

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 748 480

②1 N° d'enregistrement national : **96 06029**

⑤1 Int Cl⁶ : C 07 K 14/415, C 07 K 16/10, C 12 N 15/47, 15/84,
5/10, A 01 H 5/00, 5/10, A 61 K 39/205, 48/00, 35/78

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 09.05.96.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 14.11.97 Bulletin 97/46.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : BIOCEM SOCIETE ANONYME —
FR et RHONE MERIEUX — FR.

⑦2 Inventeur(s) : MEROT BERTRAND, BAUDINO
SYLVIE, GRUBER VERONIQUE, BOURNAT
PHILIPPE, LENEÉ PHILIPPE, RIVIERE MICHEL
EMILE ALBERT et AUDONNET JEAN CHRISTOPHE
FRANCIS.

⑦3 Titulaire(s) : .

⑦4 Mandataire : ERNEST GUTMANN YVES
PLASSERAUD SA.

⑤4 PLANTES TRANSGENIQUES EXPRIMANT LA GLYCOPROTEINE G DE LA RAGE, ET GLYCOPROTEINES
AINSI OBTENUES.

⑤7 L'invention concerne un procédé pour la production de
la glycoprotéine G du virus de la rage, ou d'un virus appa-
renté au virus de la rage, caractérisé par:

i) l'introduction, dans une cellule végétale, d'une molé-
cule d'acide nucléique comprenant une séquence codante
chimérique, comportant d'une part une séquence codante
pour ladite protéine G virale mature, ou pour une protéine
analogue, et d'autre part, une séquence codante pour un
peptide signal N-terminal autre que celui naturellement as-
socié à la protéine G virale, l'introduction de la séquence
codante chimérique permettant l'expression dans la cellule
de la protéine G;

ii) la multiplication, sous forme de culture cellulaire, des
cellules transformées, ou la régénération de plantes entiè-
res transgéniques ou chimériques à partir de ces cellules;

iii) éventuellement l'extraction et la purification de la gly-
coprotéine G à partir des cellules ou des tissus végétaux
ainsi obtenus.

FR 2 748 480 - A1



**PLANTES TRANSGENIQUES EXPRIMANT LA GLYCOPROTEINE G DE
LA RAGE, ET GLYCOPROTEINES AINSI OBTENUES**

La présente invention concerne un procédé de production, par des cellules végétales, de la glycoprotéine G de la rage, ou d'un virus apparenté à la rage. L'invention concerne également la glycoprotéine ainsi obtenue et son utilisation en tant que médicament, notamment en tant que vaccin humain ou vétérinaire. L'invention vise en outre les cellules végétales transformées, et les plantes transgéniques, capables de produire la glycoprotéine G de la rage.

Le virus de la rage fait partie de la famille des Rhabdoviridae, genre Lyssavirus. Il s'agit d'un virus à ARN- dont le génome comporte environ 12000 nucléotides, codant pour cinq protéines structurelles : la protéine de la nucléocapside « N », les protéines de matrice « M₁ » et « M₂ », la glycoprotéine d'enveloppe « G » et la protéine « L » codant pour la polymérase virale.

L'enveloppe virale est constituée d'une bi-couche lipidique contenant des spicules composés d'une forme polymérique de la glycoprotéine G. Elle est exprimée sous forme d'un précurseur ayant 524 acides aminés, dont 19 constituent la séquence signal N-terminal hydrophobe. Le signal N-terminal est clivé pour donner lieu à la glycoprotéine mature de 505 acides aminés. Le poids moléculaire de la glycoprotéine rabique monomérique mature est de 66 kDa. Cette forme de la glycoprotéine est la forme dite « insoluble », c'est-à-dire qu'elle comprend un domaine C-terminal transmembranaire permettant à la glycoprotéine de se fixer dans l'enveloppe virale. La forme « soluble » de la glycoprotéine a un poids moléculaire d'environ 60 kDa et se distingue de la forme insoluble par l'absence

d'environ 58 acides aminés C-terminaux. Cette forme de la glycoprotéine, étant dépourvue de segment transmembranaire, ne peut plus s'associer à l'enveloppe virale.

