

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 80 18754**

---

(54) Nouveaux plasmides hybrides utiles notamment pour l'introduction des gènes responsables de la fixation de l'azote dans des micro-organismes et cellules eucaryotes; micro-organismes et cellules eucaryotes contenant lesdits plasmides.

(51) Classification internationale (Int. Cl. <sup>3</sup>). 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 : INSTITUT PASTEUR, résidant en France.

(72) Invention de : Claudine Elmerich, Nicole Tandeau de Marsac et Michel Guérineau.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

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

La présente invention concerne des "plasmides hybrides" utiles pour l'introduction des 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 clairement aujourd'hui que l'introduction dans les plantes de la capacité d'utiliser l'azote atmosphérique aurait des conséquences économiques considérables.

La présente invention constitue une première approche de la solution de ce problème en fournissant des plasmides permettant l'introduction des gènes nif dans une cellule eucaryote.

Il s'agit d'un plasmide hybride caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

- un fragment d'ADN d'un plasmide 2 $\mu$ m de levure,
- un segment d'ADN renfermant un gène de levure,

- un fragment d'ADN d'un plasmide bactérien, et
- un fragment d'ADN renfermant les gènes nif.

Dans un mode de réalisation préféré de ces plasmides, le fragment d'ADN de plasmide 2 $\mu$ m est le fragment de restriction R1 H<sub>3</sub> de 2,12 Kb de la forme B du plasmide 2 $\mu$ m.

Ce fragment permet une meilleure amplification du plasmide hybride dans la levure.

Dans le cadre de la présente description, on utilisera parfois, lorsqu'aucune ambiguïté n'est permise, les abréviations "Hind III" et "Eco R1" pour désigner les endonucléases de restriction Hind III et Eco R1, et les termes "site Hind III" ou "site Eco R1" pour désigner les sites de restriction Hind III ou Eco R1.

La nomenclature des sites de restriction du plasmide 2 $\mu$ m 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.

Ainsi, le fragment de restriction R1 H<sub>3</sub> est un fragment de restriction entre le site Eco R1(1) et le site Hind III(3) tels que définis dans le document précédent.

Le fragment d'ADN d'un plasmide bactérien portera, de préférence, un site cos de phage lambda ou lambdaoïde qui facilite le clonage comme cela sera décrit ci-après, mais, pour la mise en oeuvre du plasmide, la présence d'un site cos n'est pas indispensable.

On entend par "site cos" dans le cas du phage lambda, le domaine comprenant les extrémités

cohésives agglutinantes. Ainsi, parmi les plasmides bactériens qui peuvent être fragmentés pour être introduits dans un plasmide selon l'invention, il faut mentionner le cosmide (plasmide comportant un site cos) pHC 79 décrit dans COLLINS J., Methods in Enzymol., 68, 309, 1979 et particulièrement le fragment de restriction Hind III Eco RI de 6,5 Kb comportant le site cos.

Le fragment d'ADN portant les gènes nif provient de préférence de Klebsiella pneumoniae. Chez cette bactérie, ces gènes sont portés par deux fragments de l'ADN dont les extrémités sont pourvues de séquences de nucléotides reconnus par l'enzyme de restriction Hind III. Ces fragments sont de l'ordre de 16 et 25 Kb, il s'agit des 14 gènes nif organisés en 7 unités de transcription qui ont été identifiés.

Enfin, dans le mode de réalisation préféré des plasmides selon l'invention, le gène de levure est le gène  $URA_3^+$  et les fragments d'ADN de levure sont contigus afin de former un "bloc d'ADN de levure".

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

Les exemples ci-après sont destinés à illustrer certaines caractéristiques des plasmides selon la présente invention mais ne sauraient en aucune façon la limiter.

L'utilisation des enzymes de restriction 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 par la société BIOLABS, la société MILES LABORATORIES INC. et la société BOEHRINGER.

