

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 18755

(54)

Nouveaux plasmides hybrides et micro-organismes les comportant.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 N 15/00.

(22)

Date de dépôt..... 29 août 1980.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 9 du 5-3-1982.

(71)

Déposant : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), résidant en
France.

(72)

Invention de : Claude Gerbaud, Michel Guérineau et Claudine Elmerich.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Martin et Schrimpf,
26, av. Kléber, 75116 Paris.

La présente invention concerne de nouveaux plasmides hybrides utiles comme vecteurs pour la modification des propriétés des souches de micro-organismes et notamment des levures.

5 De tels types de plasmides ont déjà été décrits dans le brevet français n° 78 32100 déposé le 14 novembre 1978 au nom de l'Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR).

10 Les plasmides hybrides décrits dans le brevet précédent comportent, outre l'ADN d'un plasmide bactérien, un segment d'ADN renfermant le gène URA_3^+ de levure et au moins une partie de l'ADN du plasmide 2 μ m. Cet ADN du plasmide 2 μ m permet au plasmide hybride d'être amplifié dans une levure et le gène URA_3^+ permet de sélectionner les levures
15 ayant intégré le plasmide hybride. Toutefois, les vecteurs décrits dans ce brevet présentent l'inconvénient de ne posséder que des sites de restriction multiples en particulier plusieurs sites de restriction Eco RI et Hind III, ce qui rend délicate l'introduction d'un gène au niveau
20 de ces sites. En effet, lors de la digestion du plasmide, les fragments de restriction sont nombreux et après ligation on peut obtenir une grande variété de plasmides suivant le sens et la
25 place des fragments.

Un tel inconvénient est éliminé lorsque le plasmide présente des sites de restriction uniques.

C'est pourquoi la présente invention concerne un plasmide hybride caractérisé en ce qu'il comporte
5 au moins :

a) un bloc d'ADN de levure constitué :

. d'un segment d'ADN renfermant le gène
URA₃⁺ de levure et du fragment de
restriction R1 H₃ de 2,12 Kb de la forme B
10 du plasmide 2µm de levure, ledit bloc d'ADN
de levure ne comportant pas en dehors de
ses extrémités d'autres sites de restriction
Eco R1 ou Hind III ; et

b) un fragment d'ADN d'un plasmide bactérien.

15 Dans un mode de réalisation préféré des
plasmides selon l'invention, le fragment d'ADN
bactérien est le fragment de restriction Eco R1
Hind III de 4331 paires de base du plasmide bactérien
pBR 322.

20 Dans certaines applications, en particulier
lorsque le gène que l'on désire cloner est long comme
dans le cas des gènes nif qui sera explicité ci-dessous,
le plasmide selon la présente invention comportera
au moins un site cos du phage lambda,
25 c'est-à-dire un domaine comprenant les extrémités
cohésives.

Ainsi, l'ADN du plasmide bactérien pourra
être un fragment de l'ADN du cosmide pHC 79,
en particulier le fragment de restriction Eco R1
30 Hind III portant le site cos.

Les plasmides selon la présente invention, en particulier lorsque le fragment d'ADN bactérien est le fragment du plasmide pBR 322, présentent l'avantage de comporter de nombreux sites uniques, en particulier Hind III et Eco RI et, en outre, de présenter un bloc d'ADN de levure qui peut être aisément séparé et inséré dans un plasmide bactérien quelconque.

La présente invention concerne également les cellules et notamment les microorganismes comportant un plasmide tel que défini précédemment. Parmi ces microorganismes il faut citer plus particulièrement les bactéries et surtout les levures.

A titre d'exemple d'application des plasmides selon l'invention, ceux-ci peuvent être utilisés pour introduire les gènes nif dans des cellules procaryotes ou eucaryotes qui en sont dépourvues, notamment des bactéries et des levures.

Les gènes nif ("nitrogen fixation") sont les gènes portant l'information génétique pour la fixation de l'azote atmosphérique.

L'information génétique pour la fixation de l'azote atmosphérique ne se trouve que chez des organismes procaryotes (bactéries et cyanophycées). Cependant, cette information conditionne tout le reste de la vie sur la terre puisque les autres organismes vivants (plantes, animaux) ont un besoin absolu d'azote combiné. Le développement de l'agriculture intensive n'a pu se faire que par l'apport massif d'engrais azotés de synthèse et il

apparaît clair aujourd'hui que l'introduction dans les plantes de la capacité d'utiliser l'azote atmosphérique aurait des conséquences économiques considérables.

