

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 14.09.01.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.03.03 Bulletin 03/12.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR et INSTI-
TUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
INRA — FR.

⑦② Inventeur(s) : KAMINSKI PIERRE ALEXANDRE,
TAILLIEZ PATRICK, MARLIERE PHILIPPE, QUENEE
PASCAL et COTAYA RACHEL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : RINUY SANTARELLI.

⑤④ N-DESOXYRIBOSYLTRANSFERASES DE LACTOBACILLES, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES
CORRESPONDANTES ET LEURS APPLICATIONS.

⑤⑦ La présente invention concerne de nouveaux poly-
peptides et leurs fragments, isolés de *Lactobacillus*, ayant
au moins une activité N-désoxyribosyltransférase, les poly-
nucléotides codant lesdits polypeptides, les vecteurs de clo-
nage et/ ou d'expression incluant lesdits polynucléotides,
les cellules transformées par lesdits vecteurs et les anti-
corps spécifiques dirigés contre lesdits polypeptides. L'in-
vention concerne également un procédé de synthèse
enzymatique de désoxyribonucléosides.

FR 2 829 774 - A1



La présente invention est relative au domaine de la biologie, et plus particulièrement de la production microbiologique d'analogues de bases. La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leurs
5 fragments, isolés de *Lactobacillus*, ayant au moins une activité N-désoxyribosyltransférase, les polynucléotides codant lesdits polypeptides, les vecteurs de clonage et/ou d'expression incluant lesdits polynucléotides, les cellules transformées par lesdits vecteurs et les
10 anticorps spécifiques dirigés contre lesdits polypeptides. L'invention concerne également un procédé de synthèse enzymatique de désoxyribonucléosides.

Les analogues de nucléosides dont la structure comporte des altérations du sucre ou de la base
15 hétérocyclique, forment une famille de molécules actives dans le traitement de nombreuses infections bactériennes, virales, parasitaires et fongiques ainsi que dans la chimiothérapie antitumorale [Périgaud et coll, 1992]. Par ailleurs les propriétés insecticides et
20 herbicides de certains antibiotiques nucléosidiques en font des agents potentiels dans le secteur de l'agrochimie et de l'environnement [Isono, 1988]. L'industrie emploie deux modes de production de ces analogues, la synthèse organique et la conversion
25 biocatalytique (conversion enzymatique et conversion microbiologique), qui présentent avantages et inconvénients opposés. La synthèse organique permet d'accéder aux structures chimiques les plus variées mais nécessite des étapes multiples et coûteuses en réactifs
30 et en solvants. Au contraire, les méthodes biocatalytiques permettent une production aisée en milieu aqueux mais limitée à un petit nombre de composés

possibles du fait de la spécificité des enzymes, qui admettent une gamme limitée d'analogues à la place de leurs substrats physiologiques. Les nucléosides phosphorylases et N-désoxyribosyltransférase, qui
5 proviennent des voies de sauvegarde des purines et pyrimidines chez les bactéries, sont les enzymes les plus utilisées pour ces conversions enzymatiques (Krenisky et coll, 1981).

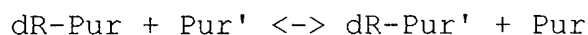
Il existe donc une nécessité urgente d'obtenir des
10 enzymes de conversion de nucléosides et de leurs dérivés, ayant une activité enzymatique élargie afin de diversifier la production industrielle de ces composés. C'est le problème technique que se propose de résoudre les inventeurs de la présente invention.

15 La N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus leichmannii* ainsi que celle de *L. helveticus*, partiellement purifiée ou non, se révèle être le meilleur donneur de groupement glycosyl et tolère un nombre important de variations structurales sur la base.
20 Cette enzyme a été utilisée pour produire un certain nombre d'analogues parmi lesquels il convient de citer la 2-chloro,2'-désoxyadénosine (Carson et coll, 1984), les 2',3'-didésoxynucléosides des bases naturelles (Carson et Wasson, 1988) ou encore plusieurs
25 pyrazolo(3,4-d)pyrimidine et triazolo(4,5-d)pyrimidine dérivés de la 2',3'-didésoxycytidine et de la base correspondante (Fischer et coll, 1990).

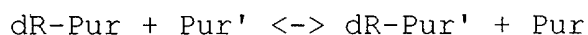
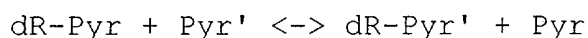
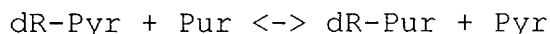
Dans le but de disposer d'enzymes recombinantes capables de traiter la plus large variété de substrats
30 déviants soit par la base ou par le sucre, les inventeurs ont isolé des gènes codant pour une activité N-désoxyribosyltransférase de différentes souches de

lactobacilles. Cette variété d'enzymes N-désoxyribosyltransférase permet d'augmenter les chances d'obtenir des enzymes à la spécificité élargie par des mutations dans les gènes sauvages ou par des chimères de
 5 ces gènes sauvages.

Deux classes de N-désoxyribosyltransférase ont été distinguées (Danzin et Cardinaud, 1976), la première (classe I) désigné ptd (pour purine transdésoxyribosylase) catalysant exclusivement
 10 l'échange de désoxyribose entre deux purines:



et la deuxième (classe II) désignés ntd (pour nucléoside transdésoxyribosylase), l'échange de désoxyribose entre une purine et une pyrimidine, entre
 15 deux pyrimidines ou entre deux purines:



Seuls deux gènes spécifiant des enzymes de classe
 20 II, désignés ntd, ont été rapportés à ce jour (Hück, 1997 ; dbj|BAA92683.2| (AB039914)).

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-désoxyribosyltransférase de séquence
 25 d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14.

Selon un mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°2 (ou SEQ ID N°14)
 30 codée par le gène ntd Lh de *Lactobacillus helveticus*.

Selon un second mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°4 codée par le gène ptd Lh de *Lactobacillus helveticus*.

5 Selon un troisième mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°6 codée par le gène ntd Lf de *Lactobacillus fermentum*.

 Selon un quatrième mode préféré de réalisation, le
10 polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°8 codée par le gène ntd de *Lactobacillus crispatus*.

 Selon un cinquième mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-
15 désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°10 codée par le gène ntd de *Lactobacillus amylovorus*.

 Selon un sixième mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-
20 gène ntd de *Lactobacillus acidophilus*.

 Le polypeptide isolé selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi (a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14; (b) un polypeptide variant de polypeptide de séquences d'acides aminés défini en a) ; (c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en (a) ou (b) et comportant au moins 80 % d'identité, de préférence 85 %, 87 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %
25 d'identité avec ledit polypeptide de a) ; (d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs de préférence 17, 20, 23, 25, 30, 40, 50, 100, 250 amino-

acides consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ; et (e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

Le polypeptide selon l'invention se caractérise en ce qu'il permet de satisfaire l'exigence en guanine de certaines souches bactériennes telles PAK6 qui est une souche d'*E. coli* dont les deux gènes de l'opéron *guaBA*, qui commandent la conversion de IMP en XMP puis en GMP, ainsi que ceux de l'opéron *deoCABD* qui commandent la dégradation des désoxynucléosides, ont été délétés. En effet, ces souches pour survivre ou croître nécessitent l'apport de désoxyguanosine (dR-G) dans le milieu de culture et la présence d'une activité N-désoxyribosyltransférase d'un polypeptide selon l'invention pour réaliser l'échange: dR-G + A $\leftrightarrow$ dR-A + G.

Dans la présente description, on utilisera le terme polypeptide pour désigner également une protéine ou un peptide.

On entendra par polypeptide variant l'ensemble des polypeptides mutés pouvant exister naturellement, en particulier chez l'être humain, et qui correspondent notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions de résidus d'acides-amino.

Par polypeptide homologue, on entendra désigner les polypeptides présentant, par rapport aux désoxyribosyltransférases naturelles de *Lactobacillus* selon l'invention, certaines modifications comme en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncature, un allongement et/ou une fusion chimérique. Parmi les polypeptides homologues, on préfère ceux dont la séquence d'acides

aminés présente au moins 80% d'identité, de préférence d'au moins 85%, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% d'identité avec les séquences d'acides aminés des polypeptides selon l'invention. Dans le cas d'une
5 substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, peuvent être remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression acide aminé « équivalent » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de
10 la structure de base sans cependant modifier les caractéristiques ou propriétés fonctionnelles essentielles, comme leurs activités biologiques (c'est-à-dire de désoxyribosyltransférase), des polypeptides correspondants telles que l'induction *in vivo*
15 d'anticorps capables de reconnaître le polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14, ou l'un de ses fragments. Ces acides aminés équivalents
20 peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur les résultats des essais d'activité biologique croisée auxquels les différents polypeptides sont susceptibles de donner lieu. A titre
25 d'exemple, on mentionnera les possibilités de substitutions susceptibles d'être effectuées sans qu'il en résulte une modification approfondie des activités biologiques des polypeptides modifiés correspondants, les remplacements, par exemple, de la leucine par la
30 valine ou l'isoleucine, de l'acide aspartique par l'acide glutamique, de la glutamine par l'asparagine, de l'arginine par la lysine etc., les substitutions

inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Par fragment de polypeptide, on entend désigner un polypeptide comportant au minimum 15 acides aminés consécutifs, de préférence 17, 20, 23, 25, 30, 40, 50, 100, 250 amino-acides consécutifs. Les fragments de polypeptide selon l'invention obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, par un réactif chimique, ou encore en plaçant ledit polypeptide dans un environnement très acide font également partie de l'invention.

Par fragment biologiquement actif, on entendra désigner en particulier un fragment de séquence d'acides aminés de polypeptide selon l'invention présentant au moins une des caractéristiques ou propriétés fonctionnelles du polypeptide selon l'invention, notamment en ce qu'il comporte une activité N-désoxyribosyltransférase. Le polypeptide variant, le polypeptide homologue ou le fragment de polypeptide selon l'invention possède au moins 10%, de préférence 20% , 30 , 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% de l'activité N-désoxyribosyltransférase.