Exemple 1

Préparation du plasmide pG 63

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, 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 par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % et le grand fragment est récupéré par la technique de congélation-décongélation (COLBERE-GARRAPIN F., CHOUSTERMANN S., HORODNICEANU F., KOURILSKY P., GARAPIN A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1979, 76, 3755-3759.)

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

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 2 $\mu$ m montre qu'il existe deux formes A et B du plasmide de 2 $\mu$ m. Le fragment Eco RI(1) Hind III(3) (RI H<sub>3</sub>) 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.





5 C - Le fragment pBR 322 et le fragment de levure de 2,12 Kb cités précédemment sont mélangés et ligaturés avec de la DNA ligase extraite du bactériophage T4 dans les conditions indiquées par le fabricant (BIOLABS).

10 Comme le fragment d'ADN du plasmide pBR 322 porte le gène Amp<sup>r</sup>, 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, appelé pG 6 et décrit dans la demande de brevet français n° 80 18755 déposée le même jour que la présente demande au nom du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et intitulée "Nouveaux plasmides hybrides et micro-organismes les comportant", contient le morceau RI H<sub>3</sub> du 2  $\mu$ m de levure inséré dans les sites RI H<sub>3</sub> de pBR 322.

15 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. Acad. Sci. USA 1979, 20 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 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.

25 De ces transformants on extrait un nouveau plasmide chimère pG 63 qui est décrit dans la 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 plasmide 2µm
- la partie  représente une séquence répétée inverse du plasmide 2µm.

Les sites de restriction sont notés de la façon suivante :

- 10 - R site de restriction Eco R1
- H site de restriction Hind III
- P site de restriction Pst
- Hpa site de restriction Hpa
- B site de restriction Bam H<sub>1</sub>.

15 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 2µm de levure et d'un fragment d'ADN de 1,1 Kb portant le gène URA 3. Le fragment

20 bactérien qui complète le plasmide est constitué par le fragment d'ADN de pBR 322 comportant 4331 paires de bases.

Il faut remarquer que ce plasmide possède dans le bloc d'ADN de levure un site Hind III qui

25 a servi à insérer le gène URA 3.

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

30 des enzymes de restriction le plus couramment utilisée. C'est pourquoi on doit déléter ce site Hind III.

#### Exemple 2

##### Préparation du plasmide pG 63 11

Le site Hind III situé entre la partie levure

35 2 µm et le gène URA 3 de pG 63 a été délété de la

manière suivante : le plasmide pG 63, déposé à la CNCM (Collection Nationale de Cultures Microbiennes à l'Institut Pasteur à Paris) sous le n° I-130, 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 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 ampïcilline sensible et on sélectionne les bactéries ampïcilline résistantes qui contiennent nécessairement le plasmide.

Après analyse des plasmides que l'on extrait et qui sont analysés par restriction, on obtient 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.

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

1) il possède plusieurs sites de restriction uniques : Eco R1, Hind III, Bam H<sub>1</sub> et Hp a1 ;

2) le fragment de restriction Eco R1 Hind III 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 site Bam H<sub>1</sub> 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 Ps tI dans ce vecteur.



### 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.

De même, on traite comme dans l'exemple 1-A le cosmide pHC 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 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.

Dans ce schéma, la partie  représente le site cos d'un 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  représente l'ADN du cosmide pHC 79 dans lequel on a fait apparaître le site cos.

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

Exemple 4Préparation du cosmide pPC 857A - Source d'ADN nif

La source d'ADN nif est le plasmide pCE 1  
5 (Km Tc Cb Gnd His Nif Tra Inc<sup>P</sup>) décrit dans ELMERICH C.,  
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 ( $\Delta$ (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 (Luria  
Broth) à 37°C on a obtenu 500 µg d'ADN purifié. Une  
20 partie aliquote de 5 µg a été hydrolysée par l'endo-  
nucléase 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 men-  
25 tionné 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*, décrite  
dans Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 1978, 75, 4242, contenant  
pHC 79 décrit dans l'article de COLLINS J. (Methods in  
30 Enzymol., 1979, 68, 309) après amplification au  
chloramphenicol (150 µg/ml). On a obtenu 200 µg d'ADN  
purifié. Une partie aliquote (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 pHC 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, on a décelé la présence de gènes nif dans 10 à 20 % des clones 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.