5 Les exemples suivants sont destinés à illustrer certaines caractéristiques de la présente invention mais ne la limitent en aucune façon.

Dans le cadre de la présente description, on utilisera parfois, lorsqu'aucune ambiguïté n'est permise, les abréviations "Hind III" et "Eco RI" 10 pour désigner les endonucléases de restriction Hind III et Eco RI et les termes "site Hind III" ou "site Eco RI" pour désigner les sites de restriction Hind III ou Eco RI.

15 La nomenclature des sites de restriction du plasmide 2µm se référera, sauf indication contraire, aux cartes de restriction figurant dans GUERINEAU M., Plasmid DNA in Yeast, in Lemke, P.A. (Ed), Viruses and Plasmids in Fungi, Marcel Dekker, New York, 1979.

20 Ainsi, le fragment de restriction RI H₃ est un fragment de restriction entre le site Eco RI(1) et le site Hind III(3) tels que définis dans le document précédent.

L'utilisation des enzymes de restriction 25 et des ligases est connue de l'homme de métier et, afin d'alléger la description, sauf indication contraire, les enzymes en cause seront mises en oeuvre conformément aux prescriptions du fabricant.

Ces enzymes sont commercialisées notamment 30 par la société BIOLABS, la société MILES LABORATORIES, INC. et la société BOEHRINGER.

Exemple 1

Préparation du plasmide pG 63 (déposé à la CNCM
(Collection Nationale de Cultures Microbiennes à
l'Institut Pasteur à Paris) sous le n° I-130)

5 A - On utilise comme plasmide de départ le
plasmide pBR 322 (commercialisé par BETHESDA
RESEARCH LABORATORY, INC., Rockville, Maryland.)

 Ce plasmide est digéré simultanément par
deux enzymes de restriction : endo Eco RI et Hind III,
10 selon les conditions décrites par le fabricant
(BIOLABS). Le plasmide est coupé en deux fragments,
l'un de 31 paires de bases et l'autre de 4331 paires
de bases (SUTCLIFFE J.C. Nucleic Acids Research
1978, 5, 2721-2728). Les deux fragments sont séparés
15 par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % et le
grand fragment est récupéré par la technique de
congélation-décongélation (COLBERE-GARRAPIN F.,
CHOSTERMAN S., HORODNICEANU F., KOURILSKY P.,
GARAPIN A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1979, 76,
20 3755-3759.)

 B - Le plasmide de 2µm est extrait de la
souche T8 de levure (GUERINEAU M., SLONIMSKI P.P.,
AVNER P.R. Biochemical Biophys. Res. Com. 1974, 61,
462-469.

25 Il est digéré lui aussi simultanément par
les deux enzymes de restriction endo Eco RI et endo
Hind III (BIOLABS).

 La carte de restriction du plasmide 2µm montre
qu'il existe deux formes A et B du plasmide de 2µm.
30 Le fragment Eco RI(1) Hind III(3) (RI H₃) de la forme B
d'un poids moléculaire de 2,12 Kb est purifié par
électrophorèse en gel d'agarose à 1 % et il est
recueilli du gel par la technique de congélation-
décongélation déjà décrite.

C - Les deux fragments pBR 322 et levure sont mélangés et ligaturés avec de la DNA ligase extraite du bactériophage T4 dans les conditions indiquées par le fabricant (BIOLABS).

5 Comme le fragment d'ADN du plasmide pBR 322 porte le gène Amp^r , le mélange de ligation sert à transformer une souche d'E. coli ampicilline sensible et les bactéries devenues ampicilline résistantes sont sélectionnées. Le plasmide extrait pG 6 contient
10 le morceau RI H_3 du $2\mu\text{m}$ de levure inséré dans les sites RI H_3 de pBR 322.

D - Le gène URA 3 est obtenu par digestion par Hind III du plasmide pBR 322 - URA 3 clone 6 (BACH M.L., LACROUTE F., BOTSTEIN D., Proc. Nat.
15 Acad. Sci. USA 1979, 76, 386-390) et le fragment de 1,1 Kb est purifié et récolté par les techniques précédemment décrites. Il est mélangé à pG 6 préalablement digéré par Hind III puis ligaturé
20 comme précédemment décrit. Le mélange sert à transformer une bactérie E. coli pyr F. Les transformants capables de se multiplier en l'absence d'uracile sont sélectionnés.

De ces transformants on extrait un nouveau plasmide chimère pG 63 qui est décrit dans la
25 figure 1.