Différents protocoles connus de l'homme de l'art ont été décrits pour introduire des mutations dans les polypeptides. Parmi ceux-ci il convient de citer à titre d'exemple la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en présence de manganèse (Cadwell et al., 1992). Les mutations peuvent être introduites soit de manière aléatoire - dans ce cas l'étape de mutagenèse est suivie d'une étape de criblage du mutant d'intérêt - soit de manière ciblée. Dans ce dernier cas, les mutations sont

de préférence introduites au niveau du site catalytique des N-désoxyribosyltransférases selon l'invention.

De préférence un polypeptide selon l'invention est un polypeptide constitué de la séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 ou d'une séquence possédant au moins 80% d'identité, de préférence au moins 85%, 90%, 95%, 98% et 99% d'identité avec la SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 après alignement optimal. Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80%, de préférence d'au moins 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de référence, comme en particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente un pourcentage d'identité d'au moins 80%, de préférence d'au moins 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 ou avec l'un de leurs fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés par les séquences peptidiques variantes telles que précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport aux séquences SEQ ID

N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 ou avec l'un de leurs fragments ; de manière plus préférée, les polypeptides variants présentant au moins une mutation qui diminue la
5 spécificité du polypeptide selon l'invention pour son substrat, de sorte que les polypeptides variants selon l'invention sont capables de catalyser une plus large variété de substrat, afin d'obtenir une gamme plus étendue d'analogues de base.

10 L'invention concerne également un polynucléotide purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide tel que défini précédemment, et de préférence pour un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID
15 N°12, SEQ ID N°14. De manière préférée, le polynucléotide selon l'invention possède la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

Le polynucléotide isolé ou purifié selon
20 l'invention se caractérise en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi (a) SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 ; (b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs, de préférence d'au moins 18,
25 21, 24, 27, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13; (c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70 %, de préférence
30 d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b); (d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN

correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).

Le polynucléotide selon l'invention se caractérise également en ce que son expression dans les cellules hôtes, notamment les souches bactériennes telles PAK6, permet de satisfaire à l'exigence en guanine de la dite souche. La souche PAK6 a été déposée à la CNCM le 2 mai 2001 sous le N° I-2664. La souche PAK6 correspond à la souche bactérienne d'*Escherichia coli* MG 1655 délétée de deux gènes *guaA* et *guaB* ainsi que des gènes *déoC*, *déoA*, *déoB*, *déoD*. La souche PAK6 est auxotrophe pour la guanine en milieu minimal glucose.

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADN, et/ou un fragment d'ARN.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également

désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

Par polynucléotide de séquence complémentaire, on entend désigner tout ADN dont les nucléotides sont
5 complémentaires de ceux de la SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 ou d'une partie de la SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11, SEQ ID N°13 et dont l'orientation est inversée.

10 Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le
15 meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement significatif", l'alignement pour lequel le pourcentage
20 d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière significative,
25 ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement significatif des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au
30 moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la

méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, 5 Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement significatif, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

10 Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière significative, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des
15 additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement significatif entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est
20 identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

25 Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70%, de préférence d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement significatif avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par
30 rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou

une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 70%, de préférence au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% d'identité après alignement significatif avec la séquence nucléique de référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 70%, de préférence d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% d'identité après alignement significatif entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre. Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes : l'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1% d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (c'est-à-dire : 42°C, pour une sonde de taille >

100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour
5 une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon
10 l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70 %, de préférence d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement significatif avec la séquence selon
15 l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, ou de leurs fragments, c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléiques correspondant à des variants
20 alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

Plus particulièrement, l'invention concerne un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente
25 invention, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 de leurs séquences complémentaires ou des séquences de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1, SEQ ID N°3, SEQ ID
30 N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13. Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon

l'invention, font également partie de l'invention. Ainsi, les amorces ou les sondes selon l'invention sont utiles pour la détection, l'identification, le dosage ou l'amplification de séquence d'acide nucléique. En particulier, ils peuvent permettre de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique de nouveaux gènes eucaryotes ou procaryotes, bactériens notamment, et plus précisément de bactéries *Lactobacillus*, codant pour une N-désoxyribosyltransférase, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée. Selon l'invention, les polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 10 bases, de préférence d'au moins 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50 bases. Selon un mode de réalisation, les amorces selon l'invention sont choisies parmi les séquences SEQ ID N° 15 et SEQ ID N° 16.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en œuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (Rolfs et al., 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4 683 202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la

chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La
spécificité de l'amplification peut être contrôlée en
utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de
polynucléotides de l'invention et comme matrices, des
5 plasmides contenant ces séquences ou encore les produits
d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques
amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des
réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la
présence, dans un échantillon biologique, d'un acide
10 nucléique cible de séquence complémentaire à celle
desdits fragments nucléotidiques amplifiés. L'invention
vise également les acides nucléiques susceptibles d'être
obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon
l'invention.

15 D'autres techniques d'amplification de l'acide
nucléique cible peuvent être avantageusement employées
comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple
d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention.
Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes
20 mettant en œuvre des reproductions directes ou
indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien
dans lesquelles les systèmes de marquage ont été
amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En
général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une
25 polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN
il convient préalablement d'effectuer une transcription
reverse. Il existe actuellement de très nombreux
procédés permettant cette amplification, comme par
exemple la technique SDA (Strand Displacement
30 Amplification) ou technique d'amplification à
déplacement de brin (Walker et al., 1992), la technique
TAS (Transcription-based Amplification System) décrite

par Kwoh *et al.* (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli *et al.* (1990), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis *et al.* (1991), la
5 technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren *et al.* (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck *et al.*
10 (1990), la technique d'amplification à la Q- β -réplicase décrite par Miele *et al.* (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantageusement, préalablement à
15 la mise en œuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en œuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon
20 biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en œuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses (Matthews *et al.*, 1988).
25 La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) pour réaliser par exemple des puces à ADN, puis à incubé,
30 dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides

formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en œuvre des sondes
5 nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon
10 biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement détectable.

Parmi les fragments d'acides nucléiques
15 intéressants, il convient par ailleurs de citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les
20 oligonucléotides sens qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression. Les oligonucléotides selon l'invention présente une taille
25 minimale de 9 bases, de préférence d'au moins 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 40, 50 bases.

Les sondes, amorces et oligonucléotides selon l'invention peuvent être marqués directement ou indirectement par un composé radioactif ou non
30 radioactif, par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable. Les séquences de polynucléotides selon

l'invention non marquées peuvent être utilisées directement comme sonde ou amorce.

Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^3H ou le ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

L'invention comprend également une méthode de détection et/ou de dosage d'un polynucléotide selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) d'isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ; (ii) d'amplification spécifique de l'ADN codant pour le polypeptide selon l'invention à l'aide d'amorces ; (iii) d'analyse des produits d'amplification. C'est également un objet de l'invention de fournir une trousse pour la détection et/ou le dosage d'un acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) un couple d'amorces nucléiques selon l'invention, (ii) les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN, et éventuellement (iii) un

composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde selon l'invention.

L'invention comprend aussi une méthode de détection
5 et/ou de dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) de mise en contact d'un polynucléotide selon l'invention avec un échantillon biologique ; (ii) de détection et/ou de
10 dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique. C'est également un objet de l'invention de fournir une trousse pour la détection et/ou le dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique,
15 caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) une sonde selon l'invention, (ii) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation, et/ou le cas échéant, (iii) un couple d'amorces selon l'invention, ainsi que les réactifs
20 nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

De préférence, l'échantillon biologique selon l'invention dans lequel sont réalisés la détection et le dosage est constitué par un milieu de culture, un broyat cellulaire, un fluide corporel, par exemple un sérum
25 humain ou animal, du sang, du lait.

La présente invention concerne également les vecteurs recombinants de clonage et/ou d'expression comprenant un polynucléotide selon l'invention et/ou exprimant un polypeptide selon l'invention. Une telle
30 cellule hôte est également un objet de l'invention.

De préférence, les vecteur recombinants selon l'invention sont :

- le vecteur appelé pLH2 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°1 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2676 ; le plasmide pLH2 contient un fragment Alu I de 1,4 kb
5 contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type II de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 cloné dans le site SmaI du plasmide pBAM3 ; le plasmide pLH2, qui exprime cette enzyme, est propagé dans la souche PAK6 auxotrophe pour la
10 guanine ;
- le vecteur appelé pLH4 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°3 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2677 ; le plasmide pLH4 contient un fragment AluI de 1,6 kb
15 contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type I de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, cloné dans le site SmaI du plasmide pBAM3. Le plasmide pLH4, qui exprime cette enzyme, est propagé dans la souche PAK6 auxotrophe
20 pour la guanine ;
- le vecteur appelé pLF6 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°5 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2678 ; le plasmide pLF6 contient un fragment AluI de 1,36 kb
25 contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type II de *Lactobacillus fermentum* CIP102780T. Le plasmide pLF6, qui exprime cette enzyme est propagé dans la souche PAK6 auxotrophe pour la guanine ;
- 30 - le vecteur appelé pLA comprenant le polynucléotide SEQ ID N°11 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 21 juin 2001 sous le

N° I-2689 ; le plasmide pLA correspond au plasmide pSU19 est cloné aux sites PstI et BamHI un insert contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type II de *Lactobacillus acidophilus* CNRZ 1296. Le plasmide est propagé dans la souche d'*Escherichia coli* TG-I.

Les vecteurs selon l'invention comportent les éléments nécessaires à l'expression, et notamment, de préférence un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Les différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type « plasmide », « cosmide », « phagemide » ou « mini-chromosome », ou des systèmes de type viral, les vecteurs viraux pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes. Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par

exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, "bacterial artificial chromosome"), les chromosomes artificiels de levure (YAC, "yeast artificial chromosome") pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, "mouse artificial chromosome") pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, "human artificial chromosome") pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention. Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les bactéries et les levures. Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, la bactérie est choisie parmi le groupe composé de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticum*, *Lactobacillus lactis*,

Escherichia coli, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter pylori*, *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Thermophilus aquaticus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum*,
5 *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la bactérie est *Lactobacillus*. Selon un mode préféré, il s'agit de :

- la bactérie transformée par le plasmide pLH2
10 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°1 telle que déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2676 ;
- la bactérie transformée par le plasmide pLH4 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°3 telle que déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2677 ;
- 15 - la bactérie transformée par le plasmide pLF6 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°5 telle que déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2678 ;
- la bactérie transformée par le plasmide pLA comprenant le polynucléotide SEQ ID N°11 telle que
20 déposée à la CNCM le 21 juin sous le N°I-2689.

