

⑫

**DEMANDE DE CERTIFICAT D'ADDITION
À UN BREVET D'INVENTION**

A2

②2 Date de dépôt : 15 juillet 1987.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 3 du 20 janvier 1989.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés : 1^{re} addition au brevet 86 11311 pris le 5 août
1986.

⑦1 Demandeur(s) : *TRANSGENE S.A.* — FR.

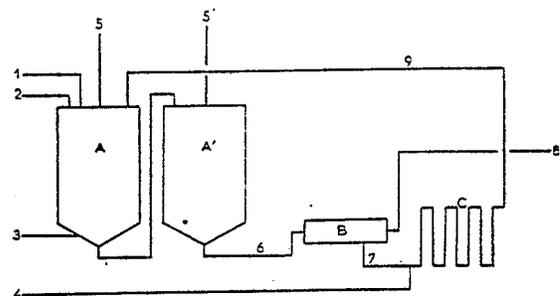
⑦2 Inventeur(s) : Eric Degryse.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Regimbeau, Martin, Schrimpf,
Warcoï et Ahner.

⑤4 Procédé de stabilisation d'un plasmide contenu dans une souche bactérienne et souche obtenue.

⑤7 La présente addition concerne un procédé de stabilisation
d'un vecteur plasmidique contenu dans une bactérie, selon
l'une des revendications 1 à 5 du brevet principal dans lequel
la bactérie comporte une délétion d'une partie au moins du
gène *dapD* et le vecteur plasmidique porte un gène *dapD*
intact. Application à la préparation de protéines d'intérêt
industriel.



La présente addition concerne un perfectionnement du procédé de stabilisation d'un vecteur plasmidique contenu dans une bactérie décrit au brevet principal.

5 Le brevet principal propose un procédé de stabilisation dans lequel la bactérie comporte une mutation chromosomique dap^- et le vecteur plasmidique comporte un gène dap^+ , la mutation chromosomique en cause pouvant être plus ou moins importante et étant située, de préférence, dans le gène $dapD$.

10 Afin d'éviter les recombinaisons homologues possibles entre le plasmide $dapD^+$ et le gène $dapD$ muté du chromosome, la présente addition propose une délétion importante du gène $dapD$ du chromosome.

15 C'est pourquoi la présente addition concerne un procédé de stabilisation d'un vecteur plasmidique contenu dans une bactérie selon l'une des revendications 1 à 5 du brevet principal, caractérisé en ce que la mutation chromosomique dap est une délétion d'une partie au moins du gène $dapD$ et en ce que le vecteur plasmidique porte un gène $dapD$ intact.

20 Il est clair qu'afin d'éviter toute recombinaison, une délétion totale du gène $dapD$ sera la solution la plus satisfaisante.

25 Toutefois, un système de sélection si puissant soit-il ne peut remédier à l'instabilité propre d'un plasmide. C'est pourquoi, afin d'augmenter la stabilité des vecteurs d'expression en cause par des moyens génétiques, il est possible d'introduire dans lesdits vecteurs une séquence qui les maintient à l'état de monomères, en particulier la séquence "cer".

35 Le "cer" (Summers et Sherratt, 1984) est un élément qui ne code pour aucune protéine et dont la présence favorise

le maintien monomérique d'un plasmide. Si le plasmide se multimerise, le nombre d'unités distribuables aux cellules filles chute et on obtient plus facilement des cellules dépourvues de plasmide. Indirectement donc, le cer stabilise le plasmide en le maintenant à l'état de monomère.

Comme cela a été décrit dans le brevet principal, les vecteurs plasmidiques en cause sont stables sur milieu complet et peuvent être utilisés industriellement pour la préparation de protéines d'intérêt industriel.

C'est pourquoi la présente addition concerne également des vecteurs plasmidiques qui comportent en outre le gène codant pour une protéine d'intérêt industriel et les éléments assurant son expression dans la bactérie hôte, et, notamment, le gène codant pour une hirudine ou l'un de ses variants naturels ou synthétiques, le $C_{2,3}O$, l'interféron gamma ou l'alpha-antitrypsine par exemple, ainsi que les souches transformées par ces différents vecteurs et les procédés de préparation des protéines industrielles par culture desdites souches transformées sur milieu complet et récupération de la protéine après culture.

Les éléments d'expression des protéines industrielles sont connus, il s'agit essentiellement de promoteurs actifs dans les cellules hôtes, par exemple l'un des promoteurs du phage lambda dans E. coli.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente addition.

Les figures suivantes illustrent les exemples.

- Figure 1 : Carte de restriction du fragment HindIII-BamHI du pDB6.
- 5 Figure 2 : Schéma des inserts PstI du pDB6 dans M13mp8 et position des sites EcoRI qui y sont introduits.
- Figure 3 : Carte de restriction du fragment KpnI-BglII du pTG47.
- Figure 4 : Démonstration de la délétion du gène *dap* dans les
10 ADNs chromosomiques de différentes souches, par autoradiographie de "Southern blots".
- Figure 4A : . sonde = gène *kan*^R porté par le fragment EcoRI du pTG47
- | | | |
|----|-----------------------------------|---------------------------------|
| | . bandes 6 à 9 | ADN coupé par PstI |
| 15 | 10 à 14 | ADN coupé par BamHI et HindIII |
| | . bandes 6 et 10 = souches GC4540 | |
| | 7 et 11 | TGE7213 |
| | 8 et 12 | TGE7214 |
| | 9 et 13 | TGE901 |
| 20 | 14 | pDB6 |
| | 1, 2, 5, 16 | marqueurs de poids moléculaires |
- Figure 4B : . sonde = côté 5' du gène *dapD* porté par le fragment EcoRI du M13TG620
- | | | |
|----|----------------------------------|---|
| 25 | . bandes 4 à 7 | ADN coupé par PstI |
| | 8 à 11 | ADN coupé par BamHI et HindIII |
| | . bandes 4 et 8 = souches GC4540 | |
| | 5 et 9 | TGE7213 |
| | 6 et 10 | TGE7214 |
| 30 | 7 et 11 | TGE901 |
| | . bandes 13 | marqueurs de poids moléculaires |
| | 1 et 12 | pDB6 coupé par PstI ou BamHI et HindIII |
| 35 | 2 | M13TG620 coupé par PstI |
| | 3 | M13TG597 coupé par PstI |
- Figure 4C : . sonde = régions flanquantes du gène *dapD* portées

par le fragment KpnI-BglIII du pTG47.

. ADN chromosomique coupé par PstI.

. bandes 4 = souches GC4540

5 TGE7213

6 TGE7214

7 TGE901

. bandes 8 = marqueurs de poids moléculaires

1 fragment BamHI-HindIII de pDB6 coupé
par PstI

2 M13TG620 coupé par PstI

3 M13TG597 coupé par PstI

Figure 4D : . sonde = régions flanquantes du gène dapD portées
par le fragment KpnI-BglIII du pTG47.

. ADN chromosomique coupé par PstI

. bandes 4 = souches RH5345

5 RL58

6 TGE7615

1, 2, 3 (comme en 4C)

Figure 5 : Schéma et carte de restriction du pTG790.

Figure 6 : Schéma et carte de restriction du pTG792.

Figure 7 : Schéma et carte de restriction du pTG7922.

Figure 8 : Schéma et carte de restriction du pTG769.

Figure 9 : Schéma et carte de restriction du pTG7406.

Figure 10 : Electrophorèse sur gel d'acrylamide-SDS, révélé au
bleu de Coomassie, des protéines synthétisées par
TGE7213/pTG7407.

