



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

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑲ Numéro de la demande: 1189/84

⑳ Date de dépôt: 09.03.1984

㉔ Brevet délivré le: 29.04.1988

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 29.04.1988

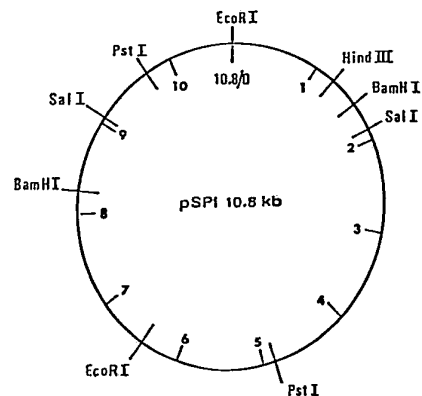
⑦③ Titulaire(s):
Antibioticos S.A., Madrid 3 (ES)

⑦② Inventeur(s):
Garcia Lopez, José Luis, Madrid 16 (ES)

⑦④ Mandataire:
Micheli & Cie, ingénieurs-conseils, Genève

⑤④ **Vecteur plasmide hybride.**

⑤⑦ Le nouveau vecteur plasmide hybride pSP1 est capable de transformer des bactéries du genre *Escherichia* et correspond à la carte génétique présentée dans la figure 1. Ce plasmide confère aux cellules *E.coli* K12 la capacité de fermentation du sucrose. Le plasmide peut également être utile pour porter d'autres informations génétiques pour le contrôle de la production de composés chimiques d'intérêt commercial par un tel micro-organisme. Les cultures de fermentation de ces micro-organismes ainsi obtenus peuvent être effectuées dans un milieu contenant du sucrose comme source de carbone principale, tel que des mélasses. La stabilité du plasmide est augmentée dans un tel milieu.



REVENDECATIONS

1. Vecteur plasmide hybride pSP1 pour la transformation de bactéries du genre *Escherichia* et correspondant à la carte génétique selon la figure 1, caractérisé par le fait que:

- a) il comporte la séquence nucléotide complète du plasmide pBR325 et un insert DNA étranger sur le site PstI du pBR325;
- b) il a une dimension d'environ 10,8 kb et les sites de clivage suivants pour endonucléases de restriction:

Enzyme de restriction	Nombre de sites de clivage
BglII	0
XbaI	0
XhoI	0
SmaI	1
HindIII	1
ClaI	2
BamHI	2
EcoRI	2
SaII	2
PstI	2
SphI	2
HincII	5
PvuII	5

c) ledit insert DNA est le fragment 4,85 kb du plasmide pSP1 montré dans la figure 1.

2. *Escherichia coli* DH1 (pSP1), ayant la référence de dépôt NCIB 11940 et contenant le vecteur plasmide hybride pSP1 selon la revendication 1.

DESCRIPTION

La présente invention se rapporte à un nouveau vecteur plasmide hybride susceptible de transformer des bactéries du genre *Escherichia*, et plus particulièrement de conférer à des cellules *E. coli* K12 la capacité de fermenter le sucrose.

Il est bien connu que les souches d'*Escherichia coli* K12 sont parmi les micro-organismes préférés pour effectuer des expériences de génie génétique. La technologie de recombinaison du DNA a été développée industriellement pour produire commercialement des substances intéressantes en utilisant le système hôte-vecteur d'*Escherichia coli* K12, cela pour deux raisons principales, à savoir, d'une part, le fait que la génétique de ces micro-organismes est la mieux connue pour le moment et, d'autre part, que les règles de recombinaison du DNA de plusieurs pays insistent sur l'utilisation de cette souche pour effectuer des expériences de recombinaison. Toutefois, ces souches n'ont pas le pouvoir de fermentation du sucrose que d'autres micro-organismes utiles industriellement ont, tels que *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* et les levures. En conséquence, les souches d'*Escherichia coli* K12 ne peuvent pas croître efficacement en utilisant des produits de départ, tels que des mélasses, contenant du sucrose comme source de carbone principale. Ainsi, il est souhaitable d'obtenir un vecteur plasmide *E. coli* qui pourrait être utilisé afin de conférer à ces bactéries le caractère de fermentation du sucrose en même temps qu'il pourrait être utile pour apporter une information génétique utilisable industriellement.

