

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 835 848

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

②① N° d'enregistrement national :

02 01835

⑤① Int Cl⁷ : C 12 N 15/65, C 12 N 15/60

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 14.02.02.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.08.03 Bulletin 03/33.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *EVOLOGIC SA Société anonyme —
FR.*

⑦② Inventeur(s) : MARLIERE PHILIPPE et DORING
VOLKER.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ COMBINAISONS DE VECTEURS ET LEURS HOTES POUR PROPAGER ET EXPRIMER DES GENES
RECOMBINANTS SANS RECOURIR A DES ANTIBIOTIQUES.

⑤⑦ L'invention se rapporte à de nouveaux systèmes
eubactériens d'expression de protéines, utilisant le gène
dapA comme marqueur de sélection, ainsi qu'à leur utilisation
pour la production de protéines recombinantes.

FR 2 835 848 - A1



L'invention se rapporte à de nouveaux systèmes eubactériens d'expression
5 de protéines, permettant de ne pas utiliser d'antibiotiques, ainsi qu'à leur utilisation
pour la production de protéines recombinantes.

La production de protéines recombinantes dans des hôtes eubactériens
s'effectue actuellement en utilisant des plasmides portant des gènes de résistance
aux antibiotiques en tant que marqueurs de sélection positive. On transforme les
10 microorganismes avec ces plasmides portant le gène codant pour la protéine
d'intérêt, sous le contrôle d'un promoteur approprié (constitutif ou inductible selon
le but recherché), et on sélectionne les transformants, par leur aptitude à proliférer
dans un milieu contenant l'antibiotique marqueur de sélection.

On utilise en général l'ampicilline, la tétracycline, la kanamycine ou le
15 chloramphénicol pour la sélection. Parmi ces antibiotiques utilisés pour la sélection,
ceux dont l'activité est bactéricide sont généralement préférés à ceux dont l'activité
est bactériostatique.

Toutefois, de tels systèmes d'expression, s'ils peuvent éventuellement être
adaptés à la production de protéines dans les laboratoires scientifiques, ne sont pas
20 souhaitable pour la production de protéines à grande échelle. En particulier, les
plasmides portant les gènes de résistance à un antibiotique peuvent être échangés
entre des microorganismes, ce qui peut donner lieu à une dissémination du gène de
résistance dans des organismes sauvages. Par ailleurs, il peut rester des traces
d'antibiotiques dans les préparations de protéines, ce qui est rédhibitoire lorsque la
25 protéine recombinante doit obtenir un agrément de la part d'autorités
réglementaires.

Il convient donc de mettre au point de nouveaux systèmes d'expression de
protéines, dont la propagation ne requiert pas l'emploi d'antibiotiques pour produire
la protéine d'intérêt.

30 On peut définir la stabilité d'un plasmide dans son hôte comme étant la
propriété de maintenir une expression de la (ou des) protéine(s) d'intérêt, tout en
maintenant l'activité détectable de la protéine, après propagation de l'hôte, pendant

un nombre de génération supérieur à 40 générations, de préférence, supérieur à 50 générations, de façon plus préférée supérieur à 60 générations.

Une méthode de propagation de l'hôte consiste à ensemercer au millième un milieu de culture avec un aliquote provenant d'une culture stationnaire
5 (généralement après 24 heures de culture dans les conditions normales (37 °C pour *Escherichia coli*)), et à répéter cette opération. Chaque opération de nouvel ensemencement correspond à la réalisation d'environ 10 générations.

Dans un premier mode de réalisation, l'invention se rapporte à un vecteur
10 d'expression d'une protéine dans une eubactérie, caractérisé en ce qu'il comprend, en tant qu'unique facteur de sélection positive, un gène complétant une auxotrophie à l'acide meso-diaminopimélique (DAP), choisi notamment dans les gènes de synthèse de DAP.

De préférence, le facteur de sélection positive n'est pas le gène *dapD2*, mais
15 est le gène *asd* (codant pour l'aspartate semialdéhyde déhydrogénase, Haziza *et al.*, EMBO J., 1982, 1(3), 379-84, GenBank V00262, SEQ ID N° 20), ou le gène *dapA*. Le gène *dapA* choisi est de préférence issu de *E. coli*, tel le gène décrit dans GenBank (M12844), et dont la séquence codante est représentée par SEQ ID N° 1.

Ce gène *dapA* code pour la dihydropicolinate synthase, enzyme qui catalyse
20 la première étape de la synthèse de l'acide meso-diaminopimélique (DAP) précurseur du peptidoglycane de la paroi et de la lysine des protéines.

Le gène *asd* code pour l'aspartate semialdéhyde déhydrogénase, enzyme impliquée non seulement dans la synthèse du DAP mais aussi dans celle de la lysine, la méthionine, et la thréonine des protéines.

Un intérêt d'utiliser une auxotrophie au DAP est que, contrairement à la
25 plupart des autres auxotrophies décrites, on peut utiliser des milieux riches classiques pour propager les bactéries. En effet, ceux-ci ne contiennent pas de DAP, alors qu'ils contiennent généralement les facteurs de complémentation pour les autres auxotrophies (acides aminés...), et qu'il est donc nécessaire, pour ces autres
30 auxotrophies, d'utiliser des milieux minimaux.

Un autre intérêt du choix de DAP comme marqueur d'auxotrophie est que le déficit en cet élément est bactéricide (et non bactériostatique).

Afin de réaliser la sélection des transformants, on utilise alors des hôtes pour lesquels le gène *dapA* a été inactivé, de préférence de façon non réversible, c'est-à-dire qu'une mutation naturelle lors de la croissance de l'hôte ne peut pas restaurer l'activité endogène du gène *dapA*. Lorsque le gène est inactivé, les bactéries ne peuvent pas se développer sur un milieu ne contenant pas de DAP. En revanche, après transformation par le vecteur selon l'invention et complémentation en *trans*, la présence de DAP n'est plus requise pour la croissance des microorganismes.

On obtient les bactéries modifiées par des techniques classiques de mutagenèse dirigée ou d'inactivation du gène par recombinaison homologue. Toutes ces techniques sont bien connues de l'homme du métier. On préfère notamment le remplacement du gène *dapA* par recombinaison homologue, pour assurer que l'inactivation est irréversible. Pour ce faire, on peut utiliser un vecteur de recombinaison homologue, dans lequel un gène de résistance à un antibiotique (par exemple de résistance au chloramphénicol ou à l'érythromycine) est flanqué de séquences homologues aux séquences flanquant le gène *dapA*. On sélectionne les bactéries Δ *dapA*, en fonction de leur résistance à l'antibiotique et de leur incapacité à pousser en absence de DAP.

Il convient de noter que l'utilisation d'un antibiotique pour obtenir la bactérie mutante est moins gênante, dans la mesure où le gène de résistance à l'antibiotique est introduite dans le génome bactérien. Les risques de dissémination dudit gène à d'autres organismes sont alors réduits. De plus, le gène n'est présent qu'en une seule copie dans la bactérie (alors qu'il est présent à un grand nombre de copies lorsqu'il est porté par un plasmide). Par ailleurs, il n'est nul besoin de maintenir une pression de sélection en utilisant l'antibiotique sur la bactérie après avoir sélectionné la bactérie mutante désirée.

En conséquence, la technique classique d'obtention d'une bactérie knock-out pour le gène *dapA* peut être utilisée. De plus, si la présence d'un gène codant pour la résistance à l'antibiotique est réellement non désirable, certains systèmes de sélection négative peuvent permettre de supprimer ce gène, après inactivation du gène *dapA*.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit vecteur est stable dans son hôte procaryote, qui est préférentiellement *E. coli*.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit vecteur est dérivé du vecteur pQE-60 ou pQE-70 (le plasmide pQE-60 correspond à SEQ ID N° 3, le plasmide pQE-70 ne différant de celui ci que par un site multiple de clonage, ces deux plasmides étant commercialisés par Qiagen (www.qiagen.com)).

5 L'homme du métier comprend le terme « dérivé », qui signifie notamment que le vecteur final possède globalement le même squelette (notamment les origines de réplication, et éléments stabilisateurs...) que le vecteur de départ dont il est dérivé. Il est important de noter que ceci signifie également que, de préférence, les éléments intergéniques sont conservés.

10 Dans le cas présent, les modifications apportées au vecteur de base sont restreintes et ne modifient pas l'hôte de réplication du vecteur, ni ses propriétés fondamentales (nombre de copies, taille de l'insert, stabilité...). Dans le cas présent, on considère surtout qu'un vecteur est dérivé d'un autre, après substitution du gène marqueur de sélection positive.

15 Dans le cas présent, le gène *bla* codant pour la résistance à l'ampicilline du vecteur pQE-60 ou pQE-70 est remplacé par le gène *dapA*.

Dans un cas particulier de l'invention, le vecteur comporte en outre un gène permettant la régulation ou l'induction de l'expression de ladite protéine.

20 En effet, lorsque le vecteur selon l'invention est dérivé de pQE-60 ou pQE-70, le gène codant pour la protéine d'intérêt est alors sous le contrôle du promoteur T5, et de deux opérateurs lacO. Il peut donc être intéressant d'introduire, dans le squelette du vecteur selon l'invention, le gène *lacI*, codant pour une protéine interagissant avec les opérateurs lacO, et restreignant l'expression de la protéine d'intérêt. Lorsque l'on ajoute de l'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosidase) au milieu de culture, celui-ci fixe la protéine LacI, menant donc à l'expression induite de la protéine d'intérêt.

