

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 79 19226

(54) Vecteur cosmique possédant un gène de résistance à la kanamycine.

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

(22) Date de dépôt..... 25 juillet 1979.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 7 du 13-2-1981.

(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR et AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RE-
CHERCHE (ANVAR), résidant en France.

(72) Invention de : Philippe H. Kourilsky et François Bregegere.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

L'invention est relative à de nouveaux vecteurs constitués par des molécules hybrides formées par recombinaison, notamment *in vitro*, de fragments génomiques de plasmides et de bactériophages, du type de ceux qui ont déjà été dési-
5 gnés par les expressions "plasmidophages" (P. KOURILSKY et al, Biochimie, 60 (1978), 183-187) ou "cosmides" (J. COLLINS et B. HOHN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1978), 4242-4246).

Certains cosmides de ce type ont déjà été décrits. Ils comportent un marqueur déterminé, plus particulièrement
10 un gène de résistance à un antibiotique, en l'occurrence la rifampicine ou l'ampicilline, les fragments cohésifs terminaux réassociés du phage λ , une origine de réplication et au moins un site de clivage par une endonucléase, notamment une
15 enzyme de restriction, ce site permettant notamment l'insertion d'un fragment d'ADN étranger, dont on désire effectuer le clonage. Ces cosmides (COS) qui présentent en eux-mêmes de préférence une taille faible (ou une masse moléculaire
faible), inférieure à celle du phage λ , se répliquent en tant que plasmides, tout en possédant les fragments de l'ADN vi-
20 ral qui sont capables de coder la synthèse des protéines d'encapsidation du virus.

Grâce à cette caractéristique, on obtient une possibilité de protection par encapsidation de ceux de ces cosmides qui ont été modifiés par insertion dans l'un au moins
25 de leurs sites de coupure d'un fragment d'ADN étranger conférant au cosmide ainsi complété une taille du même ordre de grandeur que celle du phage λ , et ce au cours des divisions cellulaires des micro-organismes préalablement transformés
par ces cosmides complétés et mis en oeuvre en vue du clo-
30 nage de ces derniers. Ce sera le cas en particulier de ceux de ces cosmides complétés dont les tailles, exprimées en nombre de kilobases, seront d'environ 36 à environ 50, no-

-2-

tamment de l'ordre de 48 kilobases.

Cette possibilité d'encapsidation, liée à la taille des ADN modifiés correspondants, peut donc en particulier être mise en oeuvre pour effectuer un tri de fragments d'ADN particuliers parmi les recombinants obtenus, notamment par recombinaison *in vitro* de tels cosmides et de fragments d'ADN à étudier.

L'invention a pour but de fournir des cosmides nouveaux et perfectionnés, pourvus de marqueurs particulièrement efficaces et comportant, de préférence, une pluralité de sites de coupures distincts, susceptibles de n'être respectivement ouverts que par des endonucléases elles-mêmes distinctes, chacun de ces sites étant unique de son espèce dans les cosmides du genre en question.

Le cosmide selon l'invention, qui est constitué d'un recombinant d'un fragment génomique d'un plasmide et d'une partie au moins du fragment d'ADN résultant de la réassociation de fragments terminaux cohésifs du phage λ , susceptibles d'être reconnus par des systèmes d'encapsidation du phage, est caractérisé en ce que le fragment génomique du plasmide est pourvu d'un gène de résistance à la kanamycine.

Le cosmide selon l'invention est, dans l'un de ses modes de construction préférés, encore caractérisé en ce que les extrémités du fragment d'ADN du phage sont respectivement constitués par des extrémités cohésives EcoRI et BamHI et que le fragment génomique de plasmide est pareillement délimité par les mêmes extrémités cohésives, la recombinaison entre les deux fragments étant faite, d'une part, au niveau de leurs sites EcoRI respectifs et, d'autre part, au niveau de leurs sites BamHI respectifs.

Dans l'un de ses modes de construction plus particulièrement préféré, le gène de résistance à la kanamycine est pourvu d'un site HindIII.

