène dont l'expression est recherchée au niveau de la bactérie. Elle concerne évidemment aussi les vecteurs finals ainsi obtenus.

Le plasmide selon l'invention comprend dans une  
15 partie non essentielle de son génome un fragment d'ADN dérivé lui-même d'un fragment de phage  $\lambda$ , lié à un fragment d'opéron bactérien, notamment d'un opéron lactose, comprenant au moins le promoteur bactérien et un fragment du gène lié à ce promoteur, tel que le gène Z codant la pro-  
20 duction de la  $\beta$ -galactosidase dans l'opéron lactose, ce fragment de gène étant éventuellement limité au premier ou aux premiers triplets de nucléotides codant le premier ou les premiers acides aminés de la protéine correspondante, la  $\beta$ -galactosidase dans le cas de l'opéron lactose, ce  
25 plasmide étant encore caractérisé en ce qu'il est pourvu, au niveau dudit fragment de gène ( $\Delta Z$ ), d'un site de coupure par une endonucléase déterminée, de préférence à l'exclusion de tout autre site de coupure par la même endonucléase dans les autres parties de son génome.

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

Dans un plasmide préféré de l'invention, le fragment d'opéron bactérien est un fragment d'opéron lactose et il comporte au moins la séquence du gène Z apte à coder les  
35 7 premiers acides aminés de la  $\beta$ -galactosidase bactérienne (ou les 8 premiers acides aminés si on compte la formyl-méthionine en tant que premier acide aminé).

Un plasmide préféré selon l'invention est constitué d'un recombinant de l'ADN du plasmide pBR322 décrit par

Bolivar et al, 1977, GENE, 2, 95, dont a été séparé un fragment non essentiel sous l'action des enzymes EcoRI et Hind III, d'une part, et d'un fragment de phage  $\lambda$  lié à un fragment d'opéron lactose, comprenant le promoteur de  
5 celui-ci et le fragment de gène Z codant les 7 (ou 8) premiers acides aminés, comme définis ci-dessus, d'autre part.

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

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

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

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

L'invention fournit donc aussi un procédé de fa-

brication d'une protéine hybride dont une partie appartient à une protéine normalement codée, dans une cellule-hôte naturel procaryote ou eucaryote, par le gène correspondant appartenant au génome de cette dernière cellule, procédé 5 qui consiste à introduire dans une bactérie, notamment *E. coli*, un plasmide recombinant résultant de l'insertion par fusion génétique du gène déterminé susdit dans le plasmide selon l'invention, plus particulièrement dans le fragment de gène Z (ou le fragment de gène correspondant dans 10 le cas d'un opéron bactérien différent) ou de façon immédiatement contiguë à celui-ci, la protéine hybride contenant le fragment recherché étant alors récupérable à partir des protéines cellulaires formées par ladite bactérie.

Avantageusement, le fragment de gène caractéristique de la protéine recherchée a une taille, exprimée en 15 nombre de nucléotides, plus élevée que celle du fragment de gène Z ou analogue. Ce rapport est avantageusement au moins égal à 50 (de l'ordre de 387/7 dans l'exemple considéré).

L'invention concerne également les produits nouveaux obtenus, notamment les protéines, caractérisés par 20 la séquence d'acides aminés propre à l'ovalbumine, cependant essentiellement exempte de résidus glycosylés et acylés du genre de ceux que l'on rencontre associés à la protéine naturelle.

Une autre caractéristique de la protéine modifiée selon l'invention réside dans sa capacité d'être détectée par les anticorps de la protéine naturelle, dans des dosages radio-immunologiques courants. 25

L'invention concerne également encore les souches 30 de micro-organismes, notamment *E. coli*, contenant les plasmides selon l'invention et autorisant leur répllication en simultanéité avec leur propre division.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description d'un exemple de 35 production des plasmides selon l'invention et de leurs applications à la production d'une protéine nutritive, essentiellement caractérisée par une séquence d'acides aminés substantiellement identiques à une partie au moins

et de préférence à la plus grande partie de l'ovalbumine de poulet.

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

EXEMPLE :

1°) Construction du vecteur.

On se propose d'incorporer dans une partie non essentielle du plasmide pBR322 (fig. 4a) déjà mentionné un ADN comportant un fragment de phage  $\lambda$  porteur d'un segment d'opéron lactose, avec un site de coupure par EcoRI situé au niveau du 7ème acide aminé de la  $\beta$ -galactosidase.

Ce dernier ADN a été obtenu de la façon suivante :

On part du phage  $\lambda$  dans lequel a été incorporé par fusion génétique un segment d'opéron lactose tel qu'il a été décrit par BACKMAN et coll. dans PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. (vol. 73), n° 11, pp. 4174-4178, Novembre 1976, "Genetics"). Le génome de ce phage modifié comprend un site EcoRI-Z dans le gène Z de son segment d'opéron lactose.