25 Dans un cas préféré, le vecteur selon l'invention est un vecteur pSP102, pSP114, pSP150, pSP139, pSP117, pSP136, tel que décrits dans les exemples, et en particulier le vecteur pSP114 ou pSP139 déposés à la CNCM sous les numéros d'ordre respectifs I-2796 et I-2793, le 08 février 2002.

30 Dans un autre mode de réalisation, l'invention se rapporte à un système d'expression d'une protéine, caractérisé en ce qu'il comporte :

- un premier vecteur selon l'invention, tel que décrit ci-dessus, et

- un hôte eubactérien, présentant une inactivation dans le gène *dapA*.

On a vu plus haut comment obtenir un hôte eubactérien (en particulier *E. coli*) présentant une inactivation, de préférence par une mutation (insertion, substitution, délétion) non réversible du gène codant pour ledit marqueur métabolique.

Dans un autre mode de réalisation, ledit système d'expression comporte en outre un second vecteur portant un élément permettant la régulation ou l'induction de l'expression de ladite protéine. Ledit élément a été décrit plus haut. Il peut ainsi s'agir d'un gène codant pour une protéine se fixant au promoteur ou à un opérateur du système d'expression sur le premier vecteur, fixation pouvant être diminuée par l'addition d'un composé compétiteur.

Alternativement, ledit élément peut être un facteur de transcription, sous le contrôle d'un promoteur inductible, notamment par l'IPTG, ou le lactose.

Dans un mode de réalisation préféré, ledit second vecteur ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique, et comprend le gène *thyA*, en tant qu'unique facteur de sélection positive.

Le gène *thyA* code pour la thymidylate synthase, et les bactéries présentant une inactivation dans le gène *thyA* nécessitent la présence de thymidine si elles possèdent l'allèle *tdk*, ou de thymine si elles possèdent aussi l'allèle *deoA* pour leur croissance. Un gène *thyA* préféré est celui d'*E. coli*, représenté par SEQ ID N° 2.

Dans ce cas, et pour permettre la sélection, l'hôte eubactérien présente aussi une inactivation dans le gène *thyA*.

Dans un cas particulier, ledit second vecteur est le vecteur pREP4 (SEQ ID N° 4, commercialisé par Qiagen), dans lequel le gène *neo* codant pour la résistance la kanamycine a été remplacé par le gène codant pour *thyA*.

Dans un cas préféré, ledit système d'expression comporte au moins l'un des vecteurs choisis parmi pSP114, pSP139 et pVDM62 et au moins une souche choisie parmi +552, +838, +849, +1005, +1010 déposés à la CNCM sous les numéros d'ordre I-2792 à I-2796 le 08 février 2002.

L'invention se rapporte également à un kit pour la production de protéines, comprenant un système d'expression selon l'invention, ainsi qu'à l'utilisation d'un vecteur selon l'invention, d'un système d'expression selon l'invention, ou d'un kit

selon l'invention pour la production de protéines recombinantes. Dans un mode de réalisation particulier, la protéine recombinante est la protéine pipA*, codée en particulier par le gène *pipA** (SEQ ID N° 19).

5

Dépôt de matériel biologique

Les organismes suivants ont été déposés le 08 février 2002 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux,
10 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest.

	- Souche +552	Numéro d'ordre I-2792
	- Souche +838	Numéro d'ordre I-2793
	- Souche +849	Numéro d'ordre I-2794
	- Souche +1005	Numéro d'ordre I-2795
15	- Souche +1010	Numéro d'ordre I-2796

Les souches déposées ont les génotypes suivants :

	- Souche +552	Δ dapA :: erm
	- Souche +838	Δ dapA :: erm pSP139
20	- Souche +849	Δ dapA :: cm
	- Souche +1005	Δ dapA :: cm Δ thyA :: erm
	- Souche +1010	Δ dapA :: cm Δ thyA :: erm pSP114 pVDM62

Les plasmides inclus dans les souches peuvent aisément être isolés par des
25 techniques connues de l'homme du métier, notamment en utilisant des kits commerciaux.

Les exemples ci-après sont destinés à illustrer certains modes de mise en œuvre de l'invention, et ne doivent pas être considérés comme limitant l'invention.

30 DESCRIPTION DES FIGURES

Les figures représentent les plasmides décrits dans les exemples.

Figure 1 : pSP102. Description du plasmide : MCS (396-455) ; LacZ (fragment N-Term de la β -Galactosidase) (469-146) ; Origine de répliation (réplicon pMB1) (866) ; Gène dapA (séquence codante de la dihydropicolinate synthetase) (2504-1626)

5 Figure 2 : pQE 60. Description du plasmide : Début de numérotation / site XhoI (1) ; Promoteur T5 / opérateur lac (7-87) ; Site + 1 de début de transcription (61) ; MCS (113-132) ; 6xHis-tag (133-150) ; Lambda t₀ (terminaison de la transcription) (173-267) ; rrnB T1 (terminaison de la transcription) (1033-1131) ; ColE1 origine de répliation (1608) ; Gène bla (séquence codante de la b-lactamase) (3226-2366).

10 Figure 3 : pSP114. Description du plasmide : Début de numérotation / site XhoI (1) ; Promoteur T5 / opérateur lac (7-87) ; Site + 1 de début de transcription (61) ; MCS (113-132) ; 6xHis-tag (133-150) ; Lambda t₀ (terminaison de la transcription) (173-267) ; rrnB T1 (terminaison de la transcription) (1033-1131) ; ColE1 origine de répliation (1608) ; Gène dapA (séquence codante de la dihydropicolinate synthetase) (3244-2366)

15 Figure 4 : pSP 139. Description du plasmide : Début de numérotation / site XhoI (1) ; Promoteur T5 / opérateur lac (7-87) ; Site + 1 de début de transcription (61) ; MCS (113-132) ; 6xHis-tag (133-150) ; Lambda t₀ (terminaison de la transcription) (173-267) ; rrnB T1 (terminaison de la transcription) (1033-1131) ; ColE1 origine de répliation (2812) ; Gène régulateur de l'opéron lac (lacI) (1219-2310) ; Gène dapA (4448-3570)

20 Figure 5 : pSP150. Description du plasmide : Début de numérotation / site XhoI (1) ; Promoteur T5 / opérateur lac (7-87) ; Site + 1 de début de transcription (61) ; MCS (113-132) ; 6xHis-tag (133-150) ; Lambda t₀ (terminaison de la transcription) (173-267) ; rrnB T1 (terminaison de la transcription) (1033-1131) ; ColE1 origine de répliation (2812) ; Gène régulateur de l'opéron lac (lacI) (1218-2309) ; Gène dapA (4447-3569)

25 Figure 6 : plasmide pSP117. Description du plasmide : Début de numérotation / site XhoI (1) ; Promoteur T5 / opérateur lac (7-87) ; Site + 1 de début de transcription (61) ; 6xHis-tag (1203-1220) ; Lambda t₀ (terminaison de la transcription) (1243-1343) ; rrnB T1 (terminaison de la transcription) (2103-2201) ; ColE1 origine de répliation (2684) ; Gène dapA (4303-3425)

Gène cloné : Gène synthétique pipA* (1068 pb ; 355 AA) (115-1182)

Figure 7 : pSP136. Description du plasmide : Début de numérotation / site XhoI (1) ; Promoteur T5 / opérateur lac (7-87) ; Site + 1 de début de transcription (61) ; 6xHis-tag (1203-1220) ; Lambda t₀ (terminaison de la transcription) (1243-1343) ; rrnB T1 (terminaison de la transcription) (2103-2201) ; ColE1 origine de répliation
5 (3882) ; Gène régulateur de l'opéron lac (lacI) (2278-3369) ; Gène dapA (5507-4629) ;

Gène cloné : Gène synthétique pipA* (1068 pb ; 355 AA) (115-1182)

Figure 8 : pREP4. Description du plasmide : Début de numérotation / site HindIII (1) ; Gène neo(codant l'aminoglycoside 3'-phosphotransférase) (357-1151) ; Gène
10 régulateur de l'opéron lac (lacI) (2620-1529)

Figure 9 : pVDM62. Description du plasmide : Début de numérotation / site HindIII (1) ; Gène thyA (527-1321) ; Extrémité 3' du gène neo (1471-1702) ; Gène régulateur de l'opéron lac (lacI) (3171-2080)

15 EXEMPLES

Exemple 1: Construction de plasmides propagés de façon stable dans E. coli sans marqueur de résistance à un antibiotique.

1.1. Construction d'un plasmide de clonage sans marqueur de résistance à un antibiotique.

20 Cette construction est réalisée à partir du plasmide commercial pUC18 (BioLabs) qui porte une origine de répliation du groupe de compatibilité ColE1 et le gène bla de résistance aux pénicillines spécifiant la β -lactamase.

25 La séquence du plasmide pUC18 a été modifiée par mutagenèse dirigée aux nucléotides 1615 (changement T vers C), 1617 (changement G vers A) et 1618 (changement T vers G) par une méthode décrite (Ansaldi et al., 1996 Anal. Biochem., 234: 110-111) en utilisant les oligonucléotides PUC1 et PUC2 (SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6). Le plasmide pSP98 ainsi obtenu possède un site unique XhoI. La digestion du plasmide pSP98 par les enzymes de restriction SspI et XhoI permet d'éliminer le gène bla.