Sur cette figure 1 :

- la partie  représente l'ADN du gène URA 3
- la partie  représente l'ADN du plasmide pBR 322
- la partie  représente le fragment d'ADN du
30 plasmide $2\mu\text{m}$
- la partie  représente une séquence répétée inverse du plasmide $2\mu\text{m}$.

Les sites de restriction sont notés de la façon suivante :

- R site de restriction Eco R1
- H site de restriction Hind III
- 5 - P site de restriction Pst
- Hpa site de restriction Hpa
- B site de restriction Bam H₁.

10 Ce plasmide comporte donc un bloc d'ADN de levure de 3,3 Kb situé entre un site de restriction Eco R1 et Hind III et constitué du fragment d'ADN de 2,12 Kb du plasmide 2 μ m de levure et d'un fragment d'ADN de 1,1 Kb portant le gène URA 3. Le fragment bactérien qui complète le plasmide est constitué par le fragment d'ADN de pBR 322 comportant 4331 paires
15 de bases.

Il faut remarquer que ce plasmide possède dans le bloc d'ADN de levure un site Hind III qui a servi à insérer le gène URA 3.

20 Afin d'obtenir un plasmide vecteur intéressant, il convient que celui-ci possède un maximum de site de restriction unique, en particulier un site de restriction unique Hind III qui correspond à l'une des enzymes de restriction le plus couramment utilisée. C'est pourquoi on doit déléter ce site Hind III.

25 Exemple 2

Préparation du plasmide pG 63 11

Le site Hind III situé entre la partie levure 2 μ m et le gène URA 3 de pG 63 a été délété de la
30 manière suivante : le plasmide pG 63 a été digéré partiellement par Hind III. Les molécules linéaires de longueur complète sont séparées et purifiées par électrophorèse en gel d'agarose. Ces molécules sont

ensuite traitées par l'endonucléase SI spécifique du DNA monobrin (BIOLABS) dans les conditions décrites par le fabricant, excepté la température qui est 20°C.

Après traitement, le DNA est précipité et
5 ligaturé avec de la DNA ligase du phage T4 (BIOLABS) à forte concentration, ce qui permet de ligaturer des bouts francs sans extrémités cohésives.

Comme précédemment, après ligation, le mélange de ligation sert à transformer une souche E. coli
10 ampicilline sensible et on sélectionne les bactéries ampicilline résistantes qui contiennent nécessairement le plasmide.

Après analyse des plasmides que l'on extrait et qui sont analysés par restriction, on obtient
15 le plasmide pG 63 11 représenté sur la figure 2.

Ce plasmide présente la même structure d'ensemble que le plasmide pG 63 décrit précédemment mais le site de restriction Hind III situé entre la partie levure 2µmet le gène URA 3 a été délété.

20 La structure de ce plasmide est particulièrement intéressante. En effet,

1) il possède plusieurs sites de restriction uniques : Eco R1, Hind III, Bam H₁ et Hp a1 ;

2) le fragment de restriction Eco R1 Hind III
25 n'est constitué que de DNA de levure, c'est-à-dire que l'on a ainsi construit un bloc levure transposable aisément dans d'autres vecteurs ;

3) la résistance à la tétracycline est maintenue et l'incorporation d'un DNA étranger au
30 site Bam H₁ entraîne l'inactivation du gène et donne donc un phénotype tétracycline sensible ; la résistance à l'ampicilline est aussi maintenue mais, cependant, il existe trois sites Pst 1 dans ce vecteur.

Ce plasmide peut être utilisé pour cloner des gènes de levure par exemple car il se maintient et s'amplifie dans les levures et peut être introduit dans les bactéries.

5 Exemple 3

Préparation du cosmide pHCG 3

A partir du plasmide pG 63 11 on extrait le bloc levure par digestion du plasmide par Hind III et Eco RI comme cela est décrit dans l'exemple 1-B.

10 De même, on traite comme dans l'exemple 1-A le cosmide pHCG 79 décrit par COLLINS (J. Methods in Enzymol., 68, 309, 1979) par Hind III et Eco RI par électrophorèse sur gel d'agarose, on récupère le
15 fragment de restriction Eco RI Hind III de 6,5 Kb comportant le site cos.

Par ligation des deux fragments d'ADN obtenus, comme cela est décrit dans l'exemple 1-C, on obtient le cosmide pHCG 3 ayant la structure représentée à la figure 3.