. bandes 1 et 8 = marqueurs de poids moléculaires

. bandes 2 à 5 = culture à 30°C, 4 heures (2 et 3)
ou 7 heures (4 et 5)

. bandes 6 à 12 : culture induite à 42°C, 4 heures
(6, 11 et 12) ou 7 heures (7, 9 et 10)

C = fraction insoluble ; 20 µl

S = fraction soluble ; 40 µl

Figure 11 : Schéma et carte de restriction du pTG7675.

Figure 12 : Schéma et carte de restriction du pTG7914.

Exemple 1 Délétion du gène *dapD* du chromosome de la bactérie.

Sous clonage du gène *dapD* sur 2 fragments *Pst*I

5

Le plasmide pDB6 et le M13mp8 sont coupés par *Pst*I et ligués. On crible les M13 contenant l'extrémité 5' et l'extrémité 3' du gène par des oligonucléotides spécifiques de ces régions, respectivement TG596 (GCGCTTAATAACGAGTTG) et TG598

10 (TGTGCATACTTTAGTC). Les candidats SB96 et SB98 sont retenus et l'insertion des fragments voulus confirmée par séquençage. (voir schéma de la figure 1).

15 Introduction d'un site *Eco*RI dans les extrémités 5' et 3' du gène *dapD*

Des sites *Eco*RI sont introduits dans SB96 et SB98 par mutation ponctuelle :

- dans SB98 avec l'oligonucléotide TG597 :

20

GTACGCAGGAATTCCTTAATGCCG

qui s'apparie avec la région 3' de la fin du gène, mais avant un terminateur de transcription supposé.

- dans SB96 avec l'oligonucléotide TG620 :

25

AGAGGCCCGAATTCCAAACG

qui s'apparie avec la région 5' en amont du promoteur supposé du gène *dapD*.

Les transformants sont analysés avec les mêmes sondes qui ont servi à introduire les sites *Eco*RI. La présence de ce site *Eco*RI est confirmée en minipréparation d'ADN et ensuite par séquençage des candidats M13 retenus (voir schéma figure 2).

30

Construction d'un vecteur de délétion

Le gène de résistance à la kanamycine du plasmide pUC-4K (vendu par Pharmacia) est récupéré sous forme de fragment *Eco*RI.

35

Les M13TG597 et 620 sont coupés par EcoRI et PstI ce qui libère respectivement l'extrémité 3' du gène dapD (sans le terminateur supposé) et l'extrémité 5' du gène (sans son promoteur supposé).

5

Le vecteur de clonage pTG192 (décrit dans le brevet principal) est coupé par PstI.

10 L'ensemble de ces fragments est ligué. Après transformation de cellules 5K et étalement sur LB + ampicilline 0.1 mg/ml + kanamycine 0.02 mg/ml, on crible les colonies par l'oligonucléotide TG596.

15 Une construction a été sélectionnée : pTG47. Sa structure est analysée par minipréparation d'ADN et l'orientation du gène de résistance à la kanamycine est déterminée par digestion du plasmide par HindIII, ce qui libère 2 bandes de tailles 5.3 et 4.0 kb. L'orientation du gène de résistance à la kanamycine dans pTG47 est la même que celle du gène dapD dans pDB6 (dans 20 l'autre orientation on aurait obtenu des bandes de tailles 4.9 et 4.4 kb).

Le schéma du pTG47 est représenté dans la figure 3.

25 Délétion du gène dapD du chromosome

Délétion du gène dapD du chromosome d'une souche intermédiaire

30 Des cellules RH5345, dont la compétence s'élève à $2.5 \cdot 10^{-7}$ transformants/ μ g d'ADN de pTG47, sont transformées par le plasmide pTG47 préalablement coupé par KpnI et BglII (voir figure 3).

Cette digestion libère un fragment qui contient les régions flanquantes du gène dapD, le gène lui-même étant remplacé par le gène de résistance à la kanamycine.

35

Après étalement sur LB + DAP + kanamycine 0.01 mg/ml on sélectionne 9 candidats : TGE721 à TGE729 dont on confirme le phénotype dap⁻, kan^R.

L'absence du gène *dapD* est confirmée après transformation de ces souches par le pTG764 par leur capacité de se multiplier en milieu LB.

5 Déléction du gène *dapD* de la souche TGE901 et N5969

10 La déléction *dapD* de la souche TGE721 est ensuite transduite dans les souches TGE901 et N5969 par le phage transducteur Plvir/TGE721 et les recombinants *dap*⁻ sélectionnés par leur résistance à 0.01 mg/ml de kanamycine.

15 Les candidats retenus sont respectivement TGE7213, 7214 et TGE7303. Les exigences en *ile*, *val*, *his* de la souche mère, TGE901, en plus du caractère *dap*⁻ *kan*^R ont été confirmés sur les milieux appropriés, pour un candidat : TGE7214.

Exemple 2 Confirmation de la déléction du gène *dap* dans différentes souches par "blot" chromosomique.

20 Les différentes souches suivantes ont été analysées :

- . les souches parentales TGE901 et RH5345, *dapD*⁺
- . les souches déléctées TGE7213 et 7214
- . la souche parentale RL58 qui a été employée pour introduire
25 la mutation *dapD*⁻ dans TGE901, et le mutant *dapD*⁻, TGE7615, qui en dérive
- . une souche GC4540 qui est résistante à la kanamycine par intégration du Tn5 alors que dans les souches TG... le gène de résistance à la kanamycine dérive du Tn903 (les 2 gènes
30 ne devraient pas donner d'hybridation croisée par manque d'homologie - Beck et al. 1982)

Le choix des enzymes de restriction est basé sur la séquence du pDB6 ; une coupure par :

35

- BamHI et HindIII libère un fragment chromosomique de 9 kb contenant le gène *dapD* et ses régions flanquantes, dans le cas des souches sauvages ; dans le cas des souches déléctées,

le gène de résistance devra être libéré par la digestion par BamHI et coupé en 2 fragments par digestion par HindIII.

- 5 - PstI libère 2 fragments contenant chacun une partie du gène dapD (2.8 kb de la région 5' et 3.4 kb de la région 3') pour les souches sauvages ; dans le cas des souches délétées la digestion par PstI libère le gène de résistance à la kanamycine et les 2 régions flanquantes (du côté 5' un fragment de 2.4 kb et du côté 3' un fragment de 2.8 kb) (voir figures 1 et 3).

10

Les sondes ont été choisies pour allumer le gène dap ou ses régions flanquantes ou le gène kan^R :

- 15 - pour sonder le gène de résistance à la kanamycine on isole un fragment EcoRI du pTG47 qui ne contient que ce gène de résistance (figure 3).
- pour sonder le gène dapD on utilise un fragment EcoRI de 2.4 kb du M13TG620 ne contenant que la région 5' du gène dapD et qui devrait être entièrement délété dans TGE721, 20 7213, 7214 (figure 2).
- pour sonder le chromosome on utilise un fragment KpnI-BglIII de pTG47 qui contient le gène de résistance à la kanamycine et les 2 régions (le côté 5' et le 3') du chromosome qui flanquent le gène dapD (figure 3).

25

On s'attend donc à allumer,

- 30 - dans les souches sauvages, une bande de 2.8 kb correspondant à la région 5' du gène dapD et une bande de 3.4 kb correspondant à la région 3' de ce gène (figure 1).
- dans les souches délétées, le gène de résistance à la kanamycine, la région 5' flanquante du gène dapD qui subsiste (2.4 kb) et la région 3' flanquante du gène dapD qui subsiste (2.8 kb) (figure 3).