Un fragment génomique de plasmide préféré de l'invention est formé d'un fragment de 4 kilobases présentant les susdites extrémités cohésives et le gène de résistance à la kanamycine originaire d'un plasmide p_{TK16} ayant les caractéristiques d'identification du plasmide p_{FF1} déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur (C.N.C.M.), sous le n° I-093, le

-3-

8 juin 1979, le fragment dérivé du phage λ ayant lui-même une taille pouvant notamment être de l'ordre de 4 à 9,5 kilobases.

Des cosmides préférés selon l'invention comportent :

- 5 - en sus des sites uniques EcoRI et BamHI reconstitués au moment de la recombinaison et des sites uniques distincts BamHI, SalI, BglIII et HindIII,
- au moins un site de restriction unique supplémentaire (notamment PstI).

10 Le site unique PstI peut notamment être obtenu par la délétion de la zone de sites PstI que contient encore initialement celui des fragments cohésifs du phage comportant le site terminal BamHI, délétion qui entraîne alors l'avantage supplémentaire d'un raccourcissement du vecteur ainsi
15 obtenu.

Un raccourcissement additionnel est encore obtenu par délétion de la partie du même fragment compris entre les deux sites HpaI, cependant au prix de la disparition du site unique PstI.

20 Parmi les vecteurs particulièrement intéressants selon l'invention se trouvent ceux qui sont pourvus de sites de restriction distincts très rapprochés entre eux, notamment à des distances inférieures à 0,5 kilobases.

On obtient ainsi des séries de nouveaux vecteurs
25 permettant l'insertion dans leurs différents sites uniques de plusieurs fragments d'ADN, eux-mêmes distincts, et/ou de fragments d'ADN relativement importants, dont la taille peut être d'autant plus grande que le vecteur utilisé est initialement plus petit.

30 Dans le premier cas, les vecteurs selon l'invention permettent alors le clonage simultané des fragments distincts d'ADN insérés. Dans le second cas, on dispose ainsi d'une batterie de vecteurs permettant le tri de fragments d'ADN distincts selon leurs tailles.

35 Comme il sera vu à propos d'exemples préférés de construction des vecteurs selon l'invention, certains d'entre eux sont caractérisés par des sites de coupure distincts, pour ce qui est de la nature des enzymes de restriction capables de les reconnaître, mais très rapprochés les uns des
40 autres, d'où la possibilité d'étudier les relations pouvant

-4-

exister entre divers fragments d'ADN étrangers insérés dans ces sites, notamment au niveau de l'expression des protéines correspondantes.

Le gène de résistance à la kanamycine commun à tous ces vecteurs permet leur reconnaissance. Il ne conduit pas aux difficultés qui sont susceptibles d'être rencontrées à l'occasion de l'utilisation de cosmides de l'état de la technique comportant soit un gène de résistance à la rifampicine, soit un gène de résistance à l'ampicilline. On sait en effet que les cultures de bactéries transformées avec des plasmides porteurs de gènes de résistance à la rifampicine doivent être maintenues à l'obscurité, en raison de la sensibilité de la rifampicine à la lumière.

Le gène de résistance à la kanamycine ne présente pas d'avantage l'inconvénient des gènes de résistance à l'ampicilline, inconvénient qui se manifeste par le fait que les bactéries résistantes à l'ampicilline produisent des métabolites qui sont capables de détruire l'ampicilline. Il en résulte en effet des zones localement appauvries en ampicilline des milieux de culture contenant cet antibiotique et par conséquent le développement dans ces zones de colonies de bactéries non résistantes à l'ampicilline. Il devient alors difficile, dans la pratique, de distinguer les "bactéries résistantes" et les bactéries non résistantes" à l'égard de l'ampicilline, par conséquent celles qui ont effectivement été transformées par un vecteur contenant le fragment d'ADN étranger cloné.