30 Le gène dapA d'E. coli spécifie la dihydropicolinate synthase, enzyme qui catalyse la première étape de la synthèse de l'acide meso-diaminopimélique (DAP), un précurseur du peptidoglycane. Ce gène a été amplifié par PCR sur l'ADN chromosomique d'E. coli. 2 μ l d'ADN total ont été mis en présence des 4 dNTP

(250 μ M), de chacun des oligodésoxynucléotides PUC3 et PUC4 (500 nM) (SEQ ID N° 7 et SEQ ID N° 8) et d'une unité de Vent DNA Polymérase (BioLabs) dans un volume final de réaction de 50 ml dans le tampon 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM MgSO₄, 0.1 % Triton X-100. Après
5 une période de dénaturation à 95°C pendant 5 min, l'amplification de l'ADN a été réalisée durant 30 cycles de dénaturation 30 sec à 95°C - hybridation 30 sec à 52°C - élongation 1 min à 72°C, et terminée par 5 min d'élongation à 72°C.

Le fragment ainsi amplifié a été digéré par SspI et XhoI et introduit par ligation dans le plasmide pSP98 lui aussi préalablement digéré par SspI et XhoI.
10 Les produits de ligation ont été introduits dans des souches d'E. coli portant une délétion au locus *dapA* et qui nécessitent donc pour croître la présence dans le milieu de culture d'acide méso-diaminopimélique (DAP), et plus précisément dans les souches +849, (Δ *dapA*::*cat*, construite selon Richaud et al., 1993 J. Biol. Chem., 268:26827-26835), déposée à la CNCM sous le numéro I-2794, ou +552
15 (Δ *dapA*::*erm*, construite selon une méthode analogue à celle utilisée pour la souche +849), et déposée à la CNCM sous le numéro I-2792. Les transformants ont été sélectionnés sur le milieu riche de Luria-Bertani (LB, DIFCO) sans DAP.

Douze transformants ont été analysés pour essayer de déceler la présence de plasmides portant le gène *dapA*⁺ conformes à la construction espérée. Les ADN
20 plasmidiques de ces 12 transformants ont été extraits (Kit Qiaprep, Qiagen) et soumis à des coupures analytiques par des enzymes de restriction appropriées. Un plasmide conforme a été isolé et nommé **pSP102**. Une représentation schématique de ce plasmide est donnée en Figure 1.

La souche +541 contenant le plasmide pSP102 (Δ *dapA*::*erm* pSP102) a été
25 restreinte cinq fois consécutivement sur LB-agar sans DAP et le maintien du plasmide de clonage pSP102 en l'absence d'antibiotique a été établi.

1.2. Construction d'un plasmide d'expression sans marqueur de résistance à un antibiotique.

30 Cette construction utilise le plasmide commercial pQE60 (Qiagen, représenté schématique en Figure 2). Ce plasmide (origine de répllication ColE1, gène *bla*) contient le promoteur du phage T5, deux éléments de l'opérateur *lac*, le

site synthétique de liaison ribosomique RBSII en 5' du polylinker et une séquence de codage pour un tag 6 x His en 3' du polylinker.

Afin de remplacer le gène *bla* par le gène *dapA* d'E. coli, la séquence du plasmide pQE60 a été modifiée par mutagénèse dirigée (méthode selon Ansaldi et al., 1996, *op. cit.*) au nucléotide 838 (changement T vers A, oligonucléotides PQE60/1 et PQE60/2, SEQ ID N° 9 et SEQ ID N° 10), entraînant la destruction d'un site de restriction *SspI* et aux nucléotides 2358-2360 (changement TCT vers GTC, oligonucléotides PQE60/3 et PQE60/4, SEQ ID N° 11 et SEQ ID N° 12) entraînant la création d'un site de restriction *Sall*. Le plasmide obtenu, pSP110, a été digéré ensuite par *SspI* et *Sall* afin d'éliminer le gène *bla*.

Le gène *dapA* d'E. coli a été amplifié par PCR sur ADN chromosomique d'E. coli comme décrit ci-dessus dans l'exemple 1.1 à l'aide des oligonucléotides PQE60/5 et PQE60/6 (SEQ ID N° 13 et SEQ ID N° 14).

Le fragment ainsi amplifié a été digéré par les enzymes de restriction *XhoI* et *EcoRV* et introduit par ligation dans le plasmide pSP110 digéré par *SspI* et *Sall*. Les produits de ligation ont été introduits dans la souche +552 (*ddapA::erm*) et la souche transformante +644 sélectionnée sur milieu LB sans ajout de DAP. La présence du gène *dapA* sur le plasmide extrait de cette souche a été confirmée par séquençage. Ce plasmide, représenté schématiquement en Figure 3 a été nommé pSP114.

La construction d'un vecteur d'expression *dapA+* d'E. coli portant le gène répresseur *lacI* de l'opéron lactose a été réalisée à partir du plasmide pSP114 et le gène *lacI* du plasmide pREP4 (Qiagen) amplifié par PCR. L'amplification a été réalisée selon le protocole décrit ci-dessus en 1.1. en présence d'ADN plasmidique 10 nM et des oligodésoxynucléotides PQE60/7 et PQE60/8 (SEQ ID N° 15 et SEQ ID N° 16). Le fragment ainsi amplifié a été digéré par *NheI* et introduit par ligation dans le plasmide pSP114 préalablement digéré par *XbaI* (site de coupure unique au nucléotide 1134). Les produits de ligation ont été introduits dans la souche +552 et les transformants sélectionnés sur milieu LB sans ajout de DAP.

Les ADN plasmidiques des transformants ont été extraits et analysés. Ainsi, la présence du gène *lacI* sur le plasmide pSP139 (fig. 4) de la souche transformante +838 et son orientation par rapport aux autres éléments du plasmide ont été

vérifiées par coupures analytiques avec des enzymes de restriction appropriées et par séquençage. La souche +838 a été déposée à la CNCM sous le numéro I-2793.

Le même schéma de construction a été appliqué au vecteur commercial pQE70 (QIAGEN) qui possède un site de clonage (MCS : multiple cloning site) différent de celui du pQE60. Le vecteur résultant (**pSP150**) est représenté schématiquement en Figure 5.

Les plasmides **pSP114**, **pSP139** (dérivés de pQE60) et **pSP150** (dérivé de pQE70) offrent donc un large éventail de possibilités de clonage.

10 Exemple 2: Surexpression dans *E. coli* du gène hétérologue **pipA*** cloné dans les plasmides **dapA+**.

Le gène **pipA** d'une taille de 1066 pb codant pour la lysine cyclodésaminase de *Streptomyces pristinaespiralis* et dont la séquence est décrite dans le brevet WO 9601901-A1, est composé d'une proportion en G + C de 69,6 %. Ce gène a été réécrit suivant le code génétique optimisé pour l'expression dans *Escherichia coli* (**pipA***, SEQ ID n° 19) et est désormais composé d'une proportion en G + C de 38 %. Ce gène a été construit par PCR.

Afin d'introduire un site de restriction unique KpnI, le résidu thréonine 97 a été codé par ACC au lieu de ACT. Un codon de terminaison de la traduction TAA a été également ajouté en position 1080 (1er nucléotide du codon) de la séquence SEQ ID n° 19, et des sites de restriction uniques EcoRI et NcoI d'une part, HindIII d'autre part, ont été introduits respectivement en 5' et en 3' du gène permettant ainsi son insertion dans un vecteur de clonage. La traduction commence à l'ATG en position 15.

Le gène synthétique **pipA*** a été préalablement cloné dans le vecteur pQE60 pour donner le plasmide pSP47. Il a ensuite été inséré dans les vecteurs **dapA+** **pSP114** et **pSP139** (décrits ci-dessus en 1.2.). Le plasmide pSP47 a été coupé par les enzymes de restriction NcoI et BglII ; le fragment de digestion de 1076 bp a été introduit par ligation dans les plasmides pSP114 et pSP139 digérés par NcoI et BglII. Les produits de ligation ont été introduits dans la souche +552 (décrite à l'exemple 1.1) et les transformants sélectionnés en milieu LB sans DAP. Les plasmides **pSP117** (Figure 6) et **pSP136** (Figure 7) résultant respectivement des ligations avec les vecteurs **pSP114** et **pSP139** ont été caractérisés et réintroduits

dans la souche +552. Les souches +626 et +823 ont été ainsi isolées, hébergeant respectivement les plasmides **pSP117** et **pSP136**.

L'expression du gène *pipA** a été étudiée dans les trois souches +75, +626 et +823. La souche +75 est un dérivé de la souche d'*E. coli* K12 MG1655 (Vidal *et al.* (1998) *J. Bacteriol.*, 180 :2442-2449) contenant le plasmide pSP47 (pQE60::*pipA**) et le plasmide auxiliaire pREP4 portant le gène *lacI*. Les souches +626 et +823 et la souche contrôle +75 ont été cultivées en milieu LB à 37°C jusqu'à atteindre la densité optique (600 nm) de 0,8.

Dans le cas des souches +75 et +823, l'IPTG a été ajouté au milieu de culture suivant le protocole du fournisseur (Kit Qiaexpressionist, Qiagen) pour induire l'expression du gène *pipA**.

Les protéines totales des cellules ainsi cultivées ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide/SDS et colorées par le bleu de Coomassie. Une protéine d'un poids moléculaire de 36 kDa a été détectée et son taux d'expression a été estimé à environ 5 % des protéines totales dans les trois souches. Des cultures témoins des souches +75 et +823 sans ajout d'IPTG ont permis de contrôler l'absence d'expression du gène *pipA** et donc l'activité du répresseur *lacI* porté, en *trans* sur le plasmide auxiliaire pREP4 (souche +75), en *cis* sur le plasmide **pSP136** (souche +823).