Démonstration de l'incorporation du gène de résistance à la kanamycine

On a comparé les ADNs chromosomiques de GC4540, TGE7213, TGE7214 et TGE901, coupés par PstI ou BamHI et HindIII et sondé par le fragment EcoRI du pTG47.

PstI libère la bande de 1.3 kb ; une restriction BamHI et HindIII donne 2 fragments de 0.7 et 0.6 kb pour les souches délétées uniquement. Aucune bande ne s'allume dans TGE901 ni dans GC4540 (figure 4A).

Ces résultats prouvent que le gène de résistance à la kanamycine est incorporé dans le chromosome des souches délétées et que ce gène provient du pUC-4K.

Démonstration de la délétion du gène dapD du chromosome

Les ADNs chromosomiques de GC4540, TGE7213, 7214 et TGE901 sont comparés avec comme contrôles M13TG620, M13TG597, le fragment BamHI-HindIII de pDB6 et le même fragment coupé par PstI (figure 1).

Les ADNs chromosomiques sont coupés par PstI ou BamHI et HindIII.

On isole M13TG620 coupé par EcoRI de la bande contenant spécifiquement le côté 5' du gène dapD pour l'utiliser comme sonde (figure 4B).

Après digestion par PstI on voit que dans les souches sauvages on allume une bande de 2.8 kb correspondant à la région 5' du gène dapD, mais aussi une bande inattendue de 1.7 kb.

Après digestion par BamHI et HindIII on allume une bande d'environ 12 kb qui est plus grande que la bande (de 9 kb) en provenance de pDB6. En plus une bande supplémentaire de 2.5 kb est aussi présente dans les souches sauvages (figure 4B).

Aucune homologie significative n'est apparente pour les souches délétées, dans aucun fragment de digestion.

Ces observations montrent que :

- 5
- une sonde qui couvre la partie 5' du gène *dapD* n'allume aucune bande dans le chromosome des souches TGE7213, 7214 ce qui démontre la délétion du côté 5' de ce gène.
 - comme on allume dans les souches sauvages, en plus de la
- 10
- bande attendue, une deuxième bande, spécifique du gène *dapD*, il semble que ce gène soit dupliqué dans ces souches.

Comme une duplication du gène *dapD* était inattendue, nous avons confirmé cette duplication dans certaines souches sauvages, et confirmé la délétion du gène *dap* du côté 3' en plus du côté 5'.

15

Les mêmes ADNs chromosomiques et contrôles sont utilisés après digestion avec *PstI* (figure 3).

20

La sonde est le pTG47 coupé par *KpnI* et *BglII*. Cette sonde devrait allumer, en plus des bandes que l'on a prédites plus haut, au moins une bande de 1.7 kb. En effet le pTG47 contient 300 pb et 100 pb homologues au gène *dapD*, du côté 5' et du côté 3' respectivement, et qui devraient s'allumer dans les souches délétées.

25

La figure 4C montre que :

- 30
- on allume des bandes de 2.8 et 2.4 kb dans les souches délétées et des bandes de 3.4 et 2.8 kb dans les souches sauvages ; en plus on allume une bande de 1.3 kb correspondant au gène de résistance à la kanamycine. Ceci prouve la délétion dans les souches TGE7213 et 7214.
- 35
- on allume aussi des bandes moins intenses, dans les souches sauvages uniquement, dues au gène *dapD* dupliqué. Comme on sait que la bande de 1.7 kb s'allume avec la partie 5', la

bande de 2.1 kb doit provenir du côté 3'. Ceci prouve que ces souches contiennent effectivement une duplication qui a disparu dans les souches délétées.

5 Nous avons comparé l'ADN chromosomique coupé par PstI des souches RH5345 et RL58 ainsi que le mutant $dapD^-$ obtenu par conjugaison du RL58 avec TGE901. Ces ADNs sont sondés par le fragment KpnI, BglII isolé de pTG47 qui contient le gène de résistance à la kanamycine (qui ne devrait rien allumer) et
10 les régions flanquantes du gène $dapD$.
La figure 4D montre que dans RH5345 on n'allume que les bandes 3.4 et 2.8 kb et pas les bandes dues à la duplication du gène présentes dans GC4540 ou TGE901. De plus on ne remarque qu'une
15 bande de 7 kb pour RL58 et TGE7615, ce qui indique une perte d'un site PstI ; ceci prouve que ces 2 mutants sont identiques et touchés au moins dans le site PstI du gène $dapD$.

En conclusion, ces expériences montrent que :

- 20 - les souches TGE7213, 7214 sont délétées pour le gène $dapD$ et qu'elles contiennent le gène de résistance à la kanamycine.
- la mutation $dapD^-$ de RL58 et TGE7615 se trouve au moins au niveau du site PstI du gène $dapD$.
- 25 - certaines souches de E. coli présentent une duplication du gène $dapD$ et cette duplication n'est pas présente dans les souches délétées.

30 Comme par transduction on réussit à déléter les 2 gènes $dapD$ de la souche réceptrice, on peut conclure que le gène dupliqué doit se trouver proche (à moins de 2' sur la carte chromosomique de E. coli) du premier gène $dapD$.

Exemple 3 Clonage du gène cer.

Le gène cer est récupéré à partir du plasmide ColE1, dont la séquence a été publiée par Chan et al. (1985), sous forme d'un fragment HaeII de 1,85 kb.

Le fragment HaeII est ensuite coupé par HpaII, traité à la Klenow et une bande de 0.4 kb est récupérée. Le M13mpl30 est coupé par EcoRV et traité à la phosphatase. On ligue le fragment de 0.4 kb du ColE1 dans le M13mpl30 et on l'introduit dans la souche JM103. La présence du fragment cer de ColE1 a été confirmée par séquençage de la bande de 0.4 kb libérée par coupure SmaI et HindIII.

Le gène cer inséré dans le polylinker du M13mpl31 est ensuite isolé après digestion par SmaI et HindIII et ligué dans le vecteur pTG720 (portant le gène hirudine, figure 2 du brevet principal) coupé par BglII et traité à la Klenow. Le plasmide résultant est le pTG720cer.

Exemple 4 Construction de vecteurs de clonage contenant le gène cer et le gène dapD.

Inversion du sens du polylinker de M13mpl31 dans un vecteur codant pour la résistance à l'ampicilline

Le pTG192 (figure 1 du brevet principal) est coupé par EcoRI et BglII pour libérer le polylinker de M13mpl31 et est raccourci par digestion HaeIII. On utilise un plasmide portant le gène de la résistance à l'ampicilline, par exemple le pTG730 (vecteur d'expression de l'hirudine décrit dans le brevet français 86.16723) ; ce plasmide est coupé par BglII et EcoRI et ligué au fragment EcoRI-BglII du pTG192. De cette manière on perd le bloc d'expression comprenant le PL et le gène de structure de l'hirudine du pTG730 que l'on remplace par le polylinker de M13mpl31. On appelle ce nouveau plasmide pTG790 (figure 5).

Introduction du fragment cer dans un vecteur de clonage

Le pTG790 est coupé par SstI et KpnI et traité à la phosphatase. Le fragment résultant de cette digestion est ligué au
5 pTG720cer, coupé par SstI et KpnI (ce qui libère le fragment cer) et raccourci par digestion BglII. Le vecteur résultant, pTG792, contient le fragment cer (figure 6).