Selon un autre mode préféré de réalisation la bactérie est *Escherichia coli*. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la cellule est une levure qui est de préférence *Saccharomyces cerevisiae*,
25 *Saccharomyces pombe*, *Candida albicans*.

Parmi les cellules hôte selon l'invention, il convient également de citer les cellules d'insectes, les cellules animales ou végétales.

De préférence, la cellule selon l'invention est
30 dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit désoxyribonucléoside précurseur ou ledit désoxyribonucléoside obtenu par réaction bioenzymatique

catalysée par un polypeptide selon l'invention. Alternativement, ladite cellule hôte peut être pourvue d'activités bio-enzymatiques additionnelles destinées à transformer le désoxyribonucléoside précurseur, et/ou le
5 désoxyribonucléoside obtenu par la réaction bioenzymatique catalysée par le polypeptide selon l'invention. Parmi ces activités bio-enzymatiques additionnelles, il convient de citer la phosphorylation, la sulfatation, l'acétylation, la succinylation, la
10 méthylation.

La séquence d'acide nucléique codant pour les N-désoxyribosyltransférases selon l'invention est soit naturellement présente dans ladite cellule soit est introduite dans ladite cellule par les techniques de
15 l'ADN recombinant connues de l'homme du métier. Selon un mode préféré de réalisation, la séquence d'acide nucléique introduite dans ladite cellule par les techniques de l'ADN recombinant et qui code pour une N-désoxyribosyltransférase selon l'invention est
20 hétérologue. On entend désigner par séquence d'acide nucléique hétérologue, une séquence d'acide nucléique qui n'est pas présente naturellement dans la cellule selon l'invention.

La présente invention concerne également les
25 organismes métazoaires, végétaux ou animaux, de préférence les mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. Parmi les animaux selon l'invention, on préfère les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les
30 lapins, exprimant au moins un polypeptide selon l'invention.

Les cellules de préférence bactériennes, ou fongiques notamment de levure, ainsi que les organismes métazoaires selon l'invention sont utilisables dans une méthode de production de N-désoxyribosyltransférase
5 selon l'invention. La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce que l'on cultive les cellules transformées, notamment les cellules de la présente
10 invention, dans des conditions permettant l'expression et éventuellement la sécrétion d'un polypeptide recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant. Les polypeptides recombinants
15 susceptibles d'être obtenus par cette méthode de production font également partie de l'invention. Ils peuvent se présenter sous forme glycosylée ou non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire de la protéine naturelle. Les séquences des
20 polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la
25 substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides
30 recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous

le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une
5 cellule hôte selon l'invention. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication
10 et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à
15 partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, tels que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps
20 monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc. Une variante préférée consiste à produire un polypeptide recombinant fusionné à une protéine « porteuse » (protéine chimère). L'avantage de ce système est qu'il permet une stabilisation et une diminution de la
25 protéolyse du produit recombinant, une augmentation de la solubilité au cours de la renaturation *in vitro* et/ou une simplification de la purification lorsque le partenaire de fusion possède une affinité pour un ligand spécifique.

30 Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques

connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Les polypeptides
5 obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

Les polypeptides selon l'invention permettent de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. C'est
10 donc également un des objets de la présente invention de fournir un anticorps monoclonal ou polyclonal et ses fragments, caractérisés en ce qu'ils lient sélectivement et/ou spécifiquement un polypeptide selon l'invention. Les anticorps chimériques, les anticorps humanisés et
15 les anticorps simple chaîne font également partie de l'invention. Les fragments d'anticorps selon l'invention sont de préférence des fragments Fab, F(ab')₂, Fc ou Fv. Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple par immunisation d'un animal, en particulier une
20 souris, avec un polypeptide selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse immunitaire, puis purification des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixé le polypeptide ayant
25 servi d'antigène. Les anticorps polyclonaux selon l'invention peuvent aussi être préparés par purification sur une colonne d'affinité, sur laquelle a préalablement été immobilisé un polypeptide selon l'invention. Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être
30 préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 1975.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'anticorps est capable d'inhiber l'interaction entre la N-désoxyribosyltransférase de l'invention et son substrat afin d'altérer la fonction
5 physiologique dudit polypeptide N-désoxyribosyltransférase.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en
10 œuvre un anticorps selon l'invention. L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la
15 purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

Pour ces différentes utilisations, les anticorps de
20 l'invention pourront également être marqués de la même manière que décrit précédemment pour les sondes nucléiques de l'invention et de manière préférée avec un marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

Les anticorps de l'invention constituent également
25 un moyen d'analyse de l'expression de polypeptide selon l'invention, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immunoconjugués enzymatiques. Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en œuvre dans toute situation où
30 l'expression d'un polypeptide selon l'invention, normal ou muté, doit être observée, et plus particulièrement en immunocytochimie, en immunohistochimie ou dans des

expériences de « western blotting ». Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps
5 selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé est également un objet de l'invention.

C'est également un des objets de la présente invention de fournir un procédé de synthèse enzymatique
10 *in vitro* ou *in vivo* de désoxyribonucléotides caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape réactionnelle catalysée par au moins une N-désoxyribosyltransférase selon l'invention. Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que la dite N-désoxyribosyl
15 transférase catalyse l'échange d'une première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside par une seconde nucléobase.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la dite seconde nucléobase est sélectionnée
20 dans le groupe composé des purines liées par N9, des pyrimidines liées par N1, des azines liées par N1, des imidazoles liées par N1, lesdites secondes nucléobases pouvant porter des substitutions des hydrogènes aux positions non liées. De préférence, ladite seconde
25 nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé de la 6-méthyl purine, 2-amino-6-méthylmercaptapurine, 6-diméthylaminopurine, 5-azacytidine, 2,6-dichloropurine, 6-chloroguanine, 6-chloropurine, 6-aza-thymine, 5-fluoro-uracile, éthyl-4-amino-5-imidazole carboxylate,
30 imidazole-4-carboxamide et 1,2,4-triazole-3-carboxamide. La dite première nucléobase est quant à elle, sélectionnée de préférence dans le groupe composé de

l'adénine, la guanine, la thymine, l'uracile et l'hypoxanthine. Ces listes ne sont pas exhaustives, et il est évident que des analogues naturels ou non-naturels de nucléobases peuvent être employés dans la
5 présente invention comme substrat d'une N-désoxyribosyl transférase de l'invention.

Facultativement, le procédé *in vivo* selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première
10 nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

Facultativement, le procédé *in vivo* selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la seconde nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

15 Facultativement, le procédé *in vivo* selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside et la seconde nucléobase de manière simultanée et/ou décalée
20 dans le temps.

Les désoxyribonucléosides susceptibles d'être produit en grande quantité et de manière peu onéreuse par la méthode de biosynthèse selon l'invention constituent donc des composés d'intérêt destinés au
25 traitement préventif ou curatif de pathologies humaines ou animales, tumorales, virales telles que le SIDA (syndrome d'immunodéficience humaine acquise), bactériennes, parasitaires ou fongiques. Alternativement, ces désoxyribonucléosides susceptibles
30 d'être produit en grande quantité et de manière peu onéreuse par la méthode de biosynthèse selon l'invention constituent des herbicides et des insecticides.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après.

EXEMPLES

1. MATERIEL ET METHODES

5 1.1. Souches et conditions de culture :

Les souches de bactéries lactiques utilisées proviennent de la collection CNRZ (Centre National de Recherche Zootechnique), Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, INRA, Jouy en Josas. Elles sont
10 cultivées en bouillon MRS (de Man et coll., J. Appl. Bacteriol., 23 :130-135, 1960) et incubées à 30°C, 37°C ou 42°C selon les espèces. La souche d'Escherichia coli TG1, fournie par Stratagène, est cultivée dans du LB (Luria broth base 10g/L, Agar-agar 16g/L) sous agitation
15 et à 37°C.

1.2. Préparation de l'ADN cellulaire total des bactéries lactiques :

Les cultures en fin de phase exponentielle sont
20 centrifugées pendant 5 minutes à 13000 g. Le culot correspondant à une culture de 2 ml est repris dans 200 µl de TES (Tris 50 mM, pH8, EDTA 10 mM, pH8, saccharose 250 mM) contenant 20 µg/ml de lysozyme et 50 U/ml de mutanolysine (Sigma). Après une incubation d'une
25 heure à 37°C, la clarification de la préparation est obtenue en ajoutant 60 µl de SDS 20%.

L'extraction des acides nucléiques est effectuée en ajoutant au lysat 500 µl de phénol saturé en eau, pH8, additionné d'hydroxyquinoline 0.1% et 100 µl d'un
30 mélange de chloroforme-alcool isoamylique (24/1, V/V). La solution est homogénéisée puis centrifugée 10 minutes à 13000 g et à température ambiante. La phase

supérieure, limpide et contenant les acides nucléiques est gardée. Sur cette dernière, l'extraction est répétée trois fois afin d'éliminer les constituants cellulaires indésirables. Les traces de phénol sont éliminées en ajoutant 500 µl de chloroforme-alcool isoamylique à la phase aqueuse. Après homogénéisation et centrifugation pendant 3 minutes à 15000 g et à 4°C, les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse supérieure sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol froid. Après une incubation d'une heure à -20°C, une centrifugation est effectuée pendant 20 minutes à 15000 g et à 4°C. L'isopropanol est éliminé et remplacé par 500 µl d'éthanol 70%. Une dernière centrifugation de 10 minutes à 15000 g et à 4°C permet de récupérer un culot d'acides nucléiques. Celui-ci est mis à sécher dans un évaporateur et remis en suspension dans 200 µl d'eau stérile contenant 10 µl d'ARNase à 10 µg/µl. Après 15 minutes d'incubation à 37°C pour faire agir l'enzyme dégradant les ARN, 10 µl de la solution d'ADN sont mis à migrer par électrophorèse dans un gel d'agarose 0.8% afin d'en évaluer la concentration et la qualité.