La glycoprotéine constitue l'antigène majeur du virus, responsable de l'induction d'anticorps neutralisants et de l'immunité protectrice. Seule la forme « insoluble » est protectrice, bien qu'il n'y ait pas de déterminants antigéniques dans le C-terminal (Dietzschold B. et al., 1983).

Pour ces raisons, la glycoprotéine G de la rage a été largement étudiée et utilisée dans le développement de vaccins sous-unités. Les cADN de différentes souches du virus de la rage ont été clonés (Anilionis A. et al., 1981 ; Yelverton et al., 1983) et exprimées dans différents hôtes cellulaires.

Par exemple, Yelverton et al. (1983) ont décrit l'expression du gène de la glycoprotéine rage (souche CVS) dans E. coli. L'activité antigénique du produit d'expression n'est que de 2 à 3% par rapport à la glycoprotéine naturelle.

Kieny et al. (1984) ont décrit l'expression de la glycoprotéine G dans des cellules d'eucaryotes supérieures, infectées par un virus de la vaccine, recombinant et répliatif.

L'expression d'une glycoprotéine de la rage (souche CVS) ayant un poids moléculaire de 63 et 65 kDa (Préhaud et al., 1989), et celle du virus Mokola, virus apparenté au virus de la rage (Tordo N. et al., 1993), a été obtenue dans des cellules d'insectes infectées par un vecteur baculovirus recombinant.

Parmi ces travaux, l'utilisation d'hôtes eucaryotes supérieurs a permis d'obtenir des glycoprotéines recombinantes capables de conférer une immunité protectrice in vivo, par voie orale ou par injection intramusculaire ou intrapéritonéale.

L'utilisation de plantes transgéniques pour la production de la glycoprotéine G rabique a également été envisagée. En effet, la production de protéines vaccinales dans les plantes présente des avantages économiques considérables car les plantes sont plus faciles à cultiver que les cellules animales. En outre, les risques de contamination par les virus ou par les prions sont éliminés lorsque les protéines sont produites dans les plantes.

McGarvey et al. (1995) ont décrit la transformation de cotylédons de tomates par le cADN entier du gène de la glycoprotéine G du virus rabique (souche ERA). Des plantes transgéniques ont été régénérées. L'expression d'une protéine, reconnue par des anticorps anti-glycoprotéine rabique, et apparaissant comme deux bandes distinctes de 62 et 60 kDa sur gel d'électrophorèse, a été constatée dans les feuilles et dans les fruits des plantes transgéniques. La différence de poids moléculaire par rapport à la glycoprotéine naturelle est probablement liée, selon les auteurs, à une modification post-traductionnelle de la protéine, notamment à un clivage protéolytique ou à une glycosylation particulière.

Jusqu'à ce jour, la production, dans des plantes, de la glycoprotéine rabique ayant un poids moléculaire comparable à celui de la glycoprotéine naturelle, n'a pas été décrite.

Le problème technique que se propose de résoudre la présente invention est de produire, dans une cellule végétale, la glycoprotéine du virus de la rage, ou d'un virus apparenté au virus de la rage, conforme à la forme « insoluble » de la glycoprotéine naturelle, notamment en ce qui concerne son poids moléculaire.

De manière surprenante, il a été constaté par les présents inventeurs que le remplacement du peptide signal N-terminal endogène de la glycoprotéine rabique,

par un peptide signal N-terminal hétérologue, permet d'obtenir des glycoprotéines ayant un poids moléculaire plus élevé que celles obtenues dans des plantes auparavant. Les présents inventeurs ont donc mis en oeuvre pour la transformation de la cellule végétale, une séquence codante chimérique comportant la séquence codante du gène de la glycoprotéine rabique, dans laquelle la séquence du peptide signal N-terminal naturel a été remplacée par une séquence codant pour un peptide signal N-terminal hétérologue.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé pour la production de la glycoprotéine G du virus de la rage, ou d'un virus apparenté au virus de la rage, caractérisé par :

i) l'introduction, dans une cellule végétale, d'une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence codante chimérique, comportant d'une part une séquence codant pour ladite protéine G virale mature, ou pour une protéine analogue, et d'autre part, une séquence codant pour un peptide signal N-terminal autre que celui naturellement associé à la protéine G virale, l'introduction de la séquence codante chimérique permettant l'expression dans la cellule de la protéine G ;

ii) la multiplication, sous forme de culture cellulaire, des cellules transformées, ou la régénération de plantes entières transgéniques ou chimériques à partir de ces cellules ;

iii) éventuellement l'extraction et la purification de la glycoprotéine G à partir des cellules ou des tissus végétaux ainsi obtenus.