Le cosmide pPC 857 est représenté sur la figure 4. Il a été déposé à la CNCM sous le n° I-131 ; il s'est révélé contenir l'ensemble des gènes nif.

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

5 Les gènes nif sont indiqués par leurs abréviations communes : BALFMVSUNEKDHJ.

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. Les autres sites de restriction portés sur l'ADN codant pour les gènes nif ne sont pas représentés sur le schéma.

#### Exemple 5

##### Préparation des cosmides pPC 874 et pPC 922

20 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 H<sub>1</sub>, Bgl II (BIOLABS). Ils se répartissent dans les deux groupes théoriques possibles :

- 30 - 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.

Afin d'étudier l'expression des gènes nif portés par ces plasmides, ceux-ci ont été transférés dans des

souches bactériennes de *E. coli* et de *K. pneumoniae* dépourvues de gènes nif. On a utilisé, par exemple, la souche *K. pneumoniae* UNF 107 qui porte une délétion totale des gènes nif ( $\Delta$ nif) décrite dans Molec. Gen. Genet., 1978, 165, 181.

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

L'activité fixatrice d'azote, selon la méthode décrite dans Molec. Gen. Genet., 1978, 165, 181-189 (test de réduction de l'acétylène) d'*E. coli* ou de *K. pneumoniae* ( $\Delta$ nif) portant les plasmides pPC 874 ou pPC 922 est équivalente à celle de la souche sauvage M5 al de *K. pneumoniae* dont dérivent les gènes nif clonés.

Pour éviter la perte des plasmides pendant la croissance des bactéries hôtes (ségrégation), il faut ajouter de l'ampicilline à tous les milieux.

#### Exemple 6

##### Préparation du cosmide pGPC 875

##### A - Source d'ADN nif

A partir de 23  $\mu$ g d'ADN 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.


##### B - Hydrolyse du vecteur

1  $\mu$ 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 les fragments 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 H<sub>3</sub> 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  $\lambda$ h434 cts  
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<sup>+</sup> et nif<sup>+</sup> avaient été conservés.

15 Fixation de l'azote

L'activité fixatrice d'azote d'E. coli ou K. pneumoniae ( $\Delta$  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, bactérie ou levure, ne comportant pas les gènes responsables de la fixation de l'azote.

25 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.

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

REVENDEICATIONS

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

- un fragment d'ADN d'un plasmide 2  $\mu$ m de levure,
- un segment d'ADN renfermant un gène de levure,
- 5 - un fragment d'ADN d'un plasmide bactérien, et
- un fragment d'ADN renfermant les gènes responsables de la fixation de l'azote.

2) Plasmide hybride selon la revendication 1, caractérisé en ce que le fragment d'ADN du plasmide bactérien porte un ou plusieurs sites cos du phage  $\lambda$ .

3) Plasmide hybride selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le fragment d'ADN renfermant la totalité des gènes responsables de la fixation de l'azote est constitué de deux fragments de restriction Hind III.

4) Plasmide hybride selon la revendication 3, caractérisé en ce que le fragment d'ADN renfermant la totalité des gènes responsables de la fixation de l'azote provient de *K. pneumoniae*.

5) Plasmide hybride selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le fragment d'ADN de plasmide 2  $\mu$ m est le fragment de restriction R1 H<sub>3</sub> de 2,12 Kb de la forme B du plasmide 2  $\mu$ m.

6) Plasmide hybride selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que le fragment d'ADN d'un plasmide bactérien est le fragment de restriction Eco R1 Hind III du cosmide pHC 79 comportant le site cos.

