

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 31.01.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 07.08.98 Bulletin 98/32.

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) : RHONE MERIEUX SOCIETE ANONYME — FR.

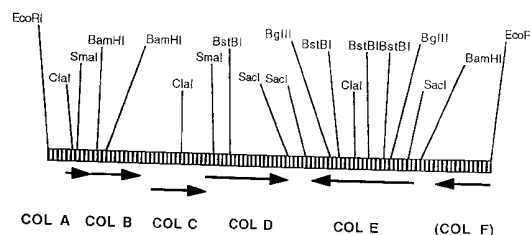
⑦② Inventeur(s) : BUBLOT MICHEL JOSEPH MARIE, LAPLACE ELIANE LOUISE FRANCOISE et AUDONNET JEAN CHRISTOPHE FRANCIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ VACCIN VIVANT RECOMBINANT AVIAIRE, UTILISANT COMME VECTEUR LE VIRUS DE LA LARYNGOTRACHEITE INFECTIEUSE AVIAIRE.

⑤⑦ Le vaccin vivant recombinant aviaire comprend, comme vecteur, un virus ILTV comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, cette séquence nucléotidique étant insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé entre les codons stop des COL D et COL E d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la SEQ ID NO: 1. La séquence nucléotidique hétérologue peut être sous le contrôle d'un promoteur eucaryote fort, tel que promoteur CMV-IE, et peut provenir des virus de la maladie de Newcastle, de la maladie de Marek, de la maladie de Gumboro, de la bronchite infectieuse, de l'anémie du poulet, de la pneumovirose du poulet. Formule de vaccin multivalent comprenant au moins deux vaccins vivants selon l'invention. Virus ILTV ainsi recombiné.



Partie séquencée (7082 pb)



Vaccin vivant recombinant aviaire, utilisant comme vecteur le virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire.

La présente invention a trait à des vaccins à usage aviaire à base de virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV), dans lequel a été insérée, par recombinaison
5 génétique, au moins une séquence nucléotidique hétérologue, notamment codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, dans des conditions assurant une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre ledit agent pathogène.

Le virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV) est un alphaherpèsvirus (B.
10 Roizman, *Arch. Virol.* 1992. **123**. 425-449) qui provoque une pathologie respiratoire importante (la laryngotrachéite infectieuse ou ILT) chez le poulet (L.E. Hanson et T.J. Bagust, *Diseases of Poultry* 9th edn 1991.pp 485-495. Ames, Iowa State University Press). Les vaccins actuellement disponibles contre cette affection contiennent une souche atténuée administrable par différentes voies dont les voies intranasales, conjonctivales,

cloacales, dans l'eau de boisson et par aérosol (L.E. Hanson et T.J. Bagust, *Diseases of Poultry* 9th Edition 1991.pp 485-495. Ames, Iowa State University Press).

Les études de biologie moléculaire du virus ILTV ont permis de caractériser le génome viral (M.A. Johnson *et al.*, *Arch. Virol.* 1991. **119**. 181-198) et d'identifier
 5 quelques gènes du virus (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1989. **70**. 3085-3089) dont les gènes codant pour la thymidine kinase (UL23) (A.M. Griffin et M.E.G. Boursnell, *J. Gen. Virol.* 1990. **71**. 841-850; C.L. Keeler *et al.*, *Avian Dis.* 1991. **35**. 920-929), la glycoprotéine gB (UL27) (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1991. **72**. 393-398; K. Kongsuwan *et al.*, *Virology* 1991. **184**. 404-410; D.J. Poulsen *et al.*, *Virus Genes* 1991.
 10 **5**. 335-347), la glycoprotéine gC (UL44) (D.H. Kingsley *et al.*, *Virology* 1994. **203**. 336-343), la protéine de capsid p40 (UL26) (A.M. Griffin, *Nucl. Acids Res.* 1990. **18**. 3664), la protéine homologue de la protéine ICP4 de l'herpès simplex (HSV-1) (M.A. Johnson *et al.*, *Virus Research* 1995. **35**. 193-204), les protéines homologues aux protéines ICP27 (UL54), glycoprotéine gK (UL53) et DNA hélicase (UL52) de l'HSV-1
 15 (M.A. Johnson *et al.*, *Arch. Virol.* 1995. **140**. 623-634), la ribonucléotide réductase (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1989. **70**. 3085-3089, WO-A-90/02802), les gènes UL1 à UL5 (W. Fuchs et T.C. Mettenteleiter, *J. Gen. Virol.* 1996. **77**. 2221-2229), les gènes présents dans la séquence unique courte du génome (U_s) (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence- The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. **Vol. 5**. pp191-194; K.
 20 Kongsuwan *et al.*, *Arch. Virol.* 1995. **140**. 27-39; K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Research* 1993. **29**. 125-140; K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Gene* 1993. **7**. 297-303; M.A. Wild *et al.*, *Virus Genes* 1996. **12**. 107-116; WO-A-92/03554; WO-A-95/08622).

La présente invention a pour objectif de mettre au point un vaccin aviaire à base de virus ILTV recombinant exprimant un gène hétérologue, ce virus étant capable de se
 25 répliquer et d'induire une immunité chez l'hôte vacciné tout en conservant une bonne innocuité.

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit en même temps particulièrement efficace contre la laryngotrachéite infectieuse (ILT).

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit utilisable
 30 dans la vaccination de masse par voie mucosale, par exemple par voie aérosol ou dans l'eau de boisson, de telle manière que la réplication du virus au niveau mucosal permette

d'induire une immunité mucosale et systémique. Une telle immunité mucosale sera particulièrement efficace pour lutter contre les maladies respiratoires, ainsi que contre les autres maladies pour lesquelles la porte d'entrée de l'agent pathogène est mucosale.

5 Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit utilisable aussi bien chez les adultes que chez les jeunes animaux.

Un objectif spécifique est de proposer un tel vaccin utilisable dans la vaccination de masse par voie mucosale des tout jeunes animaux tels que les poussins d'un jour.

10 Un autre objectif de l'invention est de proposer un vaccin contre l'ILT qui ait une efficacité accrue par rapport à la souche parentale et qui puisse même éventuellement permettre l'insertion et l'expression d'un gène hétérologue.

Au cours de leurs travaux sur le virus ILTV, les inventeurs ont trouvé une région génomique qui s'est révélée tout à fait appropriée comme site d'insertion de gènes hétérologues. Cela a permis de mettre au point un vaccin vivant recombinant à base d'un vecteur ILTV dans lequel est insérée au moins une séquence codant pour un immunogène aviaire, en particulier les protéines HN et F du virus de la maladie de Newcastle (NDV), et/ou la glycoprotéine gB du virus de la maladie de Marek (MDV), et/ou la protéine VP2 du virus de la maladie de Gumboro (IBDV), et/ou les protéines S et M du virus de la bronchite infectieuse (IBV). Un tel vaccin incorporant une séquence codant pour des protéines du NDV, du MDV et/ou de l'IBV assure une protection satisfaisante des animaux contre la maladie de Newcastle, contre la maladie de Marek, contre la maladie de Gumboro, et contre la bronchite infectieuse respectivement.

25 La présente invention a donc pour objet un vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, le virus ILTV comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, notamment codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, insérée dans le locus d'insertion formé de l'intergène situé entre les codons "stop" des COL-D et COL-E du virus ILTV et qui, dans une souche ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la séquence SEQ ID NO:1.

Si la séquence particulière décrite dans la demande (SEQ ID NO:1) provient de la souche vaccinale d'ILTV T-20 12-8-66 (vaccin LT BLEN) provenant de Select Laboratories (10026 Main Street P.O. Box 6 Berlin, Maryland 21811, USA), il est bien évident que l'homme du métier pourra utiliser les autres souches d'ILTV, compte-tenu
5 des informations données dans la présente sur la souche vaccinale.

Le COL-E correspond au gène UL54 décrit dans l'article de M.A. Johnson *et al.* (*Arch. Virol.* 1995. **140**. 623-634) de la souche vaccinale australienne SA-2. La séquence nucléotidique du gène UL54 de la souche SA-2 est légèrement différente de celle de la souche T-20, ce qui entraîne des différences entre les séquences en acides aminés des
10 gènes de ces 2 souches, et notamment à la partie C-terminale (codons STOP différents). Cet article ne suggère en aucune manière que la séquence en aval du gène UL54 puisse être utilisée comme locus d'insertion.

La séquence référencée SEQ ID NO:19 reproduit pour cette souche SA-2, une partie de la séquence équivalente à SEQ ID NO:1 (en sens inverse). L'intergène servant
15 de locus d'insertion conformément à l'invention est en partie compris à la SEQ ID NO:19 entre les nucléotides 2808 et 3116 (dernier nucléotide de cette séquence).

Par séquence hétérologue, on entend une séquence qui ne provient pas de ce locus d'insertion, c'est-à-dire aussi bien une séquence n'ayant pas pour origine le virus ILTV, qu'une séquence provenant d'une autre région génomique de ce virus, ou encore
20 provenant d'une autre souche ILTV, notamment une souche virulente.

Par insertion dans la région d'insertion, on entend notamment insertion simple ou après délétion totale ou partielle du locus d'insertion.

On peut insérer une ou plusieurs cassettes d'expression chacune comprenant au moins une séquence à exprimer.

25 Pour exprimer la séquence insérée, on préfère utiliser un promoteur eucaryote fort tel que le promoteur CMV immediate early (IE), le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), et le promoteur précoce du virus SV40.

Par promoteur CMV immediate early (IE), on entend notamment le fragment donné dans les exemples ainsi que ses sous-fragments conservant la même activité
30 promotrice.

Le promoteur CMV IE peut être le promoteur humain (HCMV IE) ou le

promoteur murin (MCMV IE), ou encore un promoteur CMV IE d'une autre origine, par exemple du singe, du rat, du cobaye ou du porc.

D'autres promoteurs d'origine virale ou cellulaire peuvent également être utilisés. Parmi les promoteurs d'origine virale, on peut encore citer les promoteurs de gènes du virus ILTV (gènes considérés comme précoce-immédiats (ICP4, ICP27, ...), précoces (thymidine kinase, DNA helicase, ribonucléotide réductase, ...), ou tardifs (gB, gD, gC, gK, ...)), du virus de la maladie de Marek (MDV) (gènes gB, gC, pp38, pp14, ICP4, Meq,...) ou du virus de l'herpès de la dinde (herpèsvirus of turkey) (gènes gB, gC, ICP4, ...).

La séquence nucléotidique insérée dans le vecteur ILTV pour être exprimée peut être toute séquence codant pour un polypeptide antigénique, d'un agent pathogène aviaire, capable, une fois exprimé dans les conditions favorables procurées par l'invention, d'assurer une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre l'agent pathogène. On pourra donc insérer, dans les conditions de l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour les antigènes d'intérêt pour une maladie donnée.

Cette séquence nucléotidique insérée dans le vecteur ILTV peut également coder pour un polypeptide immunomodulateur, et notamment une cytokine.

De manière remarquable, les vaccins selon l'invention pourront être utilisés pour la vaccination *in ovo*, des poussins d'un jour ou plus et des adultes. Différentes voies d'administration pourront être utilisées: la voie parentérale, ou les voies mucosales telles que oronasale (eau de boisson, aérosol), conjonctivale (goutte dans l'oeil) ou cloacale, avec une préférence pour les voies permettant une vaccination mucoale de masse (eau de boisson, aérosol).

L'invention se révèle particulièrement utile aussi bien pour la protection contre les pathologies respiratoires que contre les pathologies systémiques en bloquant les voies d'entrée naturelles de l'agent pathogène.

L'invention peut notamment être utilisée pour l'insertion d'une séquence nucléotidique codant convenablement pour une protéine antigénique du virus NDV et en particulier, la glycoprotéine HN ou la glycoprotéine F. On obtient ainsi un vaccin vivant recombinant assurant, en plus d'une protection contre la laryngotrachéite infectieuse, une

protection satisfaisante contre la maladie de Newcastle.

Le vaccin recombinant contre la maladie de Newcastle contiendra de préférence de 10 à 10^4 PFU/dose.

D'autres cas préférés de l'invention sont l'insertion de séquences nucléotidiques
5 codant pour des antigènes d'autres agents pathogènes aviaires, et notamment, mais de
manière non limitative, des antigènes du virus de la maladie de Marek, en particulier
gènes gB, gC, gD, et gH+gL (WO-A-90/02803), du virus de la maladie de Gumboro,
en particulier gène VP2, du virus de la bronchite infectieuse (IBV), en particulier gènes
S et M (M. Binns *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1985. **66**. 719-726 ; M. Boursnell *et al.*, *Virus*
10 *Research* 1984. **1**. 303-313), du virus de l'anémie du poulet (CAV), en particulier VP1
(52 kDa) + VP2 (24 kDa) (N.H.M. Noteborn *et al.*, *J. Virol.* 1991. **65**. 3131-3139),
du virus ILTV, en particulier les gènes codant pour gB (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.*
1991. **72**. 393-398), ou pour gD (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence-The Journal of*
Sequencing and Mapping 1995. **Vol. 5**. pp191-194. Harwood Academic Publishers
15 GmbH), ou pour gp60 (K.K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Genes* 1993. **7**. 297-303), et du
virus du syndrome infectieux du gonflement de la tête ("swollen head syndrome" ou
pneumovirose du poulet ou turkey rhinotracheitis virus (TRTV) de la dinde;
pneumovirus), en particulier la glycoprotéine de fusion F (Q. Yu *et al.*, *J. Gen. Virol.*
1991. **72**. 75-81), ou la glycoprotéine d'attachement G (R. Ling *et al.*, *J. Gen. Virol.*
20 1992. **73**. 1709-1715; K. Juhasz et J. Easton, *J. Gen. Virol.* 1994. **75**. 2873-2880). Les
doses seront de préférence les mêmes que celles pour le vaccin de Newcastle.

Dans le cadre de la présente invention, on peut bien entendu insérer plus d'une
séquence hétérologue dans le même virus ILTV, notamment dans ce locus. On peut
notamment y insérer des séquences provenant d'un même virus ou de virus différents,
25 ce qui comprend également l'insertion de séquences d'ILTV et d'un autre virus aviaire.
On peut également y associer des séquences codant pour des immunomodulateurs, et en
particulier des cytokines.

Par exemple, on associe au promoteur CMV IE un autre promoteur de façon que
leurs extrémités 5' soient adjacentes (ce qui implique des transcriptions dans des sens
30 opposés), ce qui permet d'insérer, dans la zone d'insertion, deux séquences
nucléotidiques, l'une sous la dépendance du promoteur CMV IE, l'autre sous celle du

promoteur associé. Cette construction est remarquable par le fait que la présence du promoteur CMV IE, et notamment de sa partie activatrice (enhancer), active la transcription induite par le promoteur associé. Le promoteur associé peut être en particulier un promoteur d'un gène du virus ILTV ou du virus MDV ou HVT.

5 Un cas intéressant de l'invention est un vaccin comprenant une séquence nucléotidique codant pour HN de NDV et une séquence nucléotidique codant pour F de NDV ou un antigène d'une autre maladie aviaire, notamment celles citées plus haut, l'un des gènes étant sous le contrôle du promoteur CMV IE, et l'autre sous le contrôle du promoteur associé.

10 On peut aussi monter deux promoteurs CMV IE d'origines différentes avec leurs extrémités 5' adjacentes.

L'expression de plusieurs gènes hétérologues insérés dans le locus d'insertion peut également être rendu possible par insertion entre les cadres ouverts de lecture de ces gènes d'une séquence appelée "IRES" (Internal Ribosome Entry Site) provenant
15 notamment d'un picornavirus tel le virus de la maladie vésiculaire du porc (swine vesicular disease virus, SVDV; B.-F. Chen *et al.*, *J. Virology*, 1993, **67**, 2142-2148), le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV; R.J. Kaufman *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1991, **19**, 4485-4490), le virus de la fièvre aphteuse (FMDV; N. Luz et E. Beck, *J. Virology*, 1991, **65**, 6486-6494), ou encore d'une autre origine. Le contenu des 3 articles
20 cités est incorporé par référence. La cassette d'expression de deux gènes aurait donc la structure minimale suivante: promoteur - gène 1 - IRES - gène2 - signal de polyadénylation. Le vaccin vivant recombinant selon l'invention pourra donc comprendre, insérée dans le locus d'insertion, une cassette d'expression comprenant successivement un promoteur, deux ou plusieurs gènes séparés deux à deux par un IRES,
25 et un signal de polyadénylation.

En plus de l'insertion dans le locus selon l'invention, on peut réaliser une ou plusieurs autres insertions, une ou plusieurs mutations, ou une ou plusieurs délétions ailleurs dans le génome; si la souche parentale est virulente, on peut par exemple inactiver (par délétion, insertion ou mutation) des gènes impliqués dans la virulence tels
30 que le gène thymidine kinase, le gène ribonucléotide réductase, le gène gE,... Dans tous les cas, l'insertion dans un autre locus que celui décrit dans l'invention, permet

d'exprimer d'autres gènes.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin contre l'ILT comprenant un virus ILTV recombinant dans lequel on a inséré en amont des gènes codant pour des immunogènes majeurs de l'ILTV, de préférence les gènes codant pour gB (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1991. **72**. 393-398), ou pour gD (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. **Vol. 5**. pp191-194. Harwood Academic Publishers GmbH), ou pour gp60 (K.K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Genes* 1993. **7**. 297-303), un promoteur exogène, en particulier un promoteur fort tel que décrit plus haut. Cela permet d'augmenter le niveau d'expression de l'un ou plusieurs de ces gènes et ainsi conduire à un vaccin à efficacité accrue contre l'ILT. On peut bien sûr combiner cela avec une construction telle que décrite plus haut comprenant l'insertion d'une séquence hétérologue dans le locus d'insertion.

La présente invention a aussi pour objet une formule de vaccin multivalent, comprenant, en mélange ou à mélanger, un vaccin tel que défini plus haut avec un autre vaccin, et notamment un autre vaccin vivant recombinant aviaire tel que défini plus haut, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes, notamment de pathogènes différents.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de préparation des vaccins selon l'invention, telle qu'elle ressort de la description.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de vaccination aviaire comprenant l'administration d'un vaccin vivant recombinant ou d'une formule de vaccin multivalent tel que défini plus haut. Elle a notamment pour objet une telle méthode pour la vaccination *in ovo*, des poussins d'un jour ou plus et des adultes. Différentes voies d'administration du vaccin peuvent être utilisées (voir plus haut) avec une préférence pour les voies permettant une vaccination de masse par voie mucosale (aérosol, eau de boisson), la dose de vaccin étant choisie de préférence entre 10^1 et 10^4 par animal.

La présente invention a aussi pour objet un virus ILTV comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue telle que décrite ci-dessus insérée dans le locus d'insertion tel que défini plus haut.