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

Le susdit segment d'opéron lactose contient l'opérateur, le promoteur et l'information codant pour les premiers acides aminés de la  $\beta$ -galactosidase (avec les mutations L8 et UV5). Ce fragment a été intégré *in vitro* dans le site EcoRI situé à la fin du gène Z d'un phage  $\lambda$ lac5 (ce phage n'avait pas d'autre site sensible à EcoRI).

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

ci, selon la méthode de BACKMAN et coll.

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

Dans la fig. 2, a également été représenté le site sHind III λ<sub>2</sub> de coupure par l'enzyme Hind III le plus proche du segment de l'opéron lactose.

Le vecteur ainsi obtenu a été coupé selon les techniques en soi connues par les enzymes EcoRI et Hind III. On recueille par une méthode en soi connue le fragment de phage, y inclus le fragment Z', ayant une extrémité (du côté de Z') correspondant au site de coupure EcoRI-ΔZ et dont l'extrémité opposée correspond au site de coupure sHind III λ<sub>2</sub>. Cette identification peut être effectuée par exemple en mettant à profit sa capacité d'agir en tant que fragment marqueur *lac* dans une souche indicatrice *E. coli* K12Δ*lac* sur milieu coloré,

notamment sur un substrat chromogène à base de 5-chloro-4-bromo-3-indolyl- $\beta$ -galactosidase.

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

On procède à la recombinaison *in vitro* des fragments de l'ADN du plasmide pBR322 et des fragments de phage  $\lambda$  porteurs de segments d'opéron lactose, en présence d'une DNA ligase, notamment de celle extraite du phage T4 et l'on isole par clonage dans *E. coli* K12, notamment *E. coli* K12 C600  $rk^- mk^+$  selon une méthode classique, par exemple celle décrite dans Humphries et coll. déjà cité, le vecteur recherché schématisé par la fig. 4b. Ce vecteur comprend la partie essentielle A de l'ADN du plasmide initial et l'ADN inséré B comportant le fragment de phage  $\Delta\lambda$ , et le fragment d'opéron lactose ( $\Delta Z, o, p(i)$ ) ((i) désignant un fragment seulement du gène (i)).

Le nouveau plasmide ainsi obtenu, dénommé p1397, porte le segment d'opéron lactose indiqué ci-dessus, avec un seul site de coupure par EcoRI au niveau du 7ème acide aminé (ou du 8ème si l'on compte en tant que tel la formyl-méthionine) de la  $\beta$ -galactosidase.

#### 2°) Construction du recombinant ovalbumine

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

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

L'ADN obtenu, schématisé en 4d, est traité par

la DNA polymérase I d' *E.coli* en présence des 4 déoxytriphosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP (comme décrit dans Humphries et al., 1977).

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

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

On isole parmi les molécules recombinantes obtenues, celles dont la séquence codant pour l'ovalbumine (à l'exception des 15 premières paires de bases  
15 codant les 5 premiers acides aminés) est fusionnée avec les 7 premiers acides aminés de la  $\beta$ -galactosidase bactérienne (ou les 8 premiers acides aminés si l'on compte le formyl-méthionine (fig. 4e).

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

35 Les souches non lysées appartenant aux colonies répondant positivement dans ce système (donc porteuses de séquence ovalbumine) sont isolées et les plasmides retransférés par transformation dans une autre souche

d'*E.coli* K12 non lysogène (C600 2K<sup>-</sup> rk<sup>+</sup>), selon la technique décrite par Rougeon F., Kourilsky P., Mach B. (1975), NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2, 2365. Ces souches sont cultivées dans un bouillon et des extraits sont faits par sonication.

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

La présence d'antigènes semblables à l'ovalbumine a été détectée par analyse radio-immunologique. Dans ce dosage, on fait entrer en compétition l'extrait bactérien de certaines souches avec de l'ovalbumine marquée à l'iode, pour former des complexes avec un anticorps anti-ovalbumine très spécifique.

Le dosage radio-immunologique indique la présence d'au moins 20.000 monomères d'antigène par bactérie. L'affinité de l'antigène produit par la bactérie n'apparaît pas très différente de celle de l'ovalbumine elle-même.

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

La molécule hybride a le même poids moléculaire apparent que l'ovalbumine (38.500 daltons environ).

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

La séquence théorique de l'ovalbumine modifiée est la suivante:

formyl-méthionine - thréonine - méthionine - Isoleucine-  
thréonine - acide aspartique - sérine - leucine -  
alanine - sérine - méthionine - acide glutamique...,  
les 8 premiers acides aminés provenant de la  $\beta$ -galacto-  
sidase et les 5 suivants formant les premiers acides  
aminés du fragment d'ovalbumine Hha ov (auquel manquent  
d'ailleurs les 5 premiers amino-acides naturels de l'o-  
valbumine).