Dans le contexte de l'invention, les termes « virus de la rage, ou virus apparenté au virus de la rage » signifient les virus des différents sérotypes du genre Lyssavirus (Bourhy et al., 1993). A l'heure actuelle, les Lyssavirus sont divisés en quatre

sérotypes distincts : le sérotype 1 correspond au virus de la rage proprement dit et comprend différentes souches du virus de la rage, par exemple CVS, HEP, ERA, PM. Il existe normalement au moins 90% d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés, entre les différentes souches de la rage. Les autres sérotypes correspondent aux virus apparentés au virus de la rage (« rabies - related viruses ») et sont exemplifiés par le virus du « Lagos bat » (sérotype 2) ; le virus Mokola (sérotype 3) ; le virus Duvenhage (sérotype 4). Tous les virus rabiques sont pathogènes pour les mammifères, y compris l'homme, et donnent lieu à une encéphalite rabique.

Dans le contexte de la présente invention, le terme « glycoprotéine G » signifie la glycoprotéine constituant les spicules de l'enveloppe virale. Selon l'invention, elle est normalement sous forme monomérique mais peut également exister sous forme polymérique, par exemple en homodimer. Selon certains auteurs, la glycoprotéine G est également appelée « l'antigène de surface » du virus, ainsi que « l'haemagglutinine », en raison de sa capacité de provoquer l'agglutination des érythrocytes.

La première étape de l'invention consiste en l'introduction, dans une cellule végétale, d'une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence codante chimérique.

Selon l'invention, une « séquence codante chimérique » signifie une séquence d'acide nucléique, codant pour un enchainement d'acides aminés, constituée de fragments peptidiques d'origines différentes. En l'espèce, il s'agit d'une séquence comportant, d'une part une séquence codant pour la glycoprotéine G virale mature, c'est-à-dire dépourvue du signal N-terminal naturellement associée à la protéine, et d'autre part,

une séquence codant pour un peptide signal N-terminal hétérologue à la glycoprotéine.

Comme exemple de séquence codant pour la glycoprotéine G mature, l'on peut citer celle de la glycoprotéine rabique, souche CVS dont la séquence en acide nucléique et en acide aminés ont été décrites par Yelverton et al. (1983), ou encore celle de la souche ERA dont la séquence a été décrite par Anilionis et al. (1981), et modifiée par Kieny et al. (1984). La protéine mature est dépourvue de la séquence de 19 acides aminés N-terminaux. D'autres séquences sont décrites par N. Tordo et al., *Virol.*, 1993, 194, 59-69.

La séquence du gène de la glycoprotéine G du virus Mokola a été décrite par Tordo et al. (1993). La séquence de la protéine mature démarre à l'acide aminé 20.

L'acide nucléique codant pour la glycoprotéine G mature est obtenu par l'élimination de la partie de la séquence qui code pour le peptide signal N-terminal.

La séquence codante peut coder pour une protéine « analogue » à la glycoprotéine G. Les protéines analogues sont des protéines qui présentent normalement au moins 90% d'homologie avec la glycoprotéine naturelle, et qui présentent en outre une homologie fonctionnelle et immunologique avec la glycoprotéine naturelle.

Selon l'invention, la séquence codant pour le peptide signal N-terminal endogène est donc remplacée par un signal hétérologue. Comme exemple de séquence codant pour un peptide signal N-terminal hétérologue, l'on peut citer un peptide signal (ou « pré-peptide ») végétal, ou provenant d'un virus de plante, ou d'un micro-organisme, par exemple la levure.

Par « peptide signal N-terminal », il faut comprendre le peptide responsable de l'adressage de la protéine naissante dans le réticulum endoplasmique.

Dans la cellule végétale, l'adressage des protéines est basé sur le même principe que dans les cellules animales. A partir de l'ADN chromosomique, le gène est transcrit en ARN messenger, puis traduit en protéine au niveau des ribosomes. Si la protéine naissante possède un peptide signal N-terminal ou prépeptide, elle pénètre dans le réticulum endoplasmique où ont lieu un certain nombre de maturations post-traductionnelles, notamment le clivage du peptide signal, les N-glycosylations conduisant aux glycanes polymannosidiques, et la formation des ponts disulfures.