La présente invention a encore pour objet tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1. Par partie de la séquence, on entend non seulement les COLs caractérisés pris

séparément et leurs fragments, mais aussi la région intergénique située entre les COLs D et E, et les fragments situés de chaque côté de cette région intergénique, qui peuvent, le cas échéant inclure une partie de cette région intergénique, ces fragments pouvant servir de bras flanquant pour une recombinaison homologue, technique parfaitement connue de l'homme du métier. De manière générale, mais sans que cela soit limitatif, les bras flanquants pourront avoir de 100 à 1500 paires de bases.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples de réalisation non limitatifs, pris en référence au dessin, dans lequel :

- Figure 1 :** Carte de restriction du fragment cloné et position des COLs
- 10 **Figure 2 :** Séquence de 7082 pb et traduction des COLs A, B, C, D, E et F de la souche vaccinale T-20 de Select Laboratories
- Figure 3 :** Schéma d'obtention du plasmide pEL168
- Figure 4 :** Schéma d'obtention du plasmide pEL024
- Figure 5 :** Schéma d'obtention du plasmide pEL027
- 15 **Figure 6 :** Schéma du plasmide pEL169
- Figure 7 :** Schéma d'obtention du plasmide pCD009
- Figure 8 :** Schéma d'obtention du plasmide pEL070
- Figure 9 :** Schéma du plasmide pEL170
- Figure 10 :** séquence du gène HN du NDV
- 20 **Figure 11 :** Schéma d'obtention du plasmide pEL030
- Figure 12 :** Schéma du plasmide pEL171
- Figure 13 :** Schéma du plasmide pEL033
- Figure 14 :** Schéma du plasmide pEL172
- Figure 15 :** Schéma de double cassette d'expression
- 25 **Figure 16 :** Schéma d'obtention du plasmide pCD011
- Figure 17 :** Schéma du plasmide pEL181
- Figure 18 :** Séquence de 3116 pb et traduction des UL53 et 54 de la souche SA-2

Liste des séquences :

	SEQ ID NO:1	Séquence du fragment <i>EcoRI-EcoRI</i> (7082 pb, voir figure 2)
	SEQ ID NO:2	Oligonucléotide EL005
	SEQ ID NO:3	Oligonucléotide EL006
5	SEQ ID NO:4	Oligonucléotide EL007
	SEQ ID NO:5	Oligonucléotide EL008
	SEQ ID NO:6	Oligonucléotide MB070
	SEQ ID NO:7	Oligonucléotide MB071
	SEQ ID NO:8	Séquence du gène HN du NDV (voir figure 10)
10	SEQ ID NO:9	Oligonucléotide EL071
	SEQ ID NO:10	Oligonucléotide EL073
	SEQ ID NO:11	Oligonucléotide EL074
	SEQ ID NO:12	Oligonucléotide EL075
	SEQ ID NO:13	Oligonucléotide EL076
15	SEQ ID NO:14	Oligonucléotide EL077
	SEQ ID NO:15	Oligonucléotide CD001
	SEQ ID NO:16	Oligonucléotide CD002
	SEQ ID NO:17	Oligonucléotide CD003
	SEQ ID NO:18	Oligonucléotide CD004
20	SEQ ID NO:19	Séquence de la souche SA-2 (3116 bp, à partir du site <i>EcoRI</i> en position 1696 de la séquence de Genbank n° d'accès L34065 ; voir figure 18)

EXEMPLES

25 Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook J. *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Le virus utilisé comme virus parental peut être choisi parmi les souches vaccinales décrites dans J.R. Andreasen *et al.* (*Avian Diseases* 1990. **34**. 646-656) ou la souche T-20 12-8-66 vaccin LT BLEN provenant de Select laboratories 10026 Main Street P.O. Box 6 Berlin, Maryland 21811, USA. On peut également utiliser des souches virulentes
5 telles que la souche de Lütticken (voir ci-dessus), la souche N-71851 (ATCC VR-783) ou la souche 83-2 de l'USDA, que l'on peut atténuer par les techniques connues, par exemple celle décrite dans WO-A-95/08622.

Exemple 1: Culture du virus ILTV:

Le virus ILTV (souche T20 de Select Laboratories) est cultivé sur des cellules primaires de reins de poulets (CRP); ces cellules sont mises en culture en milieu MEM complétement avec 3% de sérum de veau foetal (SVF) dans des flacons de culture de 75 cm² (2 10⁵ cellules/cm²) un ou deux jours avant inoculation.

Le jour de l'inoculation, un flacon de 1000 doses de vaccin lyophilisé est resuspendu dans 10 ml de milieu MEM complétement avec 1% de SVF; environ 0,5 ml de cette solution est ensuite déposé sur la culture de CRP. Le lendemain, le milieu est changé, et le surlendemain, lorsque l'effet cytopathogène (ECP) se généralise, les flacons de culture sont congelés à -70°C.

La culture du virus ILTV peut également être faite sur des cellules immortalisées de foie de poulet, et notamment sur la lignée LMH (W.M. Schnitzlein *et al.*, *Avian Diseases* 1994. 38. 211-217).

Exemple 2: Préparation de l'ADN génomique de l'ILTV:

Après 2 cycles de congélation/décongélation, la culture d'ILTV (2 flacons de 75 cm²) est récoltée et centrifugée à basse vitesse (5000 tr/min dans un rotor 20, centrifugeuse Beckman JA21, pendant 5 minutes) pour éliminer les gros débris cellulaires. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé (100000 tr/min rotor TLA100.3, centrifugeuse Beckman TL100, pendant 1 heure). Le culot est alors repris dans 1,6 ml de TEN-SDS (Tris pH 8,0 10mM; EDTA 1mM; NaCl 0,5M; sodium dodecyl sulfate 0,5%), et 35 µl d'une solution de protéinase K à 20 mg/ml sont ensuite ajoutés; la solution est incubée 3 à 4 heures au bain marie à 37°C, et l'ADN est ensuite extrait 3 fois au phénol/chloroforme et 1 fois au chloroforme, puis il est précipité à l'éthanol à -20°C. Après centrifugation, le culot est rincé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 200 µl TE (Tris pH8.0 10mM; EDTA 1mM). La concentration en acide nucléique est ensuite dosée au spectrophotomètre (DO₂₆₀). L'ADN peut être directement digéré par les enzymes de restriction appropriées, pour être ensuite cloné dans le plasmide pBlue Script II SK⁺; de même, il pourra également être utilisé dans les expériences de transfection pour l'obtention d'un virus recombinant.

Exemple 3: Isolement et purification de virus recombinant ILTV

Le plasmide donneur composé d'une cassette d'expression d'un polypeptide inséré entre deux régions flanquantes du locus d'insertion est digéré par une enzyme de restriction permettant la linéarisation du plasmide, puis il est extrait avec un mélange

5 phénol/chloroforme, précipité avec de l'éthanol absolu, et repris dans de l'eau stérile. Des cellules CRP primaires de 24 heures sont ensuite transfectées avec le mélange suivant: 0,2 à 1 μ g de plasmide donneur linéarisé + 2 à 5 μ g d'ADN viral d'ILTV (préparé comme dans l'exemple 2) dans 300 μ l de milieu OptiMEM (Gibco BRL Cat# 041-01985H) et 100 μ g de LipofectAMINE dilués dans 300 μ l de milieu (volume final

10 du mélange = 600 μ l). Ces 600 μ l sont ensuite dilués dans 3 ml (volume final) de milieu et étalés sur $5 \cdot 10^6$ CRP. Le mélange est laissé en contact avec les cellules pendant 5 heures, puis éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de culture. Les cellules sont alors laissées en culture pendant 3 à 8 jours à + 37°C, puis, lorsque l'effet cytopathogène est apparu, elles sont congelées à -70°C. Après décongelation et éventuellement sonication,

15 cette population virale est clonée en dilution limite en microplaques (96 puits) afin d'isoler une population homogène de virus recombinant. Ces plaques sont laissées en culture pendant 1 à 3 jours, puis le surnageant est récolté dans une plaque 96 puits vide et la plaque contenant les surnageants est placée à 4°C ou à -70°C. Les cellules restant dans les autres plaques sont ensuite fixées à l'acétone 95 % pendant 20 à 30 minutes à -

20 20°C, ou pendant 5 minutes à température ambiante. Une réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI) est réalisée avec un anticorps monoclonal dirigé contre le polypeptide exprimé pour rechercher les plages exprimant ce polypeptide. Un nouveau clonage est ensuite effectué de la même manière (en dilution limite en plaques 96 puits) à partir du surnageant présent dans les cupules des plaques mises à 4°C ou à

25 -70°C et correspondant aux cupules présentant des plages positives en IFI. En général, 4 cycles d'isolement successifs (dilution limite, récolte du surnageant, contrôle des cellules par IFI, dilution limite à partir du surnageant...) suffisent pour obtenir des virus recombinants dont la totalité de la progénie présente une fluorescence spécifique. L'ADN génomique de ces virus recombinants est caractérisé au niveau moléculaire par des

30 techniques classiques de PCR et de Southern blot en utilisant les oligonucléotides et les sondes d'ADN appropriés.

L'isolement de virus recombinant peut également se faire par hybridation avec une sonde spécifique de la cassette d'expression insérée. Pour cela, la population virale récoltée après transfection est diluée et déposée sur des cellules CRP (cultivées en boîte de Petri) de manière à obtenir des plages isolées. Après un contact d'1 heure à 37°C, le milieu d'infection est éliminé et remplacé par 5 ml de milieu MEM à 1 % d'agarose, maintenu en surfusion à 42°C. Lorsque l'agarose est solidifié, les boîtes sont incubées 48 à 72 heures à 37°C en étuve CO₂ jusqu'à apparition de plages. La couche d'agarose est alors éliminée et un transfert des plages virales est réalisé sur une membrane stérile de nitrocellulose de même diamètre que la boîte de Petri ayant servi à la culture. Cette membrane est elle-même transférée sur une autre membrane de nitrocellulose de manière à obtenir une "copie" inversée du premier transfert. Les plages transférées sur cette dernière copie sont alors hybridées, selon les techniques usuelles connues de l'homme de l'art, avec un fragment d'ADN de la cassette d'expression marqué à la digoxigénine (DNA Labelling Kit, Boehringer Mannheim, CAT # 1175033). Après hybridation, lavages et mise en contact avec le substrat de révélation, la membrane de nitrocellulose est mise en contact avec un film autoradiographique. Les images d'hybridation positive sur cette membrane indiquent quelles sont les plages qui contiennent des virus ILTV recombinants ayant inséré la cassette d'expression. Les plages correspondant à ces plages positives sont découpées stérilement sur la première membrane de nitrocellulose, placées dans un tube Eppendorf contenant 0,5 ml de milieu MEM et soniquées pour libérer les virions de la membrane. Le milieu contenu dans le tube Eppendorf est ensuite dilué en milieu MEM et les dilutions ainsi obtenues servent à infecter de nouvelles cultures de cellules CRP.

Exemple 4: Clonage et caractérisation d'une région génomique de l'ILTV

L'ADN extrait du virus ILTV a été digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* pendant 2 heures à 37°C. L'enzyme de restriction a ensuite été éliminée par une extraction au phénol/chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Les fragments résultant de cette digestion ont ensuite été ligaturés (une nuit à 14°C) avec le plasmide pBlueScriptII SK+ (pBS SK+; Stratagene) digéré par *EcoRI* et traité à la phosphatase alcaline ;

l'analyse des clones obtenus après transformation de bactéries *E. coli* DH5 α et culture sur boîtes de milieu complétement en ampicilline a permis d'identifier des inserts *EcoRI-Eco-RI* de tailles différentes, dont un fragment d'environ 7 kb (plasmide pEL133).

Le séquençage complet de l'insert présent dans pEL133 (voir figure 1) a permis de mettre en évidence cinq cadres ouverts de lecture (COLs) complets d'au moins 120 acides aminés (COLs A, B, C, D et E), et une partie d'un autre COL (COL F). La carte de restriction de cette région génomique clonée et séquencée, est montrée à la figure 1; la séquence de 7082 pb (SEQ ID NO:1) est montrée à la figure 2. La position et la séquence en acides aminés des COLs A, B, C, D, E et F sont également montrées sur les figures 1 et 2 respectivement.

La séquence entre les codons STOP des COLs D et E (position de 3873 à 4260 sur SEQ ID NO:1), est utilisable pour insérer des cassettes d'expression de polypeptides dans le génome de l'ILTV. Cette séquence est appelée locus d'insertion. L'insertion peut se faire avec ou sans délétion dans la région intergénique (voir exemple 5).

Exemple 5: Construction du plasmide donneur pEL168 pour l'insertion dans la région intergénique entre les COLs D et E

Le plasmide pBluescript II SK+ (pPB SK+ ; Stratagene) a été digéré par les enzymes *XhoI* et *HindII*, et ensuite traité à l'ADN polymérase (fragment de Klenow) en présence de dNTP pour rendre les bouts francs. Après ligature et transformation des bactéries *E. coli*, le clone pEL166 (2957 pb) a été obtenu.

Le plasmide pEL166 a été digéré par les enzymes *ScaII* et *XbaI*, et ensuite traité à l'ADN polymérase (fragment de Klenow) en présence de dNTP pour rendre les bouts francs. Après ligature et transformation des bactéries *E. coli*, le clone pEL167 (2944 pb) a été obtenu.

Les oligonucléotides EL005 (SEQ ID No:2) et EL006 (SEQ ID No:3) ont servi d'amorce pour une première amplification en chaîne par la Taq polymérase (PCR). Les oligonucléotides EL007 (SEQ ID No:4) et EL008 (SEQ ID No:5) ont servi d'amorce

pour une deuxième amplification en chaîne par la Taq polymérase (PCR).

EL005 (SEQ ID No : 2) : 5' TGCCGGAGCGCAACCGCATGG 3'

EL006 (SEQ ID No : 3) : 5' GACACCGAATTCGTAAGCTTTCCCCGGGCAGTCG
ACAACGTGGAGCATTTTTATTTATC 3'

5 EL007 (SEQ IDNo : 4) : 5' GTGTTATCTCTCTAGCATTGGC 3'

EL008 (SEQ ID No : 5) : 5' AGTTCTGAATTCGTGTCGGTTGTATTGTATTC 3'

Les PCR ont été effectuées en présence de tampon PCR, de dNTP, d'ADN du plasmide pEL133, de Taq polymérase, et pour la première PCR, des oligonucléotides EL005 et EL006, et pour la deuxième PCR, des oligonucléotides EL007 et EL008.

- 10 Pour les deux PCR, 25 cycles ont été effectués (30 secondes à 94°C ; 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C). Les produits des deux PCR ont été purifiés par une extraction au phénol/chloroforme, suivie d'une purification par l'éthanol. Le produit de la première PCR (EL005/EL006) a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Bst*BI et *Eco*RI pendant 2 h à 37°C pour donner un fragement d'ADN *Bst*BI-*Eco*RI de 1132
- 15 pb qui a été élué après électrophorèse en gel d'agarose. Le produit de la deuxième PCR (EL007/EL008) a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Bgl*II et *Eco*RI pendant 2 h à 37°C pour donner un fragment d'ADN *Bgl*II-*Eco*RI de 550 pb qui a été élué après électrophorèse en gel d'agarose. Le plasmide pEL167 a été digéré par les enzymes *Cla*I et *Bam*HI. Les deux fragements de PCR *Bst*BI-*Eco*RI (1132 pb) et *Bgl*II-*Eco*RI (550 pb) ont été ligaturés une nuit à 14°C avec le plasmide pEL167 digéré par
- 20 *Cla*I et *Bam*HI. Après transformation des bactéries *E. coli*, et culture sur boîtes de milieu complémenté en ampicilline, le clone pEL168 (4589 pb), comprenant un polylinker *Eco*RI - *Hind*III - *Sma*I - *Sal*I a été obtenu (voir schéma d'obtention de pEL168 à la figure 3).

Exemple 6: Construction du plasmide donneur pEL169 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur HCMV IE dans le site intergénique entre les COLs D et E, et isolement de vILTV13:

6.1 - Clonage du gène VP2 du virus de la maladie de Gumboro (IBDV) et construction d'une cassette d'expression de VP2 sous contrôle du promoteur HCMV IE

Le plasmide pEL004 (voir figure 4; = plasmide pGH004 décrit dans la demande de brevet français 92.13109) contenant le gène IBDV VP2 sous forme d'une cassette *Bam*HI-*Hind*III a été digéré par *Bam*HI et *Xba*I pour isoler le fragment *Bam*HI-*Xba*I (gène VP2 tronqué) de 1104 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS SK+, préalablement digéré avec *Xba*I et *Bam*HI pour donner le plasmide pEL022 de 4052 pb (figure 4). Le vecteur pBS-SK+ a été digéré par *Eco*RV et *Xba*I, puis ligaturé sur lui-même pour donner pBS-SK* (modifié). Le plasmide pEL004 a été digéré par *Kpn*I et *Hind*III pour isoler le fragment *Kpn*I-*Hind*III de 1387 pb contenant le gène IBDV VP2 complet. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK*, préalablement digéré par *Kpn*I et *Hind*III, pour donner le plasmide pEL023 de 4292 pb (figure 4). Le plasmide pEL022 a été digéré par *Bam*HI et *Not*I pour isoler le fragment *Bam*HI-*Not*I de 1122 pb (fragment A). Le plasmide pEL023 a été digéré par *Bam*HI et *Not*I pour isoler le fragment *Bam*HI-*Not*I de 333 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Not*I et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pEL024 de 4369 pb (figure 4).

Le plasmide pEL024 a été digéré par *Not*I pour isoler le fragment *Not*I-*Not*I de 1445 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pCMVβ (Clontech Cat# 6177-1, figure 5), préalablement digéré par *Not*I, pour donner le plasmide pEL026 de 5095 pb (figure 5).

Le plasmide pEL026 a été digéré par *Eco*RI, *Sal*I et *Xmn*I pour isoler le fragment *Eco*RI-*Sal*I de 2428 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Eco*RI et *Sal*I, pour donner le plasmide pEL027 de 5379 pb (figure 5).

6.2 - Construction du plasmide donneur pEL169

Le plasmide pEL027 a été digéré par *Eco*RI, *Sal*I et *Xmn*I pour isoler le fragment *Eco*RI-

Sall de 2428 pb. Ce fragment a été ligaturé dans le plasmide pEL168 (voir exemple 5 et figure 3), préalablement digéré par *EcoRI* et *Sall*, pour donner le plasmide pEL169 de 7007 pb (figure 6).

6.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV13

- 5 Le virus vILTV13 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL169 préalablement linéarisé par l'enzyme *KpnI* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette HCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

10 **Exemple 7: Construction du plasmide donneur pEL170 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur MCMV IE dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement de vILTV14:**

7.1 - Construction de pEL070 contenant une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur immediate early (IE) du MCMV (Mouse CytoMegalovirus)

- 15 Le plasmide pCMV β (Clontech Cat# 6177-1, figure 7) a été digéré par *Sall* et *SmaI* pour isoler le fragment *Sall-SmaI* de 3679 pb contenant le gène *lacZ* ainsi que le signal de poly-adénylation du gène tardif du virus SV40. Ce fragment a été inséré dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Sall* et *EcoRV*, pour donner le plasmide pCD002 de 6625 pb (figure 7). Ce plasmide contient le gène reporter *lacZ* mais aucun promoteur
- 20 n'est situé en amont de ce gène.