D'autres caractéristiques encore de l'invention apparaîtront au cours de la description de constructions préférées de cosmides selon l'invention, cette description s'appuyant sur :

- la fig. 1 qui est une carte du plasmide p_{TK16} dont est dérivé l'un des fragments intervenant dans lesdits cosmides,
- la fig. 2 est une représentation schématique de l'ADN du phage λ , mettant en évidence les emplacements vis-à-vis de ses extrémités cohésives de ses différents sites de reconnaissance par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI, et
- les fig. 3a, 3b et 3c représentent schématiquement des cartes de vecteurs du type cosmide conforme auxdites constructions préférées de cosmides selon l'invention.

-5-

TK16 (dont la carte est représentée dans la fig. 1) est un petit plasmide de 4,2 kilobases porteur de gènes de résistance à la tétracycline et à la kanamycine. Les emplacements de ces gènes de résistance sont respectivement schématisés par les fragments de courbe Tc^R et Km^R . La carte de la fig. 1 fait apparaître la position de l'origine de réplication du plasmide (ori) et les emplacements des sites de reconnaissance par diverses enzymes de restriction identifiées dans la fig. 1. L'ADN de ce plasmide, purifié par centrifugations successives en gradient de chlorure de césium puis en gradient de sucrose 5-40 %, a été coupé successivement par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI (enzymes Boehringer-Mannheim). On a eu recours aux tampons suivants :

Tampon de digestion BamHI : Tris-HCl pH 7.4 :
 6.10^{-3} M ; $MgCl_2$: 6.10^{-3} M ; sérumalbumine bovine "fatty acid free" (Sigma) : 100 µg/ml ; β -mercaptoéthanol : 6.10^{-3} M ;

Tampon de digestion EcoRI : Tris-HCl pH 7.4 :
 8.10^{-2} M ; NaCl : 5.10^{-2} M ; $MgCl_2$: 10^{-2} M ; sérumalbumine bovine "fatty acid free" (Sigma) : 100 µg/ml.

Les produits de ces deux digestions sont un fragment d'environ 4 kilobases et un fragment d'environ 0,2 kilobases.

Ces produits ont été détectés de façon en soi connue, notamment par l'électrophorèse sur une plaque d'un gel d'acrylamide. C'est le fragment de 4 kilobases (f4b dans les fig. 3a, 3b, 3c) purifié sur gradient de sucrose 5-40 %, qui est utilisé pour la construction du cosmide selon l'invention, lequel a alors perdu la capacité d'induire la résistance des cellules transformées à la tétracycline.

Dans la fig. 2 est schématiquement représenté l'ADN du phage λ . Les petites flèches orientées vers le trait plein, représentatif du phage λ , et affectées de nombres, sont représentatives des emplacements respectifs des sites EcoRI du phage en pourcentages de longueurs de celui-ci, vis-à-vis de ses extrémités cohésives marquées respectivement des nombres 0 et 100. De même, les petites flèches situées au-dessous du trait plein, représentatif du phage, et les nombres qui leur sont affectés indiquent les positions relatives des sites BamHI.

-6-

L'ADN du bactériophage λ extrait à partir de phages purifiés sur gradient de chlorure de césium a été coupé de la même manière que dans le cas de p_{TK16} , par les mêmes enzymes, donnant un mélange complexe de 11 fragments différents. Les

5 deux fragments terminaux (repérés par les lettres f1 et f11) sont partiellement associés parce qu'ils portent chacun à une extrémité un des "bouts cohésifs" de λ , ceux-ci étant formés de prolongements monocaténares complémentaires de 12 nucléotides de long.

10 Cette dernière propriété a été mise à profit pour purifier ces fragments par centrifugation en gradient de sucre 5-40 % dans le tampon suivant : Tris-HCl pH 8 : 10^{-2} M ; NaCl : 1 M ; EDTA-NaOH pH 8 : 10^{-3} M. Après 16 h 30 de centrifugation à 32.000 tours/minute dans une centrifugeuse munie d'un rotor de type "Spinco SW41", l'analyse du

15 gradient en densité optique révèle la présence d'un pic bien séparé, correspondant essentiellement aux fragments terminaux f1, f11 réassociés, au niveau (COS) de leurs extrémités cohésives terminales antérieures (fig. 3a, 3b, 3c).