1.3. Réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) :

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont effectuées dans un volume réactionnel de 100 µl contenant 20 à 100 ng d'ADN, 0,5 µM d'amorces, 200 µM des dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dans un tampon Tris-HCl pH 9 à 10 mM, KCl à 50 mM, MgCl₂ à 1,5 mM, BSA à 0,002% ainsi que 2,5 unités de la polymérase Taq. Trente cycles d'amplification ont été appliqués (Gene Amp PCR

systems 2400, Perkin Elmer). Les inventeurs ont défini deux amorces ntd 1 (SEQ ID N° 15) et ntd2 (SEQ ID N° 16) à partir de la séquence ntd de *Lactobacillus leichmanii* décrite par Huck (communication personnelle) :

5

ntd 1	5'-AGA CGA TCT ACT TCG GTG-3'	18 bases	Tm= 54°C
ntd 2	5'-ACG GCA CCT TCG TAG AAG-3'	18 bases	Tm= 56°C

1.4. Hybridation de type Southern :

Restriction enzymatique des ADN. Les ADN totaux sont digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les enzymes utilisées sont : BamHI, BglII, ClaI, EcoRI, HindIII, HpaI, NcoI, NotI, PstI, XbaI, XhoI (Bio-Lab). La digestion est réalisée dans un volume final de 40 µl contenant 70 U d'enzyme, 4 µl de tampon NEB (Bio-Lab) 10X et 4 à 8 µg d'ADN. L'incubation s'effectue pendant 1h30 à 37°C.

Transfert de l'ADN sur une membrane. Les fragments d'ADN totaux issus de la digestion enzymatique sont séparés à l'aide d'un gel d'agarose à 0,7%. Après migration, le gel d'agarose est placé sous agitation dans une solution de dépurination (HCl 0.25N) pendant 30 minutes. Ce procédé permet ainsi le transfert des fragments d'ADN supérieur à 10 kbs. Après rinçage à l'eau, l'ADN est dénaturé en plaçant le gel pendant 40 minutes dans une solution de NaCl 5M, NaOH 0,5M. Le gel est rincé à l'eau puis incubé de nouveau 30 minutes dans une solution de neutralisation, NaCl 1,5M, Tris HCl 0,5M; pH 7,5. Les ADN sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N+, Amersham). Ils sont élués par un flux ascendant de

SSC 20X (citrate trisodique 0,3M ; NaCl 3M ; pH7). Après le transfert, les ADN sont fixés de manière covalente sur la membrane à l'aide d'un appareil UV Stratalinker 2400 (Stratagene).

5

Préparation de la sonde. La sonde utilisée est un fragment interne du gène ntd de *Lactobacillus helveticus* amplifié par PCR. La sonde est purifiée à l'aide du kit Wizard (Promega) afin d'éliminer les amorces PCR. La concentration de sonde nécessaire est de 10 ng/ μ l. Le marquage de l'ADN est réalisé en utilisant le kit de marquage ECL (Amersham). Pour ce faire, l'ADN est dénaturé par chauffage 5 minutes à 100°C et immédiatement refroidi dans la glace. Un volume de réactif de marquage (peroxydase) puis un volume de solution de glutaraldéhyde sont additionnés. Cette solution est incubée pendant 10 minutes à 37°C pour fixer de manière covalente la peroxydase à l'ADN.

Hybridation et révélation. Après une préhybridation d'une heure à 42°C dans du tampon d'hybridation, la membrane est hybridée pendant 16h à 42°C en présence de la sonde marquée. Afin d'éliminer la sonde fixée de manière non spécifique, la membrane est lavée pendant 20 minutes à 42°C dans deux bains successifs de tampon: urée 6M - SDS 0,4% - SSC 0,5X, puis rincée pendant 5 minutes dans deux bains successifs de tampon: citrate de sodium 0,3M - NaCl 3M pH 7. La révélation est effectuée par autoradiographie selon le protocole du kit ECL. Un premier réactif de révélation contenant du peroxyde d'hydrogène est réduit par la peroxydase fixée sur la sonde. Puis le luminol contenu dans un deuxième réactif

de révélation est alors oxydé, produisant de la lumière qui impressionne le film autoradiographique.

1.5. Clonage de fragments PCR :

5 Les gènes homologues à ntd amplifiés par PCR sont insérés dans le plasmide vecteur pBluescript II SK+ d'*E. coli* TG1 (Stratagene). Ce plasmide est auparavant restreint en son site unique par l'enzyme EcoRV (Gibco-BRL) qui crée des extrémités franches. Le mélange de
10 digestion est effectué dans un volume de 30 µl, contenant 4 µl d'ADN. Les fragments des ADN amplifiés à cloner doivent avoir leurs extrémités 5' et 3' franches afin de permettre le clonage. La préparation des extrémités franches de 50 µl de produits PCR purifiés à
15 l'aide du kit Wizard (Promega) est réalisée dans un volume réactionnel de 100 µl contenant 3,6 unités d'ADN polymérase du phage T4 (Bio-Lab) et 6 unités d'ADN polymérase I (ou fragment de Klenow) (Bio-Lab), n'ayant pas d'activité exonucléasique 5' > 3'. La polymérisation
20 se fait pendant 20 minutes à 11°C puis les enzymes sont inactivées après 10 minutes à 75°C. L'ADN est ensuite précipité en présence de deux volumes d'éthanol 100%, de glycogène et de 10 % d'acétate de sodium 3M, pH 4,8. Le mélange est placé pendant une heure à -20°C puis
25 centrifugé 20 minutes à 15000 g. Le culot est rincé avec 250 µl d'éthanol à 70 %, centrifugé à nouveau 10 minutes à 15000 g, séché dans un évaporateur et remis en suspension dans 20 µl d'eau stérile.

30 L'ADN restreint du plasmide pBS-SK+ et le fragment amplifié sont mis à co-migrer sur un gel d'agarose à

0,7 % afin d'évaluer leurs concentrations respectives : le nombre de molécules du fragment à cloner doit être trois à quatre fois supérieur à celui du plasmide. La ligation se fait dans un volume de 10 µl contenant 60 ng d'insert, 26 ng de plasmide pBS-SK+ restreint, 2 unités de ligase (T4 DNA ligase, Boehringer-Mannheim), pendant la nuit à 16°C. Les produits de ligation sont dialysés sur un filtre Milipore 0,025 µm de manière à enlever les sels et à éviter ainsi les arcs électriques lors de l'électroporation.

1.6. Transformation :

Préparation des cellules électro-compétentes de la souche TG1 d'E. coli. A partir de 5 ml d'une culture de nuit à 37°C sous agitation, 500 ml de milieu LB sont inoculés. La culture est placée sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une $D.O_{600nm} = 1$. Elle est ensuite refroidie pendant 2 heures dans la glace puis centrifugée pendant 10 minutes à froid à 5000 rpm. Le surnageant est éliminé, le culot est repris dans 400 ml d'eau froide. Cette préparation est centrifugée pendant 10 minutes à froid et à 5000 trs/mn. Le culot obtenu est de nouveau repris dans 250 ml d'eau froide. A la suite d'une centrifugation de 10 minutes, le culot est repris dans 25 ml d'eau froide puis les cellules sont remises en suspension dans un volume final de 1ml de glycérol 10%, et réparties en aliquot avant d'être congelées rapidement dans l'azote liquide.

Transformation par électroporation et sélection des clones. Les cellules électro-compétentes conservées à -80°C sont décongelées dans la glace puis mises en

contact avec 5 μ l de mélange de ligature dans une cuvette d'électroporation. Le Gene-Pulser (Bio-Rad) est réglé à 200 Volts, 25 mF, 250 Ohms. Les cellules sont ensuite soumises à l'électroporation. On ajoute 1ml
5 d'une solution de SOC (bactopeptone 20g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5M 2ml/L, KCl 1M 2.5 ml/L, MgCl₂, 1M 10ml/L, MgSO₄ 1M 10ml/L), contenant 0.4% de glucose à la suspension cellulaire qui est mise à incuber à 37°C pendant une heure. Les cellules sont ensuite étalées sur
10 un milieu sélectif LB -Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galatoside à 1 μ g/mL) -IPTG (isopropythio- β -D-galactoside, 1 μ g/ml) -Ampicilline (50 μ g/ml), et incubées à 37°C pendant la nuit.

15 ***Extraction rapide d'ADN plasmidique des clones de E. coli recombinants par lyse alcaline.*** Les cellules de E. coli transformées et cultivées en milieu LB contenant de l'ampicilline (100 μ g/ml) sont récoltées par centrifugation à 15000 g pendant 10 minutes à 4°C. Elles
20 sont resuspendues dans 100 μ l d'une solution Saccharose 50 mM, Tris-HCl 25mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8. La lyse alcaline et la dénaturation de l'ADN se fait par ajout de 200 μ l de NaOH 0.2N, SDS 1%. L'ensemble est laissé 1 minute à température ambiante après avoir ajouté 200 μ l
25 de chloroforme. Puis, 150 μ l d'une solution d'acétate de potassium 5M, acide acétique glacial sont additionnés. L'ensemble est centrifugé pendant 15 min à 13000 g à 4°C. La phase aqueuse contenant l'ADN est précipitée en présence de 2 volumes d'éthanol 100% puis centrifugée
30 pendant 20 minutes à 13000 g à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70%, centrifugé 10 minutes à 13000 g puis

remis en suspension dans 30 µl d'eau stérile contenant de l'ARNase à 10 ng/ml.