- Le virus MCMV souche Smith a été obtenu de l'American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (ATCC N° VR-194). Ce virus a été cultivé sur cellules d'embryon de souris Balb/C et l'ADN viral de ce virus a été préparé comme décrit par Ebeling A. et al. (J. Virol. 1983. 47. 421-433). Cet ADN génomique viral a été digéré
- 25 par *PstI* pour isoler le fragment *PstI-PstI* de 2285 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *PstI* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pCD004 (figure 7). Le plasmide pCD004 a été digéré par *HpaI*

et *Pst*I pour isoler le fragment *Hpa*I-*Pst*I de 1389 pb qui contient la région promotrice/activatrice du gène Immediate-Early du cytomégaloVirus murin (Murine CytoMegalovirus = MCMV) (Dorsch-Häsler K. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 1985. 82. 8325-8329, et demande de brevet WO-A-87/03905). Ce fragment a été cloné dans le

5 plasmide pCD002, préalablement digéré par *Pst*I et *Sma*I, pour donner le plasmide pCD009 de 8007 pb (figure 7).

Un oligonucléotide double brin a été obtenu par hybridation des deux oligonucléotides suivants :

MB070 (SEQ ID NO:6)

10 5' CGAATTCAGTAGTGTGTGTCTGCAGGCGGCCGCGTGTGTGTCTGACGGTAC
3'

MB071 (SEQ ID NO:7)

5' CGTCGACACACACGCGGCCGCCTGCAGACACACACTAGTGAATTCGAGCT
3'

15 Cet oligonucléotide double brin a été ligaturé avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Kpn*I et *Sac*I, pour donner le plasmide pEL067 (figure 8).

Le plasmide pCD009 a été digéré par *Pst*I et *Spe*I pour isoler le fragment *Pst*I-*Spe*I de 1396 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL067, préalablement digéré par *Pst*I et *Spe*I, pour donner le plasmide pEL068 de 4297 pb (figure 8). Le plasmide

20 pEL024 (voir exemple 6, paragraphe 6.1 et figure 5) a été digéré par *Hind*III et *Not*I pour isoler le fragment *Hind*III-*Not*I de 1390 pb (fragment A). Le plasmide pEL027 (voir exemple 6, paragraphe 6.1 et figure 5) a été digéré par *Hind*III et *Sal*I pour isoler le fragment *Hind*III-*Sal*I de 235 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL068, préalablement digéré par *Not*I et *Sal*I, pour donner

25 le plasmide pEL070 de 5908 pb (figure 8). Ce plasmide contient donc une cassette d'expression constituée du promoteur IE du MCMV, du gène VP2 et du signal polyA de SV40.

7.2 - Construction du plasmide donneur pEL170

Le plasmide pEL070 a été digéré par *Eco*RI, *Sal*I et *Xmn*I pour isoler le fragment *Eco*RI-*Sal*I de 3035 pb. Ce fragment a été ligaturé dans le plasmide pEL168 (voir exemple 5

30

et figure 3), préalablement digéré par *EcoRI* et *SalI*, pour donner le plasmide pEL170 de 7602 pb (figure 9). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/IBDV-VP2 dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

7.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV14

- 5 Le virus vILTV14 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL170 préalablement linéarisé par l'enzyme *BssHII* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

10 **Exemple 8: Construction du plasmide donneur pEL171 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène HN du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement de vILTV15:**

8.1 - Clonage du gène HN du virus de la maladie de Newcastle (NDV)

- La constitution d'une banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (NDV), souche Texas, a été réalisée comme décrit par Taylor J. *et al.* (J. Virol. 1990. **64**. 1441-1450). Un clone pBR322 contenant la fin du gène fusion (F), la totalité du gène hémagglutinine-neuraminidase (HN) et le début du gène de la polymérase a été identifié pHN01. La séquence du gène NDV HN contenue sur ce clone est présentée sur la figure 10 (SEQ ID NO:8). Le plasmide pHN01 a été digéré par *SphI* et *XbaI* pour isoler le fragment *SphI-XbaI* de 2520 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pUC19, préalablement digéré par *SphI* et *XbaI*, pour donner le plasmide pHN02 de 5192 pb. Le plasmide pHN02 a été digéré par *ClaI* et *PstI* pour isoler le fragment *ClaI-PstI* de 700 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL071 (SEQ ID NO:9) 5' CAGACCAAGCTTCTTAAATCCC 3'

- 25 EL073 (SEQ ID NO:10) 5' GTATTCGGGACAATGC 3'

et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 270 pb. Ce fragment a été digéré par *HindIII* et *PstI* pour isoler un fragment *HindIII-PstI* de 220 pb (fragment B).

Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *ClaI* et *HindIII*, pour donner le plasmide pEL028 de 3872 pb (figure 11). Le plasmide pHN02 a été digéré par *BspHI* et *ClaI* pour isoler le fragment *BspHI-ClaI* de 425 pb (fragment C). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

5 EL074 (SEQ ID NO:11) 5' GTGACATCACTAGCGTCATCC 3'

EL075 (SEQ ID NO:12)

5' CCGCATCATCAGCGGCCGCGATCGGTCATGGACAGT 3'

et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 465 pb. Ce fragment a été digéré par *BspHI* et *NotI* pour isoler le fragment *BspHI-NotI* de 390 pb (fragment D). Les

10 fragments C et D ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *ClaI* et *NotI*, pour donner le plasmide pEL029bis de 3727 pb (figure 11). Le plasmide pEL028 a été digéré par *ClaI* et *SacII* pour isoler le fragment *ClaI-SacII* de 960 pb (fragment E). Le plasmide pEL029bis a été digéré par *ClaI* et *NotI* pour isoler le fragment *ClaI-NotI* de 820 pb (fragment F). Les fragments E et F ont été ligaturés
15 ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *NotI* et *SacII*, pour donner le plasmide pEL030 de 4745 pb (figure 11).

8.2 - Construction du plasmide pEL171 contenant une cassette d'expression de HN du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E

20 Le plasmide pEL030 a été digéré par *NotI* pour isoler le fragment *NotI-NotI* de 1780 pb (gène NDV HN entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NotI* du plasmide pEL170 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NotI-NotI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL171 de 7978 pb (figure 12). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression
25 MCMV-IE/NDV-HN dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

8.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV15

Le virus vILTV15 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL171 préalablement linéarisé par l'enzyme *BssHII* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/NDV HN dans le site
30 intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 9: Construction du plasmide donneur pEL172 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène F du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement de vILTV16:

9.1 - Clonage du gène F du virus de la maladie de Newcastle (NDV)

5 Un clone provenant de la banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (voir exemple 8, paragraphe 8.1) et contenant le gène fusion (F) en entier a été appelé pNDV81. Ce plasmide a été décrit précédemment et la séquence du gène NDV F présent sur ce clone a été publiée (Taylor J. *et al.* J. Virol., 1990, **64**, 1441-1450). Le plasmide pNDV81 a été digéré par *NarI* et *PstI* pour isoler le fragment

10 *NarI-PstI* de 1870 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL076 (SEQ ID N° 13) 5' TGACCCTGTCTGGGATGA 3'

EL077 (SEQ ID N° 14)

5' GGATCCCGGTCGACACATTGCGGCCGCAAGATGGGC 3'

15 et la matrice pNDV81 pour produire un fragment de 160 pb. Ce fragment a été digéré par *PstI* et *SalI* pour isoler le fragment *PstI-SalI* de 130 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *ClaI* et *SalI*, pour donner le plasmide pEL033 de 4846 pb (figure 13).

20 *9.2 - Construction du plasmide pEL172 contenant une cassette d'expression du gène F du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E*

Le plasmide pEL033 a été digéré par *NotI* pour isoler le fragment *NotI-NotI* de 1935 pb (gène F entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NotI* du plasmide pEL170 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NotI-NotI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL172

25 de 8131 pb (figure 14). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/NDV-F dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

9.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV16

Le virus vILTV16 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide

pEL172 préalablement linéarisé par l'enzyme *Bss*HII et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/NDV F dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 10: Construction d'un plasmide donneur pour l'insertion d'une double cassette d'expression des gènes HN et F du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement d'un virus recombinant ILTV:

Une double cassette d'expression de deux gènes, par exemple les gènes HN et F du virus NDV, peut être construite. Une telle construction est schématisée à la figure 15. Dans cette construction, l'extrémité 5' des deux promoteurs sont adjacentes de manière que la transcription des deux gènes se fasse en sens opposés. Un des deux promoteurs est le promoteur MCMV IE et l'autre promoteur (appelé promoteur associé) est le promoteur SV40 (présent dans le plasmide pSVbeta, Clontech Laboratories, Palo Alto, California 94303-4607, USA). Dans cette configuration, le promoteur associé est activé par la région activatrice du promoteur CMV IE.

Cette double cassette d'expression peut ensuite être insérée dans le plasmide donneur décrit ci-dessus (pEL168 décrit dans l' exemple 5 et représenté dans la figure 3).

L'isolement des virus recombinants se fait de la même manière que ci-dessus (voir exemple 3).

Exemple 11: Construction du plasmide donneur pEL181 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène gB du MDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement de vILTV17:

11.1 - Clonage du gène gB du virus de la maladie de Marek

Le fragment *Eco*RI-*Sal*I de 3,9 kpb de l'ADN génomique du virus MDV souche RB1B contenant le gène MDV gB (séquence publiée par Ross N. *et al.* J. Gen. Virol. 1989. 70, 1789-1804) a été ligaturé avec le vecteur pUC13, préalablement digéré par *Eco*RI et *Sal*I, pour donner le plasmide pCD007 de 6543 pb (figure 16). Ce plasmide a été digéré par *Sac*I et *Xba*I pour isoler le fragment *Sac*I-*Xba*I de 2260 pb (partie centrale du gène gB = fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD001 (SEQ ID NO:15)

5' GACTGGTACCGCGGCCGCATGCACTTTTTAGGCGGAATTG 3'

CD002 (SEQ ID NO:16) 5' TTCGGGACATTTTCGCGG 3'

et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 222 pb. Ce fragment a été digéré par *KpnI* et *XbaI* pour isoler un fragment *KpnI-XbaI* de 190 pb (extrémité 5' du gène gB = fragment B). Une autre PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD003 (SEQ ID NO:17) 5' TATATGGCGTTAGTCTCC 3'

CD004 (SEQ ID NO:18)

5' TTGCGAGCTCGCGGCCGCTTATTACACAGCATCATCTTCTG 3'

et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 195 pb. Ce fragment a été digéré par *SacI* et *SacII* pour isoler le fragment *SacI-SacII* de 162 pb (extrémité 3' du gène gB = fragment C). Les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *KpnI* et *SacI*, pour donner le plasmide pCD011 de 5485 pb (figure 16).

11.2 - Construction du plasmide pEL181 contenant une cassette d'expression du gène gB du MDV dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV

Le plasmide pCD011 a été digéré par *NotI* pour isoler le fragment *NotI-NotI* de 2608 pb (gène gB MDV entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NotI* du plasmide pEL170 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NotI-NotI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL181 de 8806 pb (figure 17). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/MDV-gB dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

11.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV17

Le virus vILTV17 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL181 préalablement linéarisé par l'enzyme *BssHII* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/MDV gB dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 12: Construction d'un plasmide donneur pour l'insertion d'une cassette d'expression de gène(s) de l'IBV dans le site intergénique entre les COLs D et E et

isolement de virus recombinant ILTV:

Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de simples cassettes (exemples 6, 7, 8, 9 et 11) ou pour l'insertion de doubles cassettes (exemple 10), dans le site décrit ci-dessus (exemple 5), il est possible de réaliser des virus ILTV recombinaux exprimant à un niveau élevé les protéines Membrane (M) ou Spike (S), ou partie de Spike (S1 ou S2), ou Nucléocapside (N) du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV). On réalise notamment une double cassette d'expression avec le gène S sous contrôle du promoteur CMV IE et le gène M sous contrôle du promoteur associé.

Exemple 13: Construction de plasmides donneurs pour l'insertion de cassettes d'expression de gène(s) d'autres agents pathogènes aviaires ou de peptide immunomodulateur dans le site décrit et isolement de virus recombinants ILTV:

Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de simples cassettes (exemples 6, 7, 8, 9 et 11), ou pour l'insertion de doubles cassettes (exemple 10), dans le site décrit ci-dessus (exemple 5), il est possible de réaliser des virus ILTV recombinaux exprimant à un niveau élevé des immunogènes du CAV (et notamment une double cassette d'expression des gènes codant pour VP1 et pour VP2), du virus de la pneumonivirose du poulet, ou d'autres agents pathogènes aviaires, ou encore des peptides immunomodulateurs et notamment des cytokines.

Exemple 14: Production de vaccins:

Les virus recombinants obtenus selon l'invention sont produits sur oeufs embryonnés. La solution virale récoltée est ensuite diluée dans une solution stabilisatrice pour la lyophilisation, répartie à raison de 1000 doses vaccinales par flacon, et enfin lyophilisée.

REVENDICATIONS

1 - Vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, un virus ILTV comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, cette séquence nucléotidique étant insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé
5 entre les codons stop des COL D et COL E d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la SEQ ID NO:1.

2 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les séquences nucléotidiques sont insérées par insertion simple, ou après délétion
10 totale ou partielle du locus d'insertion.

3 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que, pour exprimer la séquence nucléotidique insérée, le vecteur comprend un promoteur eucaryote fort.

4 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 3, caractérisé en ce que le
15 promoteur fort est choisi parmi le groupe consistant en: promoteur CMV immediate-early, de préférence le promoteur CMV immediate-early murin ou humain, promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous (RSV), promoteur précoce du virus SV40.

5 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux séquences nucléotidiques insérées dans
20 le locus d'insertion sous le contrôle de promoteurs eucaryotes différents.

6 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que les promoteurs eucaryotes sont des promoteurs CMV immediate-early d'origines animales différentes.

7 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il
25 comprend une première séquence nucléotidique associée au promoteur CMV immediate

early et un autre promoteur sous la dépendance duquel se trouve une autre séquence nucléotidique, ces deux promoteurs étant disposés de manière que leurs extrémités 5' soient adjacentes.

5 8 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend, insérée dans le locus d'insertion, une cassette d'expression comprenant successivement un promoteur, deux ou plusieurs gènes séparés deux à deux par un IRES, et un signal de polyadénylation.

10 9 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, cette séquence étant insérée dans le locus d'insertion.

15 10 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour un antigène d'un agent pathogène aviaire choisi parmi le groupe consistant en le virus de la maladie de Newcastle (NDV), le virus de la maladie de Gumboro (IBDV), le virus de la maladie de Marek (MDV), le virus de la bronchite infectieuse (IBV), le virus de l'anémie du poulet (CAV), le virus de la pneumovirose du poulet.

20 11 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique, choisie parmi les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides F et HN du virus NDV.

12 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique, choisie parmi les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides gB, gC, gD, gH+gL du virus MDV.

25 13 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe des séquences

correspondant aux antigènes VP2 de l'IBDV, aux antigènes S, ou partie de S, M et N du virus IBV, aux antigènes VP1 et VP2 du CAV, aux antigènes G et F du virus de la pneumovirose du poulet.

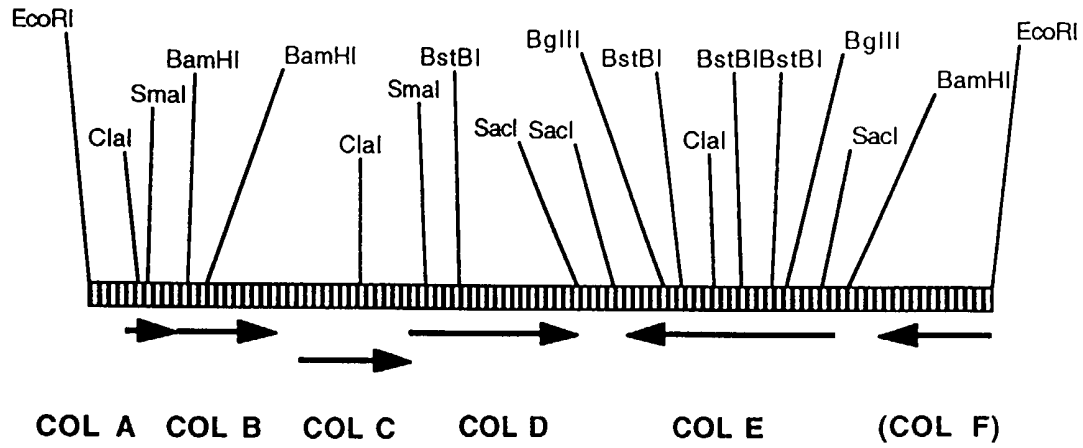
- 5 14 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide immunomodulateur, cette séquence étant insérée dans le locus d'insertion.

15 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que cette séquence nucléotidique est choisie parmi le groupe des séquences codant pour des cytokines.

- 10 16 - Formule de vaccin multivalent comprenant, en mélange ou à mélanger, au moins deux vaccins vivants recombinants tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 15, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes.

- 15 17 - Un virus ILTV comprenant au moins un séquence nucléotidique hétérologue insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé entre les codons stop des COL D et COL E d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la SEQ ID NO:1.