20 Les fragments terminaux de λ réassociés se présentent comme une séquence unique (dont la taille globale est de 9,6 kilobases) ayant à ses extrémités un demi-site BamHI et un demi-site EcoRI. Il en est de même des deux fragments de p_{TK16} produits dans l'opération précédente. Il est donc

25 possible de recombiner ces molécules entre elles de manière à obtenir notamment un hybride composé des fragments terminaux de λ et du fragment 4 kb et p_{TK16} dans un arrangement univoque. L'hybride cherché est un plasmide porteur des gènes de résistance à la kanamycine mais ayant perdu la résistance

30 à la tétracycline, et son ADN doit mesurer environ 13,6 kilobases.

A cette fin, on a traité le mélange des deux fragments de p_{TK16} et des fragments terminaux décrits ci-dessus avec l'ADN ligase du phage T4 pendant 16 h à 0°C au sein

35 d'un milieu constitué comme suit : Tris-HCl pH 7.5 : $4 \cdot 10^{-2}$ M ; $MgCl_2$: 10^{-2} M ; sérum-albumine bovine "fatty acid free" (Sigma) : 250 μ g/ml ; adénosine triphosphate : 10^{-4} M ; dithiothréitol : 10^{-2} M ; DNA substrat : 10 μ g/ml. Les produits de cette réaction ont été utilisés pour transformer

-7-

la souche *E. coli* C600. On choisit parmi les bactéries transformées résistantes à la kanamycine, celles qui ne sont pas sensibles à la tétracycline.

Les ADN plasmidiques recueillis à partir de ces
5 bactéries ont été examinés par analyse des produits obtenus, après digestion préalable par les enzymes de restriction caractéristiques tant du fragment 4 kb que du fragment de phage f1, f11. C'est celui des plasmides qui a donné les fragments d'ADN dont les tailles correspondent à celles du recombinant
10 étendu pFF1, représenté à la fig. 3, qui a finalement été retenu au titre du cosmide recherché.

Le plasmide obtenu, qui a une taille mesurée par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ordre de 14,2 kilobases, autorise l'insertion, de préférence dans l'un de ses sites
15 uniques EcoRI, BglI ou BamHI, de fragments d'ADN pouvant avoir une taille atteignant jusqu'à environ 34 kilobases, bien entendu à condition que le fragment en question ait disposé (ou ait préalablement été pourvu) d'extrémités cohésives propres à être reconnues par l'enzyme de restriction
20 correspondante.

A partir des cosmides de la fig. 3a, il a été permis d'obtenir des cosmides plus petits encore.

Le plasmide ^pFF2, schématiquement représenté à la fig. 3b, a été obtenu par excision d'une région de 3 kilobases où se trouvaient concentrés tous les sites de ^pFF1.
25 Ceci a été réalisé par digestion totale de ^pFF1, en présence de PstI, digestion qui a été suivie d'une ligation des produits de digestion réalisée dans les conditions décrites ci-dessus, à faible concentration d'ADN (5 µg/ml). Un site
30 PstI a été reconstitué lors de la ligation, de sorte que l'ADN du plasmide obtenu mesure à peu près 11 kilobases. ^pFF2 comporte finalement des sites uniques de restriction, respectivement reconnaissables : EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, Sall et BglII.

35 Enfin, par digestion totale de ^pFF1 par HpaI dans les mêmes conditions que ci-dessus avec PstI, on obtient un plasmide de 9 kilobases portant un site unique pour les enzymes EcoRI, BamHI, HindIII et BglII (fig. 3c). Le site HpaI n'a pas été reconstitué lors de la ligation.