20 Dans ce schéma, la partie ~~~ représente le site cos du phage λ ; les significations des autres éléments du schéma étant identiques à ce qui a été indiqué pour la figure 1, c'est-à-dire que la partie
25  représente l'ADN du cosmide pHCG 79 dans lequel on a fait apparaître le site cos.

Ce cosmide peut être utilisé pour cloner des gènes comme le plasmide pG 63 11 précédent et en particulier des gènes de grande dimension.

30 Le plasmide pHCG 3 est utilisé pour introduire les gènes nif dans une levure en opérant de la façon suivante.

Exemple 4

Préparation du cosmide pPC 857 (déposé à la CNCM sous le n° I-131)

A - Source d'ADN nif

La source d'ADN nif est le plasmide pCE 1
(Km Tc Cb Gnd His Nif Tra Inc^P) décrit dans ELMERICH C.,
5 HOUMARD J., SIBOLD L., MANHEIMER I. et CHARPIN N.,
Molec. Gen. Genet. 165, 181-189, 1978, qui porte les
gènes nif de K. pneumoniae. Ces gènes, dont 13 pour
l'instant ont été identifiés (MERRICK M., FILSER M.,
10 DIXON R., ELMERICH C., SIBOLD L. et HOUMARD J.,
J. Gener. Microbiol. 117, 509-520, 1980), sont portés
par deux fragments de restriction Hind III contigus
(PUHLER A., BURKARDT H.J. et KLIPP W., Molec. Gen.
Genet. 176, 17-24, 1979). Le plasmide pCE 1, introduit
15 dans E. coli SB 1801 (Δ (his gnd)rps1) a été purifié
par la méthode de HUMPHREYS G.O., WILLSHAW G.A.,
ANDERSON E.S., Biochim. Biophys. Acta, 383, 457-463,
1975. A partir de 15 l de culture en milieu LB à 37°C
on a obtenu 500 µg d'ADN purifié. Une partie aliquotée
20 de 5 µg a été hydrolysée par l'endonucléase Hind III
(BIOLABS, 1 unité) pendant 30 minutes à 37°C dans le
tampon recommandé par BIOLABS.

B - Préparation du vecteur

Le vecteur choisi est le cosmide pHC 79
25 mentionné précédemment. L'ADN du vecteur a été purifié
comme décrit en A à partir de 200 ml d'une culture
en milieu LB à 37°C de la souche 5 K d'E. coli
contenant pHC 79 décrit dans l'article de COLLINS J.
après amplification au chloramphenicol (150 µg/ml).
30 On a obtenu 200 µg d'ADN purifié. Une partie aliquotée
(1 µg) a été hydrolysée par l'endonucléase Hind III
comme décrit en A.

C - Clonage

On mélange 2 µg d'ADN hydrolysé de pCE 1 obtenu en A et 0,5 µg d'ADN hydrolysé de pHG 79 obtenu en B dans 20 µl de tampon de ligature (MILES LABORATORIES) auquel on ajoute 0,1 µl d'une solution de ligase de T4 (MILES LABORATORIES). La solution est incubée 16 heures à 12°C.

L'ADN recombinant est encapsidé in vitro dans le bactériophage λ selon la méthode de COLLINS J. et HOHN B. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 4242-4246, 1978. Les phages ainsi préparés servent à infecter la souche C 600 d'E. coli. Les clones recombinants sont sélectionnés pour leur caractère de résistance à l'ampicilline sur milieu solide LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

Sur 500 clones examinés, aucun n'a été trouvé fixateur d'azote par le test de réduction de l'acétylène décrit dans l'article de ELMERICH C. cité précédemment. Cependant, la présence de gènes nif dans 10 à 20 % des clones a pu être mise en évidence par hybridation avec l'ADN de petits plasmides amplifiables portant certains gènes nif tels que pSA 30 et pCM 1 mentionnés dans CANNON F., RIEDEL G.E. et AUSUBEL F.M. Molec. Gen. Genet. 174, 59-66, 1979.

Une vingtaine de cosmides provenant de clones donnant une réaction d'hybridation positive ont été purifiés et leurs diagrammes de restriction, après hydrolyse par Hind III et Eco RI, ont été établis.

Ce cosmide pPC 857 est représenté sur la figure 4 ; il s'est révélé contenir l'ensemble des gènes nif.

Sur ce schema, les sites Eco R1 sont représentés par : | et les sites Hind III sont représentés par : ↑.

Les gènes nif sont indiqués par leurs abréviations communes : BALEFMVSUNEKDHJ.