1/25



Partie séquencée (7082 pb)

FIG. 1

2/25

FIG. 2

EcoRI

1 GAATTCCTAAGCTTGCTTTGTGCAACCAGTTTGTTTTCTTTTGGGGGGAGGGTAGCACACA
 61 CTCTGCCCCGAGTCTCGGCATTGACTTAACAGTGATGTGAAACCCGGAAGATCGAGCATGA
 121 ACTAATAGCATTAAAGAATTGTTATCCGAGGAATAATCGTGACGCGAATTTACTCGACC
 181 GCTAAAATCTTTCTTCTACTGAGCTGGATACGTGAAATTTGGTGAGTATAACCTCTCGGG

COL A

241 ATACATAGCTTTTAAATACGGGGCGTGCAATATTAAATTCTGCACTCGGGGCTGCAATGG
 1► MetG
 301 AGCGCGGAGCTTTATTTGACAAGACCGCCAATTGCAAGGACTGGGTCTCGATCGGGACTA
 2► luArgGlyAlaLeuPheAspLysThrAlaAsnCysLysAspTrpValSerIleGlyThrT

Clal

361 CTGTGTGGGGCGCGATCGATGCAGATGACGGGGACGACTTAGTCTGGGATTATGAAAATA
 22► hrValTrpGlyAlaIleAspAlaAspAspGlyAspAspLeuValTrpAspTyrGluAsnS

SmaI

421 GCCCATATCCAAGCATAGTTTCCTCACTATTCCTCGGGGAAGAAACGGACTCGGCAATTT
 42► erProTyrProSerIleValSerSerLeuPheProGlyGluGluThrAspSerAlaIleC
 481 GTAACCTCTGTTGTTGCCGCAAACCCCTGTAGCATACCTCCTGGGCGGCAGCGTTTGGCAT
 62► ysAsnSerValValAlaAlaAsnProCysSerIleProProGlyArgGlnArgLeuAlaT
 541 GGCCATGCTGCTGTTTTCTGTCGGCCAGACAGCTTCTCCGTCCTCCGCGCGTGGAAGTTAATG
 82► rpProCysCysCysPheArgArgProAspSerPheSerValProArgValGluValAsnA
 601 CTCGCCCTGTGTCGCGCGTTGCACTGATAATTTTCTCATTGCTTGTAGTGATCTGTGTTG
 102► laArgLeuValAlaAlaValAlaLeuIleIlePheSerLeuLeuValValIleCysValA

COL B

661 CGTCATATTGGGGTAACATGCTTTCAGAGGACACATCGGGATTCCCTAACGCCCCCGCA
 122► laSerTyrTrpGly. 1► MetSerSerGluAspThrSerGlyPheLeuThrProProAla

BamHI

721 AGTGATGACGACACTGACCCTTCCGAGCCACCACCAAATTTATGGGATCCTCACCAGGAC
 15► SerAspAspAspThrAspProSerGluProProProAsnLeuTrpAspProHisGlnAsp
 781 GATTTTCCGAGGGACGCTGATTCCCCAAACCCACTTTTCTACCCCTGGGATGACTCTGTG
 35► AspPheProArgAspAlaAspSerProAsnProLeuPheTyrProTrpAspAspSerVal
 841 AATAATACTGGGGATACGGGCAGTAACGAAGATGACTATGTAGATATGGGAGGGGTAGGT
 55► AsnAsnThrGlyAspThrGlySerAsnGluAspAspTyrValAspMetGlyGlyValGly

BamHI

901 GGATCCGAAGACTATGAAGACCTCGGTACGGGCGGGGACTCTGACTATGACAATGTATCT
 75► GlySerGluAspTyrGluAspLeuGlyThrGlyGlyAspSerAspTyrAspAsnValSer
 961 ACAGCGACCGGCGGGACGTGGTTTCCCTTCCCTTACTTCTTGGTCATCAGAGGACCACGGC
 95► ThrAlaThrGlyGlyThrTrpPheProSerLeuThrSerTipSerSerGluAspHisGly
 1021 CCAACTTCTCCGAAAAACCCCTATGCAACAACCTCAAGTAACAATTCAGCAGGATTCAGAT
 115► ProThrSerProGluAsnProMetGlnGlnLeuGlnValThrIleGlnGlnAspSerAsp
 1081 CCACAGCAGGAACCCGATCCCCAGCAAGTTCCCGGTCTCCAGCAGGAACCTGACCCCCAG
 135► ProGlnGlnGluProAspProGlnGlnValProGlyLeuGlnGlnGluProAspProGln
 1141 CAAGATCCACGAGAGCCTCGTGATCCTCCTCCCTATAGTCCGCCCCCAGAGGACCCCTTTT
 155► GlnAspProArgGluProArgAspProProProTyrSerProProProGluAspProPhe
 1201 GGGCTCTCGCCATTTACTAGTGGGATGGGCGGGTTTGGGCCACCGTGGCGTGGCCCCAGC
 175► GlyLeuSerProPheThrSerGlyMetGlyGlyPheGlyProProTrpArgGlyProSer

1261 CACCCTCGTATGATGAGGCAATGGGGATGGACCTTTTACTACGACTGGGGGTCGGCGCAG
195▶ *HisProArgMetMetArgGlnTrpGlyMetAspLeuLeuLeuArgLeuGlyValGlyAsp*
1321 CTTGCTCACGCAGGCGCGGTCTCGCGGCTCTCGAGGTGCATCTCGGCGACGCAATTGGT
215▶ *LeuAlaHisAlaGlyAlaValValAlaGlyLeuGluValAspLeuGlyAspAlaIleGly*
1381 GTGCAGCAAAGTTGTGCTCAGAGGCATGTTTGTGGCATCTCTTTTGGGTTGGAGTGGCCT
235▶ *ValGlnGlnSerCysAlaGlnArgHisValCysGlyIleSerPheGlyLeuGluTrpPro*
1441 TAATGTGTTGGTGGCTCTTGTATCTTATTTTGCGCATTTGTCTGGGGACAGACTCCGGGAT
255▶ ...
1501 AAGGAAGGTTGTATCCGCATCCAGTACTCTCAATAAAAGCGTGGTGGTGCTACACGATG
XbaI
1561 TCTGTTAATTTTACAACCTCCATTTTACAGGTGATCTAGAGAGACGCTGAGTGGCACTTGT
COL C
1621 CCCGACGGGACCATGCAGTCGAACAGCAGCGATGAGGCCCAGTGTGATGATGTCGAGGAG
1▶ *MetGlnSerAsnSerSerAspGluAlaGlnCysAspAspValGluGlu*
1681 GGATGGTTCGTCCATAGCTCCAGGTGATGCACTGGATACAGATTTTCATTCCAGGGCCTTGT
17▶ *GlyTrpSerSerIleAlaProGlyAspAlaLeuAspThrAspPheIleProGlyProCys*
1741 GCCACGTCCATACATGGTATATCCAAGGCAGTTTATTTTTTTCTGTGTGGAGTTAATCTG
37▶ *AlaThrSerIleHisGlyIleSerLysAlaValTyrPhePheLeuCysGlyValAsnLeu*
1801 GAGGAATGTAGTACACTCCACAGCATGTCCAATCTCACCCATATGGACATCCTGAGCTG
57▶ *GluGluCysSerThrLeuProGlnHisValGlnSerHisProTyrGlyHisProGluLeu*
1861 AAATCAGGCAAATGGTACAAGAGGTTTTTGTCTCCGGGCTAGGCGAAATTGGAGATACAAGC
77▶ *LysSerGlyLysTrpTyrLysArgPheCysSerGlyLeuGlyGluIleGlyAspThrSer*
1921 CAGTGTCTAGCTGACACGACTATGCTGCACCTTCCGGAATGCCGGCACAGATTTTGGGCCCT
97▶ *GlnCysGlnLeuThrArgLeuCysCysThrSerGlyMetProAlaGlnIlePheGlyPro*
1981 TCGAGATTTCAGGTCTCTGCAACAGAAGCCAACCCATATGCGGGCCCCAAGATTTGCTCACT
117▶ *SerArgPheArgSerLeuGlnGlnLysProThrHisMetArgAlaGlnAspLeuLeuThr*
2041 AGGCCTTGCCATATACTAGAGTTCGATGTTGGCGCTGACCTAATCAATCTTTTCTTGTAT
137▶ *ArgProCysHisIleLeuGluPheAspValGlyAlaAspLeuIleAsnLeuPheLeuTyr*
Clal
2101 ATGGAACCATGTTTCAGGGAATCGATATTGCGTACATTTAGGATACCATAAACTAATGCC
157▶ *MetGluProCysSerGlyAsnArgTyrCysValHisLeuGlyTyrHisLysThrAsnAla*
2161 ATGCGTGTTTTTGAGCGGTGGTGGGATTCTATGGGCAGACTTCCGTGGAAGGACAACACC
177▶ *MetArgValLeuSerGlyGlyGlyIleLeuTrpGlyArgLeuProTrpLysAspAsnThr*
2221 GAGGAGCACGGGTACTCGTTGCCATATGCGAGTATTTGGGATCAAATTGCCCCATAAAGTT
197▶ *GluGluHisGlyTyrSerLeuProMetArgValPheGlyIleLysLeuProHisLysVal*
2281 TATGTGGCATGTCTGCTGCCCTGCAACTCGGACGGAACCTATTATTTGGTGAGGGGGGGGTAT

4/25

Fig-2 (suite 2)

217► TyrValAlaCysArgCysProAlaThrArgThrGluLeuLeuPheGlyGluGlyGlyVal
 2341 GGATTCAACGCGGAAAACCTTTAAACAGTGC GGACGGTTGAAAAAGACTGTGAATGTCTG

 237► GlyPheAsnAlaGluAsnPheLysGlnCysGlyArgLeuLysLysGluCysGluCysLeu
 2401 CAGAAGGCTTGTTTTACTGCAAAACGGTGTAGGTGCGGCATGTAAGTTTACTGTATAC

 257► GlnLysAlaCysPheThrAlaGlnThrValLeuGlyAlaAlaCysLysPheThrValTyr
 COL D
 2461 TCGAGCAAGGGACGAGGTCAAGAAATTCTGCTATATCAGGACCCATGAATGCTACAACGG
 1► MetAsnAlaThrThrV
 277► SerSerLysGlyArgGlyGlnGluIleLeuLeuTyrGlnAspPro...
 2521 TAATGCCTGTAGTACTGGGTATGTTAAGTAGAGAACCCACAGGTGTGCAGGTACACTCA
 6► alMetProValValLeuGlyMetLeuSerArgGluProHisArgCysAlaGlyThrLeuI
 2581 TACTGTCCAGGTCTCTGGAATTGCCGTGGATTTTCATGAGACCCAACACGATATTCCCA
 26► leLeuSerArgSerSerGlyAsnCysArgGlyPheHisGluThrGlnHisAspIleProT
 Smal
 2641 CTAACCCGGGTCTGTATCCTCTGTGTAATCATGAGCACCCCTTACTATGTGACAGTTACAG
 46► hrAsnProGlyLeuTyrProLeuCysAsnHisGluHisProTyrTyrValThrValThrA
 2701 ATGTATGCGGCAACTGTTGTTTCATGGCTTGAGCGGGTTTTTGGGAGAGTAGCTGCCCTG
 66► spValCysGlyAsnCysCysSerTrpLeuGluArgValPheGlyArgValAlaAlaProA
 2761 CTGGTCTAAGCTCCGTATCTGTATCCATTAAAGGCTCCACCCACAGCGGGACTGACGTGA
 86► laGlyLeuSerSerValSerValSerIleLysGlySerThrHisSerGlyThrAspValT
 2821 CAGAAGAACGTGAAGAGGACTCAGGGACACAGCAAACCTCCCACGACAAATTGCCGGAGC
 106► hrGluGluArgGluGluAspSerGlyThrGlnGlnThrSerHisAspLysLeuProGluA
 BstBI
 2881 GCAACCGCATGGGAGATCAAAATTCGAATTTGCGGGGAAGAGATCAATATTTGGCCGCCTG
 126► rgAsnArgMetGlyAspGlnAsnSerAsnLeuArgGlyArgAspGlnTyrTrpProProA
 2941 CCCACACCGTAGTCATTGTCACTCGGATTTTATATTTCGATGAACCTGAGCCAGAAAAGTG
 146► laProHisArgSerHisCysHisSerAspPheIlePheAspGluProGluProGluSerG
 3001 GGGAAAGACGTGCATAACATGCATCCTCCACGAGGTGCAGATGAGCAAACAGCCGCTTCTG
 166► lyGluAspValHisAsnMetHisProProArgGlyAlaAspGluGlnThrAlaAlaSerV
 3061 TGTCAGCGCTAATGCAAAGTCTAGCACAAGCATTGGTGAGTGCACAAGCTATTAGCAGCA
 186► alSerAlaLeuMetGlnSerLeuAlaGlnAlaLeuValSerAlaGlnAlaIleSerSerM
 3121 TGGTCTCTGGCTCTGCTTCCTCAGTGGGCGTAGAAGTAGACTGTGGGTACAGTCAGACTC
 206► etValSerGlySerAlaSerSerValGlyValGluValAspCysGlyTyrSerGlnThrH
 3181 ATATTACAGAGGGGCCGGGAGGGAACAATTCGGTAGAGTCCCAGAAAGAGGGCCAGAGT
 226► isIleThrGluGlyProGlyArgGluGlnPheGlyArgValProGluArgGlyProGluT
 3241 ATCCTCAAGATTACTGTGATATATATGGTCCTGTAAGTAATGGGCCTGCTGGATACAGAG
 246► yrProGlnAspTyrCysAspIleTyrGlyProValSerAsnGlyProAlaGlyTyrArgA
 3301 CAGGACCACCAGATGCTCCTAGTATACAAGATAGGACCTTCCCATGCGGCAGAAGATGCG
 266► laGlyProProAspAlaProSerIleGlnAspArgThrPheProCysGlyArgArgCysA
 3361 ACGAAGCATGGCTTGCTTAGAAGTAGGAATATGCCTTGGATTTCTTCTGGTTCACATA
 286► spGluAlaTlpLeuAlaLeuGluValGlyAsnMetProTrpIleSerSerGlySerHisS
 3421 GTCCACCTTCTCAGTATCATAACCCCTTATGGTTACATAGTCCACCTTCCCAGTCTCATA
 306► erProProSerGlnTyrHisAsnProTyrGlySerHisSerProProSerGlnSerHisA
 3481 ACCCTTATGGTACATATAGTCCGCCTTCTCAGTCTCATAACCCCTTATGGCTCATATAGTC
 326► snProTyrGlyThrTyrSerProProSerGlnSerHisAsnProTyrGlySerTyrSerP
 3541 CGCCTTCCCAGTATCATAACCCCTTGTGGTACATATAGTCCGCCTTCTCAGTCTCGTAAGC
 346► roProSerGlnTyrHisAsnProCysGlyThrTyrSerProProSerGlnSerArgLysH

5/25

FIG. 2 (Suite 3)

3601 ATGACTATTACCTCCATATCCGATACTCAAACCAAAGCCTCGATTACCCCCAGGCTTTG
 366▶ *isAspTyrSerProProTyrProIleLeuLysProLysProArgLeuProProGlyPheG*
 3661 AAAATACTGCTGGGATGTGGCCTCGATGTCCCCCTGGGTTTGAGGGGCGTCCATACAAAT
 386▶ *luAsnThrAlaGlyMetTrpProArgCysProProGlyPheGluGlyArgProTyrLysS*
 3721 CTGGGGGCATGGGTAACCTTTCTGGAAGTGCATGGACGGTAATAGATAGGGGTCTAACC
 406▶ *erGlyGlyMetGlyAsnPheProGlySerAlaTrpThrValIleAspArgGlySerAsnG*
 3781 AATGGCCAGCAGACGTGCGGGGGCCATTCTCAGATCAACGATGGGCCCCACAGAGCATG
 426▶ *lnTrpProAlaAspValArgGlyProPheSerAspGlnArgTrpAlaProThrGluHisG*
 SacI
 3841 AAACGCGACGTTTTTTCGGGTATTACAGCTGAGCTCTCATCATACCCATAACTCCACTCA
 446▶ *luThrArgArgPheCysGlyTyrTyrSer...*
 3901 TAACCCAAGGCCCATAAATCCATAACTCATAACATAAAATTCATACTTTCCGGTCGTCCAG
 3961 GGCACCACGTCATCAACAAGGATTGCAGATAAAATAAAATGCTCCACGTTGTGGTGTCC
 4021 GTTGTATTGTATTCTTTATTATACCTCCGTAATTTTCGAGAGTCGGGGAACATTCTAAAA
 4081 ATTTTAACCGTGCAATACTACAGTGTATTTACAAGGCCGGATTGCAACAGTGAACCTATT
 SacI
 4141 ACATCATTGAGCTCGCGGCGCCATCTGCTGACCAGTCCACAGAGATGGCAATCTTCAGAA
 4201 ACGTAGGATGGCACCAATTCCAATACAATACCGCCATCTGTCGATAGGTGTATAGAACTG
 4261 TCAAAAACAAGTCGCAAGAGAAAAATTTCCCTACTGTATACTGGCGGCTTAGCAGCTGCGC
 545▶ *...PheLeuAspCysSerPhePheLysGlyValThrTyrGlnArgSerLeuLeuGlnAla*
 4321 ACAAAACCACTCTGCATTCTCTTTGCGGCACACATTTGCGTGCTGCGCCAGAACGAGTGG
 525▶ *CysValValArgCysGluGluLysArgCysValAsnAlaHisGlnAlaLeuValLeuPro*
 4381 GATTTTTTTAGAACAGGTCCCAGGATAGTACATGTCCCACAATGTTCTGCGCGGGTCTAT
 505▶ *IleLysLysSerCysThrGlyProTyrTyrMetAspTrpLeuThrArgAlaProAspIle*
 4441 TGCCTTTATGATTTCATGACCATGGCCTCTGGTCGCGGATACACAATTCTTGAGAACCGGTC
 485▶ *AlaLysHisAsnMetValMetAlaGluProArgProTyrValIleArgSerPheArgAsp*
 BglII
 4501 GAAGAAGGTCAGTAATAAAGTTAAAGGACATTTTTCGCTACTCAGCGATAGCTCCTGAGA
 465▶ *PhePheThrLeuLeuLeuThrLeuProCysLysAlaSerSerLeuSerLeuGluGlnSer*
 4561 TCTAGTGGTATCTCTTAGTTGACTGCCAATGCTAGAGAGATAACACGGCAGGATTGGCCC
 445▶ *ArgThrThrAspArgLeuGlnSerGlyIleSerSerLeuTyrCysProLeuIleProGly*
 4621 CAGATGCATGGCTAGAGATTGACATGCGCAGTAGATGTTAGAGAAGATAGGATCGTGGGG
 425▶ *LeuHisMetAlaLeuSerGlnCysAlaCysTyrIleAsnSerPheIleProAspHisPro*
 BstBI SphI
 4681 GTAAATCCTTTTCATCTTCGAACCTGATGCCAAAGCATCCATACAAGTGTCTCATCGCATGC
 405▶ *TyrIleArgGluAspGluPheGlnHisTrpLeuMetTrpValLeuThrGluAspCysAla*
 4741 AAAAAGTAGCTCTTCAATGAGCAGTTCGCCAAATATACAGCTCGTGAAATTTTTTGCCAA
 385▶ *PheLeuLeuGluGluPheSerCysAsnAlaLeuTyrValAlaArgSerIleLysAlaLeu*
 4801 CCTGGCTATATCCGGACGCGATGTCCAGCGGCCCTTTCAGTGAAGCTGCGCGCCCAAAAA
 365▶ *ArgAlaIleAspProArgSerThrTrpArgGlyLysLeuSerAlaAlaArgGlyCysPhe*
 4861 CTGCTTCCACGAAGTGAATGCAGCATCTGCTGCAAGGTCAGATGATCCCGAAGACAAAAA
 345▶ *GlnLysTrpSerThrPheAlaAlaAspAlaAlaLeuAspSerSerGlySerSerLeuPhe*
 Clal
 4921 TGCTGGAAAGCAGATTCTCTATCAGATCGATATCATCACAATCATCATCATCCACTGC
 325▶ *AlaProPheCysIleGlyArgAspArgAspIleAspAspCysAspAspAspValAla*
 4981 CCGGTTTACCATGTCTAAAAGACATTTCTGATTTTCTAATCTTAACTCTTCAGTAATGCA
 305▶ *ArgAsnValMetAspLeuLeuCysLysGlnAsnGluLeuArgLeuGluGluThrIleCys*

FIG-2(SUITE 4)