Les plasmidophages de la série p_{FF} portent les extrémités cohésives du phage λ et peuvent donc être empaquetés dans des capsides de λ *in vivo* ou *in vitro* lorsque leurs ADN sont portés à la taille appropriée par oligomérisation ou insertion d'un fragment étranger. Ils ont déjà été
5 utilisés expérimentalement pour le clonage de segments d'ADN de 25 à 35 kilobases, et constituent donc des vecteurs intéressants pour l'amplification de grands fragments génomiques.

Les vecteurs selon l'invention sont particulièrement
10 intéressants en ce qu'ils disposent de sites uniques tels que ceux définis, se trouvant à des distances extrêmement proches les uns des autres, notamment en ce qu'ils sont séparés par des fragments d'ADN extrêmement courts (0,3 kilobase entre les sites PstI et BamHI) dans les vecteurs p_{FF1}
15 et p_{FF2} et 0,4 kilobase entre les sites BglII et BamHI dans le vecteur p_{FF3} .

Tous ces vecteurs sont également munis d'un site HindIII, lequel ne devrait néanmoins pas être utilisé comme site d'insertion d'un fragment d'ADN étranger à cloner, dans
20 la mesure où il est contenu dans le gène de résistance à la kanamycine et où ce gène est mis à profit pour permettre la reconnaissance des cellules porteuses de ce plasmide.

En particulier, on relèvera que l'intérêt de telles souches est de pouvoir insérer plusieurs gènes eucaryotes dans une même structure, ou des gènes de grande dimension comportant des "zones silencieuses" ou introns avec
25 leurs signaux de réplication (par exemple : gène codant pour la β -globine humaine et gène codant pour le lysozyme de poule). Avec la souche p_{FF2} , on insère des fragments de lysozyme de poule de l'ordre de 25 à 33 kb. On peut y insérer
30 également le gène X, notamment celui extrait du plasmide p_{AR2} (décrit dans Nature, Vol. 279, 10 mai 1979).

Bien entendu, les gènes en question doivent posséder par nature des extrémités cohésives correspondant aux
35 sites de restriction du cosmide dans lequel ils seront insérés. Le cas échéant, ces extrémités cohésives devront être élaborées au préalable.

Les vecteurs selon l'invention, et plus particulièrement le vecteur p_{FF2} sont d'un intérêt tout particulier,

-9-

compte tenu de leur petite taille et de leur nombre important de sites de restriction uniques, reconnaissables par des enzymes de restriction respectivement distincts. Ces vecteurs, et notamment p_{FF2} peuvent également être maintenus dans des
5 systèmes eucaryotes, notamment des levures (après insertion d'un fragment d'ADN supplémentaire fragment ou plasmide 2 μ).

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont
10 été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes.

REVENDEICATIONS

1 - Cosmide constitué d'un recombinant d'un fragment génomique d'un plasmide et d'une partie au moins du fragment d'ADN résultant de la réassociation de fragments terminaux cohésifs du phage λ , susceptibles d'être reconnus par des systèmes d'encapsidation du phage, caractérisé en ce que le fragment génomique du plasmide est pourvu d'un gène de résistance à la kanamycine.

2 - Cosmide selon la revendication 1, caractérisé en ce que les extrémités du fragment d'ADN du phage sont respectivement constituées par des extrémités cohésives EcoRI et BamHI et que le fragment génomique de plasmide est pareillement délimité par les mêmes extrémités cohésives, la recombinaison entre les deux fragments étant faite au niveau, d'une part, de leurs sites EcoRI respectifs et, d'autre part, au niveau de leurs sites BamHI respectifs.

3 - Cosmide selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que le gène de résistance à la kanamycine est pourvu d'un site HindIII.

4 - Cosmide selon l'une quelconque des revendications 2 et 3 prises dans leur ensemble, caractérisé en ce que le fragment génomique de plasmide est formé d'un fragment de 4 kilobases présentant les susdites extrémités cohésives et le gène de résistance à la kanamycine originaire d'un plasmide p_{TK16} ayant les caractéristiques d'identification du plasmide p_{FF1} déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur (C.N.C.M.), sous le n° I-093, le 8 juin 1979, le fragment dérivé du phage λ ayant lui-même une taille pouvant notamment être de l'ordre de 4 à 9,5 kilobases.