Ce vecteur plasmide présenterait un autre avantage par rapport aux autres vecteurs classiques, à cause du fait que le phénotype de fermentation du sucrose peut contribuer à assurer la stabilité d'une culture de micro-organismes contenant ce vecteur, lorsqu'un milieu de culture avec du sucrose comme source de carbone est utilisé. Dans un tel milieu, seules les cellules portant le plasmide croissent, puisqu'elles ont seules la possibilité de fermenter le sucrose. Si les cellules perdent leur plasmide contenant les gènes utiles commercia-

lement, elles perdent également leur capacité de croître. Cela évite l'addition de grandes quantités d'antibiotiques dans le milieu de culture pour assurer la stabilité du plasmide qui est économiquement coûteux.

Ainsi, le but de l'invention consiste à fournir un vecteur plasmide qui fournisse un micro-organisme utilisable industriellement. Un autre but est de fournir une culture micro-organique dans laquelle des micro-organismes contenant un plasmide utile industriellement peuvent croître alors que les micro-organismes ne contenant pas un tel plasmide ne croissent pas. Le vecteur plasmide selon l'invention et visant à atteindre le premier but précité présente les caractéristiques définies dans la revendication 1.

Le présent inventeur a réussi à réaliser génétiquement un micro-organisme du genre *Escherichia* en introduisant par transformation dans une souche d'*E. coli* K12 un vecteur plasmide incluant un fragment de DNA qui confère aux cellules la capacité de fermenter le sucrose. Le micro-organisme nouveau ainsi réalisé peut croître dans un milieu de culture contenant du sucrose comme seule source de carbone. Si le plasmide est éliminé des cellules, alors le micro-organisme ne peut pas utiliser le sucrose et ne peut pas croître dans un tel milieu. Par conséquent, les souches d'*E. coli* K12 comportant ce vecteur plasmide peuvent croître efficacement dans des matières premières telles que des molasses, qui contiennent du sucrose comme source principale de carbone.

Ce nouveau vecteur plasmide peut être utilisé pour incorporer d'autres gènes d'intérêt industriel. Dans ce cas, la capacité de fermentation du sucrose conférée par le vecteur plasmide peut être utile, non seulement pour permettre la croissance du micro-organisme dans un milieu contenant du sucrose, mais également pour augmenter la stabilité du plasmide lorsque la fermentation est effectuée dans ces milieux, même sans addition d'antibiotique à la culture. En outre, si la présence d'autres micro-organismes doit être maîtrisée, il est possible d'ajouter au milieu un antibiotique auquel le vecteur plasmide peut conférer de la résistance, augmentant par cette méthode alternative la stabilité du plasmide. En conséquence, le micro-organisme et la méthode par lesquels cette bactérie transformée est obtenue sont d'une grande utilité dans les procédés de fermentation commerciaux.

Le micro-organisme utilisé dans cette invention est la souche bien connue d'*Escherichia coli* DH1 décrite dans «Molecular cloning» (Cold Spring Harbor, 1982), qui est l'une des souches préférées d'*E. coli* K12 pour réaliser des expériences de clonage à cause de leur bonne propriété de transformation. Bien entendu, d'autres souches d'*E. coli* peuvent également être utilisées avec de bons résultats.

Pour obtenir les gènes de fermentation du sucrose (sucrose operon), le DNA de la souche d'*E. coli* AB 1281 (scr53) a été utilisé. Cette souche, mise à disposition par le Dr W.A. Wohlhieter, porte le plasmide conjugatif scr 53 (53 Mdal) qui s'est révélé comme conférant à une souche de *Salmonella* isolée cliniquement la propriété inhabituelle de fermentation du sucrose («J. Bacteriol.», 122, 401, 1975). Le plasmide scr 53 qui contient l'opéron sucrose peut être utilisé pour transférer par conjugaison ou transduction la capacité de fermentation du sucrose à d'autres souches *Salmonella* ou *Escherichia coli* («J. Bacteriol.», 122, 401, 1975), mais ne peut pas être utilisé comme un vecteur plasmide de clonage pour des expériences génétiques. Ainsi, l'opéron sucrose contenu dans le plasmide scr 53 a été sous-cloné en des vecteurs plasmides appropriés pour permettre de nouvelles manipulations génétiques de cet opéron.