6/25

5041 CTTTCCGAGACCGCCAAATGCAGTTGCGGCCTTTTCAAAATATTGGGCCGGTGTACGTT
 285 LysGlyLeuGlyGlyPheAlaThrAlaAlaLysGluPheTyrGlnAlaProThrValAsn
 5101 TCGCAACTCCTTCGTTTCGGTCCGTGATGACGTTGGGCATCGGACAAAGTCTCTCCAAAT
 265 ArgLeuGluLysThrGluThrArgSerSerThrProCysArgValPheAspArgTrpIle

BstBI

5161 CGGTCTTCGAAGTTCATCCCGATTCTTTCCCAAGACCTGCGCGAATGCTTCAACGAAAC
 245 ProArgArgLeuGluAspArgAsnArgGluTrpSerArgArgSerHisLysLeuSerVal
 5221 AGTAAAGATAGGCGCCCTATATCGCTTTTCTGGTGTAACCTGCACGGCGCCTGGGTCTAGG
 225 ThrPheIleProAlaArgTyrArgLysGluProThrGlyAlaArgArgArgProArgPro
 5281 GGGGATGCCTCTTCGGACTTGATATGCGCACGGCCTCTCATAAACTTATTTTCGAGGGCT
 205 ProIleGlyArgArgValGlnIleHisAlaArgGlyArgMetPheLysAsnArgProSer
 5341 ACTGACCCGCCTTATGGAAGACCGTACGCTCATACCTGACTGGTTCTCGTAACGGGAACG
 185 SerValArgArgIleSerSerArgValSerMetGlySerGlnAsnGluTyrArgSerArg

BstBI

5401 AGGCTCGCCATTTCGAATAGCGACGGCGCCCCCTGTACGTGAATCACGGACTCGTTTGA
 165 ProGluGlyAsnSerTyrArgArgArgGlyArgAspArgSerAspArgValArgLysSer

BglII

5461 GCTACCGCGCCCAGATGACCGGATCTGGAGCTACTTTCTGTAGAATGAGATCTGCGGCG
 145 SerGlyArgGlySerSerArgSerArgSerSerSerGluThrSerHisSerArgArgArg
 5521 AATACAATGTGCTTCGTGGCGGGATTCTGACCTCGAGCGTGAACGGCCATCCAGGCGATC
 125 IleCysHisAlaGluHisArgSerGluSerArgSerArgSerArgGlyAspLeuArgAsp
 5581 TTTTGTCTTTCCGTTGCTGATCTCGCTTCGCTATGAGTACTTGTATTGGAAGATGATCT
 105 LysThrArgGluThrAlaSerArgAlaGluSerHisThrSerThrAsnSerSerSerArg
 5641 GGAACGTGTCTCACGCCTATCTTTATTTATTCCAGATTCTCCGGTCTCCCCATCGCAGT
 85 SerArgThrGluArgArgAspLysAsnIleGlySerLysGluProArgGlyMetAlaThr
 5701 CAGTGGGTTGATGTACCGCGTGCACGTCAAAAAAATGAAACCGCATAACACACGGTTGA
 65 LeuProAsnIleTyrArgThrCysThrLeuPhePheSerValAlaTyrValValThrSer

SacI

5761 GACTTCTACGGACTCAGAACAGGTGTCGAGCTCGGAGCAGGTGCTGAGAGGTAAGCTGAC
 45 ValGluValSerGluSerCysThrAspLeuGluSerCysThrSerLeuProLeuSerVal
 5821 AGTAATCTGGCACGCTGTTTGGCAGCTAATCCACTTGGCTTTTGAATGGTCTGGGCCACT
 25 ThrIleGlnCysAlaThrGlnSerSerIleTrpLysAlaLysSerHisAspProGlySer

COL E

5881 CCCAGTATACGTCATAACACATACACTGGAACCCACAACTACAATTGCGGTCCAGTAGT
 5 GlyThrTyrThrMet

BamHI

5941 TGGTGCGAAATATTCACGCAGACATAATAATCTGCGAGAACTTCTGCGGATCCGACATGT
 6001 AACTTAATCCCGTAATGTAGTGCGGCATACCGTCTAAACCGCAAACATCCGCTTAGTAGA
 6061 ACACGCCCTAAAATCACCCACGAGTATACTTTGTACATTCTGACCGCCAGATGTTACTCC
 6121 TTTCAAACAATGATACTCAGCCGTTAGAAGTAGGGCTGTCTTCAAATGGACCAAATTCAG
 6181 ACACAATACCGCACAAACGTGTTTTAACATTTTATTGCCGTTCAAGGCCCGAACAAATTTGT
 287 ...ProGlyPheLeuLysAs

6241 TTTGTATCTTCTGTTTCGTATTTAAATGCAATTATTACAATGCTCGCAATCGCAGCCACGC
 280 nGlnIleLysGlnGluTyrLysPheAlaIleIleValIleSerAlaIleAlaAlaValCys
 6301 ACAATGCACGCAAGACTAAGCTCGAAGCAATATTGGCAAGGCATGAAGTCAAGATACTGG
 260 sLeuAlaArgLeuValLeuSerSerAlaIleAsnAlaLeuCysSerThrLeuIleSerPr
 6361 GAGGTTTCGATGCGGAGACTTTAGTCTTTGCCGGAGTCGTGTAACCCATCAGTGATAAGA
 240 oProLysSerAlaSerValLysThrLysAlaProThrThrTyrGlyMetLeuSerLeuLe
 XbaI

6421 GTTCTAGAACCGCTGAGACAATTACATATACCCAAGCACTAATTTTTACGTGTTTCATGTA
 220 uGluLeuValAlaSerValIleValTyrValTrpAlaSerIleLysValHisGluHisLe

7/25

Fig. 2 (FIN)

6481 AAATATATGCACACGGATCATAGCAAATCCGCAATGTCATGGTGGACATAATAAGCGATG
200 *u*IleTyrAlaCysProAspTyrCysIleArgLeuThrMetThrSerMetIleLeuSerAl
6541 CTAAATATAAACCGATCTCGAGTGTTCAGTAGTAAGACCCCTGGATTACAGACGCAA
180 *a*LeuTyrLeuGlyIleGluLeuThrLysLeuLeuLeuValGlyProAsnCysValCysPh
6601 ATCCTAGAGGGTCTGCTACGTAGTTCAAGCTTTTGCAATCTCGGAGATGTTCAAATTC
160 *e*GlyLeuProAspAlaValTyrAsnLeuSerLysCysAspArgLeuHisGluPheGluAr
6661 TCAAAAACCGTTGCATCTTTGTGTATGGCACCCGTAATATCAGCCTCGAAGTAAACGCTG
140 *g*LeuPheArgGlnMetLysThrTyrProValArgLeuIleLeuArgSerThrPheAlaTh
6721 TCCAGTAGTTAAGATGATATGCATCCATCGCAATGCGTTCTCGCGGCAGACATAGCCCGA
120 *r*TrpTyrAsnLeuHisTyrAlaAspMetAlaIleArgGluArgProLeuCysLeuGlyPh
6781 ACATTCGCCTCTGGCGACGGGTCAGCAAGTAACATATGTACAATACCGTCGAAATGAATG
100 *e*MetArgArgGlnArgArgThrLeuLeuTyrCysIleTyrLeuValThrSerIlePheAl
6841 CAACTCTGATCTGGGAAAACCATATGTAAAGCAGACAGTCTGCCACTTCCATGACGAATA
80 *a*ValArgIleGlnSerPheTrpIleTyrLeuLeuCysAspAlaValGluMetValPheVa
6901 CTGTTCTTTGGCCGGTGGGATCAAGACGAGAAATGAGTACAGTCTCATTTTCAAATAAG
60 *l*ThrArgGlnGlyThrProAspLeuArgSerIleLeuValThrGluAsnGluPheTyrAl
6961 CTCCTTTAACACATCTCGTCTGGTGGTTCTCGTAGTTGTTTAGACGCTGTGTATATTTTG
40 *a*GlyLysValCysArgThrGlnHisAsnGluTyrAsnAsnLeuArgGlnThrTyrLysTh
EcoRI
7021 TGAGGACATAAACTAGTGAAGAATTAAATGTAGCGGGGGGTGGTGAACAGGATTGAATT
20 *r*LeuValTyrValLeuSerSerAsnPheThrAlaProProGlnHisValProAsnPheGl
(COL F)
7081 CC
0 *u*

8/25

I-PCR

matrice pEL133

1-PCR EL005/EL006
Digestion
BstBI-EcoRI

2-PCR EL007/EL008
Digestion
BglIII-EcoRI

II-CLONAGE

dans pEL167
digéré ClaI-BamHI

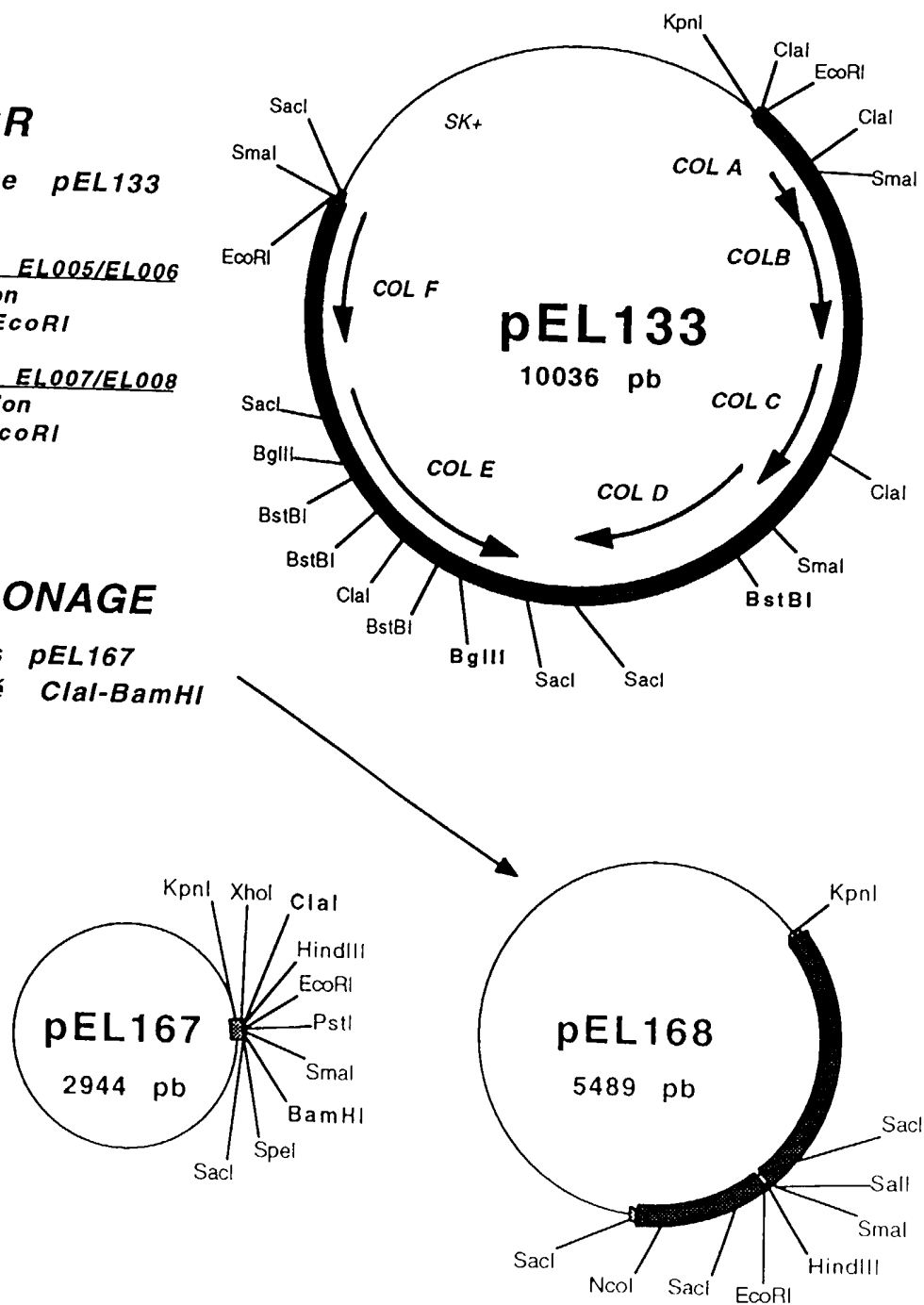
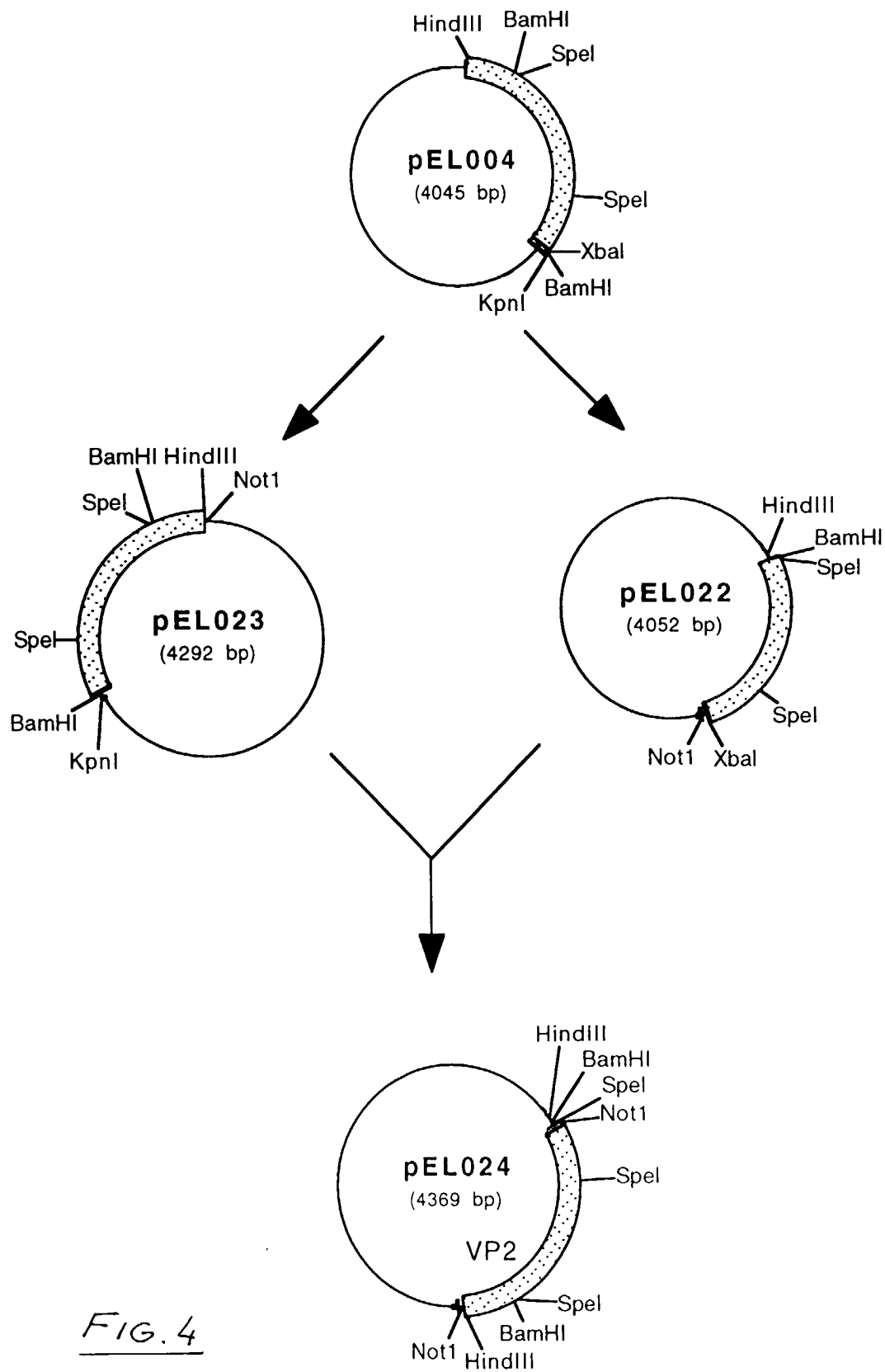
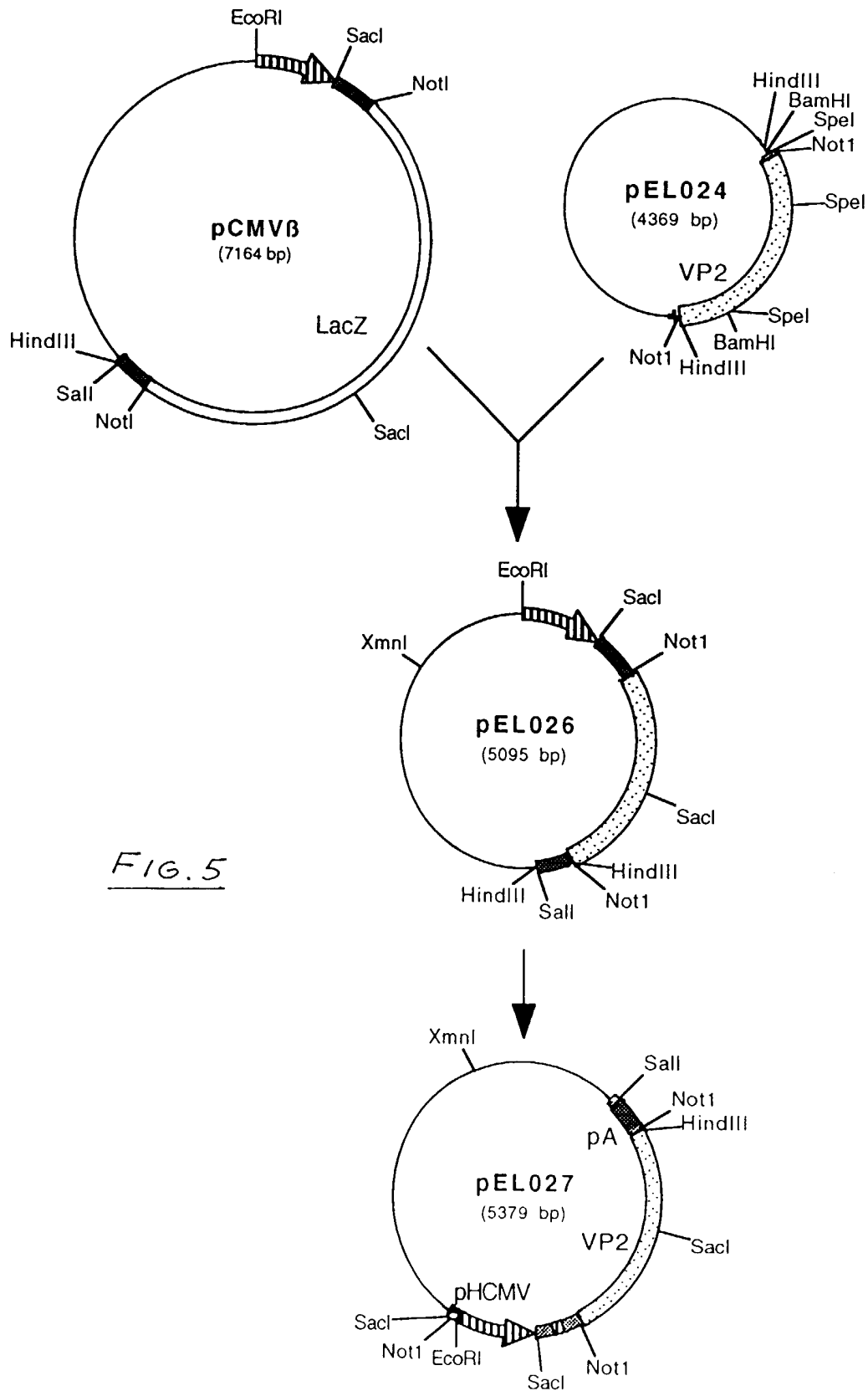