5 - Cosmide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comporte :
- en sus de sites uniques EcoRI et BamHI reconstitués lors de la recombinaison et de ses sites uniques distincts BamHI, SalI, BglIII et HindIII,
au moins un site de restriction unique supplémentaire.

6 - Cosmide selon la revendication 5, caractérisé en ce que ce site de restriction unique supplémentaire est constitué par un site PstI.

-11-

7 - Cosmide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est pourvu de sites de restriction distincts très rapprochés entre eux, notamment à des distances inférieures à 0,5 kilobases.

5 8 - Cosmide selon la revendication 7, caractérisé en ce que deux de ses sites rapprochés sont reconnaissables par PstI et BamHI.

 9 - Cosmide selon la revendication 7, caractérisé en ce que deux de ses sites rapprochés sont reconnaissables
10 par BglIII et BamHI.

 10 - Cosmide modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comporte dans l'un au moins de ses susdits sites uniques un fragment d'ADN étranger, notamment d'une taille telle qu'elle permette
15 l'encapsidation dudit cosmide modifié.

 11 - Cosmide selon la revendication 10, caractérisé en ce que la taille du fragment d'ADN étranger est d'environ 25 à environ 35 kilobases.

Fig.1.

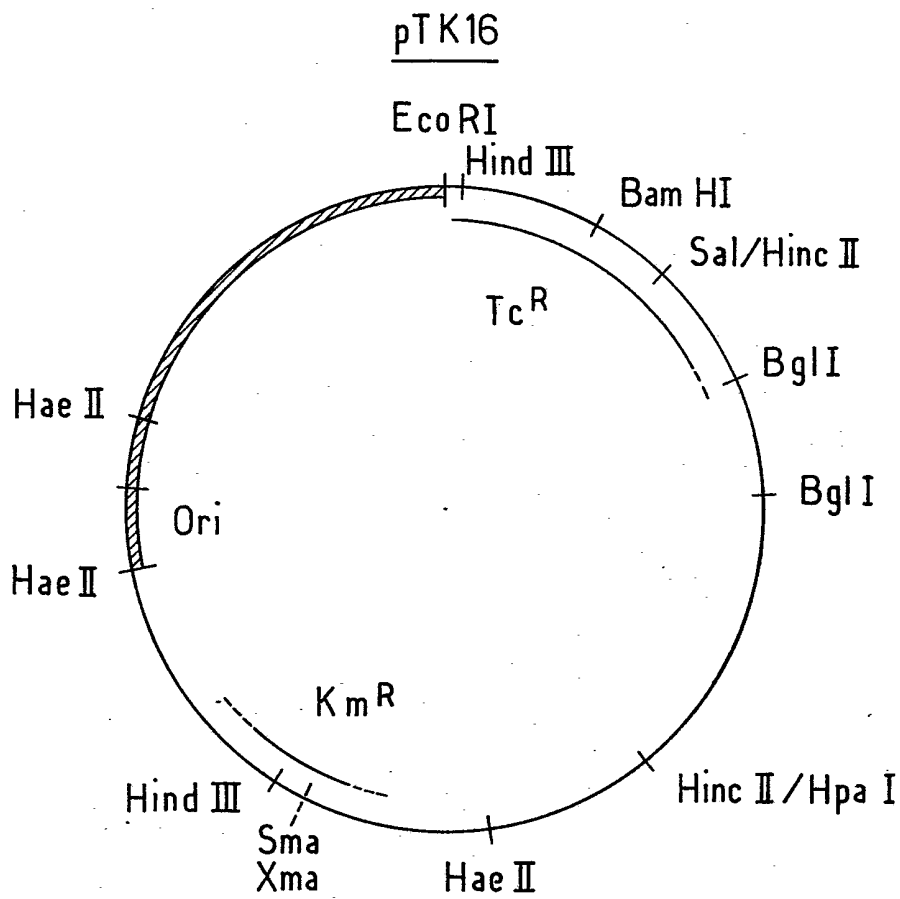


Fig.2.