La souche de plasmide P1397 a été déposée le  
2 juin 1978 dans la Collection Nationale de Cultures  
Microbiennes (C.N.C.M.) à l'INSTITUT PASTEUR sous le  
n° I-064.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs  
déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nulle-  
ment à ceux de ses modes d'application et de réalisa-  
tion qui ont été plus spécialement envisagés; elle en  
embrasse au contraire toutes les variantes, en parti-  
culier celle où l'on a recours à d'autres plasmides que  
ceux qui ont été plus particulièrement décrits dans ce  
qui précède, en particulier le plasmide pSOM1 visé dans  
l'article déjà mentionné de Keiichi Itakura et coll.,  
dans la mesure où notamment l'ovalbumine exprimée peut  
être considérée comme n'étant pas sensible à l'action  
des enzymes protéolytiques endogènes de la bactérie-  
hôte; l'invention concerne encore les plasmides modifiés  
selon l'invention, mais dans lesquels le fragment d'opé-  
ron au lieu d'être originaire de l'opéron lactose provient  
d'un autre opéron, tel qu'un opéron galactose ou un  
opéron tryptophane; en ce qui concerne ce dernier, on  
rappelle en effet que la construction d'un recombinant  
d'un phage  $\lambda$  et d'un opéron tryptophane a été décrite  
notamment par Anne Moir et W.J. Brammar dans l'article  
intitulé "The use of specialised transducing phages  
in the amplification of enzyme production" (L'utilisa-  
tion de phages transducteurs spécialisés pour l'ampli-  
fication de la production d'enzymes) (MOLEC.GEN.GENET.  
149,87-99 (1976)).

Le vecteur selon l'invention contenant le gène

de l'ovalbumine peut, à son tour, servir comme vecteur pour fabriquer d'autres protéines hybrides incluant une protéine distincte, ceci pouvant être réalisé par insertion dans le fragment de gène ovalbumine de ce vecteur  
5 d'un fragment de recopie d'ARN correspondant à la protéine recherchée et s'exprimant sous la forme de cette protéine dans sa cellule-hôte naturel. A titre d'exemple, on pourrait y insérer le gène de la somatostatine.

REVENDEICATIONS

1 - Vecteur modifié, notamment du type plasmide, comprenant dans son génome un fragment d'opéron bactérien, notamment d'un opéron lactose, comprenant au moins le promoteur bactérien et un fragment du gène lié à ce promoteur, tel que le gène Z codant la production de la  $\beta$ -galactosidase dans l'opéron lactose, ce fragment de gène étant éventuellement limité au premier ou aux premiers triplets de nucléotides codant le premier ou les premiers acides aminés de la protéine correspondante, la  $\beta$ -galactosidase dans le cas de l'opéron lactose, caractérisé par un fragment d'ADN incorporé à ce vecteur, ce fragment d'ADN étant formé par un gène de reconstitution par synthèse, soit chimique, soit enzymatique, notamment à partir d'un ARN messager correspondant à un gène codant pour la majeure partie d'une protéine déterminée.

2 - Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le susdit gène de reconstitution est dérivé de la majeure partie de l'ARN messager correspondant à l'ovalbumine.

3 - Vecteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que le susdit gène de reconstitution contient la séquence codant pour l'ovalbumine, à l'exception des quinze premières paires de bases codant pour les cinq premiers acides aminés de l'ovalbumine.

4 - Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que la susdite séquence codant pour l'ovalbumine, à l'exception des cinq premiers aminoacides de celle-ci, est fusionnée avec une séquence codant pour les sept premiers acides aminés de la  $\beta$ -galactosidase bactérienne (ou ses huit premiers acides aminés, si l'on compte parmi ceux-ci la formyl-méthionine).

5 - Procédé de production d'une protéine hybride dont une partie appartient à une protéine normalement codée, dans une cellule-hôte naturel procaryote ou eucaryote, par le gène correspondant appartenant au génome de cette dernière cellule, caractérisé par l'introduction dans

un micro-organisme, notamment dans une bactérie telle que *E. coli*, d'un vecteur modifié conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi ceux qui permettent l'expression d'un tel vecteur modifié et en ce que le gène de reconstitution de ce vecteur modifié correspond au susdit gène codant pour ladite protéine.

Fig.1.

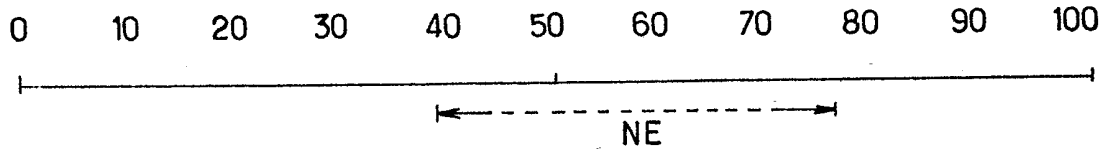


Fig.2.