Après extraction du DNA du plasmide scr 53 par une procédure conventionnelle, le DNA a été traité avec une endonucléase de restriction. Comme vecteur DNA, n'importe quel plasmide ou phage qui peut se propager dans des cellules microbiennes d'*Escherichia coli* peut être employé. Après digestion du vecteur DNA avec une endonucléase de restriction, aucune technique spéciale n'est requise afin d'incorporer le fragment DNA scr 53 dans le vecteur; toute technique conventionnelle utilisée dans la préparation du DNA recombinant peut être utilisée. Le plasmide hybride ainsi obtenu peut être

incorporé dans un micro-organisme du genre *Escherichia* par des techniques de transformation conventionnelles, bien que l'efficacité puisse différer selon ces techniques.

Les transformants sont aisément choisis, étant donné que ces colonies peuvent croître dans un milieu avec sucrose comme seule source de carbone et ont des marqueurs dans le vecteur utilisés tels que des résistances aux antibiotiques.

Lorsque le plasmide dans le transformant ainsi obtenu porte une information génétique utile pour un procédé de fermentation simultanément avec les gènes de fermentation du sucrose, les transformants peuvent croître parfaitement dans le milieu contenant du sucrose telles que des mélasses, permettant à l'opéron sucrose de maintenir la stabilité du plasmide.

L'opéron sucrose ainsi cloné peut être sous-cloné en d'autres vecteurs plasmidiques ayant un large domaine d'hôte, tel que le plasmide RSF1010 qui peut être utile pour conférer, par transformation, la capacité de fermentation du sucrose à d'autres bactéries gram-négatives.

L'invention sera maintenant décrite plus en détail en référence à l'exemple illustratif ci-après.

Exemple :

A. Préparation du DNA plasmide *scr-53* possédant l'information génétique responsable du caractère de fermentation du sucrose.

Escherichia coli AB1281 (*scr 53*), portant le plasmide conjugatif *scr-53*, exconjuguant de la souche *E. coli* AB1281 (CGSC 1281), a été fourni par le Dr J.A. Wohlhieter («J. Bacteriol.», 122, 401, 1975). Cette souche a été cultivée à 37° C pendant 16 heures avec agitation dans 500 ml de milieu L contenant 1% de peptone, 0,5% d'extrait de levure, 0,5% de NaCl et 0,1% de sucrose, ajusté à un pH de 7,2. Les cellules bactériennes ont été recueillies et le DNA plasmide a été extrait selon la technique de Hansen et Olsen («J. Bacteriol.», 135, 227, 1978). Le plasmide *scr 53* a été ensuite purifié par centrifugation isopycniqne dans du CsCl en présence de bromure d'éthidium. 10 µg de DNA purifié ont ainsi été obtenus.

B. Préparation de DNA vecteur.

Le DNA du plasmide pBR325, un vecteur contenant des gènes de résistance à l'ampicilline, tétracycline et chlorophénicol comme marqueurs («Gene.», 4, 121, 1978) a été préparé comme suit: des cellules d'*Escherichia coli* K12 DH1 contenant le plasmide pBR325 ont été incubées à 37° C dans 500 ml d'un bouillon L (1% de peptone, 0,5% d'extrait de levure, 0,5% de NaCl, ajusté à un pH de 7,2) contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les cultures de phase exponentielles ont été amplifiées avec 300 µg/ml de spectinomycine. Après 16 heures d'incubation, les cellules ont été recueillies et lysées par traitement avec du lysozyme et du SDS («Biochim. Biophys. Acta», 299, 516, 1973). Après purification par centrifugation à équilibre du gradient de densité dans CsCl-bromure d'éthidium, 500 µg de DNA plasmide ont été obtenus.

C. Insertion du fragment de DNA plasmide *scr 53* dans le DNA vecteur.

Un microgramme de DNA plasmide *scr 53* et deux microgrammes de DNA vecteur ont été traités chacun avec l'endonucléase de restriction PstI à 37° C pendant 1 heure pour ouvrir les chaînes de DNA, puis chauffés à 65° C pendant 10 minutes.

Le DNA plasmide *scr 53* digéré et les solutions de DNA vecteur ont été mélangées et soumises à une réaction de liaison (ligation) des fragments DNA par T4 phage DNA ligase en présence de ATP, de MgCl₂ et de dithiothréitol à 14° C pendant 24 heures. Le DNA recombinant a été recueilli par précipitation dans l'éthanol.

D. Transformation génétique avec le plasmide hybride contenant l'information génétique responsable du caractère de fermentation du sucrose.