20

Exemple 3: Stabilité de l'activité L-lysine cyclodésaminase propagée par un plasmide *dapA+* *lacI+* sans marqueur de résistance à un antibiotique.

Il est apparu que l'expression de l'activité de la L-lysine cyclodésaminase n'était pas stable dans la souche +626, bien que le plasmide se maintienne et assure la croissance en absence de DAP dans le milieu de culture. Ceci laisse suggérer que l'enzyme *PipA** est toxique pour les cellules. Cet effet n'a pas été décrit auparavant.

Les constructions décrites ci-dessus (souches +75 et +823) permettent de verrouiller l'expression du gène *pipA** par expression du répresseur *lacI*, d'induire l'expression du gène toxique en présence d'IPTG et offrent, dans le cas de la souche +823, un vecteur d'expression inductible dépourvu de gène de résistance à un antibiotique.

30

Les souches +75, +626 et +823 (décrites dans l'exemple 2) ont été cultivées chacune dans 100 ml de milieu LB à 37°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire (24h). Ces cultures ont été ensuite diluées en inoculant 100 mL de LB neuf avec 100 mL de la culture stationnaire. Cette opération de dilution au millième a été
5 réalisée sept fois consécutivement sur chaque culture, réalisant ainsi approximativement 70 générations.

L'activité L-lysine-cyclodésaminase de la protéine PipA* exprimée dans les souches +75, +626 et +823 a été testée suivant un protocole décrit ci-dessous sur des aliquots conservés par congélation des cultures correspondant à 0, 20, 40, 60 et
10 70 générations.

Après induction, les cultures sont centrifugées à 13000g et les culots cellulaires sont repris dans du milieu minéral MS de façon à concentrer les cellules 100 fois. Les cellules sont alors perméabilisées par deux étapes de congélation/décongélation à -20°C favorisant l'accès du substrat à l'enzyme. La L-
15 lysine monohydrochloride (pH = 7) est alors ajoutée à une concentration finale de 1 M dans les suspensions cellulaires (volume final = 2 mL). La réaction enzymatique se fait à 37°C sous agitation. Au bout de 20 heures on prélève un échantillon de 300 µl de chaque culture que l'on centrifuge à 13000g de façon à récupérer le surnageant. Une solution diluée des surnageants est ensuite déposée sur couche
20 mince de silice.

L'activité de la lysine-cyclodésaminase est mesurée par la conversion de la L-lysine en acide-L-pipécolique dans des suspensions cellulaires et par la révélation de l'acide-L-pipécolique par coloration avec la ninhydrine après migration chromatographique en couche mince (Rf = 0.22 ; butanol / acide acétique / eau
25 4/1/1).

Dans le cas de la souche +626 on a constaté une perte totale d'activité au bout de 20 générations. En revanche, dans le cas des souches +75 et +823, l'activité de la L-lysine-cyclodésaminase est stable au-delà de 70 générations.

30 Exemple 4: Construction d'une souche permettant la propagation stable de deux plasmides sans gènes de résistance à des antibiotiques.

4.1. Construction d'une souche d'E. coli portant deux délétions : au locus thyA spécifiant la thymidylate synthase et au locus dapA spécifiant la dihydropicolinate synthase.

Un lysat du phage P1 récolté sur la souche d'E. coli +849 (Δ dapA::cat, exemple 1.1) a été employé pour transduire le caractère Δ dapA::cat dans la souche β 1308 (Δ thyA::erm, Lemeignan et al., 1993 J. Mol. Biol., 231:161-166). La souche transductante +1005 (Δ dapA::cat Δ thyA::erm) a été sélectionnée en présence de chloramphénicol sur milieu LB supplémenté avec de la thymidine (dT, 0.3 mM) et du DAP (0.1mM). Les auxotrophies pour la thymidine et pour le DAP ont été confirmées sur les milieux appropriés. La souche +1005 a été déposée à la CNCM sous le numéro I-2795.

4.2. Construction d'un plasmide thyA+ sans marqueur de résistance à un antibiotique

Le gène thyA a été amplifié par PCR à partir du plasmide pTS0 (Lemeignan et al., 1993) construit par insertion du gène thyA sauvage d'E. coli dans le plasmide commercial pTZ18R (BioRad). L'amplification PCR a été réalisée avec les oligonucléotides PREP1 et PREP2 (SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 18) en utilisant la Vent Polymerase (Biolabs) selon le protocole décrit à l'exemple 1.1. Le fragment amplifié a été coupé avec les enzymes de restriction NcoI et BglIII et introduit par ligation dans le vecteur pREP4 (Qiagen, représenté schématiquement en Figure 8) dont la cassette de résistance à la kanamycine (neo) a été éliminée par digestion avec NcoI et BglIII. Les produits de ligation ont été introduits dans la souche β 1308 et des transformants sélectionnés sur milieu LB sans ajout de thymidine. Le plasmide pVDM62 (Figure 9) a été isolé. Le remplacement de la cassette neo par le gène thyA a été vérifié par coupure du plasmide pVDM62 avec des enzymes de restriction appropriées et séquençage du gène lacI.

4.3. Expression inductible et stable du gène hétérologue pipA* dans la souche +1005 (Δ dapA::cat Δ thyA::erm)

Le plasmide pVDM62 construit à l'exemple 4.2 a été introduit dans la souche +1005 décrite à l'exemple 4.1 ; les transformants ont été sélectionnés en

milieu LB en présence de DAP et en absence de thymidine. Un de ces transformants (souche +1007) a été ensuite isolé puis transformé avec le plasmide pSP117 résultant de la ligation entre le pSP114 coupé par NcoI et BglII et l'insert portant le gène *pipA** du plasmide pSP47 coupé par les mêmes enzymes. Les
5 transformants ont été sélectionnés sur milieu LB en absence de DAP.

La souche (+ 1008) ainsi obtenue héberge les plasmides pVDM62 et pSP117. Cette souche a été cultivée en présence ou en absence d'IPTG et les activités de la lysine-cyclodésaminase produite ont été mesurées comme décrit à l'exemple 3 et comparées entre elles. Il a ainsi été vérifié que l'expression de
10 l'enzyme est bien verrouillée par le répresseur *lacI* présent en *trans* sur le plasmide pVDM62.

Parallèlement la souche (+1010) a été construite en introduisant le plasmide pSP114 dans la souche +1007. Cette souche, hébergeant les plasmides pSP114 et pVMD62 a été déposée à la CNCM sous le numéro I-2796.

15

Ces exemples démontrent que les marqueurs de sélection métaboliques *dapA* et *thyA* peuvent être utilisés dans des vecteurs d'expression de protéines, dans des hôtes appropriés. Ils démontrent aussi l'utilité du répresseur *lacI*, et son activité en *cis* ou en *trans*.

20

Revendications

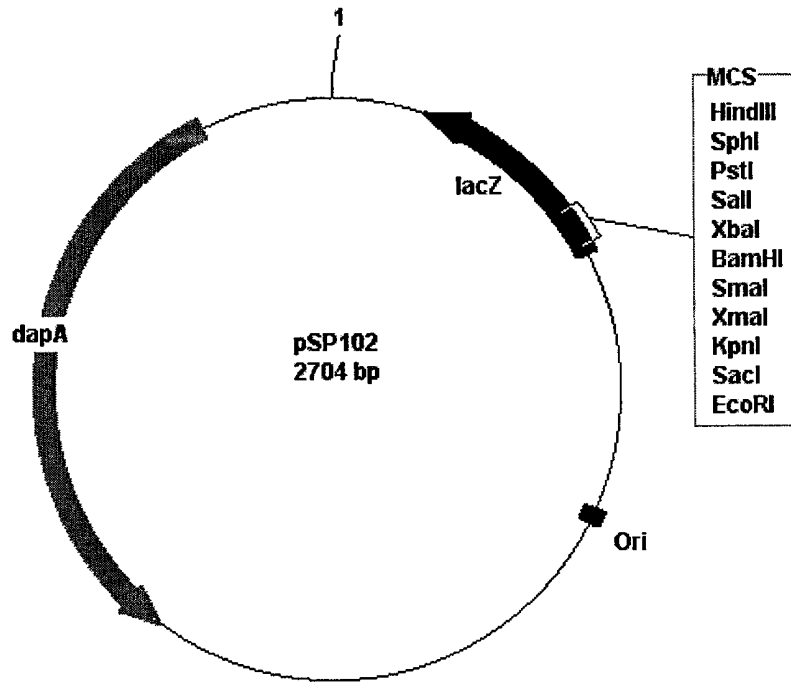
1. Vecteur d'expression d'une protéine dans une eubactérie, caractérisé en ce qu'il comprend le gène *dapA*, en tant qu'unique facteur de sélection positive.
- 5 2. Vecteur de clonage selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est stable dans son hôte eubactérien.
3. Vecteur de clonage selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il est dérivé du vecteur pQE60 ou pQE70.
4. Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le gène *bla* codant pour la résistance à l'ampicilline est remplacé par le gène *dapA*.
- 10 5. Vecteur selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un gène permettant la régulation/l'induction de l'expression de ladite protéine.
6. Vecteur selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit gène est le gène *lacI*, et que l'induction est réalisée par l'IPTG ou le lactose.
- 15 7. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pSP114 ou du vecteur pSP139 déposés à la CNCM sous les numéros d'ordre respectifs I-2796 et I-2793, le 08 février 2002..
8. Système d'expression d'une protéine, caractérisé en ce qu'il comporte :
 - un premier vecteur selon l'une des revendications 1 à 7
 - 20 - un hôte eubactérien, présentant une inactivation irréversible dans le gène *dapA*.
9. Système d'expression selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un second vecteur portant un élément permettant la régulation ou l'induction de l'expression de ladite protéine.
- 25 10. Système d'expression selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit second vecteur comprend le gène *thyA*, en tant qu'unique facteur de sélection positive.
11. Système d'expression selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit second vecteur est le vecteur pREP4, dans lequel le gène *neo* codant pour la résistance la kanamycine a été remplacé par le gène codant pour ledit marqueur métabolique.
- 30 12. Système d'expression selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comporte au moins l'un des vecteurs choisis parmi pSP114, pSP139 et

pVDM62 et/ou au moins une souche choisie parmi +552, +838, +849, +1005, +1010 déposées à la CNCM sous les numéros d'ordre I-2792 à I-2796 le 08 février 2002.