10 Introduction du gène dapD dans un vecteur contenant le fragment cer

Le pTG792 est coupé par EcoRI, traité à la Klenow et à la phosphatase. Le fragment résultant est ligué avec le fragment AluI de 1.3 kb issu de pDB6 qui contient le gène dapD (figure 1).
15 Il en résulte 2 plasmides pTG7922 et pTG7923 qui ne diffèrent que par l'orientation du gène dapD situé entre 2 sites EcoRI. Pour le pTG7922 les promoteurs des 3 gènes, origine de répllication, résistance à l'ampicilline et dapD sont orientés de la même manière (figure 7).

20

Délétion du gène de résistance à l'ampicilline

Les constructions suivantes ont un but multiple :

- 25
- déléter le gène de résistance à l'ampicilline des vecteurs contenant le gène dapD ;
 - obtenir un vecteur de clonage dapD contenant le gène cer ;
 - obtenir un vecteur de clonage dapD qui contient le polylinker de M13mp131 (moins le site EcoRV, utilisé pour le clonage du cer) ;
 - 30 - obtenir un vecteur dapD avec un seul site EcoRI.

On récupère un fragment PstI du pTG7922 et du pTG7923 contenant respectivement la partie 3' et 5' du gène dapD ainsi que
35 le gène cer pour l'introduire dans un vecteur dap contenant un fragment analogue mais pas de site EcoRI ou AvaI, ni le cer. Les vecteurs analogues sont respectivement le pTG767 et le pTG766 décrits dans le brevet principal.

Le pTG7922 et pTG7923 sont coupés par PstI, raccourcis par digestion BglII et ligués respectivement dans pTG767 et pTG766 coupés par PstI et traités à la phosphatase. Les vecteurs de clonage qui en résultent sont respectivement pTG769 et pTG768 (le pTG769 est représenté dans la figure 8).

Exemple 5 Application du modèle dap à la construction de vecteurs d'expression pour la catéchol 2,3 oxygénase ($C_{2,3}O$).

Vecteur sans site BamHI en amont de la $C_{2,3}O$

Le gène de structure de la $C_{2,3}O$ est récupéré à partir du pTG444 pour être introduit dans le vecteur dap pTG7671 (décrit dans le brevet principal).

Le pTG444, est identique au pTG445 décrit par Zukowski et al. (1984) à l'exception d'un site XmaIII non régénéré. Le pTG444 est coupé par BamHI et HindIII et ligué au pTG769 coupé par BamHI et HindIII et traité à la phosphatase. Le plasmide résultant, appelé pTG7401 ne contient que le gène de structure de la $C_{2,3}O$.

Le pTG7671 contient 2 sites BglII : un site en amont du P_L faisant partie du polylinker et un site en aval du P_L situé dans le site d'attachement des ribosomes, en amont du gène de structure de l'interféron gamma. Le pTG7671 est coupé par BglII et raccourci par digestion KpnI. Le mélange résultant est ligué dans le pTG7401 coupé dans son polylinker par BglII et BamHI et traité à la phosphatase. Par cette ligation on reconstitue le site BglII mais le site BamHI ligué au BglII est perdu. Deux orientations du P_L par rapport au gène de structure de la $C_{2,3}O$ sont possibles. Pour distinguer la construction où la $C_{2,3}O$ est sous le contrôle du P_L , on coupe par BamHI et BglII (en effet pour l'orientation voulue un site BamHI se trouve à proximité du site BglII et la diges

tion ne donnera pratiquement qu'une bande de 4.3 kb ; dans l'autre orientation la digestion libère une bande à 3.9 kb et une bande de 0.4 kb).

5 Le plasmide retenu, pTG7407, ayant la $C_{2,3}O$ sous contrôle du P_L , a une structure voisine du pTG7406 décrit plus loin (comparer à la figure 9) mais il a perdu le site BamHI en amont de la $C_{2,3}O$.

10 **Vecteur avec un site BamHI en amont de la $C_{2,3}O$**

15 Le pTG769 est coupé par BglII et BamHI, traité à la phosphatase et ligué avec un fragment BamHI-BglII d'un plasmide d'expression quelconque (pTG907) qui contient le P_L et le gène N complet, de λ . Il en résulte une construction, le pTG7400, qui peut être identifiée par une coupure BamHI et BglII qui libère 2 bandes : à 2.6 kb et 1.3 kb. Cette construction contient le P_L et le gène N complet.

20 Le pTG7400 est ensuite coupé par HpaI et on y insère un linker BamHI (vendu par BRL) CCGGATCCGG, phosphorylé et hybridé. Ceci donne le pTG7402 qui a perdu son site HpaI mais contient 2 sites BamHI.

25 Le pTG7402 est coupé par BamHI et religué pour donner le pTG7404. Par cette manipulation on a éliminé un site BamHI et tronqué le gène N.

Introduction du gène de la $C_{2,3}O$ dans un vecteur dap-cer

30

Le pTG7402 est coupé par BamHI et HindIII, traité à la phosphatase et le fragment BamHI-HindIII du pTG444 y est introduit pour donner le pTG7406 (voir figure 9). Il diffère du pTG7407 par le fait qu'on peut sortir le gène de la $C_{2,3}O$ par une coupure BamHI, HindIII pour récupérer le fragment introduit à partir de pTG444.

35

Expression de la $C_{2,3}O$ dans les souches de *E. coli* dap^- transformées par le plasmide pTG7407

5 L'expression du gène $C_{2,3}O$ dans les bactéries TGE7213/
pTG7407 a été mesurée à 30°C après 4 h et 7 h de culture et au
cours de l'induction à 42°C après 4 h et 7 h.
Pour chaque détermination, un échantillon de la culture est
récolté et centrifugé ; le culot est lavé et repris en tampon
phosphate (comme décrit par Zukowski et al. 1983) puis traité
10 aux ultra-sons pendant 3 fois 20 secondes.
Après centrifugation 10 min. à 10.000 g, on considère le culot
comme la fraction insoluble (C) et le surnageant comme la
fraction soluble (S).

15 Les protéines présentes dans chaque fraction sont analysées
par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Les bandes
sont révélées par coloration au bleu de Coomassie.
Les résultats sont présentés dans la figure 10. On remarque
l'intensité de la bande de PM 35.000, en particulier après 7 h
20 d'induction à 42°C.
Le "scanning" du gel donne environ 64 % et 75 % de $C_{2,3}O$
dans les fractions S et C respectivement.

25 Dans l'échantillon le plus riche (S, 7 h à 42°C), on a déter-
miné l'activité spécifique de la $C_{2,3}O$ (selon la méthode
décrite par Zukowski et al. 1983), par addition de catéchol
comme substrat. On mesure une activité spécifique de 28 à
35 U/mg.
L'activité spécifique d'une préparation d'enzyme pure étant de
30 280 U/mg, les extraits analysés contiennent environ 12 % de
 $C_{2,3}O$ active.

35 Exemple 6 Introduction du fragment cer dans un vecteur
d'expression de l'interféron gamma.

Le pTG7671 décrit précédemment est coupé au niveau de

son polylinker par SstI (identique à SacI) et KpnI puis traité à la phosphatase et ligué aux fragments de pTG720cer coupé par SstI et KpnI. Après transformation dans TGE7615 on retient un candidat, pTG7675, qui libère 2 fragments de 400 pb et de 3.4 kb après digestion par SstI et KpnI (figure 11).

Exemple 7 Mise en évidence de la stabilité des plasmides au cours de l'induction de l'expression de l'interféron gamma.

a) Induction de l'expression de l'interféron gamma en milieu LB à 42°C pour un vecteur portant le gène de résistance à l'ampicilline : TGE901/pTG40.