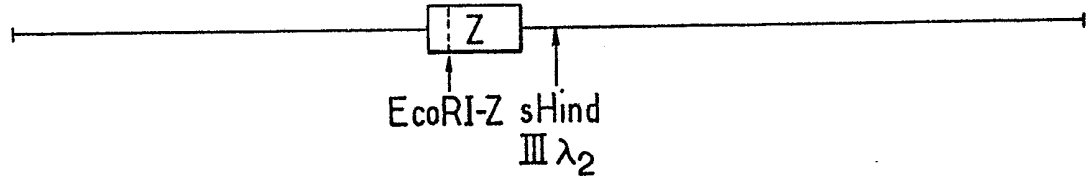


Fig.3a.

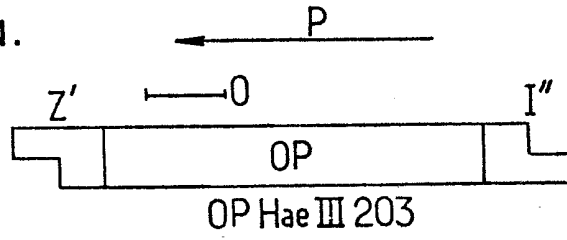


Fig.3b.

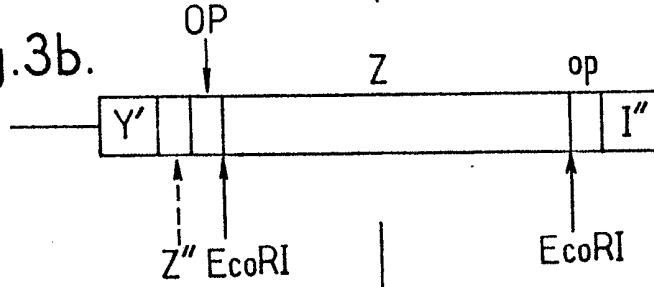


Fig.3c.

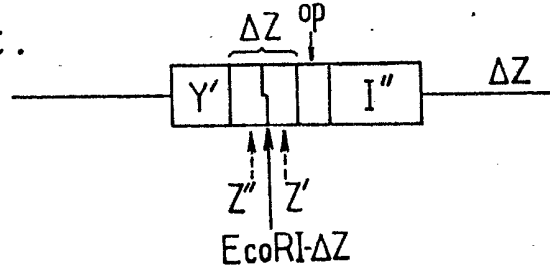


Fig.4.

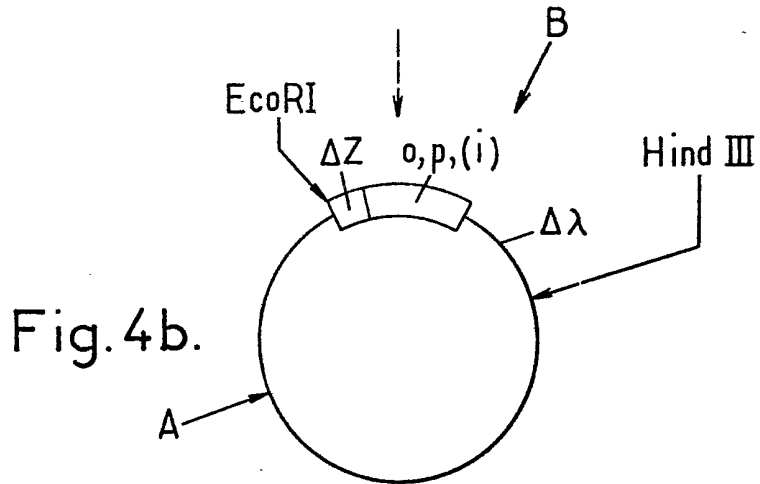
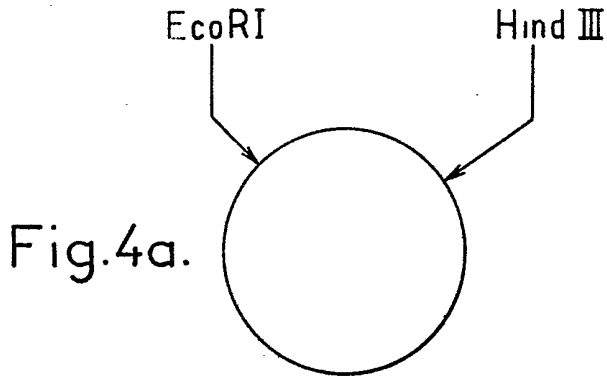


Fig.4c.