13. Kit pour la production de protéines, comprenant un système d'expression selon
5 l'une des revendications 8 à 12.
14. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, d'un système
d'expression selon l'une des revendications 8 à 12, ou d'un kit selon la
revendication 13 pour la production de protéines recombinantes.
15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ladite protéine
10 recombinante est la protéine pipA*.

pSP102

pUC18(dapA)

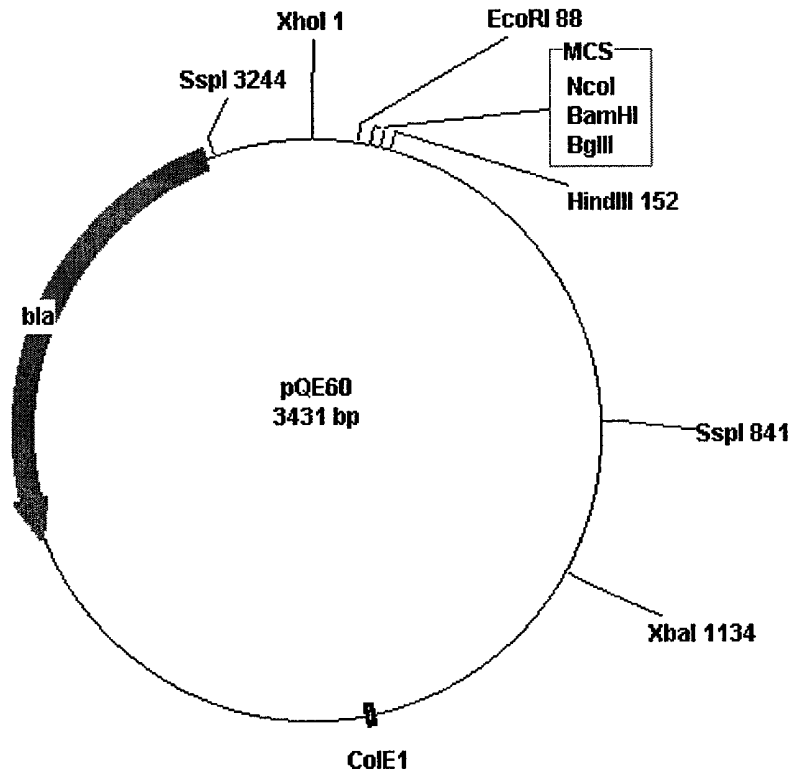


Taille : 2 704 pb

Marqueur : dapA+

FIGURE 1

pQE-60



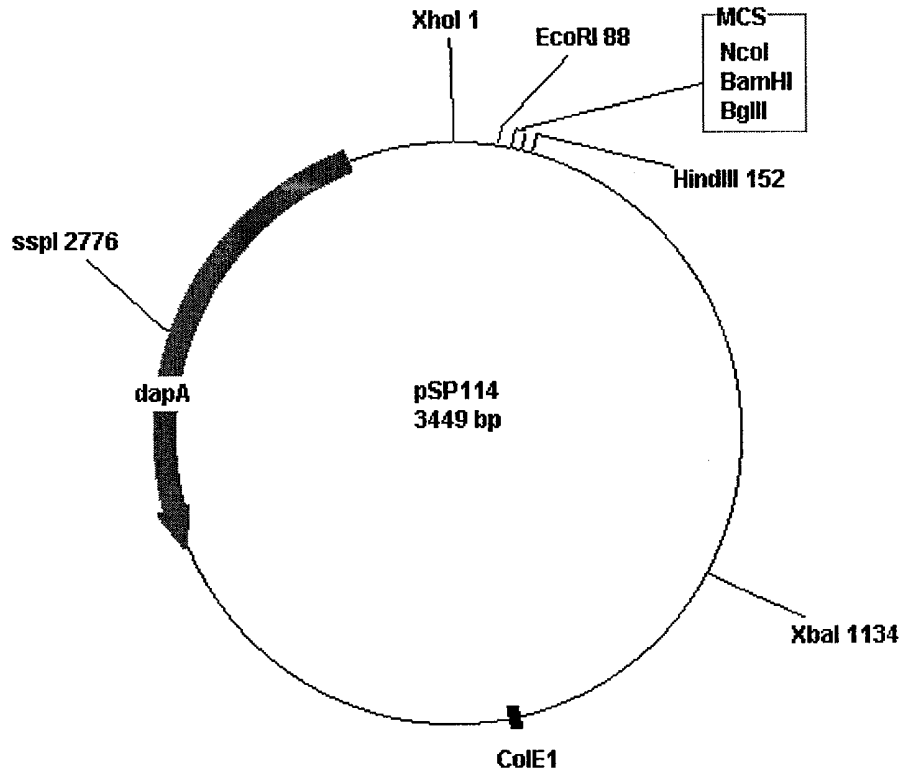
Taille : 3 431 pb

Marqueur : bla⁺ (AmpR)

FIGURE 2

pSP114

pQE60(dapA)