Les résultats sont repris dans le tableau I. On mesure les cellules totales/unité de DO/ml afin de déterminer que la perte de la viabilité est un phénomène réel et non un changement de volume des cellules, par exemple. Ces données sont aussi reprises dans le tableau I. Le F_p^- a été défini dans le brevet principal et relie le nombre de cellules p^- au nombre total de cellules présentes à un moment donné.

On remarquera que le F_p^- après 7h30 d'induction atteint une valeur de près de 2 %. Il est donc moins élevé que dans l'expérience précédente (voir brevet principal exemple 10), ce qu'on ne peut attribuer qu'à une différence dans la structure du plasmide pTG40 dans ces 2 expériences : en effet, quoique la quantité de plasmide soit équivalente à différents moments de l'induction, dans la première expérience le plasmide était sous forme dimérique alors que dans l'expérience décrite ici il est principalement sous forme monomérique (comme le montre une analyse sur gel). L'état du plasmide n'influence pas la production en interféron gamma mais illustre de manière concrète la perte de stabilité si la forme monomérique d'un plasmide n'est pas maintenue.

b) Induction de l'expression de l'interféron gamma dans une souche mutée pour le gène *dap* et transformée par un vecteur contenant le gène *dapD* et le gène *cer*, TGE7615/pTG7675

5 Les résultats sont repris dans le tableau II. On mesure les
cellules totales/unité de DO/ml ; il n'y a pas de différence
notable avec TGE901/pTG40. On confirme donc une réelle perte
de la viabilité : après 7h30 d'induction, seulement 0.02 % de
la culture reste viable. Ceci est à comparer avec le TGE901/
10 pTG40 où la valeur obtenue est de 2.4 %. Ceci se traduit au
niveau du F_p^- qui, dans le cas de TGE7615/pTG7675, est diminué
d'un facteur 1000 par rapport au TGE901/pTG40. Pourtant il
reste toujours quelques cellules p^- qui apparaissent en fin
d'induction. Le contenu plasmidique présente les mêmes caractéristiques
15 qu'avant, c'est-à-dire augmentation du nombre de
copies en fin de croissance mais les formes multimériques
présentes en plus ou moins grand nombre avec les plasmides
sans *cer*, sont quasi absentes ici. La production en interféron
gamma est légèrement supérieure à celle obtenue avec le pTG40.

20 c) Induction de l'expression de l'interféron gamma dans une
cellule hôte délétée pour le gène *dapD* et transformée par
un vecteur contenant le gène *dapD* et le *cer*, TGE7213/
pTG7675

25 Les résultats sont repris dans le tableau III. Les conclusions
sont identiques à celles tirées de la comparaison entre
TGE901/pTG40 et TGE7615/pTG7675 : la mortalité atteint un
facteur $3.5 \cdot 10^{-4}$, la quantité de cellules totales/unité de
30 DO/ml ne change pas de manière significative durant l'induction.
Par contre même après 7h30 d'induction il n'y a pas d'apparition
de cellules p^- (après 24h toute la culture est devenue
 p^- pour TGE901/pTG40 et est restée 100 % p^+ pour TGE7213/
pTG7675). Le contenu plasmidique est comparable à celui de
35 TGE7615/pTG7675 par l'absence de multimères. La production en
interféron gamma est légèrement supérieure à celle obtenue
avec TGE7615/pTG7675.

Tableau I

Induction de TGE901/PTG40 à 42°C en milieu LB

	D.O. 600 nm	c/ml/D.O.	c totales/ml/D.O.	Fp ⁻
0 h 00	0.370	3.9 10 ⁸		< 1.4 %
1 h 00	1.29	3.8 10 ⁸	6.5 10 ⁸	0.03 %
2 h 00	1.67	3.0 10 ⁷	7.2 10 ⁸	0.11 %
3 h 00	2.13	2.7 10 ⁶		0.23 %
4 h 00	2.42	2.8 10 ⁶	6.7 10 ⁸	0.70 %
6 h 15	2.89	7.0 10 ⁶	6.5 10 ⁸	1.73 %
7 h 30	3.08	9.5 10 ⁶		

NOTE : Fp⁻ est le pourcentage des p⁻ sur la totalité des cellules présentes à un moment donné.

Tableau II

TGE7615/PTG7675 à 42°C en milieu LB

	D.O. 600 nm	c/ml/D.O.	c totales/ml/D.O.	Fp ⁻
0 h 00	0.310	3.5 10 ⁸		
1 h 00	1.07	3.3 10 ⁸	4.7 10 ⁸	
2 h 00	1.64	1.5 10 ⁸	5.1 10 ⁸	
3 h 00	2.31	1.44 10 ⁷		
4 h 00	2.67	7.1 10 ⁶	7.9 10 ⁸	0.0017 %
6 h 15	3.26	6.1 10 ⁴	6.1 10 ⁸	0.0018 %
7 h 30	3.44	6.4 10 ⁴		

Tableau III

Induction de TGE7214/PTG7675 à 42°C en milieu LB

	D.O. 600 nm	c/ml/D.O.	c totales/ml/D.O.	Fp ⁻
0 h 00	0.400	3.4 10 ⁸		< 1.1 §
1 h 00	1.25	3.7 10 ⁸	5.8 10 ⁸	
2 h 00	1.71	3.8 10 ⁷	7.1 10 ⁸	
3 h 00	2.45	3.0 10 ⁵		
4 h 00	3.32	6.6 10 ⁴	12.8 10 ⁸	
6 h 15	4.25	7.3 10 ⁴	5.8 10 ⁸	
7 h 30	4.21	1.2 10 ⁵		< 6 10 ⁻⁴ §

Exemple 8 Application du modèle dap à la construction d'un vecteur d'expression pour l'alpha-1 antitrypsine.

5 Le fragment PstI contenant le bloc d'expression de l'alpha-1 antitrypsine c'est-à-dire le promoteur P_L du phage lambda, le gène N tronqué, un site d'attachement des ribosomes et le gène de structure de l'alpha-1 antitrypsine (Arg³⁵⁸) provenant du pTG2901 (dérivé tronqué du pTG983, décrit dans le brevet 85.07393) est introduit dans le pTG792 (décrit plus
10 haut) coupé par PstI et traité à la phosphatase.

Le vecteur d'expression résultant, pTG7913, est ensuite coupé par BglII et SstI et le bloc d'expression contenant l'alpha-1 antitrypsine et le gène cer est introduit dans
15 le pTG767 coupé par BglII et SstI et traité à la phosphatase.

Le plasmide résultant, pTG7914, contient le gène dapD, le gène cer et le bloc d'expression de l'alpha-1 antitrypsine (Arg³⁵⁸) (figure 12).

Dépôt des souches représentatives de l'invention

Les souches suivantes ont été déposées à la Collecti-
on Nationale de Cultures des Microorganismes (25 Rue du Dr.

5 Roux, Paris) le 10 mars 1987.

. TGE7214, souche de coli délétée du gène dapD, sous le
n° I652.

10 . TGE7303, souche de coli délétée du gène dap D, sous le
n° I653.

(les 2 souches sont transformées par le plasmide pTG768 qui
porte le gène dapD et cer).

. TGE7214/pTG7407, souche dapD⁻ transformée par le plasmide
d'expression de la C_{2,3}O, sous le n° I655.