1.7. PCR inverse :

5 La PCR inverse permet d'amplifier les régions flanquant un fragment d'ADN de séquence connue. Cette technique se déroule en trois étapes :

Digestion de la matrice d'ADN. La matrice d'ADN est
10 digérée par une ou deux enzymes de restriction choisies de telle sorte qu'elles ne coupent pas dans la séquence connue du gène et qu'elles permettent d'obtenir un fragment de taille adaptée (1 à 3 kb). Afin de choisir une enzyme adaptée, l'ADN total est digéré séparément
15 par plusieurs enzymes. Puis des hybridations de type Southern sont réalisées en utilisant comme sonde le fragment d'ADN de séquence connue. Les digestions pour lesquelles la sonde hybride avec un fragment de taille de 1 à 3 kb, sont utilisées pour la PCR inverse. Les
20 fragments d'ADN obtenus par digestion sont circularisés. Pour cela, 100 unités de T4 ADN ligase et 100 µl de tampon de ligation sont ajoutés à 4 à 8 µg d'ADN dans un volume final de 1ml. Le mélange de ligation est mis à incuber à 15°C pendant la nuit. L'ADN ligaturé est
25 ensuite précipité avec 100 µl d'acétate de sodium 3M, pH 4.8, 700 µl d'isopropanol et 2 µl de glycogène puis centrifugé pendant 30 minutes à 13000 g, à 4°C. Le culot est rincé dans 300 µl d'éthanol 70% et centrifugé 10 minutes à 13000 g, à 4°C. Le culot est repris dans 25 µl
30 d'eau ultrapure.

Amplification des ADN circularisés en utilisant des amorces divergentes. Les réactions de polymérisation en chaîne sont effectuées dans un volume réactionnel de 100 μ l contenant 20 à 100 ng d'ADN, 0,5 μ M d'amorces, 5 200 μ M des dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dans un tampon Tris-HCl pH 9 à 10 mM, KCl à 50 mM, MgCl₂ à 1,5 mM BSA à 0,002% ainsi que 2,5 unités de la polymérase Taq.

L'amplification est effectuée dans les conditions
10 suivantes :

	94°C	3 minutes	
	94°C	30 secondes	
	50 à 60°C (selon le T _m des		
	amorces utilisées)	1 minute	} 25 cycles
15	72°C	3 minutes	

(Gene Amp PCR systems 2400, Perkin Elmer).

Séquençage. Les fragments PCR sont purifiés par le kit Wizard (Promega) afin d'éliminer les
20 oligonucléotides non incorporés, les sels et la Taq polymérase. Le séquençage est réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique 373A (Applied Biosystems-Perkin Elmer) en utilisant un kit ABI PRISM Dye Terminator (Perkin Elmer), basé sur l'incorporation de
25 désoxynucléotides phosphate fluorescents lors de la phase d'élongation des amorces. Les réactions de séquences sont effectuées dans un volume réactionnel de 20 μ l contenant 30 ng d'ADN, 4 μ l de DyeT Mix (Perkin Elmer Biosystems) et 0.1mM d'amorce.

	Cycle :		
	96°C	1 minute	} 25 cycles
	96°C	10 secondes	
	50°C	5 secondes	
5	60°C	4 minutes	

A chaque réaction de séquence sont ajoutés 20 µl d'acétate de sodium 3M, pH 4.6, 50 µl d'éthanol à 95% et 1 µl de glycogène. La solution est laissée 15 minutes à température ambiante puis centrifugée 20 minutes à 13000 g. Le culot est ensuite rincé avec 250 µl d'éthanol 70% puis centrifugé pendant 10 minutes à 13000 g. Le culot est ensuite repris dans 6 µl de bleu de séquence (formamide 83%, EDTA 8.3mM, bleu dextran 2000000 (Sigma) 0.5%). Les échantillons sont dénaturés pendant 3 minutes à 90°C et 3 µl sont déposés sur gel d'acrylamide 4%.

2. UN CRIBLE NUTRITIONNEL UNIQUE POUR LES DEUX CLASSES DE N-DESOXYRIBOSYLTRANSFERASE CHEZ *ESCHERICHIA COLI*.

Un crible fonctionnel permettant de sélectionner la production de guanine a été établi chez *E. coli*, en délétant les deux gènes de l'opéron *guaBA* qui commande la conversion de IMP en XMP puis en GMP ainsi que ceux de l'opéron *deoCABD* qui commande la dégradation des désoxynucléosides, pour donner la souche PAK 6. Le génome d'*E. coli* spécifie une activité permettant de convertir la base G en GMP (guanine phosphoribosyltransférase codée par le gène *gpt*), ainsi qu'une activité permettant de libérer la base G du

désoxynucléoside dR-G (purine nucléoside phosphorylase codée par le gène *deoD*, dans l'opéron *deo*). La souche PAK 6 présente donc une exigence en guanine (G) qui ne pourra être satisfaite par l'apport de désoxyguanosine (dR-G). L'utilisation de désoxyguanosine (dR-G) pourra
 5 (dR-G). L'utilisation de désoxyguanosine (dR-G) pourra cependant être sélectionnée si une activité N-désoxyribosyltransférase s'exprime dans la souche PAK6, pour réaliser l'échange: $dR-G + A \leftrightarrow dR-A + G$

Cet échange entre deux bases purines peut être
 10 catalysé par les deux classes d'enzyme. De fait, l'introduction du gène *ntd* de *L. leichmannii* dans la souche PAK 6 permet de satisfaire l'exigence en guanine à l'aide de désoxyguanosine (dR-G) et d'adénine (A).

15 3. CLONAGE FONCTIONNEL DU GENE PTD DE L. HELVETICUS.

Des fragments d'ADN de taille comprise entre 1 et 2kb obtenus par digestion partielle (*AluI*) de *L. helveticus* CNRZ 32 furent ligaturés dans un plasmide *ColE1* (de type pUC digéré par *SmaI* et déphosphorylé) et le mélange fut utilisé pour transformer la souche PAK6. Les clones transformants furent sélectionnés en milieu minéral glucose additionné de désoxyguanosine (dR-G) et
 25 d'adénine (A) à la concentration finale de 0,3mM.

L'un des clones transformants se révéla propager un plasmide contenant un insert commandant une activité N-désoxyribosyltransférase de classe I et déviant du profil de restriction du gène *ntd* de *L. helveticus*. La
 30 séquence de cet insert révéla un gène spécifiant un polypeptide de 167 acides aminés avec un poids moléculaire de 18790.70 Daltons présentant une

similarité de 28,6% avec le polypeptide NTD de *L. leichmanii*. La séquence de ce gène désigné ptd dévie de celle des gènes ntd rendant leur hybridation impossible (7,5% d'identité).

5 Incidemment, le gène ntd de *L. helveticus* commandant une activité N-désoxyribosyltransférase de classe II put être une nouvelle fois isolé parmi les clones transformants sélectionnés.

10 4. CLONAGE FONCTIONNEL DU GENE NTD DE *L. FERMENTUM*.

Les mêmes opérations de clonage et de sélection nutritionnelle furent effectuées à partir de l'ADN
15 génomique de la souche *L. fermentum* CIP 102980T. Les clones transformants sélectionnés se révélèrent propager un plasmide dont les inserts présentant des profils de restriction semblables commandaient une activité N-désoxyribosyltransférase de classe II. La séquence d'un
20 de ces inserts révéla un gène spécifiant un polypeptide de 168 acides aminés avec un poids moléculaire de 18878.20 Daltons présentant une similarité de 32,9% avec le polypeptide NTD de *L. leichmanii* et de 36,7% avec le polypeptide PTD de *L. helveticus*. La séquence de ce
25 gène dévie de celle des gènes ntd et ptd rendant leur hybridation impossible. Le polypeptide NTD de *L. fermentum* présente une parenté évolutive plus marquée pour l'enzyme de classe I (PTD de *L. helveticus*) et une appartenance fonctionnelle à la classe II, suggérant une
30 divergence évolutive précoce dans l'évolution de ces enzymes. Son activité enzymatique pourrait se montrer

différente de celles des autres espèces, et se prêter à la préparation d'un plus grand spectre de nucléosides.

5. CLONAGE PAR PCR INVERSE DE QUATRE GENES NTD.

5

En utilisant des oligonucléotides dégénérés à partir de régions de la séquence en acides aminés du polypeptide NTD de *L. leichmannii* (Hück, 1997) un fragment interne au gène ntd de *L. helveticus* a été
10 amplifié. A partir de ce fragment, des oligonucléotides ont été synthétisés de façon à obtenir la totalité du gène par PCR inverse.

A partir des deux séquences ntd de *L. leichmannii* et de *L. helveticus*, nous avons redéfini des amorces
15 consensus pour isoler les gènes ntd d'autres espèces de lactobacilles comme *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus* avec la même démarche que celle décrite ci-dessus.

Tableau 1: Croissance de la souche PAK 6 exprimant ou non une activité N-désoxyribosyltransférase sur milieu mineral glucose (*in vivo*) et activité enzymatique des extraits bruts correspondants (*in vitro*)

5

<i>in vivo</i>						<i>in vitro</i>		
		A	G	dG	dG + A	dC + T	dG + A	dC + A
PAK 6		-	+	±	-	-	-	-
pSU19								
PAK 6	ntd	-	+	±	+	+	+	+
Ll								
PAK 6	ntd	-	+	±	+	+	+	+
Lh								
PAK 6	ptd	-	+	±	+	-	+	-
Lh								
PAK 6	ntd	-	+	±	+	+	+	+
Lf								

(+) croissance

(-) absence de croissance

PAK 6: MG1655 Δ*guaBA*::Apra, Δ*deo*

10 ntd Ll: gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus leichmannii*

ntd Lh: gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus helveticus*

15 ntd Lf: gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus fermentum*

ptd Lh: gène codant pour la purine désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus helveticus*

A: adénine; G: guanine; T: thymine; dG: désoxyguanosine;
dC: désoxycytidine

REFERENCES

- Cadwell et al. (1992) Research **2** : 28-33.
- Carson & Wasson (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. **155**,
5 829-834.
- Carson et al., (1990) Proc. Natl. Acad.Sci. USA **81**,
2232-2236.
- Carter (1993) Curr. Op. Biotechnology **3**, 533.
- Danzin & Cardinaud(1976) Eur. J. Biochem. **62**, 365-372.
- 10 Duck et al. (1990), Biotechniques, **9**, 142.
- Epstein (1992) Médecine/Sciences, 8, 902.
- Fischer et al.,(1990) Ger. Offen. DE 3840160.
- Guatelli et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:
1874.
- 15 Isono (1988) J. Antibiotics **12**, 1711-1739.
- Kievitis et al., (1991) J. Virol. Methods, **35**, 273.
- Köhler et Milstein. (1975) Nature **256**, 495.
- Krenitsky et al.,(1981) Biochemistry **20**, 3615-3621.
- Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 1173.
- 20 Landegren et al. (1988) Science **241**, 1077.
- Matthews et al. (1988) Anal. Biochem., **169**, 1-25.
- Miele et al., (1983) J. Mol. Biol., **171**, 281-285.
- Neddleman et Wunsch (1970) J. Mol. Biol. **48** : 443
- Pearson et Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** :
25 2444
- Périgaud et al.,(1992) Annales de l'Institut Pasteur
Actualités **3**, 179-215.
- Perricaudet et al. (1992), La Recherche **23** : 471.
- Rolfs, A. et al. (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- 30 Sambrook et al. (1989) Molecular cloning : a laboratory
manual second edition - Cold Spring Harbor Laboratory
Press. Cold Spring Harbor, NY. USA

Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.