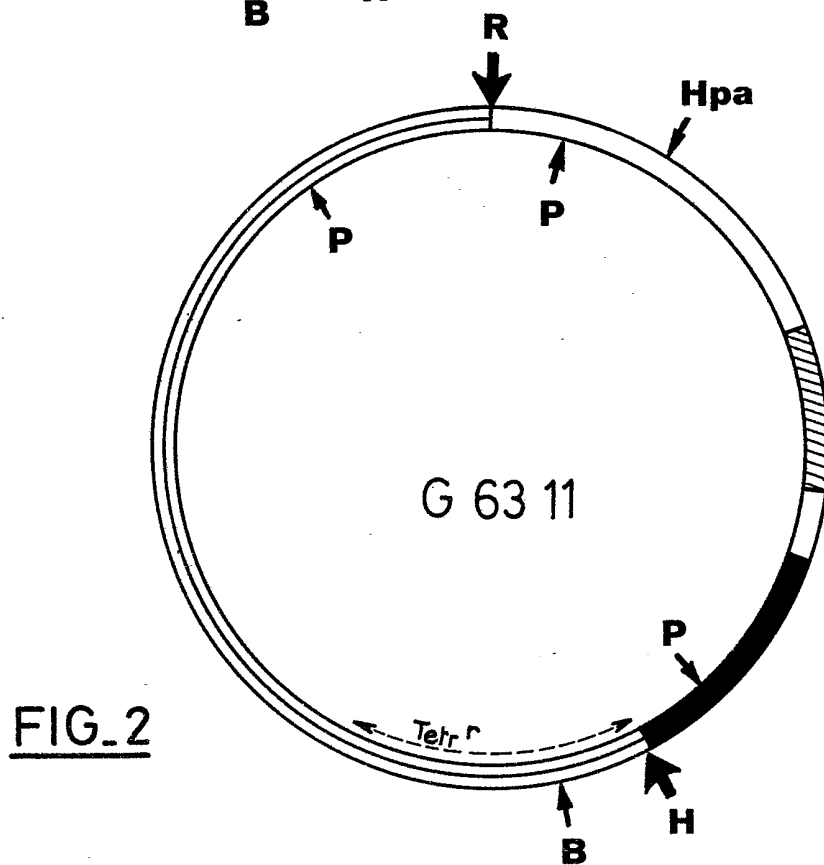
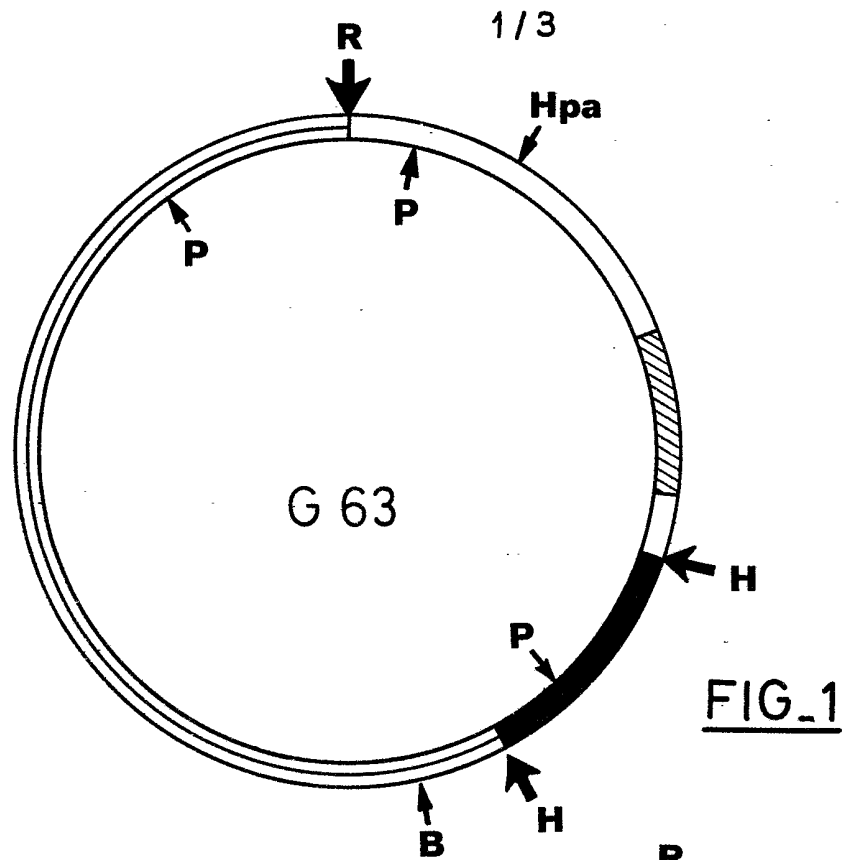
7) Plasmide hybride selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène de levure du segment d'ADN est le gène URA<sub>3</sub><sup>+</sup>.