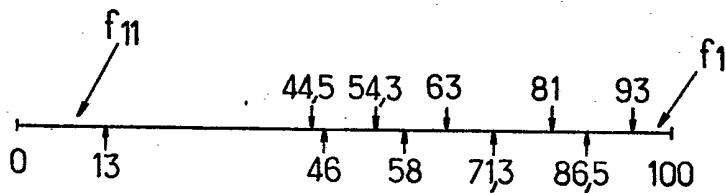


Fig. 3a.

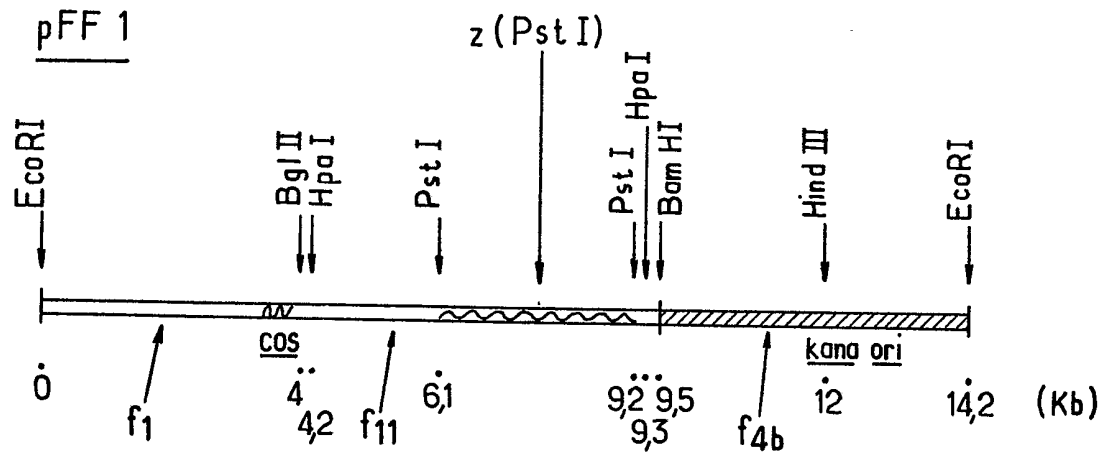


Fig. 3b.

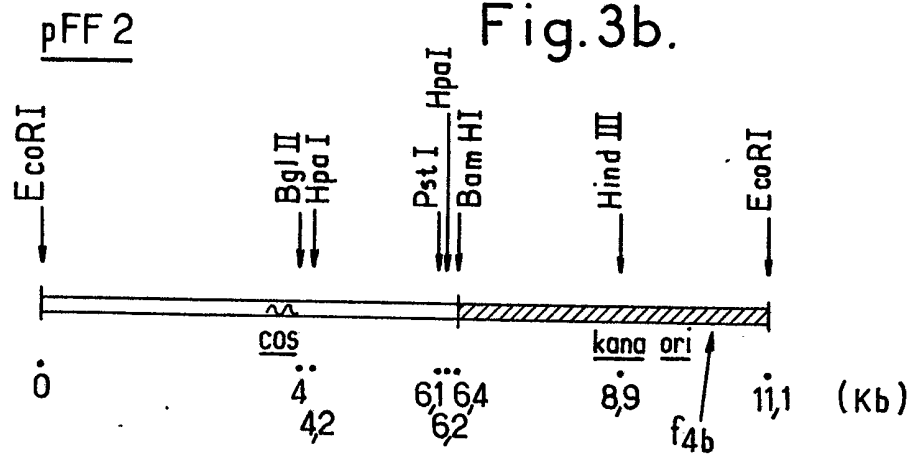


Fig. 3c.