Smith et Waterman (1981) Ad. App. Math. **2** : 482

Temin, (1986) Retrovirus vectors for gene transfer. In

5 Kucherlapati R., ed. Gene Transfer.

Walker et al. (1992) EMBO J. **1** : 945-951

Wilson et al. (1995) Synthesis 1465-1479.

Wong C.H. et al. (1995) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **34**,
412-432 et 521-546.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus*
5 ayant au moins une activité N-désoxyribosyltransférase
de séquence d'acides aminés choisi parmi les séquences
SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID
N°10, SEQ ID N°12.
- 10 2. Polypeptide isolé selon la revendication 1
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°2 est
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène
ntd Lh de *Lactobacillus helveticus*.
- 15 3. Polypeptide isolé selon la revendication 1
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°4 est
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène
ptd Lh de *Lactobacillus helveticus*.
- 20 4. Polypeptide isolé selon la revendication 1
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°6 est
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène
ntd Lf de *Lactobacillus fermentum*.
- 25 5. Polypeptide isolé selon la revendication 1
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°8 est
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène
ntd de *Lactobacillus crispatus*.
- 30 6. Polypeptide isolé selon la revendication 1
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°10 est

codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène ntd de *Lactobacillus amylovorus*.

7. Polypeptide isolé selon la revendication 1
5 caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°12 est codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène ntd de *Lactobacillus acidophilus*.

8. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il
10 comprend un polypeptide choisi parmi :

a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12.

b) un polypeptide variant de polypeptide de séquences d'acides aminés défini en a) ;

15 c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a) ou b) et comportant au moins 80 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;

d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a) ;

20 e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

9. Polypeptide selon les revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il permet de satisfaire l'exigence
25 en guanine de la souche PAK6 déposée à la CNCM le 2 mai 2001 sous le N° I-2664.

10. Polynucléotide purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide selon les
30 revendications 1 à 9.

11. Polynucléotide selon la revendication 10 de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

5 12. Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi :

a) SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

b) la séquence d'un fragment d'au moins 15
10 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 ;

c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70 %, après alignement
15 optimal avec une séquence définie en a) ou b);

d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).

20 13. Polynucléotide selon les revendications 10 à 12 caractérisé en ce que son expression dans les souches PAK6 permet de satisfaire à l'exigence en guanine de la dite souche.

25 14. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 12 en tant qu'amorce pour l'amplification ou la polymérisation de séquences nucléiques de N-désoxyribosyltransférases.

30 15. Utilisation d'un polynucléotide selon les revendications 10 à 13 en tant que sonde pour la

détection de séquences nucléiques de N-désoxyribosyltransférases.

16. Vecteur recombinant de clonage et/ou
5 d'expression comprenant un polynucléotide selon l'une
des revendications 10 à 13 ou exprimant un polypeptide
selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

17. Vecteur recombinant appelé pLH2 comprenant le
10 polynucléotide SEQ ID N°1 tel que présent dans la souche
bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le
N°I-2676.

18. Vecteur recombinant appelé pLH4 comprenant le
15 polynucléotide SEQ ID N°3 tel que présent dans la souche
bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le
N°I-2677.

19. Vecteur recombinant appelé pLF6 comprenant le
20 polynucléotide SEQ ID N°5 tel que présent dans la souche
bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le
N°I-2678.

20. Vecteur recombinant appelé pLA comprenant le
25 polynucléotide SEQ ID N°11 tel que présent dans la
souche bactérienne déposée à la CNCM le 21 juin 2001
sous le N°I-2689.

21. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est
30 transformée par un vecteur selon les revendications 16 à
20.

22. Bactérie transformée par le vecteur pLH2
comprenant le polynucléotide SEQ ID N°1 telle que
déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2676.

5 23. Bactérie transformée par le vecteur pLH4
comprenant le polynucléotide SEQ ID N°3 telle que
déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2677.

24. Bactérie transformée par le vecteur pLF6
10 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°5 telle que
déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2678.

25. Bactérie transformée par le vecteur pLA
comprenant le polynucléotide SEQ ID N°11 telle que
15 déposée à la CNCM le 21 juin 2001 sous le N°I-2689.

26. Organisme métazoaire animal ou végétal, excepté
l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule
selon la revendication 21.

20

27. Procédé de préparation d'un polypeptide
recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une
cellule hôte selon la revendication 21 ou une bactérie
selon les revendications 22 à 25 dans des conditions
25 permettant l'expression et éventuellement la sécrétion
dudit polypeptide recombinant et que l'on récupère ledit
polypeptide recombinant.

28. Polypeptide recombinant susceptible d'être
30 obtenu par un procédé selon la revendication 27.

29. Anticorps monoclonal ou polyclonal et ses fragments caractérisé en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 ou 28.

5 30. Procédé de synthèse enzymatique *in vitro* ou *in vivo* de désoxyribonucléotides caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape réactionnelle catalysée par une N-désoxyribosyltransférase selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

10

31. Procédé selon la revendication 30 caractérisé en ce que la dite N-désoxyribosyltransférase catalyse l'échange d'une première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside par une seconde nucléobase.

15

32. Procédé selon la revendication 31 caractérisé en ce que ladite seconde nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé des purines liées par N9, des pyrimidines liées par N1, des azines liées par N1, des
20 imidazoles liées par N1, lesdites secondes nucléobases pouvant porter des substitutions des hydrogènes aux positions non liées.

33. Procédé selon la revendication 32 caractérisé
25 en ce que la dite seconde nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé de la 6-méthyl purine, 2-amino-6-méthylmercaptapurine, 6-diméthylaminopurine, 5-azacytidine, 2,6-dichloropurine, 6-chloroguanine, 6-chloropurine, 6-aza-thymine, 5-fluoro-uracile, éthyl-4-
30 amino-5-imidazole carboxylate, imidazole-4-carboxamide et 1,2,4-triazole-3-carboxamide.

34. Procédé selon la revendication 31 caractérisé en ce que la dite première nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé de l'adénine, la guanine, la thymine, l'uracile et l'hypoxanthine.

5

35. Procédé *in vivo* selon les revendications 31 à 34 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

10

36. Procédé *in vivo* selon les revendications 31 à 34 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la seconde nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

15

37. Procédé *in vivo* selon les revendications 31 à 34 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside et la seconde
20 nucléobase de manière simultanée et/ou décalée dans le temps

LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut PASTEUR
Institut National de la Recherche Agronomique INRA

<120> N-desoxyribosyl transferases de Lactobacillus,
sequences nucleotidiques correspondantes et leurs
applications

<130> D19532

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 477

<212> ADN

<213> Lactobacillus helveticus NTD

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(477)

<400> 1

atg aac aag aaa aag act tta tat ttt ggt gcc ggt tgg ttt aat gaa	48
Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn Glu	
1 5 10 15	
aag caa aac aaa gct tac aaa gaa gca atg gca gct tta aaa gaa aat	96
Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala Ala Leu Lys Glu Asn	
20 25 30	
cca aca gtt gat tta gaa aat agt tat gtg ccc ctt gaa aac caa tac	144
Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln Tyr	
35 40 45	
aag ggt att cgc att gat gaa cat cca gaa tac ttg cac aac att gaa	192
Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asn Ile Glu	
50 55 60	
tgg gct tct gca acc tac cac aat gat tta gta gga att aag act tct	240
Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile Lys Thr Ser	
65 70 75 80	
gat gtc atg ctt ggc gta tat ttg cca gaa gaa gaa gac gtc ggc tta	288
Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu	
85 90 95	
ggc atg gaa ctg ggc tac gca tta tct caa gga aaa tat att tta ttg	336
Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu	
100 105 110	
gtt atc cca gat gaa gat tac ggc aag cca atc aac tta atg agc tgg	384
Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp	
115 120 125	
ggc gtt tgt gac aat gcc atc aag atc agt gaa tta aaa gac ttc gac	432
Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp	
130 135 140	

ttt aac aag cct cgc tac aat ttc tac gac gga gct gta tat taa 477
Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr
145 150 155

<210> 2
<211> 158
<212> PRT
<213> Lactobacillus helveticus NTD

<400> 2
Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn Glu
1 5 10 15
Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala Ala Leu Lys Glu Asn
20 25 30
Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln Tyr
35 40 45
Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asn Ile Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile Lys Thr Ser
65 70 75 80
Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu
85 90 95
Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu
100 105 110
Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp
115 120 125
Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp
130 135 140
Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr
145 150 155

<210> 3
<211> 504
<212> ADN
<213> Lactobacillus helveticus PTD

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(504)

<400> 3
atg aaa gca gta gtt cca aca gga aaa att tat tta ggc tca cca ttt 48
Met Lys Ala Val Val Pro Thr Gly Lys Ile Tyr Leu Gly Ser Pro Phe
1 5 10 15
tac agc gat gct caa aga gaa aga gca gct aag gca aaa gag ttg tta 96
Tyr Ser Asp Ala Gln Arg Glu Arg Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Leu
20 25 30

```

<400> 4
Met Lys Ala Val Val Pro Thr Gly Lys Ile Tyr Leu Gly Ser Pro Phe
  1                      5                      10                      15

Tyr Ser Asp Ala Gln Arg Glu Arg Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Leu
                20                      25                      30

Ala Lys Asn Leu Ser Ile Ala His Val Phe Phe Pro Phe Asp Asp Gly
  35                      40                      45

Phe Thr Asp Pro Asp Glu Lys Asn Pro Glu Ile Gly Gly Ile Arg Ser
  50                      55                      60

Met Val Trp Arg Asp Ala Thr Tyr Gln Asn Asp Leu Thr Gly Ile Ser
  65                      70                      75                      80

Asn Ala Thr Cys Gly Val Phe Leu Tyr Asp Met Asp Gln Leu Asp Asp
                85                      90                      95