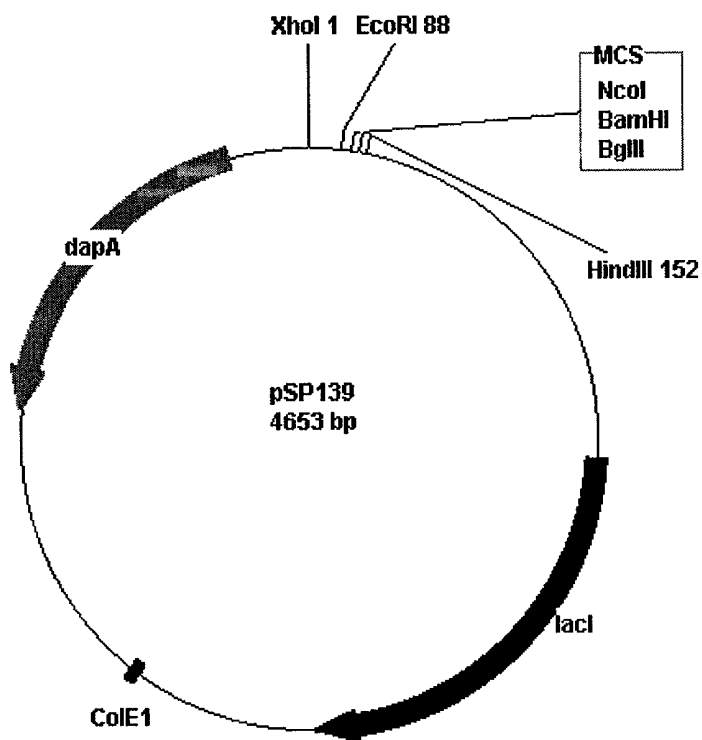
Taille : 3 449 pb

Marqueur : *dapA*⁺

FIGURE 3

pSP139

pQE60(dapA)-lacI



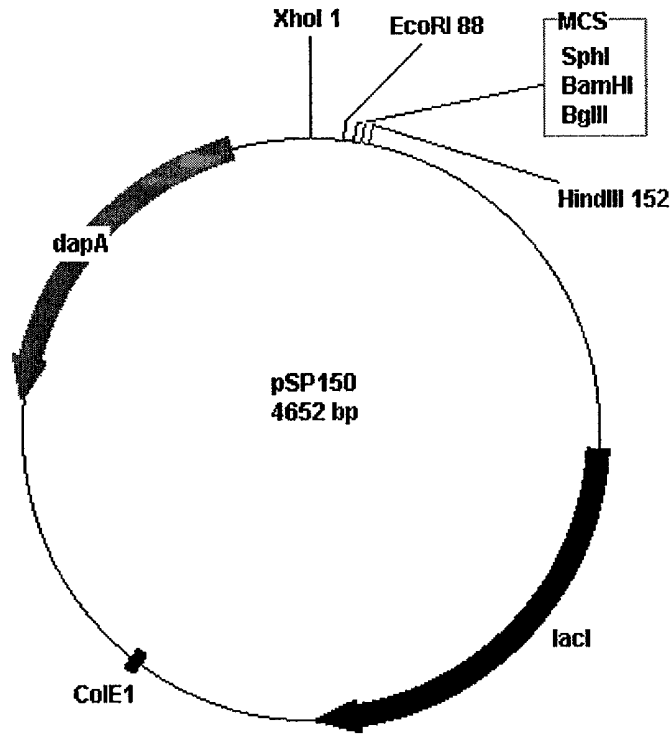
Taille : 4653 pb

Marqueur : *dapA*⁺

FIGURE 4

pSP150

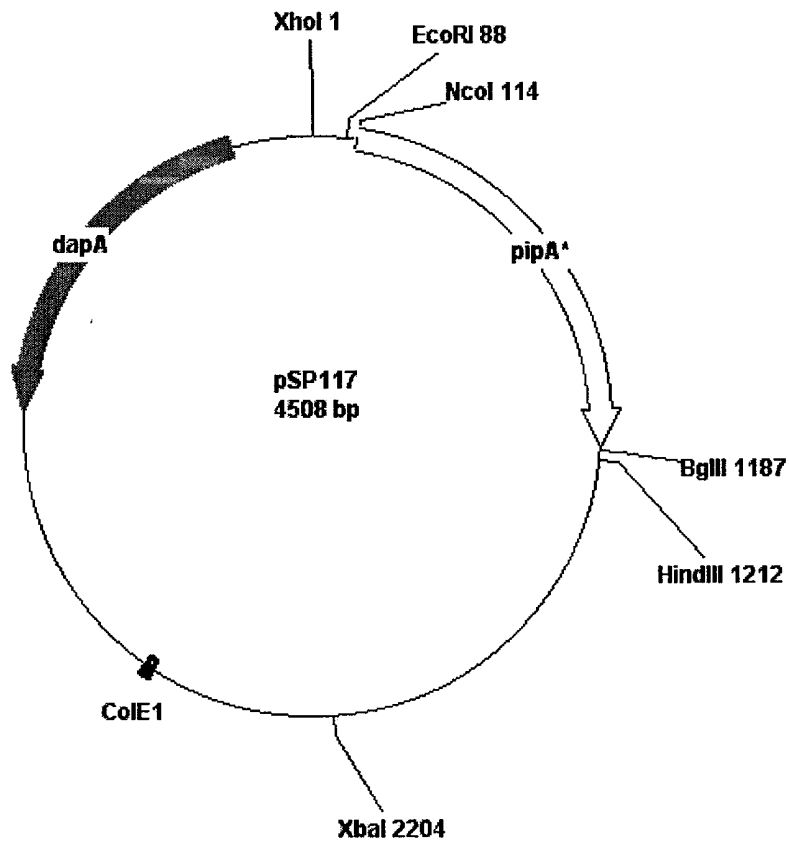
pQE70(dapA)-lacI

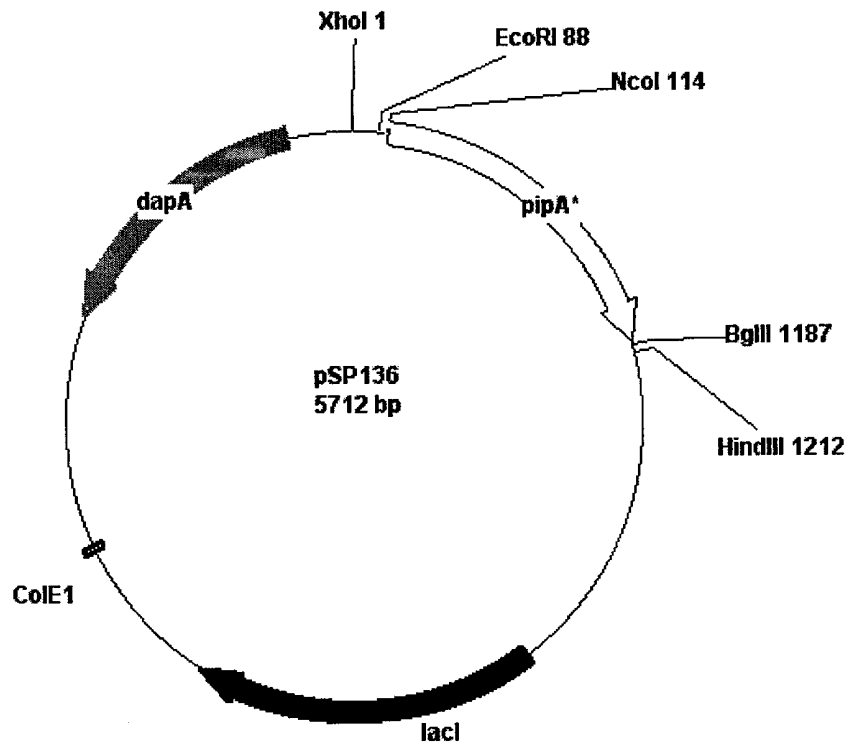


Taille : 4652 pb

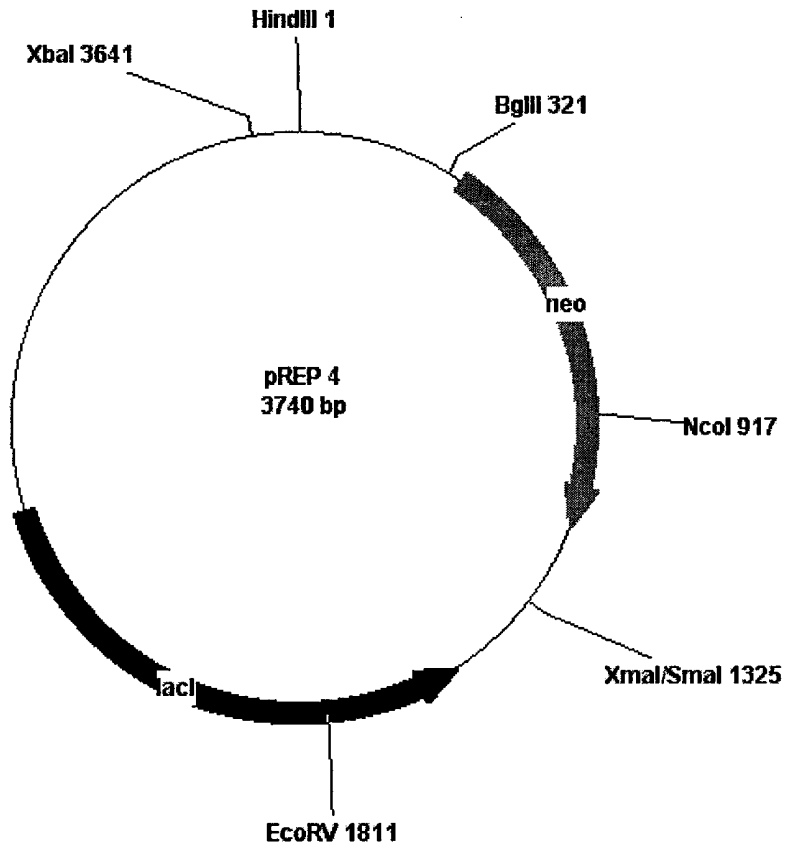
Marqueur : dapA+

FIGURE 5

pSP117**pQE60(dapA)-pipA*****Taille : 4 508 pb****Marqueur : dapA+****FIGURE 6**

pSP136**pQE60(dapA)-lacI-pipA*****Taille : 5 712 pb****Marqueur : dapA+****FIGURE 7**

pREP 4

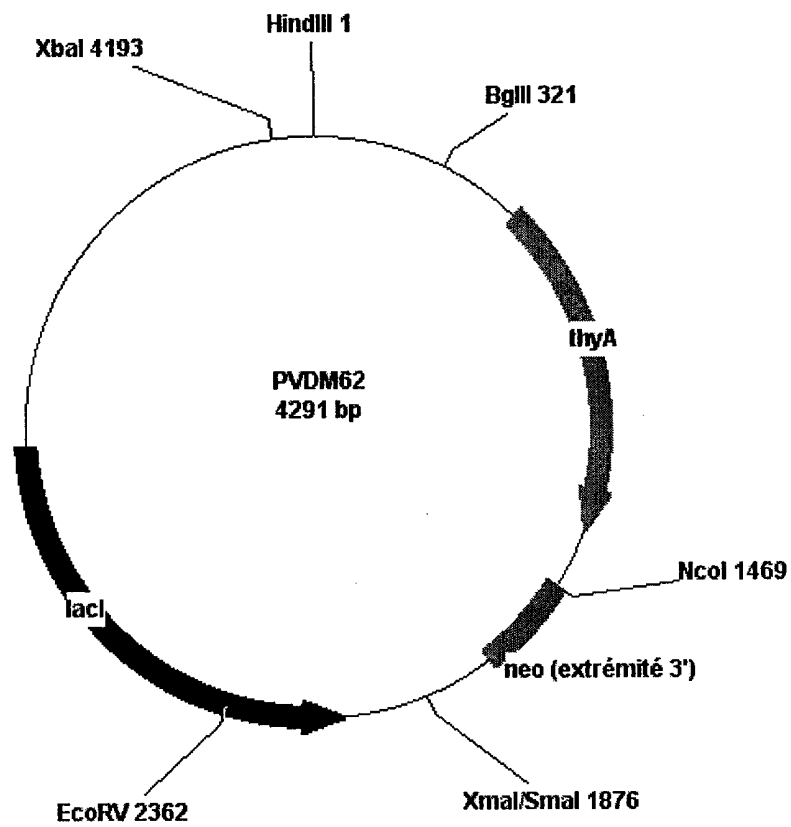


Taille : 3 740 pb

Marqueur : neo⁺ (kanR)

FIGURE 8

pVDM62
pREP4(thyA)



Taille : 4 291 pb

Marqueur : thyA⁺

FIGURE 9

LISTE DE SEQUENCES

<110> Evologic SA

<120> COMBINAISONS DE VECTEURS ET LEURS HOTES POUR PROPAGER
ET EXPRIMER DES GENES RECOMBINANTS SANS RECOURIR A DES
ANTIBIOTIQUES