FIG. 3

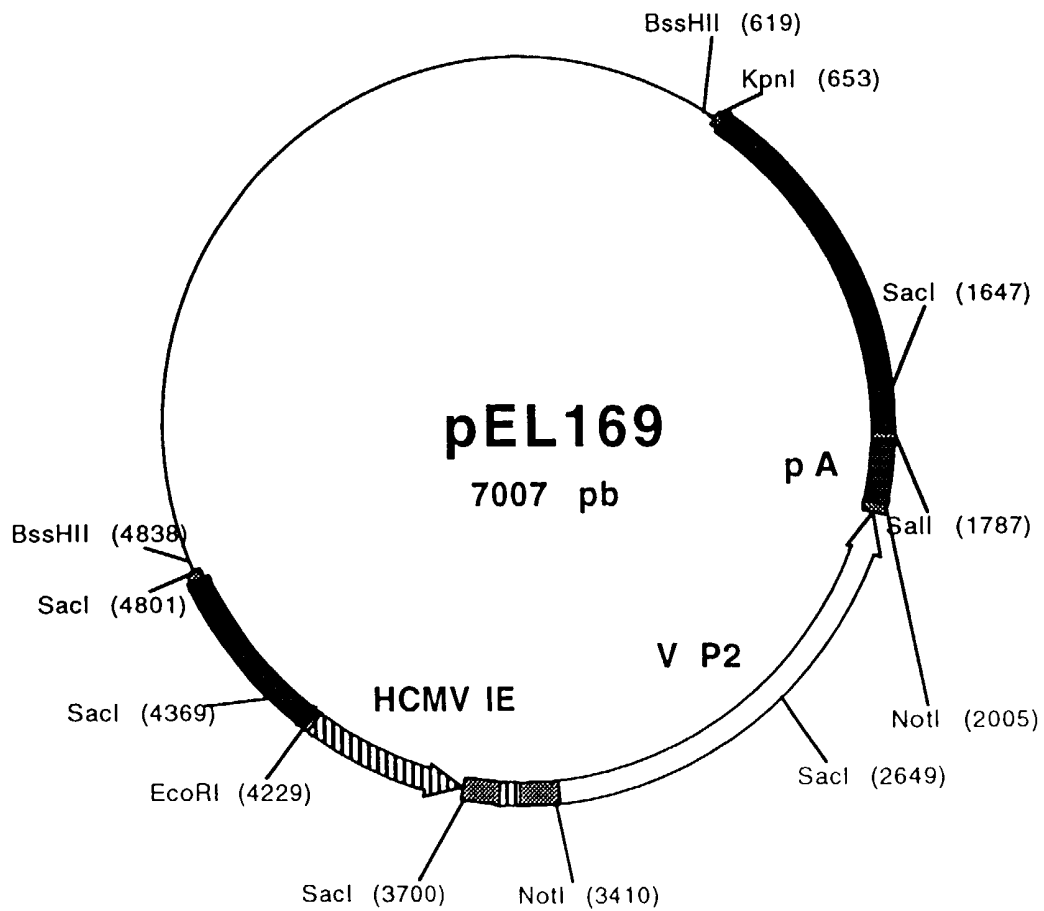
9/25

FIG. 4

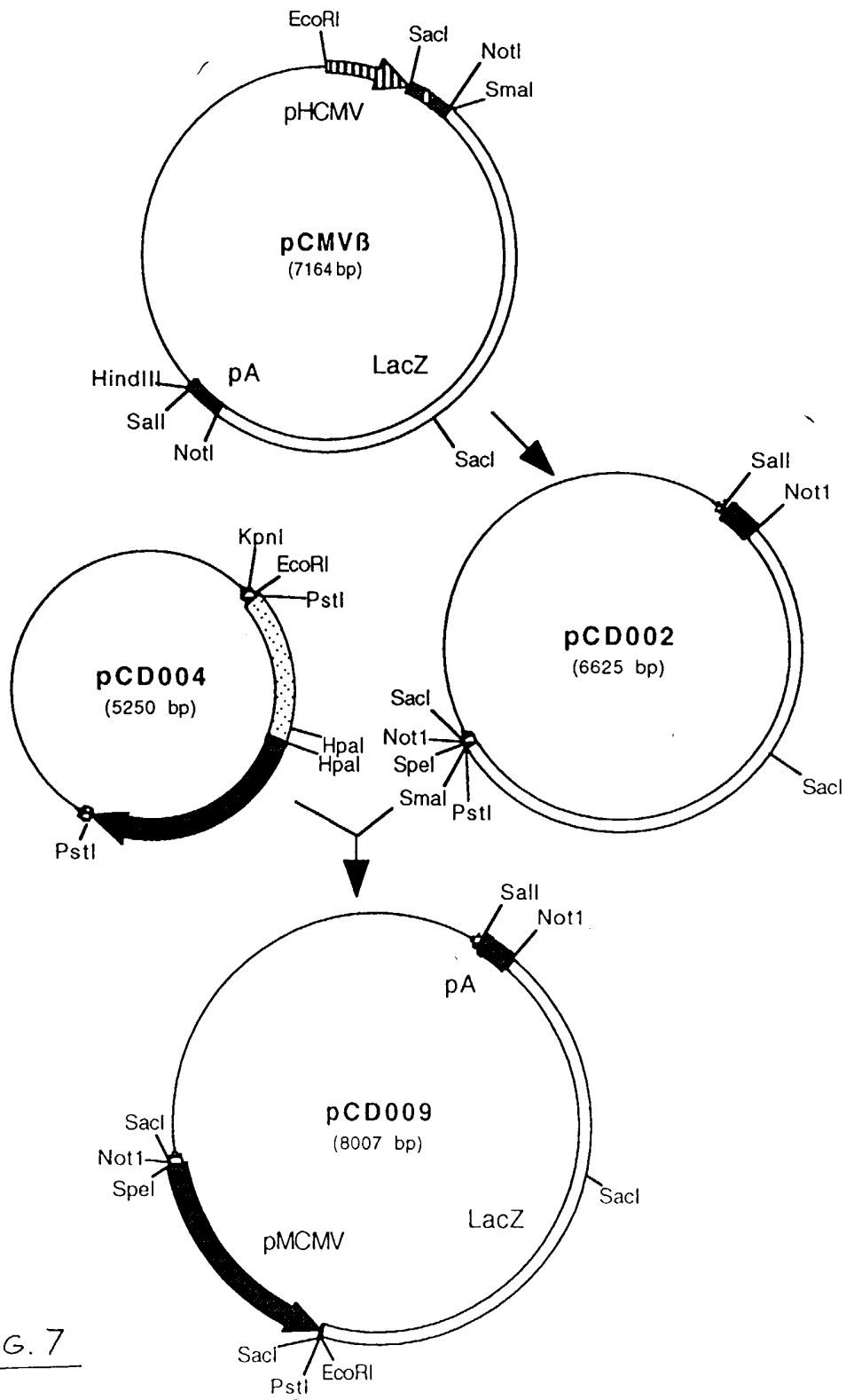
10/25



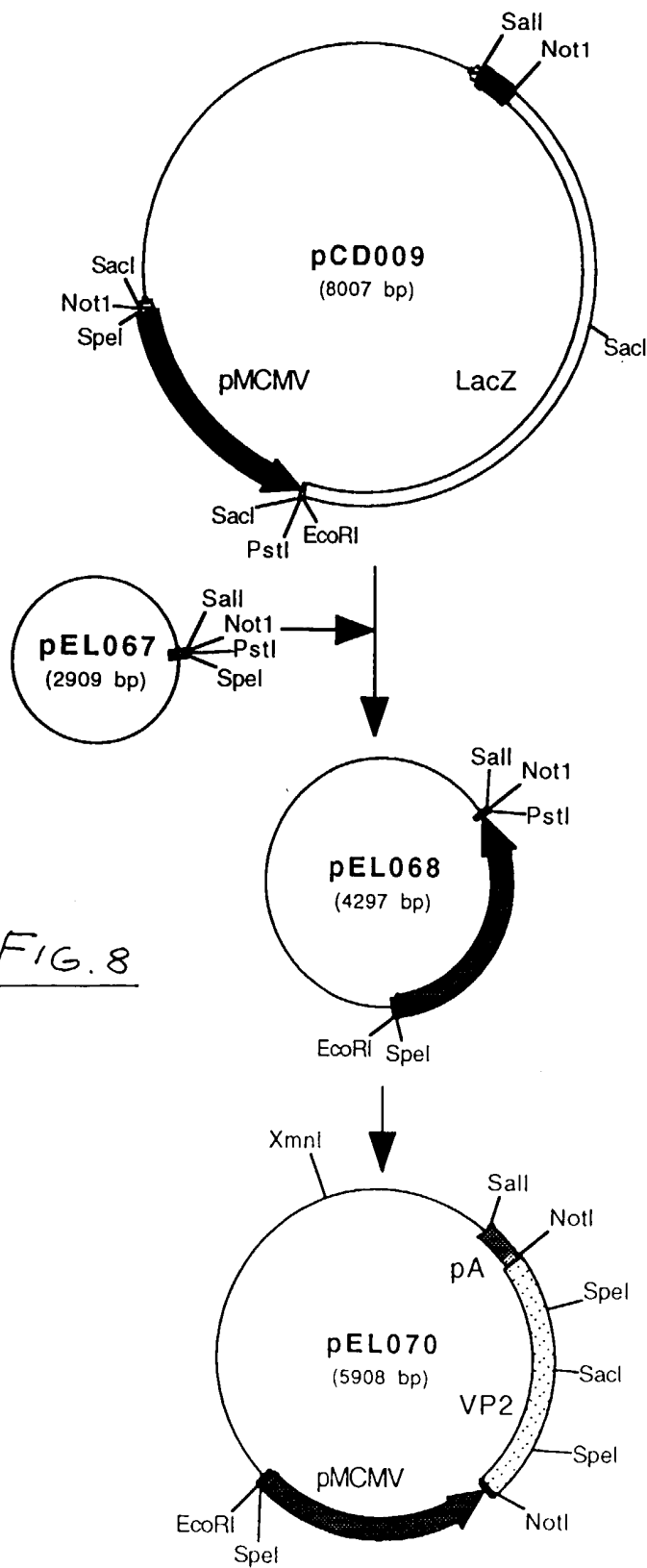
11/25

FIG. 6

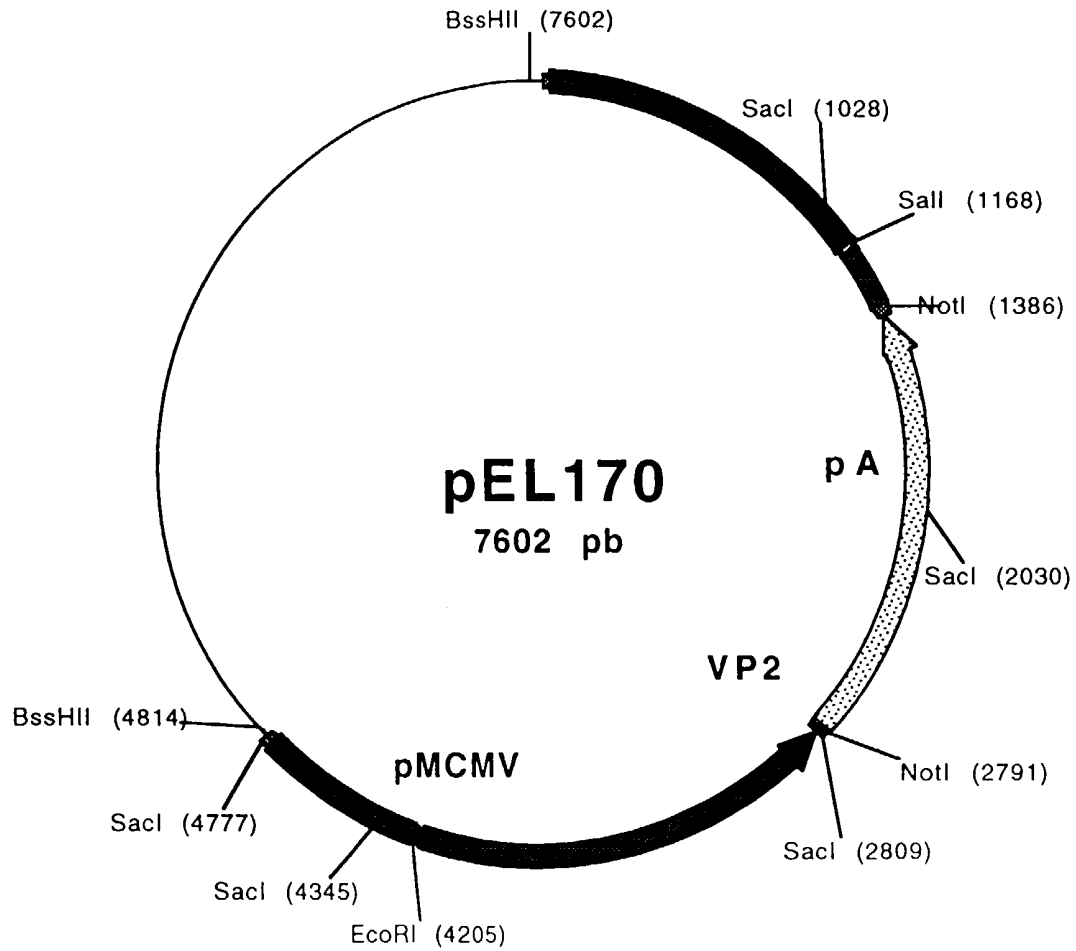
12/25

FIG. 7

13/25



14/25

FIG. 9

15/25

FIG. 10

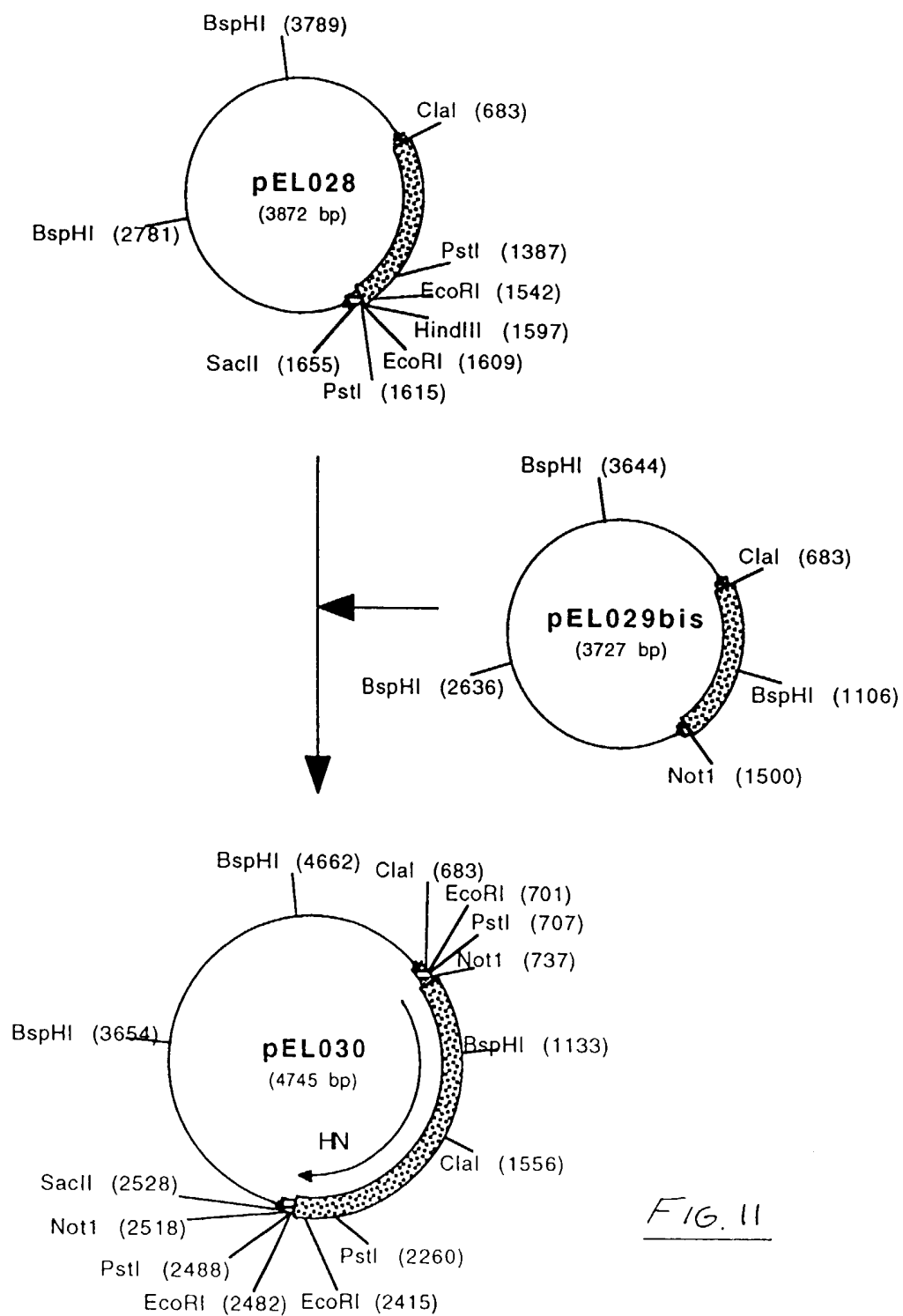
1 TGCTACCTGATGTACAAGCAAAAGGCACAACAAAAGACCTTGTTATGGCTTGGGAATAAT
 61 ACCCTTGATCAGATGAGAGCCACTACAAAATATGAATACAAACGAGAGGCGGAGGTATC
 121 CCCAATAGCAATTTGCGTGTAATTTCTGGCAACCTGTTAATTAGAAGAATTAAGAAAAAA
 181 CCACTGGATGTAAGTGACAAACAAGCAATACACGGGTAGAACGGTCGGAGAAGCCACCCC
 241 TCAATCGGGAATCAGGCCTCACAACGTCCTTTCTACCGCATCATCAATAGCAGACTTCGG
 301 TCATGGACCGTGCAAGTTAGCAGAGTTGCGCTAGAGAATGAAGAAAGAGAAGCAAAGAATA
 1▶MetAspArgAlaValSerArgValAlaLeuGluAsnGluGluArgGluAlaLysAsnT
 361 CATGGCGCTTTGTATTCCGGATTGCAATCTTACTTTTAATAGTAACAACCTTAGCCATCT
 20▶hrTrpArgPheValPheArgIleAlaIleLeuLeuLeuIleValThrThrLeuAlaIleS
 421 CTGCAACCGCCCTGGTATATAGCATGGAGGCTAGCACGCCTGGCGACCTTGTGGCATAC
 40▶erAlaThrAlaLeuValTyrSerMetGluAlaSerThrProGlyAspLeuValGlyIleP
 481 CGACTATGATCTCTAAGGCAGAAGAAAAGATTACATCTGCACTCAGTTCTAATCAAGATG
 60▶roThrMetIleSerLysAlaGluGluLysIleThrSerAlaLeuSerSerAsnGlnAspV
 541 TAGTAGATAGGATATATAAGCAGGTGGCCCTTGAGTCTCCATTGGCGTTGCTAAACACTG
 80▶alValAspArgIleTyrLysGlnValAlaLeuGluSerProLeuAlaLeuLeuAsnThrG
 601 AATCTGTAATTATGAATGCAATAACGTCTCTCTCTTATCAAATCAATGGAGCTGCAAATA
 100▶luSerValIleMetAsnAlaIleThrSerLeuSerTyrGlnIleAsnGlyAlaAlaAsnA
 BspHl
 661 ATAGCGGGTGTGGGGCACCTGTTTCATGACCCAGATTATATCGGGGGGATAGGCAAAGAAC
 120▶snSerGlyCysGlyAlaProValHisAspProAspTyrIleGlyGlyIleGlyLysGluL
 721 TTATTGTGGATGACGCTAGTGATGTCACATCATTCTATCCCTCTGCGTTCCAAGAACACC
 140▶euIleValAspAspAlaSerAspValThrSerPheTyrProSerAlaPheGlnGluHisL
 781 TGAACCTTTATCCCGGCACCTACTACAGGATCAGGTTGCACTCGGATACCCCTCATTCGACA
 160▶euAsnPheIleProAlaProThrThrGlySerGlyCysThrArgIleProSerPheAspI
 841 TAAGCGCTACCCACTACTGTTACACTCACAATGTGATATTATCTGGTTGCAGAGATCACT
 180▶leSerAlaThrHisTyrCysTyrThrHisAsnValIleLeuSerGlyCysArgAspHisS
 901 CACACTCATATCAGTACTTAGCACTTGGCGTGCTTCGGACATCTGCAACAGGGAGGGTAT
 200▶erHisSerTyrGlnTyrLeuAlaLeuGlyValLeuArgThrSerAlaThrGlyArgValP
 961 TCTTTTCTACTCTGCGTTCCATCAATTTGGATGACAGCCAAAATCGGAAGTCTTGCACTG
 220▶hePheSerThrLeuArgSerIleAsnLeuAspAspSerGlnAsnArgLysSerCysServ
 1021 TGAGTGCAACTCCCTTAGGTTGTGATATGCTGTGCTCTAAAATCACAGAGACTGAGGAAG
 240▶alSerAlaThrProLeuGlyCysAspMetLeuCysSerLysIleThrGluThrGluGluG
 Clal
 1081 AGGATTATAGTTCAATTACGCCTACATCGATGGTGCACGGAAGGTTAGGGTTTTCACGGTC
 260▶luAspTyrSerSerIleThrProThrSerMetValHisGlyArgLeuGlyPheAspGlyG
 1141 AATACCATGAGAAGGACTTAGACGTCATAACTTTATTTAAGGATTTGGGTGGCAAATTACC