```

Gly Ser Ala Phe Glu Ile Gly Phe Met Arg Ala Met His Lys Pro Val
 100 105 110
 Ile Leu Val Pro Phe Thr Glu His Pro Glu Lys Glu Lys Lys Met Asn
 115 120 125
 Leu Met Ile Ala Gln Gly Val Thr Thr Ile Ile Asp Gly Asn Thr Glu
 130 135 140
 Phe Glu Lys Leu Ala Asp Tyr Asn Phe Asn Glu Cys Pro Phe Asn Pro
 145 150 155 160
 Val Arg Gly Tyr Gly Ile Tyr
 165

<210> 5
 <211> 516
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus fermentum NTD

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(504)

<400> 5
 ttg aaa aat acc gac cca gtt gct aac act aaa att tac ctg gct acc 48
 Leu Lys Asn Thr Asp Pro Val Ala Asn Thr Lys Ile Tyr Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 agc ttc ttc aac gaa gaa caa cgt gcc cgc atc cct caa gct cta gcc 96
 Ser Phe Phe Asn Glu Glu Gln Arg Ala Arg Ile Pro Gln Ala Leu Ala
 20 25 30
 caa cta gaa gcc aac ccg act gtc ggc gtt gtt cac cag cca ttc gat 144
 Gln Leu Glu Ala Asn Pro Thr Val Gly Val Val His Gln Pro Phe Asp
 35 40 45
 ttc caa tat aaa gat gca cgc gta gac tcc gat cct gcc ggc gtc ttt 192
 Phe Gln Tyr Lys Asp Ala Arg Val Asp Ser Asp Pro Ala Gly Val Phe
 50 55 60
 ggc agc ctc gaa tgg caa att gcc act tac aat aac gac ctc aac gcg 240
 Gly Ser Leu Glu Trp Gln Ile Ala Thr Tyr Asn Asn Asp Leu Asn Ala
 65 70 75 80
 gta gga act tcc gat gtc tgc gtt gct tta tac gat atg gac caa att 288
 Val Gly Thr Ser Asp Val Cys Val Ala Leu Tyr Asp Met Asp Gln Ile
 85 90 95
 gac gaa gga att tgt atg gaa atc ggc atg ttc gtc gcc ctc cat aaa 336
 Asp Glu Gly Ile Cys Met Glu Ile Gly Met Phe Val Ala Leu His Lys
 100 105 110
 cct atc gtt tta cta cct ttt act aag aaa gat aag tct gct tat gaa 384
 Pro Ile Val Leu Leu Pro Phe Thr Lys Lys Asp Lys Ser Ala Tyr Glu
 115 120 125
 gct aac cta atg cta gca cgg ggt gta act acc tgg ttg gaa cct aat 432
 Ala Asn Leu Met Leu Ala Arg Gly Val Thr Thr Trp Leu Glu Pro Asn

130 135 140
gac ttt agt ccc tta aaa gac ttt aac ttt aac cac cca atg gct caa 480
Asp Phe Ser Pro Leu Lys Asp Phe Asn Phe Asn His Pro Met Ala Gln
145 150 155 160
cct ttc cca cca ttc aag gtt ttc taactaacct aa 516
Pro Phe Pro Pro Phe Lys Val Phe
165

<210> 6
<211> 168
<212> PRT
<213> Lactobacillus fermentum NTD

<400> 6
Leu Lys Asn Thr Asp Pro Val Ala Asn Thr Lys Ile Tyr Leu Ala Thr
1 5 10 15
Ser Phe Phe Asn Glu Glu Gln Arg Ala Arg Ile Pro Gln Ala Leu Ala
20 25 30
Gln Leu Glu Ala Asn Pro Thr Val Gly Val Val His Gln Pro Phe Asp
35 40 45
Phe Gln Tyr Lys Asp Ala Arg Val Asp Ser Asp Pro Ala Gly Val Phe
50 55 60
Gly Ser Leu Glu Trp Gln Ile Ala Thr Tyr Asn Asn Asp Leu Asn Ala
65 70 75 80
Val Gly Thr Ser Asp Val Cys Val Ala Leu Tyr Asp Met Asp Gln Ile
85 90 95
Asp Glu Gly Ile Cys Met Glu Ile Gly Met Phe Val Ala Leu His Lys
100 105 110
Pro Ile Val Leu Leu Pro Phe Thr Lys Lys Asp Lys Ser Ala Tyr Glu
115 120 125
Ala Asn Leu Met Leu Ala Arg Gly Val Thr Thr Trp Leu Glu Pro Asn
130 135 140
Asp Phe Ser Pro Leu Lys Asp Phe Asn Phe Asn His Pro Met Ala Gln
145 150 155 160
Pro Phe Pro Pro Phe Lys Val Phe
165

<210> 7
<211> 255
<212> ADN
<213> Lactobacillus crispatus NTD

<220>
<221> CDS
<222> (3)..(254)

<400> 7

```

ac aac cag tac aag ggt atc cgc gtt gat gaa cac cct gaa tac ttg      47
  Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu
    1             5             10             15

cac gac att gaa tgg gca tca gct acc tac cat aac gac tta gta ggg      95
His Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly
          20             25             30

att aag tcc agc gac atc atg ctt ggc gtt tac ttg cct gaa gaa gaa      143
Ile Lys Ser Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu
          35             40             45

gat gtt ggt ctg gga atg gaa ctt ggc tat gcc ctt tca aaa ggc aag      191
Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Lys
          50             55             60

tac atc ttg ttg gta att cct gat gaa gat tac ggt aag cca atc aac      239
Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn
          65             70             75

tta atg agc tgg ggc a                                              255
Leu Met Ser Trp Gly
    80

```

<210> 8

<211> 84

<212> PRT

<213> Lactobacillus crispatus NTD

<400> 8

```

Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His
  1             5             10             15

Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile
          20             25             30

Lys Ser Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp
          35             40             45

Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Lys Tyr
          50             55             60

Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu
          65             70             75             80

Met Ser Trp Gly

```

<210> 9

<211> 399

<212> ADN

<213> Lactobacillus amylovorus NTD

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(399)

<400> 9
 atg gaa gct tta aag aag aac cct act gtt gac tta gaa aac agt tac 48
 Met Glu Ala Leu Lys Lys Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr
 1 5 10 15

gtc cca ctt gat aac caa tac aaa ggc atc cgc gtt gat gaa cac cca 96
 Val Pro Leu Asp Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro
 20 25 30

gaa tat tta cac gac att gaa tgg gca tca tct acc tac cac aat gac 144
 Glu Tyr Leu His Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ser Thr Tyr His Asn Asp
 35 40 45

tta gtt ggt att aag tct tca gac gta atg ctc ggt gtt tat tta cct 192
 Leu Val Gly Ile Lys Ser Ser Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro
 50 55 60

gaa gaa gaa gat gtt ggc ctt ggg atg gaa ctt ggc tac gca ttg tct 240
 Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser
 65 70 75 80

caa ggt aaa tac atc ttg ctt gtc atc cct gac gaa gac tat ggt aag 288
 Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys
 85 90 95

cca atc aac ttg atg agc tgg ggc gtt tgc gac aac gta atc aag atc 336
 Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp Gly Val Cys Asp Asn Val Ile Lys Ile
 100 105 110

agc gaa ttg aaa gac ttc gac ttt aac aga cct cgc ttc aac ttt tac 384
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp Phe Asn Arg Pro Arg Phe Asn Phe Tyr
 115 120 125

gat ggt gct gtc tat 399
 Asp Gly Ala Val Tyr
 130

<210> 10
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus amylovorus NTD

<400> 10
 Met Glu Ala Leu Lys Lys Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr
 1 5 10 15

Val Pro Leu Asp Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro
 20 25 30

Glu Tyr Leu His Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ser Thr Tyr His Asn Asp
 35 40 45

Leu Val Gly Ile Lys Ser Ser Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro
 50 55 60

Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser
 65 70 75 80

Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys
 85 90 95

Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp Gly Val Cys Asp Asn Val Ile Lys Ile
 100 105 110

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp Phe Asn Arg Pro Arg Phe Asn Phe Tyr
 115 120 125

Asp Gly Ala Val Tyr
 130

<210> 11
 <211> 480
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus acidophilus NTD

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(480)

<400> 11
 atg atg gca aaa aca aaa act tta tat ttc ggc gct ggt tgg ttt aat 48
 Met Met Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn
 1 5 10 15

gaa aag caa aat aag gct tat aaa gca gct atg gaa gct tta aaa caa 96
 Glu Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Ala Met Glu Ala Leu Lys Gln
 20 25 30

aac cct act gtt gat ttg gaa aat agt tat gtt cca ctt gaa aat caa 144
 Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln
 35 40 45

tat aaa gat att cgt gtt gat gaa cat cct gaa tac tta cac gac att 192
 Tyr Lys Asp Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asp Ile
 50 55 60

gaa tgg gca tct gct act tat cac aac gac tta att ggt atc aaa tct 240
 Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Ile Gly Ile Lys Ser
 65 70 75 80

tca gat att atg tta ggg gtt tac tta cct gaa gaa gaa gat gtt ggt 288
 Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly
 85 90 95

ctt ggt atg gaa ctt ggc tac gca tta tca caa ggc aaa tat atc tta 336
 Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu
 100 105 110

ctc gtt att cct gac gaa gat tat ggc aag cct atc aac ttg atg agt 384
 Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser
 115 120 125

tgg ggt gta tgt gat aac gct att aag atc agc gaa ttg aag gac ttc 432
 Trp Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe
 130 135 140

gac ttc aat aag cca cgc ttt aac ttc tat gat ggc gct gta tat taa 480
 Asp Phe Asn Lys Pro Arg Phe Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr
 145 150 155 160

<210> 12
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus acidophilus NTD

<400> 12
 Met Met Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn
 1 5 10 15
 Glu Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Ala Ala Met Glu Ala Leu Lys Gln
 20 25 30
 Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln
 35 40 45
 Tyr Lys Asp Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asp Ile
 50 55 60
 Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Ile Gly Ile Lys Ser
 65 70 75 80
 Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly
 85 90 95
 Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu
 100 105 110
 Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser
 115 120 125
 Trp Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe
 130 135 140
 Asp Phe Asn Lys Pro Arg Phe Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr
 145 150 155