REFERENCES

- 5 Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller,
M. Gene 19, 327-336 (1982).
- Bendiak, D.S. & Friesen, J.D. Mol. Gen. Genet. 181, 356-362
(1981).
- 10 Bollen, A., Lathe, R., Herzog, A., Denicourt, D., Lecocq,
J.P., Desmarez, L. & Lavallé, R. J. Mol. Biol. 132, 219-233
(1979).
- Bukhari, A.I. & Taylor, A.L. J. Bacteriol. 105, 844-854
(1971).
- Chan, P.T., Ohmori, H., Tomizawa, J.I & Lebowitz, J. J. Biol.
Chem. 260, 8925-8935 (1985).
- 15 D'Ari, R. & Huisman, O. J. Bacteriol. 156, 243-250 (1983).
- Richaud, C., Richaud, F., Martin, C., Haziza, C. & Patte, J.C.
J. Biol. Chem. 259, 14824-14828, 1984.
- Summers, D.K. & Spherratt, Cell 36, 1097-1103 (1984).
- 20 Zukowski, M.M., Gaffney, D.F., Speck, D., Kauffmann, M.,
Findeli, A., Wisecup, A. & Lecocq, J.P. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 80, 1101-1105 (1983).
- Zukowski, M.M., Speck, D., Kauffmann, M. & Lecocq, J.P. Gene-
tics and Biotechnology of Bacilli 309-319 (1984).

REVENDEICATIONS

- 5 1) Procédé de stabilisation d'un vecteur plasmi-
dique contenu dans une bactérie selon l'une des revendications
1 à 5 du brevet principal, caractérisé en ce que la mutation
chromosomique dap est une délétion d'une partie au moins du
gène dapD et en ce que le vecteur plasmidique porte un gène
dapD intact.
- 10 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé
en ce que la délétion est une délétion totale du gène dapD.
- 3) Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2,
caractérisé en ce que le vecteur plasmidique porte une séquen-
ce qui le maintient à l'état de monomère.
- 15 4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé
en ce que ladite séquence est une séquence "cer".
- 5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 4,
caractérisé en ce que le vecteur plasmidique porte le gène
codant pour une protéine d'intérêt industriel et les éléments
20 assurant son expression dans la bactérie hôte.
- 6) Procédé selon l'une des revendications 1 à 5,
caractérisé en ce que la bactérie hôte est une souche de
E. coli.
- 25 7) Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6,
caractérisé en ce que la protéine d'intérêt industriel est
choisie parmi l'hirudine, l'interféron gamma, le C_{2,3}O et
l'alpha-antitrypsine.
- 30 8) Souche bactérienne contenant un vecteur plas-
midique d'expression stabilisé obtenue par la mise en oeuvre
du procédé selon l'une des revendications 1 à 7.
- 9) Souche bactérienne selon la revendication 8,
caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche de E. coli
présentant une délétion au moins partielle du gène dapD et
transformée par un vecteur plasmidique portant un gène dapD et
35 un gène qui code pour l'expression d'une protéine d'intérêt
industriel et les éléments assurant son expression dans la
bactérie hôte.

10) Souche bactérienne selon la revendication 9, caractérisée en ce que la protéine d'intérêt industriel est choisie parmi l'hirudine, l'interféron gamma, le $C_{2,3}O$ et l'alpha-antitrypsine.

5 11) Procédé de préparation de $C_{2,3}O$ caractérisé en ce qu'on cultive sur un milieu complet une souche selon l'une des revendications 8 à 10 dans laquelle le gène codant pour l'expression d'une protéine d'intérêt industriel est le gène codant pour le $C_{2,3}O$.

10 12) Procédé de préparation de l'hirudine, caractérisé en ce qu'on cultive sur un milieu complet une souche selon l'une des revendications 8 à 10 dans laquelle le gène codant pour l'expression d'une protéine d'intérêt industriel est le gène codant pour une hirudine ou l'un de ses variants naturels ou artificiels.

15 13) Procédé de préparation de l'interféron gamma, caractérisé en ce qu'on cultive sur un milieu complet une souche selon l'une des revendications 8 à 10 dans laquelle le gène codant pour l'expression d'une protéine d'intérêt industriel est le gène codant pour l'interféron gamma.

20

pDB6 :

le fragment Hind III - BamH I

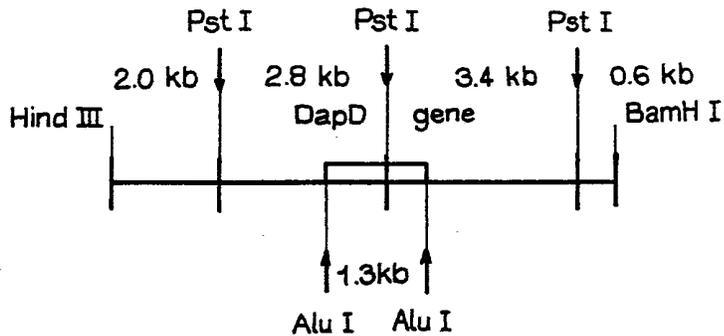


FIG-1

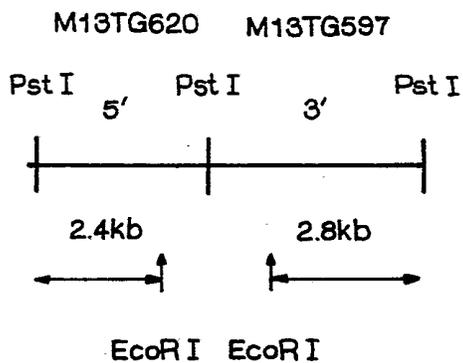
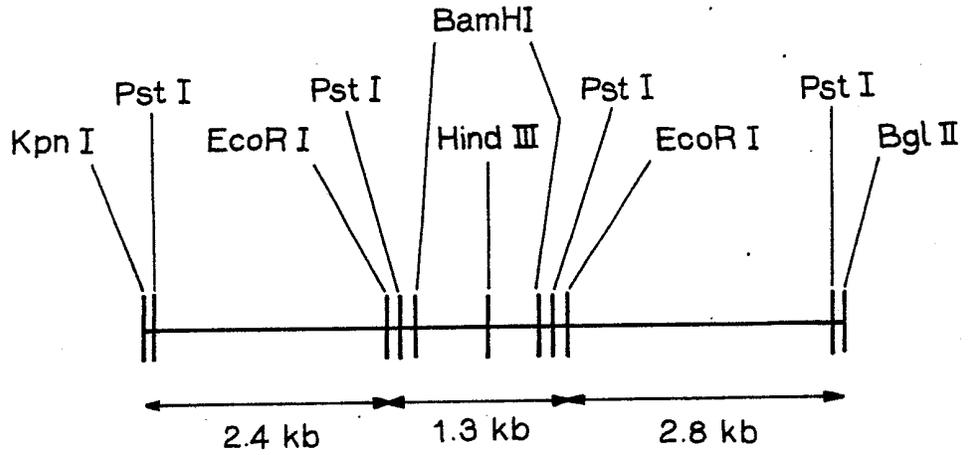