8) Plasmide hybride selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les fragments d'ADN de levure sont contigus.

5 9) Cellules et microorganismes comportant un plasmide hybride selon l'une des revendications 1 à 8.

10 10) Procédé de construction du plasmide hybride selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à utiliser le plasmide pHCG 3, à ajouter de l'ADN nif purifié à partir de pPC 857, à ligaturer, à encapsider in vitro dans un phage  $\lambda$ , et à infecter à partir du plasmide hybride ainsi obtenu.

15 11) Procédé de préparation de souches de levures initialement  $\Delta$  nif transformées en nif<sup>+</sup>, caractérisé en ce que l'on utilise de l'ADN extrait de clones bactériens (E. coli) ayant été infectés par le plasmide hybride préparé par le procédé selon la revendication 10.



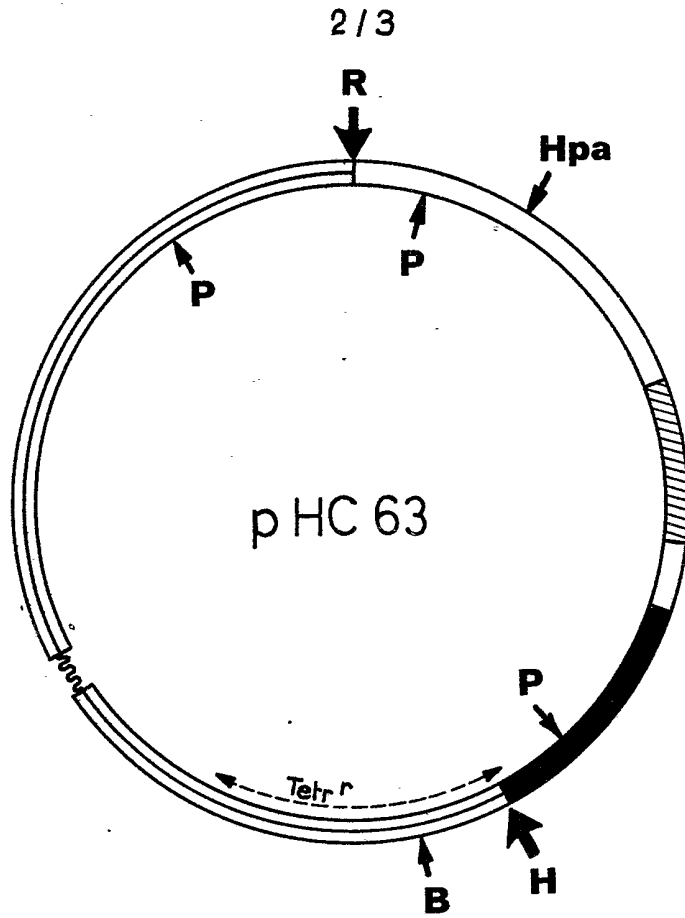


FIG. 3

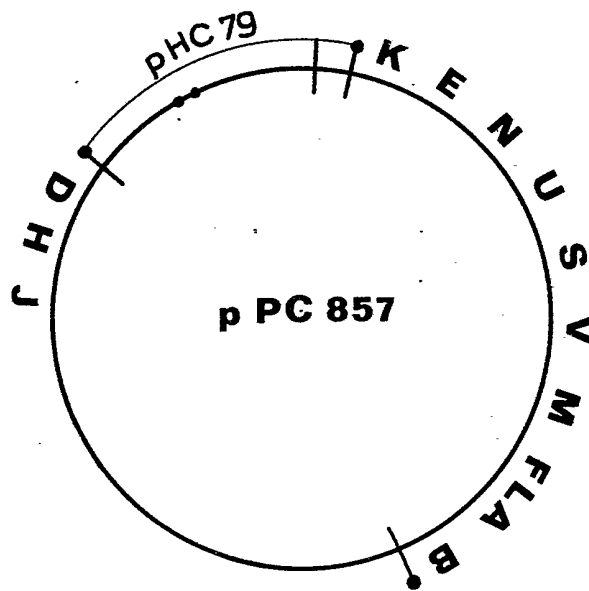


FIG. 4

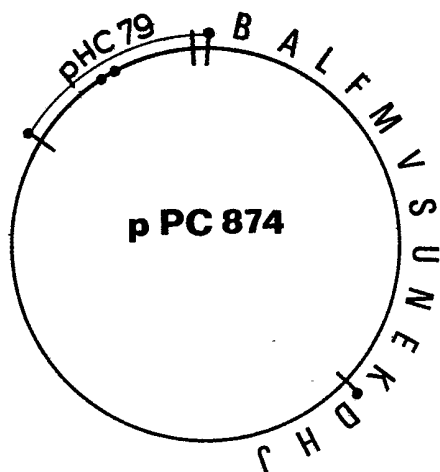


FIG.5

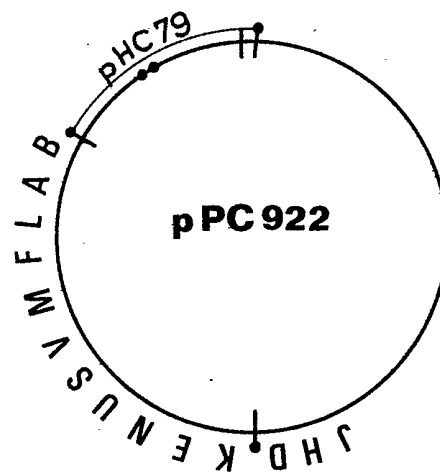


FIG.6

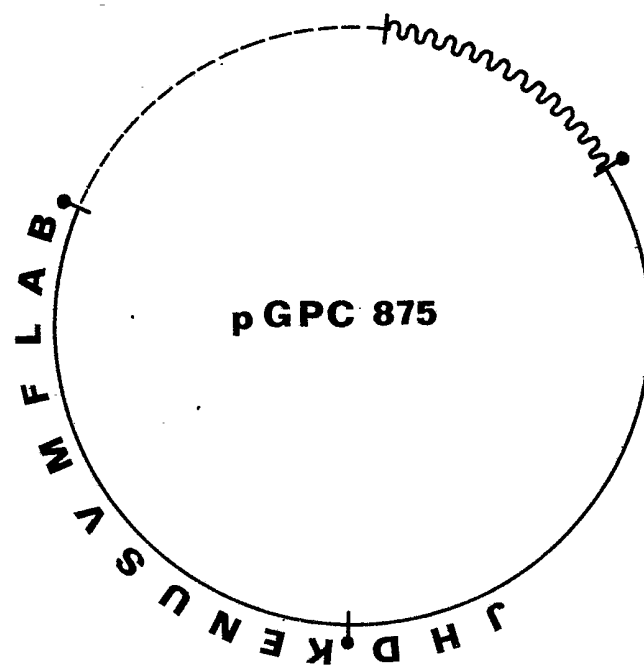


FIG.7