<210> 13
 <211> 795
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus helveticus NTD

<220>
 <221> CDS
 <222> (140)..(616)

<220>
 <223> n signifie n'importe quel nucléotide : a, g, c ou
 t/u

<400> 13
 aaaaaaattt tcagtattag tcattgaatt ttaccttcca ttatggaatt actattttta 60
 gcgtaagtta acaagacgtt ttttcaatc gaaaatatgt taaagttaat tcgtcagcaa 120
 tttttatggg ganaaaatt atg aac aag aaa aag act tta tat ttt ggt gcc 172
 Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala
 1 5 10

```

ggt tgg ttt aat gaa aag caa aac aaa gct tac aaa gaa gca atg gca 220
Gly Trp Phe Asn Glu Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala
          15                      20                      25

gct tta aaa gaa aat cca aca gtt gat tta gaa aat agt tat gtg ccc 268
Ala Leu Lys Glu Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro
          30                      35                      40

ctt gaa aac caa tac aag ggt att cgc att gat gaa cat cca gaa tac 316
Leu Glu Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr
          45                      50                      55

ttg cac aac att gaa tgg gct tct gca acc tac cac aat gat tta gta 364
Leu His Asn Ile Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val
          60                      65                      70                      75

gga att aag act tct gat gtc atg ctt ggc gta tat ttg cca gaa gaa 412
Gly Ile Lys Thr Ser Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu
          80                      85                      90

gaa gac gtc ggc tta ggc atg gaa ctg ggc tac gca tta tct caa gga 460
Glu Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly
          95                      100                      105

aaa tat att tta ttg gtt atc cca gat gaa gat tac ggc aag cca atc 508
Lys Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile
          110                      115                      120

aac tta atg agc tgg ggc gtt tgt gac aat gcc atc aag atc agt gaa 556
Asn Leu Met Ser Trp Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu
          125                      130                      135

tta aaa gac ttc gac ttt aac aag cct cgc tac aat ttc tac gac gga 604
Leu Lys Asp Phe Asp Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly
          140                      145                      150                      155

gct gta tat taa aaaataagca aactaaatga cctatcgctt aaaaattgcg 656
Ala Val Tyr

atagggtcatt ttttaatat atctgtcatg tataaaatct ttcttaataa atatactcca 716

agtgattttc caaaaaaatt attattctat acccacttca tatggaagtc cgagtcactt 776

atgtaaatca tatatcact 795

```

<210> 14

<211> 158

<212> PRT

<213> Lactobacillus helveticus NTD

<400> 14

```

Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn Glu
  1          5          10          15

```

```

Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala Ala Leu Lys Glu Asn
  20          25          30

```

```

Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln Tyr
  35          40          45

```

Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asn Ile Glu
 50 55 60
 Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile Lys Thr Ser
 65 70 75 80
 Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu
 85 90 95
 Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu
 100 105 110
 Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp
 115 120 125
 Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp
 130 135 140
 Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr
 145 150 155

<210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus leichmannii NTD1

<400> 15
 agacgatcta cttcgggtg 18

<210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus leichmannii NTD2

<400> 16
 acggcacctt cgtagaag 18

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 01 14566 A (IHLENFELDT HANS GEORG ; PHARMA WALDHOF GMBH & CO KG (DE); TISCHER W) 1 mars 2001 (2001-03-01) SEQ.ID.N.14 * page 9, ligne 10 - page 10, ligne 3 *	1,2, 8-17,21, 22,26-37	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	US 6 087 132 A (VASILOIU ROXANA) 11 juillet 2000 (2000-07-11) * le document en entier *	1,2, 8-17,21, 22,26-37	
T	KAMINSKI PIERRE ALEXANDRE: "Functional cloning, heterologous expression, and purification of two different N-deoxyribosyltransferases from Lactobacillus helveticus." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 17, 26 avril 2002 (2002-04-26), pages 14400-14407, XP002206140 April 26, 2002 ISSN: 0021-9258 * le document en entier *	1,2, 8-17,21, 22,26-37	
T	DATABASE EMBL 'en ligne! 17 juin 2002 (2002-06-17) Database accession no. AAG66170 XP002206141 Nucleoside deoxyribosyltransferase-II * abrégé * & JP 2002 051781 A 19 février 2002 (2002-02-19)	1,2, 8-17,21, 22,26-37	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
18 juillet 2002		Mateo Rosell, A.M.	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES 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 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			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0111911 FA 612516**

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 **18-07-2002**

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 0114566	A	01-03-2001	AU	6571700 A	19-03-2001
			WO	0114566 A2	01-03-2001
			EP	1206551 A2	22-05-2002
US 6087132	A	11-07-2000	DE	4020529 A1	21-03-1991
			AT	161286 T	15-01-1998
			AU	6279390 A	18-04-1991
			WO	9104322 A1	04-04-1991
			DE	59010784 D1	29-01-1998
			DK	491739 T3	24-08-1998
			EP	0491739 A1	01-07-1992
			EP	0816508 A1	07-01-1998
			ES	2110418 T3	16-02-1998
			JP	3032289 B2	10-04-2000
			JP	7500481 T	19-01-1995
JP 2002051781	A	19-02-2002	AUCUN		

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 612516
FR 0111911

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 2,17,
22 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.2; polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.1, vecteur, amorces, sondes, bactérie transformée par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.1, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalysé par une déoxyribosyltransférase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.2.

2. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 3,18,
23 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.4; polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.3, vecteur, amorces, sondes, bactérie transformée par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.3, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalysé par une déoxyribosyltransférase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.4.

3. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 4,19,
24 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.6; polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.5, vecteur, amorces, sondes, bactérie transformée par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.5, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalysé par une déoxyribosyltransférase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.6.

4. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 5 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.8; polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.7,

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 612516
FR 0111911

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

vecteur, amorces, sondes, bacterie transformé par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.7, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransferase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.8.

5. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et 6 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de Lactobacillus ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.10; polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.9, vecteur, amorces, sondes, bacterie transformé par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.9, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransferase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.10.

6. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 7,20, 25 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de Lactobacillus ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.12; polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.11, vecteur, amorces, sondes, bacterie transformé par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.11, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransferase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.12.

La première invention a été recherchée.

Motivation pour l'absence d'unité de la demande FA612516

La présente invention concerne l'isolation des gènes codant pour une activité N-déoxyribosyltransférase des différentes souches de lactobacilles dans le but de disposer d'enzymes recombinantes capables de traiter la plus large variété de substrats dévinats soit par la base ou par le sucre.

Le document EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, volume 62, numéro 2, pages 356-372, publié en 1976, cité par le demandeur, rapporte une N-déoxyribosyltransférase désigné ptd ou N-déoxyribosyltransférase classe I, qui catalise exclusivement l'échange de déoxyribose entre deux

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 612516
FR 0111911

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

purines.

De plus, le document BIOSCIENCE BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, volume 64, numéro 10, pages 2243-2245, publié le 10 octobre 2000, rapporte le clonage et l'expression du gène de la nucleoside déoxyribosyltransférase-II du *Lactobacillus helveticus*. Cette séquence est déposée auprès de la banque de données EMBL sous le numéro d'accès AB039914, cité par le demandeur. Cette enzyme, désigné ntd ou N-déoxyribosyltransférase classe II, catalise l'échange de déoxyribose entre une purine et une pyrimidine, entre deux pyrimidines ou entre deux purines.

Par conséquent, des séquences codantes du gène N-déoxyribosyltransférase, ptd ou ntd, de *Lactobacillus*, sont déjà connues dans l'art antérieur.

A la lumière de l'état de la technique, les différents problèmes de la présente demande sont donc de fournir d'autres polynucléotides et polypeptides codantes du gène N-déoxyribosyltransférase, ptd ou ntd, isolés de *Lactobacillus*.

Les solutions décrites à fournir diverse séquences polynucléotides isolés de différentes souches de *Lactobacillus* et les séquences polypeptidiques de leurs produits d'expression ainsi que l'utilisation de ces séquences pour la synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides. Elles se résument comme suit:

*Solution 1: Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus helveticus* ayant une activité N-déoxyribosyltransférase codé par le gène ntd Lh, représenté par la SEQ.ID.N.2.

*Solution 2: Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus helveticus* ayant une activité N-déoxyribosyltransférase codé par le gène ptd Lh, représenté par la SEQ.ID.N.4.

*Solution 3: Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus fermentum* ayant une activité N-déoxyribosyltransférase codé par le gène ntd Lf, représenté par la SEQ.ID.N.6.

*Solution 4: Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus crispatus* ayant une activité N-déoxyribosyltransférase codé par le gène ntd, représenté par la SEQ.ID.N.8.

*Solution 5: Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus amylovorus* ayant une activité N-déoxyribosyltransférase codé par le gène ntd, représenté par la SEQ.ID.N.10.

*Solution 6: Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus acidophilus* ayant une activité N-déoxyribosyltransférase codé par le gène ntd, représenté par la SEQ.ID.N.12.

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 612516
FR 0111911

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Etant donné, que des polypeptides isolés ou purifiés des souches de *Lactobacillus* ayant une activité N-déoxyribosyltransférase ont déjà été décrites, devant les différences des caractéristiques techniques essentielles des différentes solutions proposées aux différents problèmes comme définis ci-dessus, et compte tenu que nulle autre caractéristique technique ne peut être distinguée qui eût, à la lumière de l'état antérieur de la technique, pu être considérée comme une caractéristique technique spéciale, l'opinion de la division de recherche est qu'il n'existe pas de concept inventif unique couvrant la pluralité des solutions proposées par la présente demande et qu'il est nécessaire de soulever une objection pour absence d'unité de l'invention.

Par voie de conséquence, l'unité de l'invention requise n'existe pas et les diverses inventions, n'appartenant pas à concept inventif commun, sont formulées comme des sujets différents ainsi que notifié dans la feuille ci-jointe.

La recherche a été basée sur l'objet de la première invention, comme définie ci-dessus. Il est à noter, que la recherche des autres inventions aurait causé des efforts de recherche additionnels considérables.