FIG-2

pTG47 : 2 / 10

le fragment KpnI - BglII



région
5' flanquante

can R

région
3' flanquante

FIG- 3

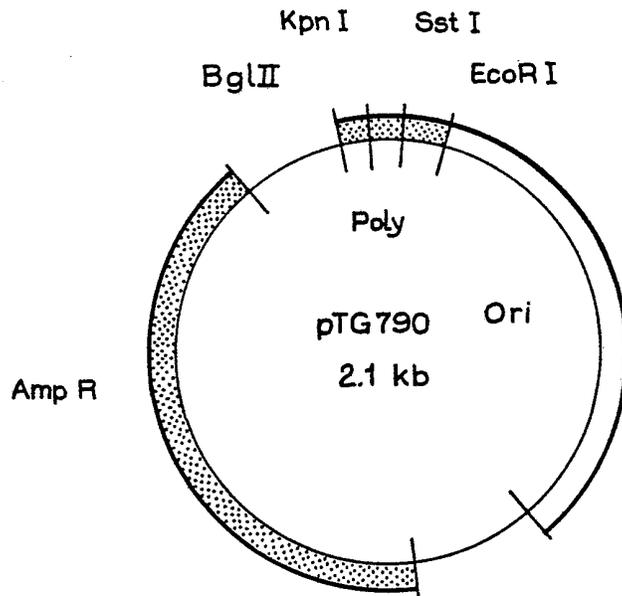


FIG- 5



FIG- 4A

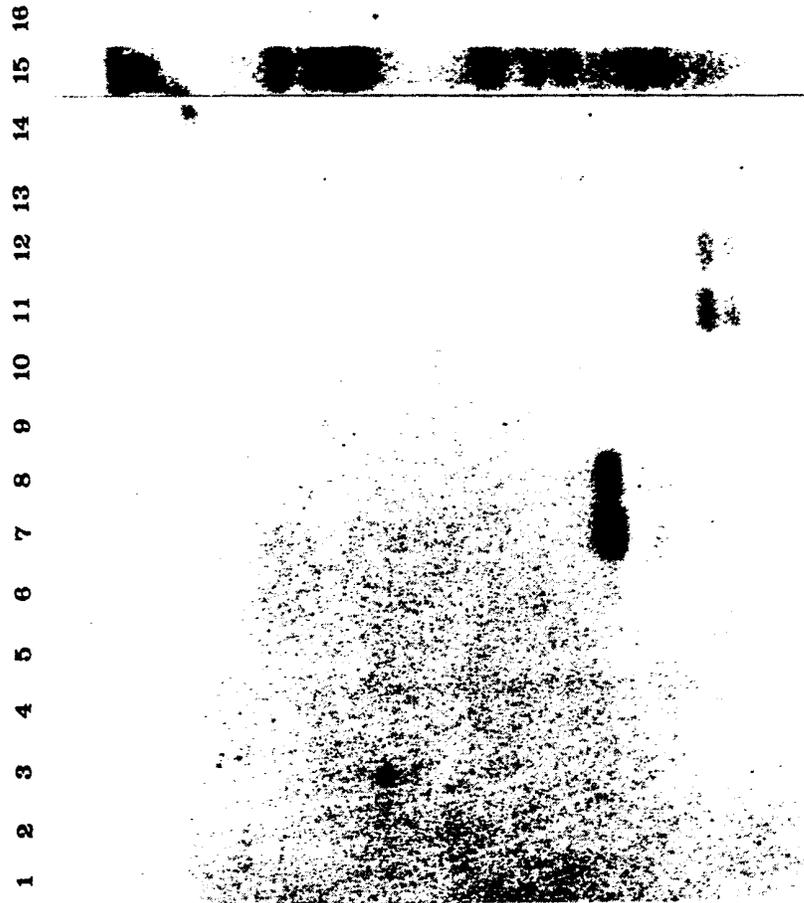


FIG- 4B



FIG-4C



FIG-4D

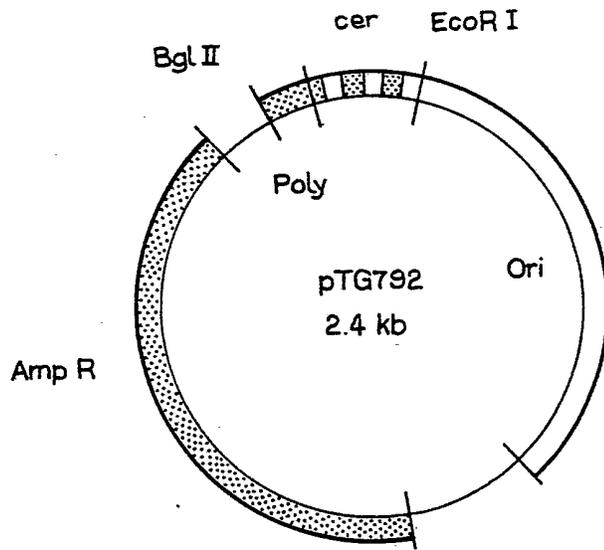


FIG- 6

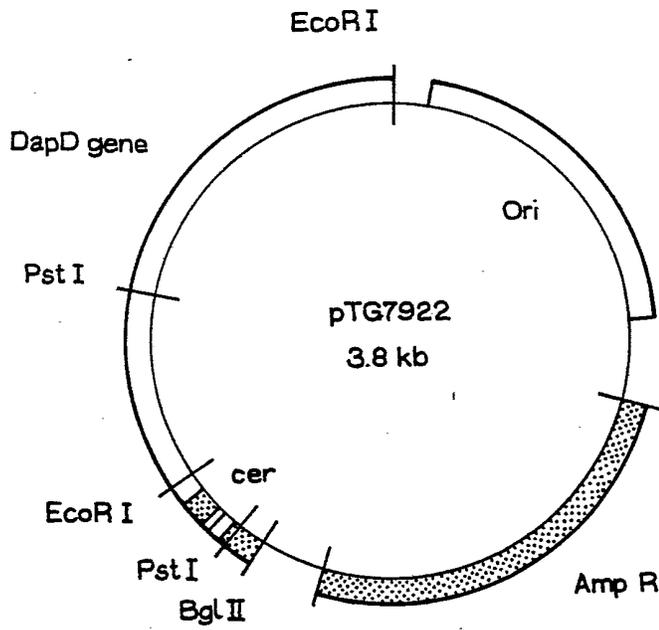
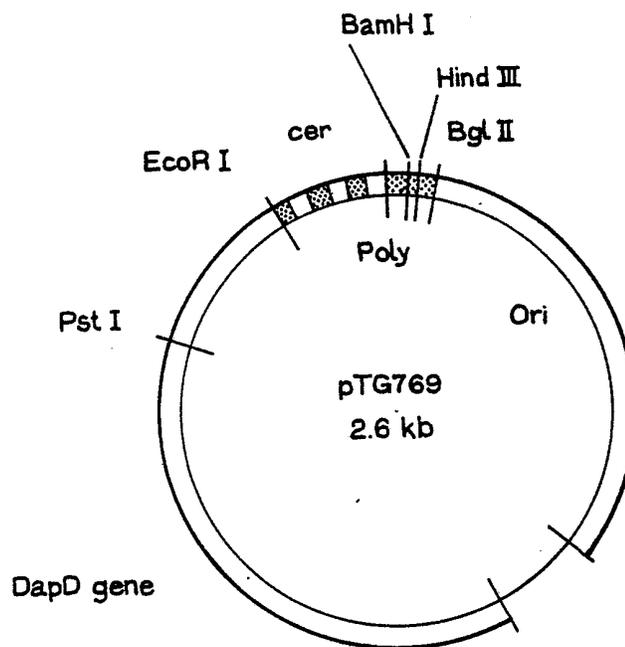
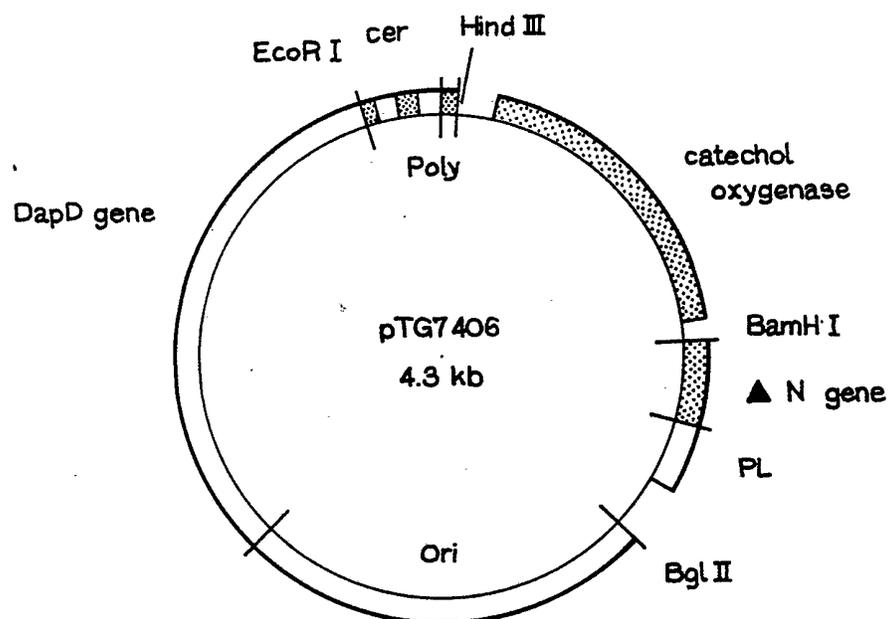