Ces gènes sont portés par deux fragments de restriction Hind III contigus, le site de restriction Hind III de séparation étant situé entre les gènes K et D. Dans ce cosmide pPC 857, les deux fragments de restriction Hind III portant l'ensemble des gènes nif sont présents mais ligaturés dans le mauvais sens. L'ADN du cosmide de pPC 79 est représenté schématiquement entre deux sites de restriction Hind III. L'ADN du cosmide de pPC 79 comporte, outre le site cos (→←), un site de restriction Eco R1.

Exemple 5

Préparation des cosmides pPC 874 et pPC 922

A partir de l'ADN de pPC 857, les opérations d'hydrolyse, ligature, encapsidation et sélection de clones décrites dans l'exemple 4 ont été répétées. Sur 200 clones examinés, 9 se sont révélés fixateurs d'azote. La structure des cosmides contenus dans ces clones a été établie sur la base de leur diagramme de restriction après hydrolyse par Hind III, Eco R1, Bam H₁, Bgl II (BIOLABS). Ils se répartissent dans les deux groupes théoriques possibles suivant le sens de fixation des gènes nif.

L'un correspond à pPC 874 (représenté sur la figure 5) qui ne confère pas de résistance à la tétracycline.

L'autre correspond à pPC 922 (représenté sur la figure 6) qui confère une faible résistance à la tétracycline.

5 Afin d'étudier les propriétés de ces plasmides, ils ont été transférés dans des souches bactériennes dépourvues de gène nif (Δ nif).

Pour transférer les plasmides pPC 874 et pPC 922 chez *Klebsiella pneumoniae*, on procède à une infection lytique des souches d'E. coli qui les portent par le phage λ h 434 cts. Le lysat obtenu sert à infecter 10 les souches de *K. pneumoniae* et les clones portant le cosmide sont sélectionnés par leur résistance à l'ampicilline.

15 L'activité fixatrice d'azote (évaluée comme cela est indiqué précédemment) d'E. coli ou de *K. pneumoniae* (Δ nif) portant les plasmides pPC 874 ou pPC 922 est équivalente à celle de la souche sauvage M5 a1 de *K. pneumoniae* dont dérivent les gènes nif clonés.

20 Pour éviter la ségrégation des plasmides, il faut ajouter de l'ampicilline à tous les milieux.

Exemple 6

Préparation du cosmide pGPC 875

25 A - A partir de 23 μ g d'ADN de pPC 857 hydrolysés par Hind III (6 unités BIOLABS), les deux segments de restriction portant l'ensemble des gènes nif ont été purifiés par gradient de saccharose selon la méthode de MANIATIS T., HARDISON R.C., LACY E., LAUER J., O'CONNELL C. et QUON D., Cell. 15, 687-701, 1978.

30 B - Hydrolyse du vecteur

1 μ g de l'ADN du plasmide pHCG 3, préparé comme décrit à l'exemple 3, a été hydrolysé par Hind III (1 unité BIOLABS).

C - Clonage

Les mêmes opérations que celles décrites à l'exemple 4 (ligature, encapsidation, sélection de clones) ont été effectuées à partir d'un mélange contenant 1 µg d'ADN nif et 0,5 µg d'ADN de pHC 3. Sur 180 clones examinés, deux avaient la propriété de fixer l'azote. Tous deux ont la même structure qui est représentée sur la figure 7. Le cosmide correspondant est appelé pGPC 875.

Sur cette figure 7, la partie en trait continu représente le fragment de restriction Hind III d'ADN de *K. pneumoniae* portant les gènes nif indiqués par leurs abréviations conventionnelles.

Le fragment de restriction Hind III Eco RI de pHC 79 (6,5 Kb) est représenté en pointillé, quant au bloc levure, il est représenté par un trait ondulé (~~~).

Ce bloc levure comporte l'ADN du gène URA_3^+ et le fragment d'ADN du plasmide 2µmR1 H₃ de la forme B (décrit à l'exemple 1-B).

Exemple 7

Transformation de la levure

1 µg d'ADN du pGPC 875 a servi à transformer *S. cerevisiae*, souche FL 100, selon la méthode de GERBAUD C., FOURNIER Ph. BLANC H., AIGLE M. HESLOT H. et GUERINEAU M., *Gene*, 5, 233-253, 1979. Environ 250 transformants sélectionnés pour le caractère Ura^+ ont été obtenus. L'ADN circulaire contenu dans un de ces clones (clone 3) a été extrait selon la méthode décrite dans l'article de GERBAUD mentionné précédemment et a servi à transformer la souche

1106 (met, hsdR, hsdM) d'E. coli selon la méthode de COHEN S.N., CHANG A.C.Y. et HSU L., Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2110-2114, 1972. Les transformants ont été sélectionnés pour la résistance à l'ampicilline.