-- Selon l'invention, la séquence codant pour le prépeptide, responsable de l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique, fait partie de la séquence codante chimérique. Il s'agit normalement d'un peptide signal N-terminal hydrophobe ayant entre 10 et 40 acides aminés et étant d'origine animale ou végétale. De préférence, il s'agit d'un prépeptide d'origine végétale, par exemple celui de la sporamine, de la lectine d'orge, de l'extensine végétale (pEXT), de l' α -mating (factor, des protéines végétales impliquées dans la défense contre les micro-organismes (PR1a et PRS, "pathogenesis related proteins").

L'introduction dans la cellule végétale de la molécule d'acide nucléique, comportant la séquence codante chimérique, est effectuée de manière à ce que l'expression de la séquence puisse être obtenue. En particulier, la séquence codante chimérique doit se trouver, dans le génome de la plante, sous le contrôle de séquences régulatrices de la transcription, reconnues par la cellule végétale.

Ces séquences régulatrices, notamment un signal d'initiation de transcription (promoteur) et un signal de terminaison de transcription (comprenant le signal de polyadénylation), peuvent être endogènes à la

plante, auquel cas, l'insertion de la séquence codante chimérique doit se faire par recombinaison homologue. Dans ce cas, l'acide nucléique transformant comporte, sur chaque extrémité, une séquence homologue aux séquences qui jouxtent le site d'insertion souhaité dans le génome.

Alternativement, les séquences régulatrices de transcription peuvent être incluses dans la molécule d'acide nucléique comportant la séquence codante chimérique. Dans ce cas, la molécule d'acide nucléique constitue un gène chimérique qui fait également partie de l'invention. Les séquences régulatrices comprennent un ou plusieurs promoteurs d'origine végétale ou provenant d'*Agrobacterium tumefaciens* ou d'un virus de plante. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif, par exemple le 35S ou le double 35S du CaMV, NOS, OCS, ou des promoteurs spécifiques de certains tissus comme le grain, ou spécifiques de certaines phases de développement de la plante.

Comme promoteurs spécifiques de graines, on peut citer le promoteur du gène de la napin et de l'acyl carrier protéine (ACP) (EP-A-0255378), ainsi que les promoteurs des gènes AT2S d'*Arabidopsis thaliana*, c'est-à-dire les promoteurs PAT2S1, PAT2S2, PAT2S3 et PAT2S4 (Krebers et al., *Plant Physiol.*, 1988, vol. 87, pages 859-866). Il est particulièrement préféré d'utiliser le promoteur de la cruciférine ou de la phaséoline, les promoteurs pGEA1 et pGEA6 promoteurs d'*Arabidopsis* de gène de type "EM, Early Methionine labelled protein" fortement exprimés au cours des phases de dessiccation de la graine.

Il peut être envisagé d'utiliser des "enhancers" pour améliorer l'efficacité d'expression.

Les séquences régulatrices de terminaison sont d'origine végétale, virale, ou bactérienne, par exemple du 35S, NOS etc..

Selon une variante de l'invention, la séquence codante chimérique comprend, outre la partie peptide signal N-terminal et la partie codant pour la protéine d'enveloppe mature, d'autres signaux d'adressage, par exemple un signal de rétention endoplasmique ou un signal d'adressage vacuolaire.

Le signal de rétention endoplasmique consiste en les peptides KDEL, SEKDEL ou HKDEL. Ces signaux se trouvent normalement à l'extrémité C-terminale de la protéine et subsistent sur la protéine mature. La présence de ce signal sur les protéines de l'invention est avantageuse pour plusieurs raisons : d'une part, la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique a tendance à augmenter les rendements en protéines recombinantes. D'autre part, la maturation de la glycosylation polymannosique en glycannes complexes n'a pas lieu ; la protéine conserve donc la glycosylation polymannosique, minimisant le risque de réactions immunologiques indésirables lorsque la protéine sera administrée à l'homme comme médicament. Selon cette variante de l'invention, le glycoprotéine comporte donc la séquence en acides aminés de la protéine G, un signal du type KDEL, au moins un glycanne de type polymannosique, et est exempt de glycannes de type complexe. Selon l'invention, ce type de protéine peut aussi être obtenu en utilisant des mutants de plantes incapables de fabriquer la N-acétyl glucosaminyl transférase (von Schaewen et al., Plant Physiol. 1993 102: 1109-1118), et donc incapables de produire des glycannes complexes.