<130> D20051

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 879

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> DapA

<400> 1

```

atgttcacgg gaagtattgt cgcgattggt actccgatgg atgaaaaagg taatgtctgt 60
cgggctagct tgaaaaaact gattgattat catgtcgcca gcggtacttc ggcgatcgtt 120
tctgttggca ccaactggcga gtcgctacc ttaaactcatg acgaacatgc tgatgtgggtg 180
atgatgacgc tggatctggc tgatggcgc attccggtaa ttgccgggac cggcgctaac 240
gctactgceg aagccattag cctgacgcag cgcttcaatg acagtggatg cgtcggctgc 300
ctgacggtaa ccccttacta caatcgctccg tcgcaagaag gtttgtatca gcatttcaaa 360
gccatcgctg agcatactga cctgccgcaa attctgtata atgtgccgtc ccgactggc 420
tgcatctgc tcccggaaac ggtgggccgt ctggcgaaag taaaaaatat tatcggaatc 480
aaagaggcaa cagggaaactt aacgcgtgta aaccagatca aagagctggt ttcagatgat 540
ttgttctgc tgagcggcga tgatgcgagc gcgtggact tcatgcaatt gggcggtcat 600
ggggttattt ccgttacgac taacgtcgca gcgcgtgata tggcccagat gtgcaaactg 660
gcagcagaag aacattttgc cgaggcacgc gttattaatc agcgtctgat gccattacac 720
aacaaactat ttgtcgaacc caatccaatc ccggtgaaat gggcatgtaa ggaactgggt 780
cttgtggcga ccgatacget gcgcctgcca atgacaccaa tcaccgacag tggctgtgag 840
acggtcagag cggcgcttaa gcatgccggt ttgctgtaa 879

```

<210> 2

<211> 795

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

<223> ThyA

<400> 2

```

atgaaacagt atttagaact gatgcaaaa gtgctcgacg aaggcacaca gaaaaacgac 60
cgtaccggaa ccggaacgct ttccattttt ggtcatcaga tgcgttttaa cctgcaagat 120
ggattcccgc tggtgacaac taaacgttgc cacctgcgtt ccatcatcca tgaactgctg 180
tggtttctgc agggcgacac taacattgct tatctacacg aaacaatgt caccatctgg 240
gacgaatggg ccgatgaaaa cggcgacctc gggccagtgt atggtaaaca gtggcgcgcc 300
tggccaacgc cagatggctg tcatattgac cagatcacta cggtagtgaa ccagctgaaa 360
aacgaccgag attcgcgccc cattattggt tcagcgtgga acgtaggcga actggataaa 420
atggcgctgg caccgtgcca tgcattcttc cagttctatg tggcagacgg caaactctct 480
tgccagcttt atcagcgtc ctgtgacgtc ttcctcgccc tgcggttcaa cattgccagc 540
tacgcgttat tggtgcatat gatggcgcag cagtgcgac tggaaagtggt tgattttgtc 600
tggaccggtg gcgacacgca tctgtacagc aaccatattg atcaaactca tctgcaatta 660
agccgcgaac cgcgtccgct gccgaagttg attatcaaac gtaaaccgga atccatcttc 720

```

gactaccggtt tcgaagactt tgagattgaa ggctacgatc cgcacccggg cattaagcg 780
ccggtggcta tctaa 795

<210> 3
<211> 3431
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Plasmide
pQE-60

<400> 3
ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcggg taacaattat aatagattca 60
attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaatt aaccatggga 120
ggatccagat ctcatcacca tcaccatcac taagcttaat tagctgagct tggactcctg 180
ttgatagatc cagtaatgac ctcagaactc catctggatt tggtcagaac gctcgggttg 240
cgccgggctg tttttattgg tgagaatcca agctagcttg gcgagatttt caggagctaa 300
ggaagctaaa atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatataat cccaatggca 360
tcgtaaagaa ctttttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt 420
tcagctggat attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc 480
ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaatttc gtatggcaat 540
gaaagacggt gagctgggta tatgggatag tggtcaccct tgttacaccg ttttccatga 600
gcaaactgaa acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct 660
acacatatac tcgcaagatg tggcgtgta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg 720
gtttattgag aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga 780
tttaaaccgtg gccaatatgg acaacttctt cgccccctt ttcaccatgc atgggcaaat 840
attatacgca aggcgacaag gtgctgatgc cgctggcgat tcaggttcat catgccgtct 900
gtgatggctt ccatgtcggc agaatgctta atgaattaca acagtactgc gatgagtggc 960
agggcggggc gtaatttttt taaggcagtt attggtgccc ttaaaccgct ggggtaatga 1020
ctctctagct tgaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaagactg gccctttcgt 1080
ttatctggtt gtttgcggtt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gctctagagc 1140
tgctcgcgct gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg 1200
gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg 1260
ggtgttgcg ggtgtcgggg cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat 1320
actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcgggtgtg 1380
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttccctgc 1440
tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgccggcagc ggtatcagct cactcaaagg 1500
cggaataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag 1560
gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc 1620
gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gagggtggca aaccgcagcag 1680
gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 1740
ccctgcgctt taccggatc ctgtccgctt ttctccctc gggaaagcgtg gcgctttctc 1800
atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg 1860
tgacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt 1920
ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 1980
gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca 2040
ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag 2100
ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca 2160
agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg 2220
ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa 2280
aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac atctaaagta 2340
tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag 2400
cgatctgtct atttggttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactaca 2460
tacgggaggg cttaccatct ggcaccagtg accgcgagac accgcgctcac 2520
cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc 2580
ctgcaacttt atccgctcc atccagctca ttaattggtg ccgggaagct agagtaagta 2640
gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac 2700
gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat 2760
gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa 2820

```

gtaagtggc cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc actgcataat tctcttactg 2880
tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta ctcaaccaag tcattctgag 2940
aatagtgtat gcgggcagcc agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc 3000
cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct 3060
caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat 3120
cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg 3180
ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc 3240
aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta 3300
tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg 3360
tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct 3420
ttcgtcttca c 3431

```

<210> 4

<211> 3740

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Plasmide
pREP-4

<400> 4

```

aagcttcacg ctgccgcaag cactcagggc gcaagggtg ctaaaggaag cggaacacgt 60
agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 120
ggacaagggg aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 180
gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 240
cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 300
tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgacggtcg tttcgcagtc 360
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct 420
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 480
aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg 540
acgaggcagc gcggtatog tggctggcca cgacggcgt tccttgcgca gctgtgctcg 600
acgtgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 660
tcctgtcatc tcaccttget cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 720
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcagtc 780
agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 840
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg 900
aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct gcttgcgaa tatcatggtg gaaaatggcc 960
gcttttctg attcatogac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 1020
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgttccctcg 1080
tgctttacgg tatcgcogct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg 1140
agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 1200
atcacgagat ttcgattcca ccgccgctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 1260
ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cgggatctc atgctggagt tcttcgcca 1320
ccccgggctc gatccccctc cgagttggtt cagctgctgc ctgaggctgg acgacctcgc 1380
ggagttctac cggcagtgca aatccgtcgg catccaggaa accagcagcg gctatccgcg 1440
catccatgcc cccgaactgc aggagtggg aggcacgatg gccgctttgg tcgacaattc 1500
gcgctaactt acattaattg cgttgcgctc actgccgct tccagtcgg gaaacctgtc 1560
gtgccagctg cattaatgaa tggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 1620
ccaggggtgt ttttctttc accagtgaga cgggcaacag ctgattgcc ttcaccgct 1680
ggccctgaga gagttgcagc aagcggcca cgctggttg cccagcagc cgaaaatcct 1740
gtttgatggt ggttaacggc gggatataac atgagctgtc ttcggtatcg tcgtatcca 1800
ctaccgagat atccgacca acgcgcagcc cggactcgg atatggcgcg attgcgcca 1860
gcgccatctg atcgttggca accagcatcg cagtgggaac gatgccctca ttcagcattt 1920
gcatggtttg ttgaaaaccg gacatggcac tccagtcgcc tcccgcttc gctatcggct 1980
gaatttgatt gcgagtgaga tatttatgac agcagccag acgcagacgc gccgagacag 2040
aacttaatg gcccgctaac agcgcgattt cctggtgacc caatgcgacc agatgctcca 2100
cgcccagtcg cgtaccgtct tcatgggaga aaataatact gttgatgggt gtctggtcag 2160
agacatcaag aaataacgcc ggaacattag tgcaggcagc ttccacagca atggcatcct 2220
ggtcatccag cggatagtta atgatcagcc cactgacgcg ttgcgcgaga agattgtgca 2280