5 Sur 10 clones examinés, tous se sont révélés fixateurs d'azote. La structure des plasmides portés par ces 10 clones est identique à celle du plasmide pGPC 875 de départ. Grâce à l'utilisation du phage λ h434 cts comme dans l'exemple 5, ces plasmides ont été

10 retransférés dans différentes souches de K. pneumoniae mutées ou délétées dans les gènes nif et dans la souche DB 6656 (pyrF...Mu,LacZam, trPam, hsdR) d'E. coli. On a pu ainsi vérifier que les phénotypes du cosmide pGPC 875 Ura⁺ et nif⁺ avaient été conservés.

15 Fixation de l'azote

L'activité fixatrice d'azote d'E. coli ou K. pneumoniae (Δ nif) portant le plasmide pGPC 875 est équivalente à celle de la souche sauvage M5a1 de K. pneumoniae.

20 Le plasmide pGPC 875 selon la présente invention peut donc être utilisé pour transformer un microorganisme ne comportant pas les gènes nif.

Le plasmide pG 63 a été déposé sous le n° I-130 dans la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) le 25 août 1980.

25

Le cosmide pPC 857 a été déposé sous le n° I-131 dans la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) le 25 août 1980.

REVENDICATIONS

1) Plasmide hybride caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

a) un bloc d'ADN de levure constitué :

- 5 - d'un segment d'ADN renfermant le gène URA_3^+ de levure et du fragment de restriction R1 H₃ de 2,12 Kb de la forme B du plasmide 2 μ m de levure, ledit bloc d'ADN de levure ne comportant pas en dehors de ses extrémités d'autres sites de restriction Eco R1 ou Hind III;

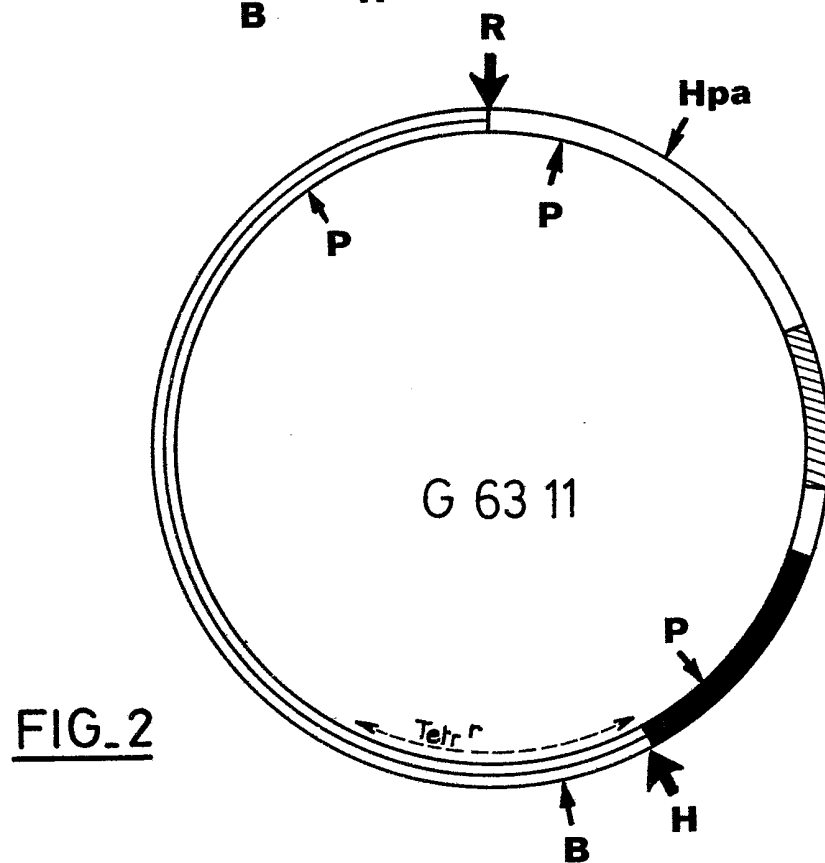
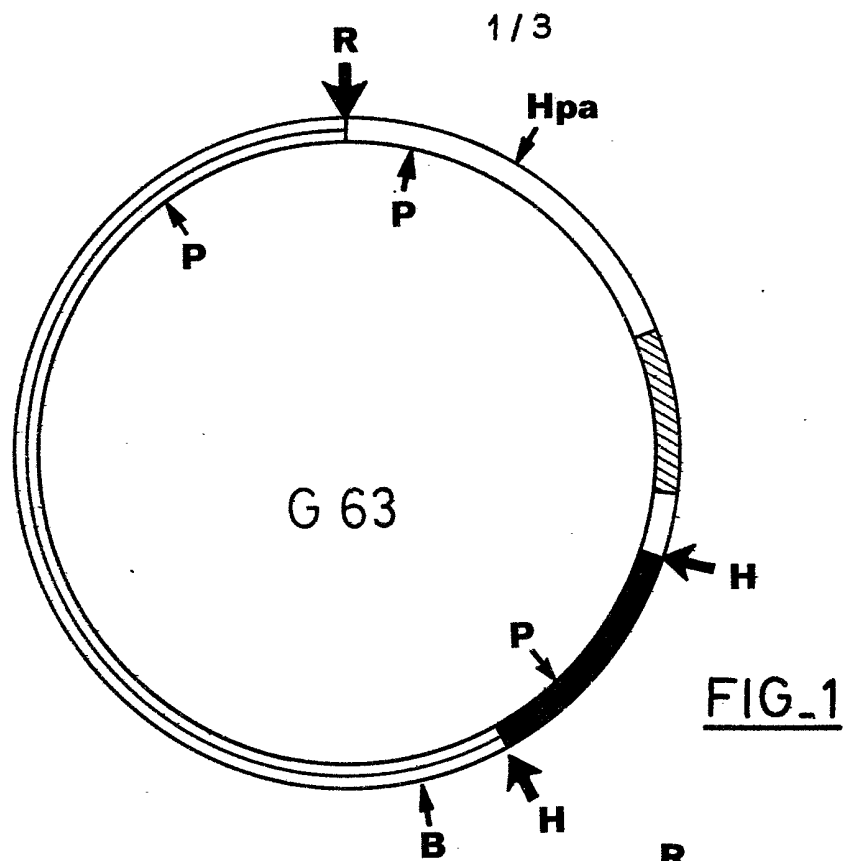
10 b) un fragment d'ADN d'un plasmide bactérien.