Les cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH1 ont été préparées par la méthode RbCl décrite par Hanahan («J. Mol. Biol.», 166,

557, 1983). Le DNA obtenu dans l'étape (C) contenant les plasmides hybrides a été ajouté à la suspension de cellules compétentes. La suspension a été maintenue dans de la glace pendant 20 minutes, puis chauffée à 37° C pendant 2 minutes et laissée à nouveau au repos dans de la glace pendant 60 secondes. Les cellules, contenant maintenant le DNA, ont été inoculées dans un bouillon L et le milieu a été agité à 37° C pendant 1 heure, de sorte que la réaction de transformation soit complète. Les cellules ont été recueillies et lavées avec une solution saline (NaCl 8,5 g/l) et déposées sur un milieu agar (9 g K₂HPO₄, 4,5 g KH₂PO₄, 2 g (NH₄)₂SO₄, 0,1 g MgSO₄·7H₂O, 0,01 g FeSO₄·7H₂O, thiamine-HCl 1 mg, 5 g de sucrose, 15 g d'agar par litre et 12,5 µg/ml de tétracycline). Les plaques ont été incubées à 37° C et, après 2 jours d'incubation, 8000 colonies ont été comptées sur ces plaques. Une centaine de ces colonies ont été prélevées, purifiées et isolées. Chaque transformant ainsi obtenu a été analysé en ce qui concerne sa capacité de fermentation du sucrose (*scr*⁺ phénotype) en utilisant un milieu contenant 10 g de peptone, 5 g de NaCl, 10 g de sucrose, 0,02 g de bromocrésol pourpre et 15 g d'agar par litre. Dans ce milieu, les transformants de fermentation de sucrose apparaissent sous forme de colonies jaunes. Les transformants ont été également analysés en ce qui concerne leur résistance à la tétracycline et au chloramphénicol et leur sensibilité à l'ampicilline. Les plasmides des cellules présentant le phénotype approprié (*scr*⁺, CmR, TcR, ApS) ont été analysés par une méthode de mini-préparation (Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Les plasmides hybrides ont été digérés par PstI, et un clone comportant un plasmide avec un insert PstI de 4,85 Kb a été choisi. Le plasmide hybride pBR325 contenant ledit insert a été dénommé pSPI présentant une dimension de 10,8 Kb.

E. Préparation du plasmide pSPI.

Des cellules de fermentation du sucrose d'*Escherichia coli* DH1 (pSPI) (AM512) comportant le plasmide pSPI ont été utilisées pour extraire le DNA plasmide pSPI par la même procédure que celle décrite dans l'étape (B).

F. Sites de clivage pour diverses endonucléases de restriction du plasmide pSPI.

Dans cette étape, 0,5 µg du DNA plasmide pSPI préparé ci-dessus a été digéré avec des endonucléases de restriction telles que:

EcoRI	<i>Escherichia coli</i>
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>
PstI	<i>Providencia stuartii</i>
SalI	<i>Streptomyces albus</i>
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>
PvuII	<i>Proteus vulgaris</i>
ClaI	<i>Caryophanum latum</i>
XhoI	<i>Xanthomonas holicola</i>
HincII	<i>Haemophilus influenzae</i>
SphI	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
SmaI	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
BglIII	<i>Bacillus globigii</i>

Les endonucléases de restriction ont été obtenues de Biolab New England Inc. et de Boehringer Mannheim GmbH, et ont été utilisées dans des conditions appropriées pour chaque enzyme. Les fragments de DNA obtenus ont été analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose 0,7%. Le poids moléculaire de chaque fragment a été déterminé à partir de la mobilité électrophorétique. Le poids moléculaire a été estimé sur la base d'une courbe standard rapportée à la mobilité électrophorétique de fragments de DNA de poids moléculaire connu, dérivé de la digestion HindIII des DNAs phage λ et ϕ₂₉. Les résultats obtenus ont été rapportés dans le tableau 1 ci-après. Le diagramme de restriction du plasmide pSPI a été réalisé par des digestions simples et doubles du plasmide DNA avec des endonucléases de restriction, par analyse des fragments de DNA au moyen d'électrophorèses sur gel d'agarose. Le diagramme connu de

l'endonucléase de restriction du plasmide pBR325 («Gene.», 14, 289, 1981) a également été utilisé pour déterminer le diagramme de restriction de pSPI qui est présenté sur la figure 1 annexée.