```

```

ccgcogcttt acaggcttcg acgccgcttc gttctaccat cgacaccacc acgctggcac 2340
ccagttgatc ggcgcgagat ttaatcgccg cgacaatttg cgacggcgcg tgcagggcca 2400
gactggaggt ggcaacgcca atcagcaacg actgtttgcc cgccagttgt tgtgccacgc 2460
ggttgggaat gtaattcagc tccgccatcg ccgcttccac ttttcccg cgttttcgag 2520
aaacgtggct ggcctggttc accacgcggg aaacggctctg ataagagaca ccggcatact 2580
ctgcgacatc gtataacgtt actggtttca cattcaccac cctgaattga ctctcttccg 2640
ggcgctatca tgccataccg cgaaagggtt tgcgccattc gatggtgtca acgtaaatgc 2700
atgccgcttc gccttcgcgc gcgaattgtc gaccctgtcc ctctgttca gctactgacg 2760
gggtggtgcg taacggcaaa agcaccgccc gacatcagcg ctagcggagt gtatactggc 2820
ttactatggt ggcactgatg aggtgtcag tgaagtgtt catgtggcag gagaaaaaag 2880
gctgcaccgg tgcgtcagca gaatatgtga tacaggatat attccgcttc ctgcctcact 2940
gactcgctac gtcggtcgt tgcactgccc cgagcggaaa tggcttacga acggggcgga 3000
gatttcctgg aagatgccag gaagatactt aacagggaaag tgagagggcc gcggcaaagc 3060
cgtttttcca taggctccgc ccccctgaca agcatcacga aatctgacgc tcaaatcagt 3120
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accagggcgtt tcccctggcg gctccctcgt 3180
gcgctctcct gttcctgcct ttcggtttac cgggtgtcatt ccgctgttat ggccgcgctt 3240
gtctcattcc acgcctgaca ctcaattccg ggtaggcagt tcgctccaag ctggactgta 3300
tgcaacgaacc ccccgttcag tccgaccgct ggccttacc cggttaactat cgtcttgagt 3360
ccaaccggga aagacatgca aaagcaccac tggcagcagc cactggtaat tgatttagag 3420
gagttagtct tgaagtcatg cgccgggtta ggctaaactg aaaggacaag ttttgggtgac 3480
tgcgctcctc caagccagtt acctcggttc aaagagttgg tagctcagag aaccttcgaa 3540
aaaccgacct gcaaggcggg ttttctgctt tcagagcaag agattacgcg cagaccaaaa 3600
cgatctcaag aagatcatc tattaatcag ataaaatatt tctagatttc agtgcaattt 3660
atctcttcaa atgtagcacc tgaagtcagc cccatacgat ataagttgtt aattctcatg 3720
tttgacagct tatcatcgat                                     3740

```

```

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

```

```

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

```

```

<220>
<223> PUC1

```

```

<400> 5
ggtaactgtc agctcgagtt tactcatata                                     30

```

```

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

```

```

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

```

```

<220>
<223> PUC2

```

```

<400> 6
tcaatctaaa gtatatatga gtaaa                                     25

```

```

<210> 7
<211> 41
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

```

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PUC3

<400> 7
cccgatatcg aaaaaggaag agtatgttca cgggaagtat t 41

<210> 8
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PUC4

<400> 8
aaaagtcgac ctgacagtta cagcaaaccg gcatgc 36

<210> 9
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PQE60-1

<400> 9
gttttcacca tgcattgggca aaaattatac gcaag 35

<210> 10
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PQE60-2

<400> 10
cagcaccttg tgccttgcg tataat 26

<210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PQE60-3

<400> 11
gagtaaactt gggtcgacag ttaccaa 27

<210> 12
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PQE60-4

<400> 12
cactgattaa gcattggtaa ctgtc 25

<210> 13
<211> 41
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PQE60-5

<400> 13
cccgatatcg aaaaaggaag agtatgttca cgggaagtat t 41

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>
<223> PQE60-6

<400> 14
aaactcgaga gttacagcaa accggcatgc 30

<210> 15
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>

<223> PQE60-7

<400> 15

ttttttgcta ggcatttac gttgacacca tcg

33

<210> 16

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>

<223> PQE60-8

<400> 16

ttttttgcta gcgctaactt acattaa

27

<210> 17

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>

<223> PREP1

<400> 17

cttagatctc aggtttgttc ctgatt

26

<210> 18

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce

<220>

<223> PREP2

<400> 18

tttccatggc cagtttctat ttcttc

26

<210> 19

<211> 1097

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Séquence

nucléique du gène synthétique pipA*

<400> 19
 gaattcgagg ttccatggaa acttgggttt taggtcgtcg tgatgttgca gaagttggtg 60
 cagcagttgg tcgtgatgaa ttaatgctgc gtattatcga tcgtttaact ggtgggttag 120
 cagaaattgg tcgtgggtgaa cgtcatttat ctccattacg tgggtggtta gaacgttctg 180
 aaccagttcc aggtatttgg gaatggatgc cacatcgtga accaggtgat catattactt 240
 taaaaactgt tggttattct ccagcaaatc caggtcgttt tggtttacca actattttag 300
 gtaccgttgc acgttatgat gatactactg gtgcattaac tgcattaatg gatggtggtt 360
 tattaactgc attacgtact ggtgcagcat ctgctggttc atctcgttta ttagcacgtc 420
 cagattctca tacttttaggt ttaattggta ctgggtgcaca agcagttact caattgcatg 480
 cattatcttt agttttacca ttacaacgtg cattagtttg ggatactgat ccagcacatc 540
 gtgaatcttt tgcacgtcgt gcagcattta ctgggtgttc tgttgaaatt gcagaaccag 600
 cacgtattgc agcagaagca gatgttattt ctactgcaac ttctgttgca gttggtcaag 660
 gtccagtttt accagatact ggtgttcgtg aacatttaca tattaatgca gttggtgcag 720
 attagttgg taaaactgaa ttaccattag gtttattaga acgtgcattt gttactgcag 780
 atcatccaga acaagcatta cgtgaagggtg aatgtcaaca attatctgct gatcgtttag 840
 gtccacaatt agcacattta tgtgcagatc cagcagcagc agcaggtcgt caagatactt 900
 tatctgtttt tgattctact ggttttgcatt ttgaagatgc attagcaatg gaagtttttt 960
 tagaagcagc agcagaacgt gatttaggta ttcgtgttgg tattgaacat catccaggtg 1020
 atgcattaga tccatatgca ttacaacatc taccattacc attagcagca ccagcacatt 1080
 aataaagatc taagctt 1097

<210> 20
 <211> 1104
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<220>
 <223> gene asd codant pour aspartate semialdéhyde
 déhydrogénase

<400> 20
 atgaaaaatg ttggttttat cggctggcgc ggtatgggtcg gctccgttct catgcaacgc 60
 atggttgaag agcgcgactt cgacgccatt cgccctgtct tcttttctac ttctcagctt 120
 ggccaggtcg cgccgtcttt tggcggaaacc actggcacac ttcaggatgc ctttgatctg 180
 gaggcgctaa aggccctcga tatcattgtg acctgtcagg gcggcgatta taccaacgaa 240
 atctatccaa agcttcgtga aagcggatgg caaggttact ggattgacgc agcatcgtct 300
 ctgocgatga aagatgacgc catcatcatt cttgaccccg tcaatcagga cgtcattacc 360
 gacggattaa ataatggcat caggactttt gttggcggta actgtaccgt aagcctgatg 420
 ttgatgtcgt tgggtggttt attcgccaat gatcttggtg attgggtgtc cgttgcaacc 480
 taccaggccg cttccggcgg tgggtgcgca catatgcgtg agttattaac ccagatgggc 540
 catctgtatg gccatgtggc agatgaactc ggcaccccgt cctctgctat tctcgatata 600
 gaacgcaaag tcacaacctt aaccctgtagc ggtgagctgc cgggtgataa ctttggcgtg 660
 ccgctggcgg gtagcctgat tccgtggatc gacaaacagc tcgataacgg tcagagccgc 720
 gaagagtgga aagggcaggc ggaaccaaac aagatcctca acacatctc cgtaattccg 780
 gtagatggtt tatgtgtgcg tgcggggca ttgcctgccc acagccaggc attcactatt 840
 aaattgaaaa aagatgtgtc tattccgacc gtggaagaac tgctggctgc gcacaatccg 900
 tgggcgaaag tcgttccgaa cgatcgggaa atcactatgc gtgagctaac cccagctgcc 960
 gttaccggca cgctgaccac gccgtaggc cgcctgcgta agctgaatat gggaccagag 1020
 ttctgtcag cttttaccgt gggcgaccag ctgctgtggg gggccgcgga gccgctgcgt 1080
 cggatgcttc gtcaactggc gtaa 1104

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
X	WO 02 059292 A (WASHINGTON UNIVERSITY) 1 août 2002 (2002-08-01) * page 6, ligne 14 - ligne 35 * * page 7, ligne 31 - page 8, ligne 9 * * page 8, ligne 25 - page 9, ligne 8 * * page 9, ligne 31 - page 10, ligne 21 * * page 18, ligne 13 - page 34, ligne 12; exemples *	1-15	C12N15/65 C12N15/60
A	NAKAYAMA K ET AL: "CONSTRUCTION OF AN ASD+ EXPRESSION-CLONING VECTOR: STABLE MAINTAINANCE AND HIGH LEVEL EXPRESSION OF CLONED GENES IN A SALMONELLA VACCINE STRAIN" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 6, no. 6, 1 juin 1988 (1988-06-01), pages 693-697, XP000578379 ISSN: 0733-222X * le document en entier *	1-15	
A	CIRILLO J D ET AL: "GENETIC DETERMINATION OF THE MESO-DIAMINOPIMELATE BIOSYNTHETIC PATHWAY OF MYCOBACTERIA" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 176, no. 14, juillet 1994 (1994-07), pages 4424-4429, XP002907358 ISSN: 0021-9193 * page 4425, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 4 * * page 4427, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite, alinéa 1 * * page 4429, colonne de gauche, alinéa 3 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12N
A	EP 0 435 132 A (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH) 3 juillet 1991 (1991-07-03) * page 4, ligne 1 - ligne 5; exemple 1 *	1-15	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
20 décembre 2002		Montero Lopez, B	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>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</p> <p>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</p>			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0201835 FA 615258**

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 20-12-2002
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 02059292 A	01-08-2002	WO 02059292 A2	01-08-2002
EP 435132 A	03-07-1991	DE 3943117 A1	04-07-1991
		DE 59006837 D1	22-09-1994
		EP 0435132 A1	03-07-1991