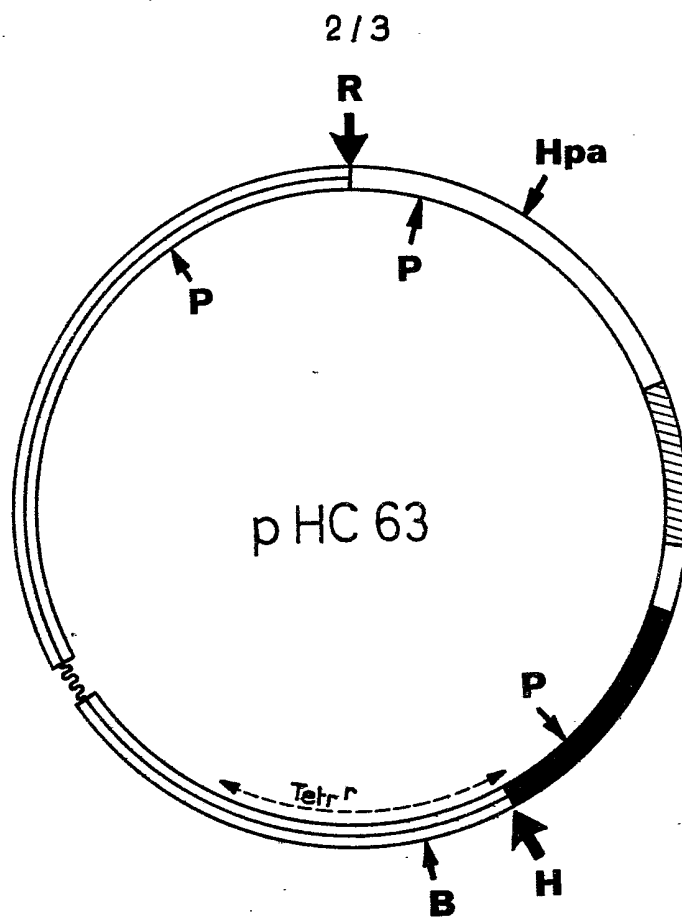
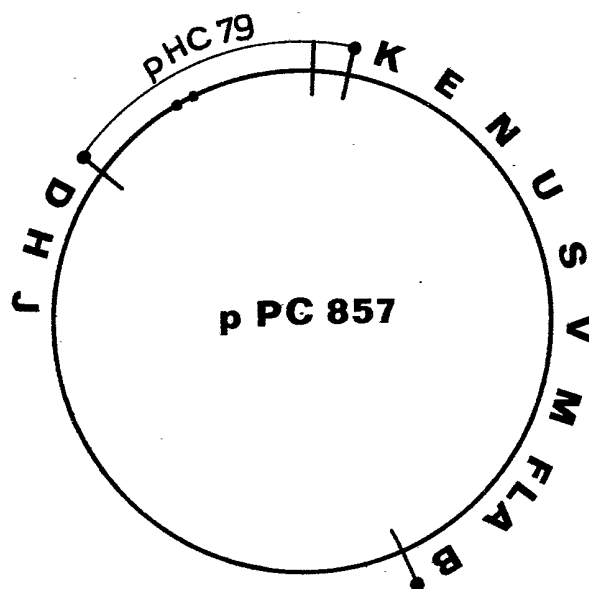
2) Plasmide hybride selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fragment d'ADN bactérien est l'ADN du plasmide bactérien pBR 322 comportant 4331 paires de base et compris entre les sites de restriction Eco R1 et Hind III.