 280▶lnTyrHisGluLysAspLeuAspValIleThrLeuPheLysAspTrpValAlaAsnTyrP
 1201 CAGGAGTGGGGGGTGGGTCTTTTATTAACAACCGGTATGGTTCACAGTCTACGGAGGGC
 300▶roGlyValGlyGlyGlySerPheIleAsnAsnArgValTrpPheProValTyrGlyGlyL
 1261 TAAAACCCCAATTTCGCCTAGTGACACCGCACAGAAGGGAGATATGTAATATACAAGCGCT
 320▶euLysProAsnSerProSerAspThrAlaGlnGluGlyArgTyrValIleTyrLysArgT
 1321 ACAATGACACATGCCCAGATGAACAAGATTACCAGATTCCGGATGGCTAAGTCTTCATATA
 340▶yrAsnAspThrCysProAspGluGlnAspTyrGlnIleArgMetAlaLysSerSerTyrL
 1381 AGCCTGGGCGGTTTGGTGGAAAACGCGTACAGCAGGCCATCTTATCTATCAAGGTGTCAA
 360▶ysProGlyArgPheGlyGlyLysArgValGlnGlnAlaIleLeuSerIleLysValSerT
 1441 CATCTTTGGGCGAGGACCCGGTGCTGACTGTACCGCCTAATACAATCACACTCATGGGGG
 380▶hrSerLeuGlyGluAspProValLeuThrValProProAsnThrIleThrLeuMetGlyA
 1501 CCGAACGGAGAGTTCTCACAGTAGGGACATCTCATTTCTTGTACCAGCGAGGGTCTTCAT
 400▶laGluArgArgValLeuThrValGlyThrSerHisPheLeuTyrGlnArgGlySerSerT

16/25

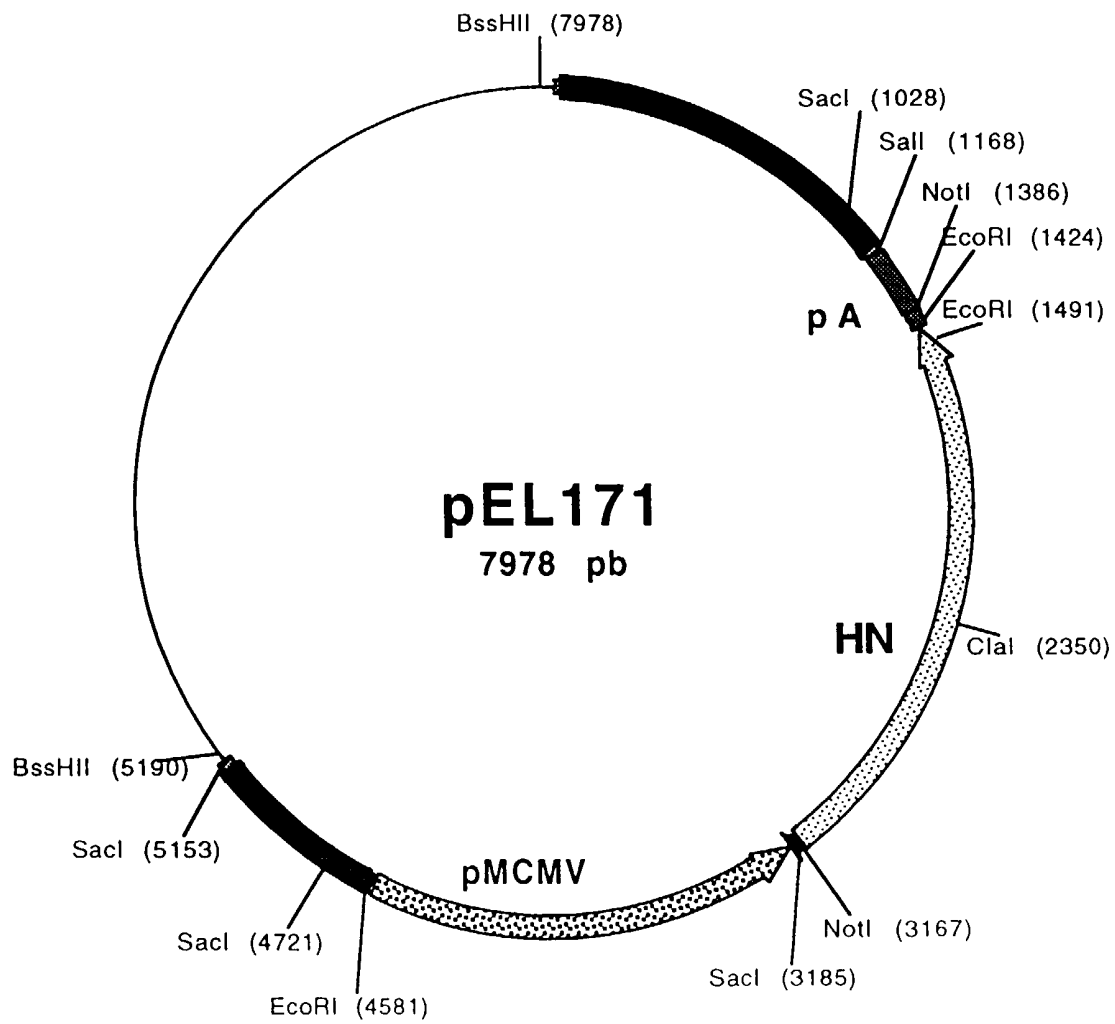
FIG. 10 (FIN)

1561 ACTTCTCTCCTGCTTTATTATACCCTATGACAGTCAACAACAAAACGGCTACTCTTCATA
420 ▶ **yrPheSerProAlaLeuLeuTyrProMetThrValAsnAsnLysThrAlaThrLeuHisS**
1621 GTCCTTACACATTCAATGCTTTCAGTGGCCAGGTAGTGTCCCTTGTCAGGCATCAGCAA
440 ▶ **erProTyrThrPheAsnAlaPheThrArgProGlySerValProCysGlnAlaSerAlaA**
1681 GATGCCCCAACTCATGTGTCACTGGAGTTTATACTGATCCGTATCCCTTAGTCTTCCATA
460 ▶ **rgCysProAsnSerCysValThrGlyValTyrThrAspProTyrProLeuValPheHisA**
1741 GGAACCATACTTGCGGGGGGTATTCCGGGACAATGCTTGATGATGAACAAGCAAGACTTA
480 ▶ **rgAsnHisThrLeuArgGlyValPheGlyThrMetLeuAspAspGluGlnAlaArgLeuA**
PstI
1801 ACCCTGTATCTGCAGTATTTGATAACATATCCCGCAGTCGCATAACCCGGGTAAGTTCAA
500 ▶ **snProValSerAlaValPheAspAsnIleSerArgSerArgIleThrArgValSerSers**
1861 GCCGTACTAAGGCAGCATACACGACATCGACATGTTTTAAAGTTGTCAAGACCAATAAAA
520 ▶ **erArgThrLysAlaAlaTyrThrThrSerThrCysPheLysValValLysThrAsnLysT**
1921 CATATTGCCTCAGCATTGCAGAAATATCCAATACCCTCTTCGGGGAATTCAGGATCGTTC
540 ▶ **hrTyrCysLeuSerIleAlaGluIleSerAsnThrLeuPheGlyGluPheArgIleValP**
1981 CTTTACTAGTTGAGATTCTCAAGGATGATGGGATTTAAGAAGCCAGGTCTGGCCAGTTGA
560 ▶ **roLeuLeuValGluIleLeuLysAsp**
2041 GTCAACTGCGAGAGGGTCGGAAAGATGACATTGTGTACCTTTTTTTTTGTAATGCCAAGG
2101 ATCAAACCTGGATACCGGCGCGAGCCCGAATCCTATGCTGCCAGTCAGCCATAATCAGATA
2161 GTACTAATATGATTAGTCTTAATCTTGTCGATAGTAACCTGGTTAAGAAAAAATATGAGT
2221 GGTAGTGAGATACACAGCTAAACAACACGAGAGATAGCACGGGTAGGACATGGCGAGC
2281 TCCGGTCCCGAAAGGGCAGAGCATCAGATTATCCTACCAGAGTCACATCTGTCTCACC
2341 TTGGTCAAGCACAACTGCTCTATTACTGGAAATTAACCTGGCGTACCGCTTCCTGACGAA
2401 TGTGACTTCGACCACCTCATTATCAGCCGACAATGGAAGAAAATACTTGAATCGGCCACT
2461 CCTGACACTGAGAGGATGATAAAGCTCGGGCGGGCAGTACACCAGACTCTCGACCACCGC
2521 C