G. *Analyse de l'enzyme de clivage du sucrose.*

L'activité sucrose a été déterminée par une méthode fondée sur l'apparition du sucre réducteur après fragmentation de sucrose de la manière suivante: on a fait croître des cellules *E. coli* DHI contenant le plasmide pBR325 ou le nouveau plasmide vecteur hybride pSPI dans un bouillon L et dans un bouillon L contenant 10 mM de sucrose. Les cellules ont été recueillies et les boulettes bactériennes ont été lavées avec 50 mM de tampon phosphate de potassium (pH = 6,5) contenant 100 mM de KCl et 1 mM de 2-mercaptoéthanol. Après lavage, les cellules ont été resuspendues dans le même tampon et sonicatées. La suspension sonicate a été centrifugée à 40 000 × g pendant 20 minutes à 4° C. La phase surnageante a été extraite et utilisée sans autre traitement. Un mélange de 0,5 ml de la préparation enzymatique et de 0,5 ml de sucrose 1M a été incubé pendant 30 minutes à 37° C. La réaction a été stoppée par addition de 1 ml de réactif dinitrosalicylique («Methods in Enzymol.», 1, 149, 1955). Des échantillons ont été placés dans un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes, refroidis dans de la glace et dilués avec 20 ml d'eau distillée. Les densités optiques des échantillons ont été déterminées à 540 nm. Des solutions standard de glucose ont été utilisées comme référence. La concentration en protéine a été déterminée par une méthode classique.

Comme montré dans le tableau 2 ci-après, l'activité sucrase était présente dans les cellules contenant l'*E. coli* DHI pSPI.

Une souche (AM 512) du nouveau plasmide *Escherichia coli* (K12) DHI (pSPI) a été déposée auprès de la National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, P.O. Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB98D6 (UK), et a reçu le numéro d'ordre de dépôt NCIB 11940 en date du 10 janvier 1984.

Tableau 1

Enzyme endonucléase de restriction	Nombre de sites de clivage du plasmide pSPI
BgIII	0
XbaI	0
XhoI	0
SmaI	1
HindIII	1
ClaI	2
BamHI	2
EcoRI	2
SaII	2
PstI	2
SphI	2
HincII	5
PvuII	5

Tableau 2

Souche	Plasmide	Croissance dans milieu sel minimum M63 + thiamine + 0,5% sucrose	Phénotype de fermentation du sucrose	Activité de sucrase (mg de sucre réducteur/30 mg de protéine)	
				Bouillon L	Bouillon L 10 mM sucrose
<i>E. coli</i> DHI	pBR325	—	scr ⁻	0,0	0,0
<i>E. coli</i> DHI	pSPI	+	scr ⁺	1,4	1,4

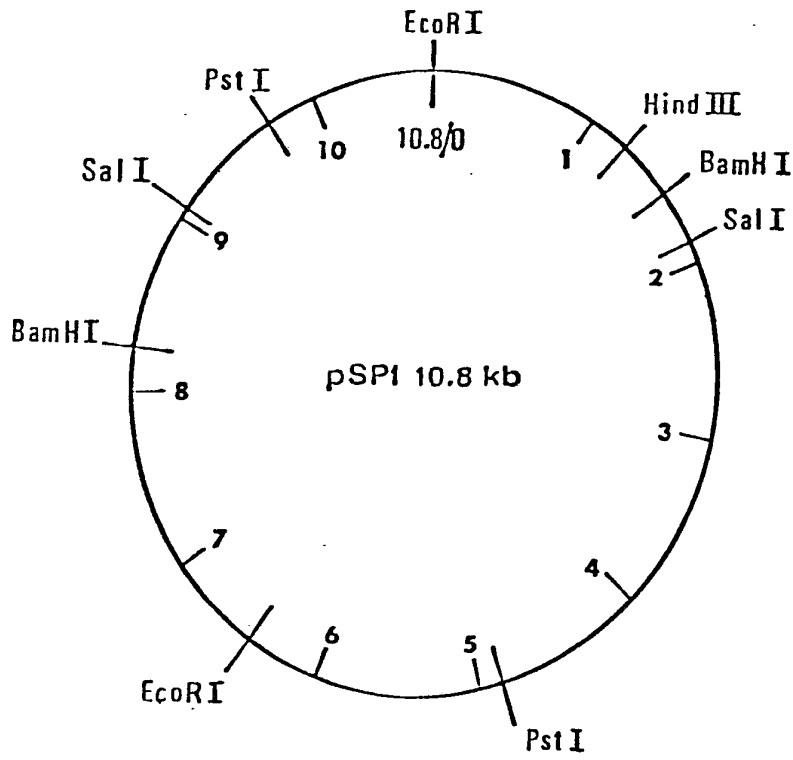


Figure 1