15 3) Plasmide hybride selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fragment d'ADN bactérien comporte au moins un site cos d'un phage lambda ou d'un phage lambdoïde.

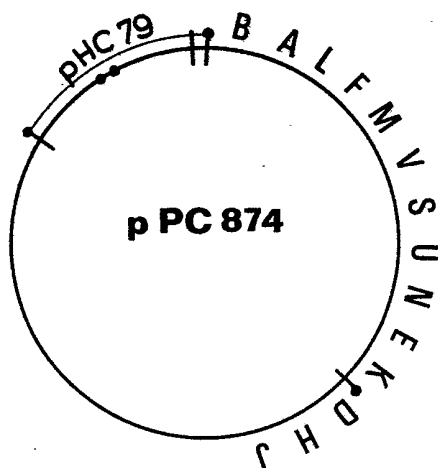
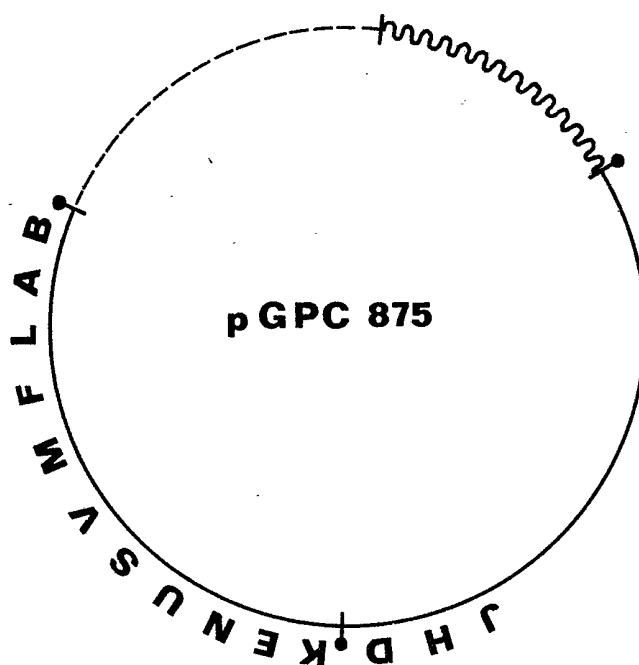
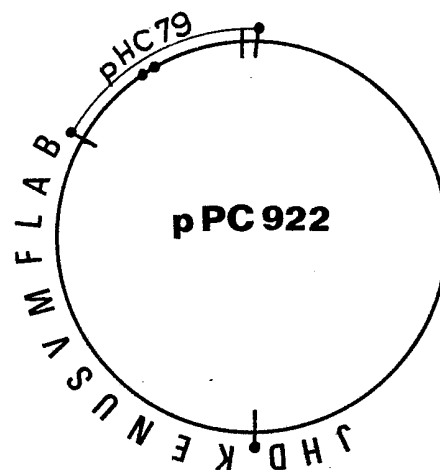
20 4) Plasmide hybride selon la revendication 3, caractérisé en ce que le fragment d'ADN bactérien est le fragment de restriction Eco R1 Hind III du cosmide pHC 79 comportant le site cos.

25 5) Microorganisme comportant un plasmide hybride selon l'une des revendications 1 à 4.



FIG. 3FIG. 4

3/3

FIG.5FIG.6FIG.7