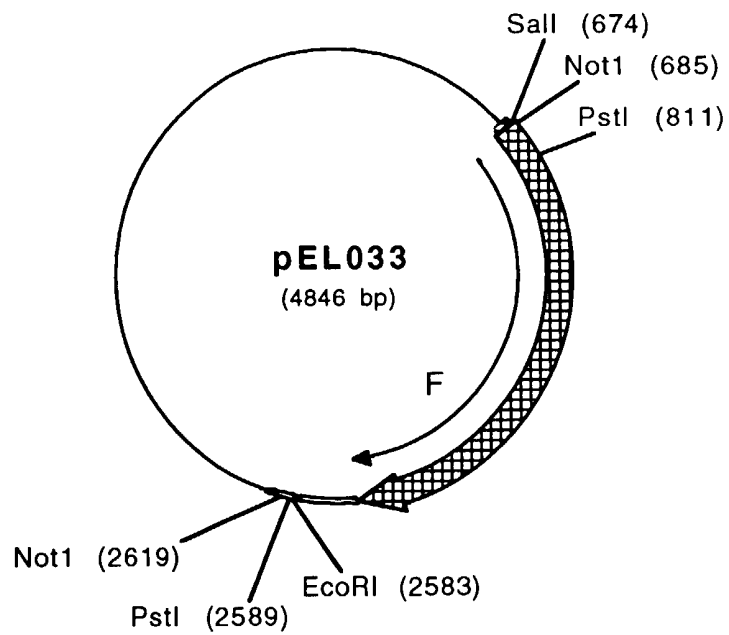
17/25

FIG. 11

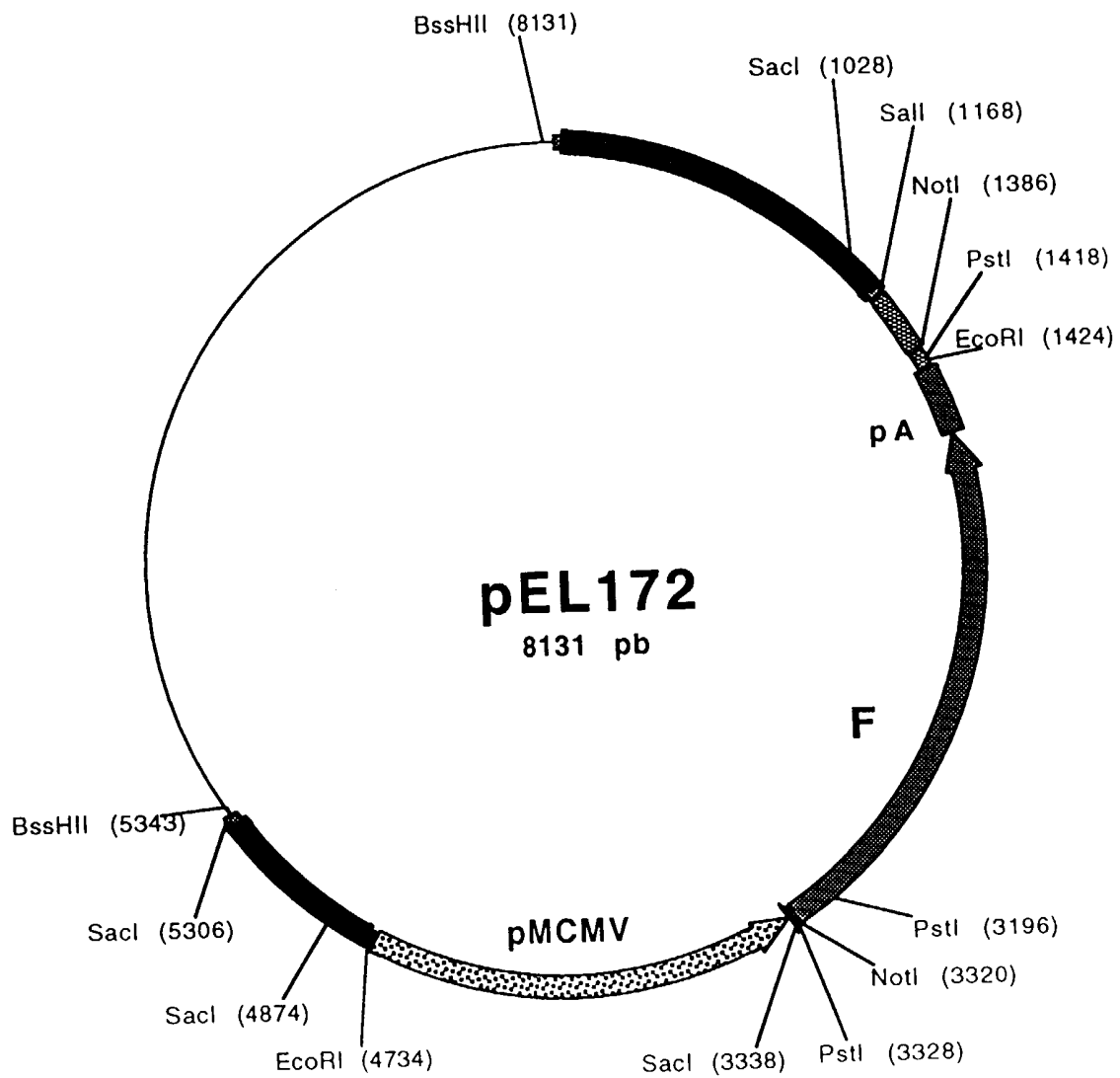
18/25

FIG. 12

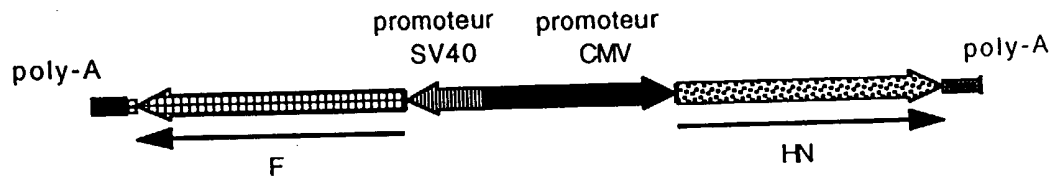
19/25

FIG. 13

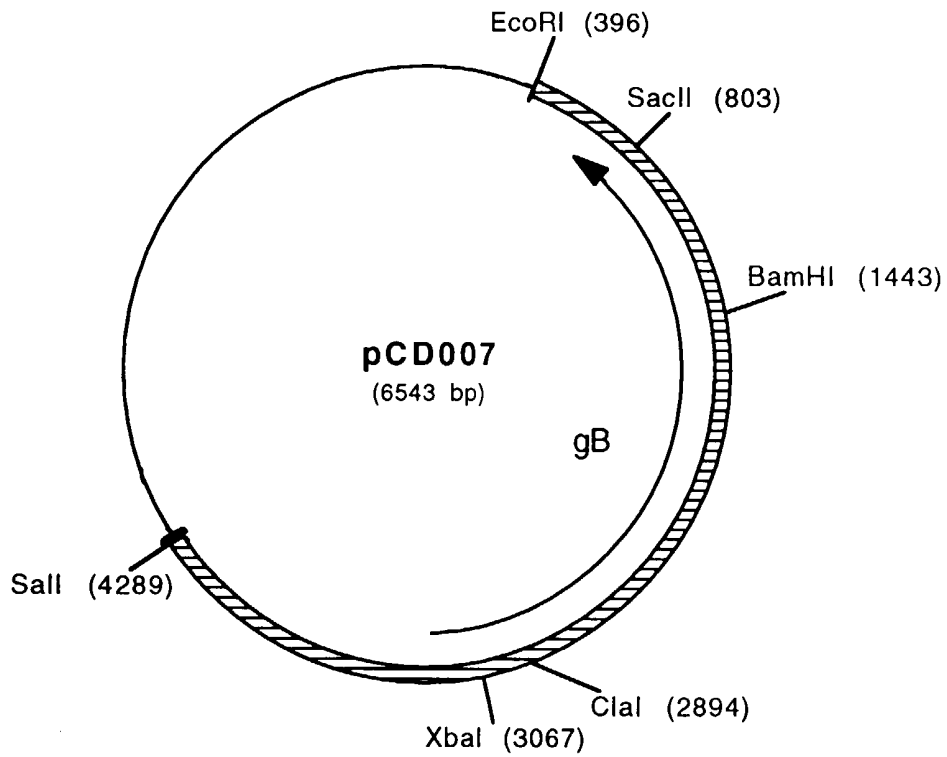
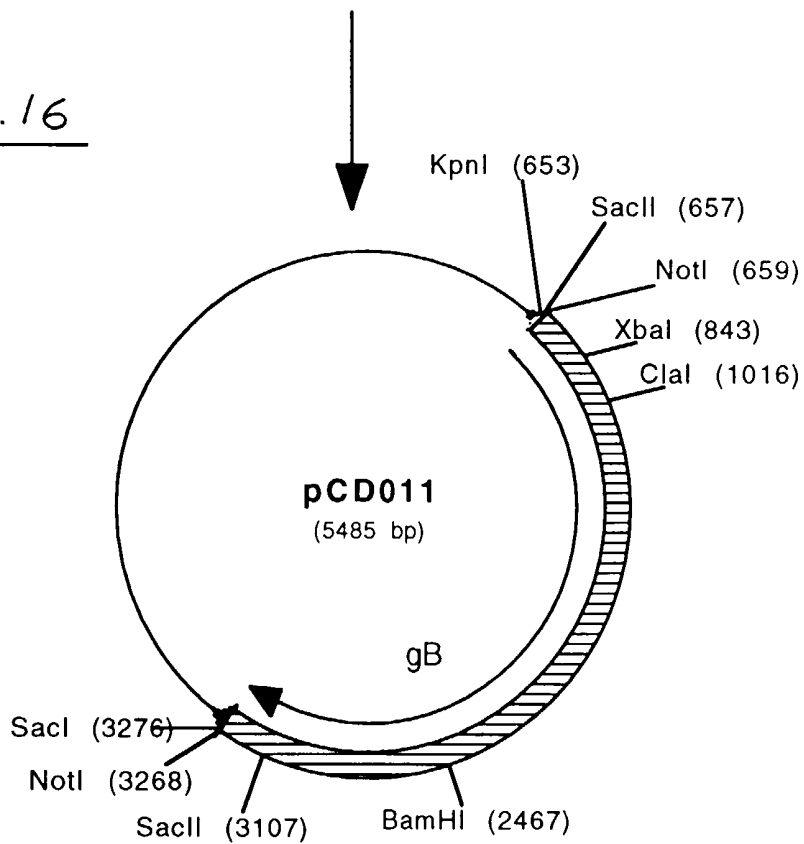
20/25

FIG. 14

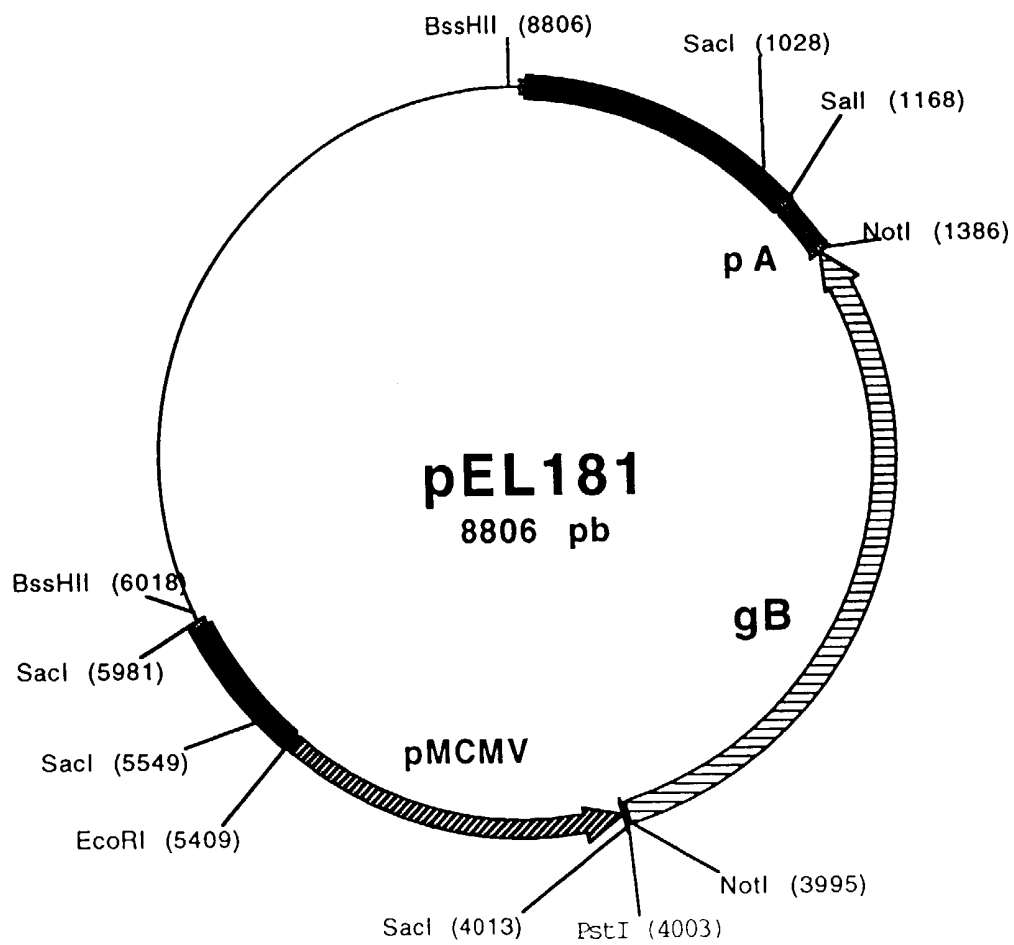
21/25

FIG. 15

22/25

FIG. 16

23/25

FIG. 17

24/25

FIG. 18

EcoRI

(UL53)

1 GAATTCAATCCTGTTACCAACCCCCGCTACATTTAATTCTTCACTAGTTTATGTCCTC
 1▶ *GluPheAsnProValHisGlnProProAlaThrPheAsnSerSerLeuValTyrValLeu*
 61 ACAAATATACACAGCGTCTAAACAACCTACGAGAACCACCAGACGAGATGTGTTAAAGGA
 21▶ *ThrLysTyrThrGlnArgLeuAsnAsnTyrGluAsnHisGlnThrArgCysValLysGly*
 121 GCTTATTTTGAATGAGACTGTACTCATTTCTCGTCTGATCCCCTGGCCAAAGAACAG
 41▶ *AlaTyrPheGluAsnGluThrValLeuIleSerArgLeuIleProLeuAlaLysGluGln*
 181 TATTCGTCATGGAAGTGGCAGACTGTCTCTTTACATATGGTTTTCCAGATCAGAGTTGC
 61▶ *TyrSerSerTrpLysTrpGlnThrValSerLeuHisMetValPheProAspGlnSerCys*
 241 ATTTCCACGGTTATTGTACATATGTTACTTGCTGACCCGTGCCAGAGGCGAATGTTCCGC
 81▶ *IleSerThrValIleValHisMetLeuLeuAlaAspProCysGlnArgArgMetPheGly*
 301 TCTGTCTGCCGCGAGAACGCATTGCGATTGGATGCATATCATCTAACTACTGGACAGCG
 101▶ *SerValCysArgGluAsnAlaLeuArgLeuAspAlaTyrHisLeuAsnTyrTrpThrAla*
 361 TTTACTTCGAGGCTGATATTACGGGTGCCATACACAAAGATGCAACGGTTTTTTGAGGGAA
 121▶ *PheThrSerArgLeuIleLeuArgValProTyrThrLysMetGlnArgPheLeuArgGlu*
 421 TTTGAACATGTCCGAGATTGCAAAAGCTTGAACCTACGTAGCAGACCCCTCTAGGCTTTTGC
 141▶ *PheGluHisValArgAspCysLysSerLeuAsnTyrValAlaAspProLeuGlyPheCys*
 481 ATCTGTAATCCAGGGTCTTAGTACTGAAAACACTCGAGATCGGTTTATATTTAGCATCG
 161▶ *IleCysAsnProGlyValLeuValLeuLysThrLeuGluIleGlyLeuTyrLeuAlaSer*
 541 CTTATTATGTCCACCATGACATTGCGGATTTGCTATGATCCGTGTGCATATATTTTACAT
 181▶ *LeuIleMetSerThrMetThrLeuArgIleCysTyrAspProCysAlaTyrIleLeuHis*
 601 GAACACGTAAAAATTAGTGCTTGGGTATATGTAATTGTCTCAGCGGTTCTAGAACTCTTA
 201▶ *GluHisValLysIleSerAlaTrpValTyrValIleValSerAlaValLeuGluLeuLeu*
 661 TCACTGATGGGTTACACGACTCCGGCAAAGACTAAAGTCTCCGCATCGAAACCTCCCAGT
 221▶ *SerLeuMetGlyTyrThrThrProAlaLysThrLysValSerAlaSerLysProProSer*
 721 ATCTTGACTTCATGCCTTGCCAATATTGCTTCGAGCTTAGTCTTGCGTGCATTGTGCGTG
 241▶ *IleLeuThrSerCysLeuAlaAsnIleAlaSerSerLeuValLeuArgAlaLeuCysVal*
 781 GCTGCGATTGCGAGCATTGTAATAATTGCATTTAAATACGAACAGAAGATACAAAACAA
 261▶ *AlaAlaIleAlaSerIleValIleIleAlaPheLysTyrGluGlnLysIleGlnAsnLys*
 841 TTGTTTCGGGCTTGAACGGCAATAAAATGTTAAAACACGTTGTGCGGTGTTGTGTCTGAA
 281▶ *LeuPheGlyPro...*

901 TTTGGTCCATTTGAAGACAGCCCTAGTTCTAACGGCTGAGTATCATTTGTTTGAAGGAGT
 961 AACATCTGGCGGTCAGAATGTACAAAGTATACTCGTGCGGTGATTTTAGGGCGTGTTCTAC
 1021 TAAGCGGATGTTTGGCGTTTAGACGGCATGCCGCACTACATTACGGGATTAAGTTACATG

BamHI

1081 TCGGATCCGCAGAAGTTCTCGCAGATTATTATGTCTGCGTGAATATTTTCGCACCAACTAC
 1141 TGGATCGCAATTGTAGTTTGTGGGTTCCAGTGTATGTGTTATGACGTATAC'TGGGAGTGG
 1201 CCCAGACCATTCAAAGCCAAGTGGATTAGCTCGCAAACAGCGTGCCAGATTACT'GTTCAG
 1261 CTTACCTTTTCAGCACCTGCTCCGAGCTTGACACCTGTTCTGAGTCCGTAGAAGTCTCAAC
 1321 CGTTGTGTATGCGGTTTCATTTTTTTTACGTCGCACGCGGTACATCAACCCACTGACTGC
 1381 GATGGAGACCGGAGAAATCTGGAAGAAATAAAGATAGCGTGAGACACGTT'CAGAGCATCT
 1441 TCAATACAAGTACTCATAGCGAAGCGAGATCAGCAACGGCCCCGACAAAAGATCGCCCT'G

BgIII

1501 GATGGCCGTTACGCTGAGGTCAGAATCCCGCCACGAAGCACATTGT'ATTCGCCGCAGAT
 1561 CTCATTCTACAGAAAGTAGCTCCAGATCCCGGTT'CATCTGGGCGCGGTACGTCCAAACGA

FIG. 18 (FIN)

UL54

1621 GTCCGTGATTCAAGTGACAGGGGCGCCGTGCTGTTTCGAATGGCGAGGACCTCGTTCCCGC
1▶MetAlaArgProArgSerAr

1681 TTACGAGAACCAGTCAGGTATGAGCGTACGGTCTTCCATAAGGCGGGTCAGTAGCCCTCG
7▶gTyrGluAsnGlnSerGlyMetSerValArgSerSerIleArgArgValSerSerProAr

1741 AAATAAGTTTATGAGAGGCCGTGCGCATATCCAAGTCCGAAGAGGCATCCCCCTAGACC
27▶gAsnLysPheMetArgGlyArgAlaHisIleGlnValArgArgGlyIleProProArgPr

1801 CAGGCGCCGTGCAGGTACACCAGAAAAGCGATATAGGGCGCCTATCTTTACTGTTTCGTT
47▶oArgArgArgAlaGlyThrProGluLysArgTyrArgAlaProIlePheThrValSerLe

1861 GAAGCATTTCGCGCAGGTCTTGGGAAAGAAATCGGGATGAACCTCGAAGACCGATTGAG
67▶uLysHisSerArgArgSerTrpGluArgAsnArgAspGluLeuArgArgProIleTrpAr

1921 AGACTTTGTCCGATGCCCAACGTCATCACGGACCGAAACGAAGGAGTTGCGAAACGTAAC
87▶gAspPheValArgCysProThrSerSerArgThrGluThrLysGluLeuArgAsnValTh

1981 ACCGGCCCAATATTTTGAAGAGGCCGCAACTGCATTGCGCGGTCTCGGAAAGTGCATTAC
107▶rProAlaGlnTyrPheGluLysAlaAlaThrAlaPheGlyGlyLeuGlyLysCysIleTh

2041 TGAAGAGTTAAGATTAGAAAATCAGAAATGCTTTTTAGACATGGTAAACCGGCAGTGGA
127▶rGluGluLeuArgLeuGluAsnGlnLysCysLeuLeuAspMetValAsnArgAlaValAs

Clal

2101 TGATGATGATTGTGATGATATCGATCGTGATAGAGGAATCTGCTTTCCAGCATTTTTGTC
147▶pAspAspAspCysAspAspIleAspArgAspArgGlyIleCysPheProAlaPheLeuSe

2161 TTCGGGATCATCTGACCTTGCAGCCGATGCTGCATTCACTTCGTGGAAGCAGTTTTGTGG
167▶rSerGlySerSerAspLeuAlaAlaAspAlaAlaPheThrSerTrpLysGlnPheCysGl

2221 GCGCGCAGCTTCACTGAAAGGCCGCTGGACATCGCGTCCGGATATAGCCAGGTTGGCAA
187▶yArgAlaAlaSerLeuLysGlyArgTrpThrSerArgProAspIleAlaArgLeuAlaLy

2281 AATTTACAGAGCTGTATATTTGGCGAACTGCTCATTTGAAGAGCTACTTTTTGCATGCGA
207▶sIleSerArgAlaValTyrLeuAlaAsnCysSerPheGluGluLeuLeuPheAlaCysAs

2341 TGAGACACTTGTATGGATGCTTTGGCATCAGTTTGAAGATGAAAGGATTTACCCCCACGA
227▶pGluThrLeuValTrpMetLeuTrpHisGlnPheGluAspGluArgIleTyrProHisAs

2401 TCCTATCTTCTCTAACATCTACTGCGCATGTCAATCTCTAGCCATGCATCTGGGGCCAAT
247▶pProIlePheSerAsnIleTyrCysAlaCysGlnSerLeuAlaMetHisLeuGlyProIl

BglII

2461 CCTGCCGTGTTATCTCTCTAGCATTGGCAGTCAACTAAGAGATACCACTAGATCTCAGGA
267▶eLeuProCysTyrLeuSerSerIleGlySerGlnLeuArgAspThrThrArgSerGlnGl

2521 GCTATCACTGAGTAGCGCAAAATGTCCTTTAACTTTATTACTGACCTTCTTCGACCGGTT
287▶uLeuSerLeuSerSerAlaLysCysProLeuThrLeuLeuLeuThrPhePheAspArgPh

2581 CTCAAGAATTGTGTATCCGCGATCAGAGGCCATAGTCATGAATCATAAAGCAATAGACCC
307▶eSerArgIleValTyrProArgSerGluAlaIleValMetAsnHisLysAlaIleAspPr

2641 GGCCAGAACATTGTGGGACATGTACTATCCTGGGACCTGTTTCTAAAAAATCCCACTCGT
327▶oAlaArgThrLeuTrpAspMetTyrTyrProGlyThrCysSerLysLysIleProLeuVa

2701 TCTGCGCAGCACGCAAAATGTGTGCCGCAAAGAGGAATGCAGAGTGGTTTGTGCGCAGCTC
347▶lLeuArgSerThrGlnMetCysAlaAlaLysArgAsnAlaGluTrpPheValArgSerSe

2761 TAAGCCGAGTATACAGTAGGGAAATTTCTCTTGCGACTTGTTTGACAGTTCTATACAC
367▶rLysProGlnTyrThrValGlyLysPheSerLeuAlaThrCysLeuThrValLeuTyrTh

2821 CTATCGACACATGGCGGTATTGTATTGGAATTGGTGCCATCCTACGTTTCTGAAGATTGC
387▶iTyrArgHisMetAlaValLeuTyrTrpAsnTrpCysHisProThrPheLeuLysIleAl

SacI

2881 CATCTCTGTGACTGGTCAGCAGATGGCGCCGCGAGCTCAATGATGTAAGCGTTCACTGTT
407▶aIleSerValThrGlyGlnGlnMetAlaProArgAlaGln...

2941 GCAATCCGGCCTTGTAATACTAGTAGTATTAGCACGGTTGAAAAATTTTAGAATGTTT
3001 CCCGACTCTCGAAAATTAACGGAGGTATAATAAAGAACACAATACAACGGACACCGACAA
3061 CGTGAGCATTTTTATTTAGTCTGCAATCCTTGGTTGATGAACGTGGTGCCCTGG

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP 0 719 864 A (RHONE MERIEUX) 3 juillet 1996 * colonne 2, ligne 40 - colonne 4, ligne 38 *	1-17
A	--- WO 96 00791 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 11 janvier 1996 * page 1, ligne 31 - page 2, ligne 7 * * page 4, ligne 27 - page 5, ligne 58 *	1-17
A	--- WO 92 03554 A (ARTHUR WEBSTER PTY. LTD.) 5 mars 1992 * page 6, ligne 20 - page 8, ligne 8 * * page 30, ligne 15 - page 32, ligne 17; figures 5,6 *	1-17

		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
10 octobre 1997		Montero Lopez, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général 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		