FIG- 7

8 / 10

FIG - 8FIG - 9

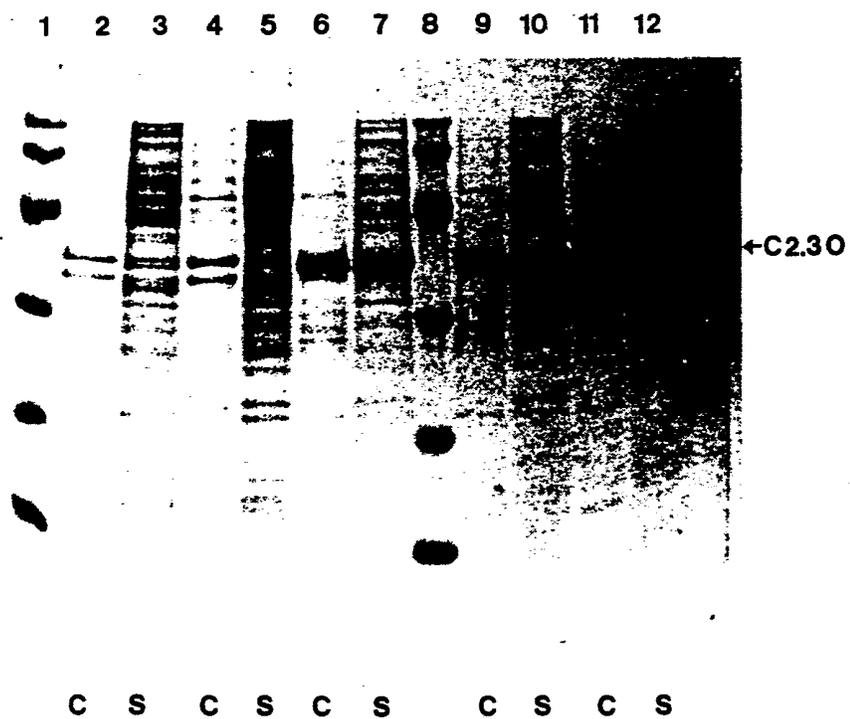


FIG-10

10 / 10

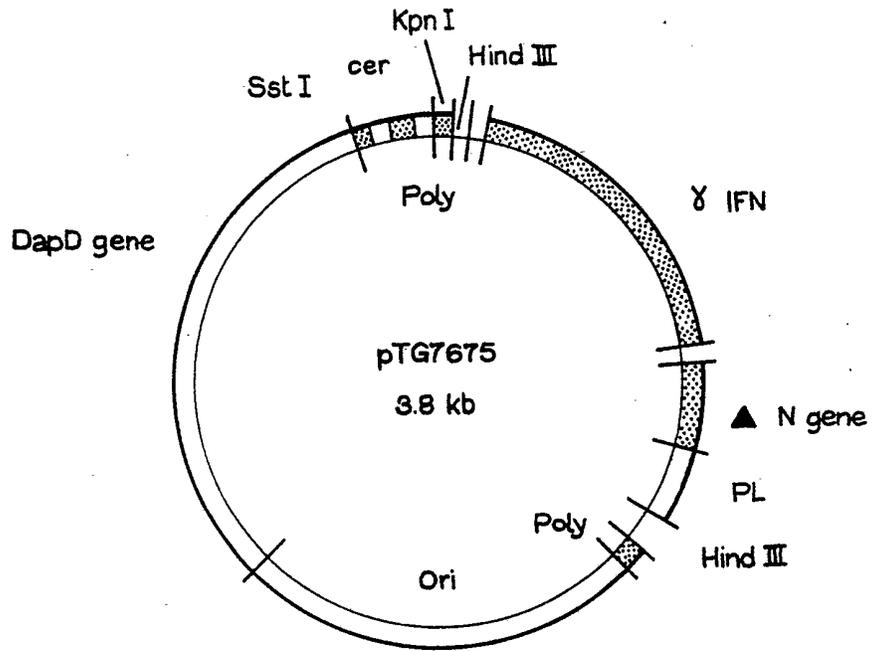


FIG-11

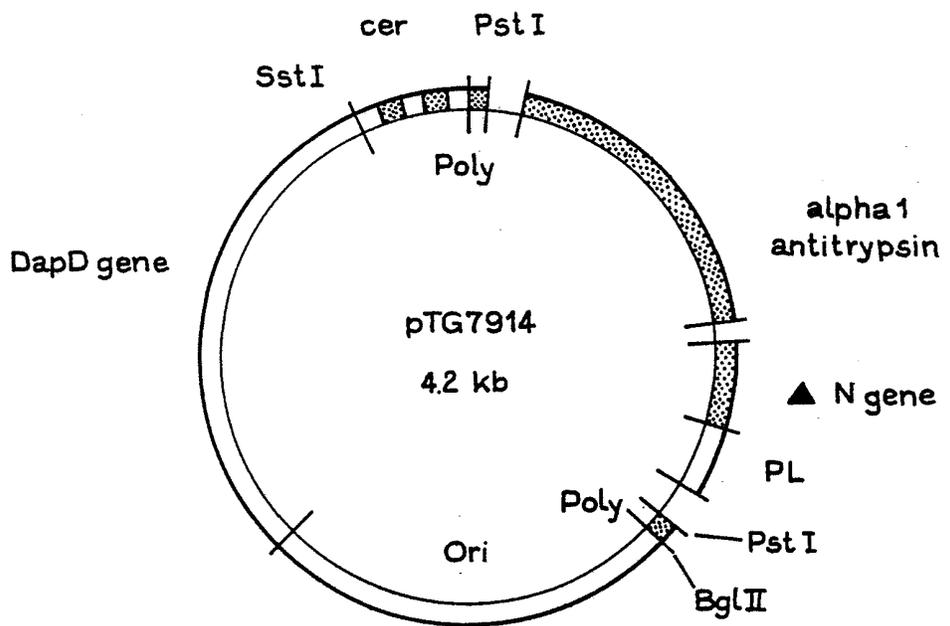


FIG-12