La protéine de l'invention peut, outre le prépeptide, comporter aussi un signal d'adressage vacuolaire ou "propeptide". En présence d'un tel signal, la protéine est adressée aux vacuoles des tissus aqueux, par exemple les feuilles, ainsi qu'aux corps protéiques des tissus de réserve, par exemple

les graines, tubercules et racines. L'adressage de la protéine vers les corps protéiques de la graine est particulièrement intéressant en raison de la capacité de la graine à accumuler des protéines, jusqu'à 40% des protéines par rapport à la matière sèche, dans des organites cellulaires dérivés des vacuoles, appelés corps protéiques et en raison de la possibilité de stocker plusieurs années les graines contenant les protéines recombinantes à l'état déshydraté.

Comme propeptide, on peut utiliser un signal d'origine animale ou végétale, les signaux végétaux étant particulièrement préférés, par exemple la pro-sporamine, ou la lectine d'orge. Le propeptide peut être N-terminal ("N-terminal targeting peptide" ou NTTP), ou C terminal (CTTP) ou peut consister en une séquence interne à la protéine. Dans la mesure où le propeptide est normalement clivé dès l'entrée de la protéine dans la vacuole, il n'est pas présent dans la protéine mature. Il a été constaté que l'utilisation du « propeptide », en association avec un prépeptide, est particulièrement avantageux, et donne lieu à des glycoprotéines ayant un poids moléculaire conforme à la molécule naturelle.

De préférence, une séquence codant pour un agent permettant la sélection des cellules transformées est introduite dans la cellule végétale en même temps que les séquences codant pour la glycoprotéine. Le gène codant pour l'agent de sélection peut être un gène chimérique constitué de séquences régulatrices reconnues par la plante en association avec la séquence codante de l'agent de sélection, par exemple NPT I, NPT II, dhfr, etc. Le gène chimérique de sélection peut faire partie du même vecteur que celui codant pour la glycoprotéine. Alternativement, il peut être porté par un vecteur indépendant et introduit par co-transformation.

Pour introduire les différentes séquences hétérologues dans la cellule végétale, tous les moyens connus pour transformer le génome nucléaire peuvent être utilisés, par exemple *Agrobacterium*, électroporation, fusion de protoplastes, bombardement avec canon à particules, ou pénétration d'ADN dans des cellules comme le pollen, la microspore, la graine et l'embryon immature, vecteurs viraux tels que les Geminivirus ou les virus satellites. *Agrobacterium tumefaciens* et *rhizogenes* constituent le moyen préféré. Dans ce cas, la séquence de l'invention est introduite dans un vecteur approprié avec toutes les séquences régulatrices nécessaires tels que promoteurs, terminateurs, etc... ainsi que toute séquence nécessaire pour sélectionner les transformants.

Après l'étape de transformation des cellules végétales, les cellules transformées sont sélectionnées grâce à la présence du gène codant pour l'agent de sélection. Ces cellules sont ensuite soumises à une étape de multiplication par culture cellulaire, où elles sont régénérées en plantes transgéniques ou chimériques.

Lorsqu'il s'agit de multiplication par culture cellulaire in vitro, l'on obtient une biomasse capable de produire la glycoprotéine G, en grande quantité. Il peut s'agir de cultures de cellules végétales *in vitro*, par exemple en milieu liquide. Différents modes de culture ("batch", "fed batch" ou en continu) pour ce type de cellules sont actuellement à l'étude. Les cultures en "batch" sont comparables à celles effectuées en erlenmeyer dans la mesure où le milieu n'est pas renouvelé, les cellules ne disposent ainsi que d'une quantité limitée d'éléments nutritifs. La culture en "fed batch" correspond quant à elle à une culture en "batch" avec une alimentation programmée en

substrat. Pour une culture en continu, les cellules sont alimentées en permanence avec du milieu nutritif. Un volume égal du mélange biomasse-milieu est ôté afin de maintenir le volume du réacteur constant. Les quantités de biomasse végétale envisageables avec des cultures en bioréacteurs sont variables selon l'espèce végétale, le mode de culture et le type de bioréacteur. Dans certaines conditions, des densités de biomasse d'environ 10 à 30g de poids sec par litre de culture peuvent être obtenus, pour des espèces comme Nicotiana tabacum, Vinca rosea et Catharanthus roseus.

Les cellules de l'invention peuvent aussi être immobilisées, ce qui permet d'obtenir une production constante et prolongée de la glycoprotéine. Comme méthode d'immobilisation, on peut citer l'immobilisation en billes d'alginate, d'agar, à l'intérieur de mousse de polyuréthane, ou bien encore dans des fibres creuses.

Les cellules de l'invention peuvent également être des cultures de racines. Les racines cultivées in vitro, en milieu liquide, sont nommées "Hairy roots", ce sont des racines transformées par la bactérie Agrobacterium rhizogenes.

Au lieu de produire la glycoprotéine de l'invention par culture de cellules végétales, on peut régénérer des plantes chimériques ou transgéniques à partir d'explants transformés, en ayant recours à des techniques connues en soi.

Le procédé de l'invention peut ou non comprendre une étape de récupération de la glycoprotéine G. En l'absence d'une étape de récupération, le procédé de l'invention donne lieu à des cellules végétales, ou à des plantes transgéniques capables de produire la glycoprotéine G. Les cellules ou les plantes constituent en soi une source de la protéine vaccinnante

et peuvent être administrées telles quelles à l'animal ou à l'homme par ingestion.

Selon une autre variante de l'invention, la glycoprotéine G est récupérée par extraction de la matière végétale, et éventuellement purifiée.

L'étape d'extraction comprend la solubilisation de la glycoprotéine, associée aux membranes cellulaires, par un détergent. Plus particulièrement, la matière végétale, par exemple, feuilles, graines, racines etc., est broyée dans l'azote liquide. L'homogénat est alors suspendu dans un tampon approprié, additionné d'un détergent, de préférence non-ionique. Le détergent est employé à des concentrations de 0.1 à 2%, de préférence 0.1 à 0.5%. Il peut s'agir par exemple de Triton X-100, ou NP40 ou β -octyl glucopyranoside. L'emploi du détergent libère la glycoprotéine des membranes cellulaires, tout en conservant son intégrité et son pouvoir immunogène. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé, la glycoprotéine « solubilisée » étant alors présente dans le surnageant. Normalement, le surnageant est filtré.

L'extrait végétal correspondant au surnageant peut être utilisé tel quel comme source de protéine vaccinnante, ou peut être soumis à une ou plusieurs étape(s) de purification. Eventuellement, le détergent peut être éliminé ou réduit. De préférence, l'extrait de matière végétale, par exemple feuilles de tabac ou graines de colza, est dialysé contre un tampon éthylène diamine acide acétique pH 8.1, ou est soumis à une gel filtration sur support Séphadex G25 Pharmacia. La fraction correspondant au rétentat ou au volume mort est ensuite soumise à une chromatographie d'échange d'ion sur support QAE Séphadex A50 Pharmacia équilibré préalablement en tampon éthylène diamine acide acétique pH 8.1. Après lavage avec ce même tampon, la

glycoprotéine est éluée par une solution 0.6 M acétate de sodium (P. Atanasiu et al., 1976).

D'autres techniques de purification sont décrites dans l'art, par exemple chromatographie d'affinité utilisant un anticorps monoclonal purifié couplé à un support Sépharose CL-4B activé au bromure de cyanogène (B. Dietzschold et al., 1983) ; chromatographie de gel perméation sur support Sépharose CL-4B (G. Coslett et al., 1980) ; technique d'électrofocalisation (J. Cox et al., 1980).

L'invention vise également la glycoprotéine G susceptible d'être obtenue par la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

Plus particulièrement, l'invention vise une glycoprotéine caractérisée en ce que :

- elle est reconnue par des anticorps spécifiques à la glycoprotéine G du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage ;
- elle a un poids moléculaire de 66 kDa approximativement ;
- elle est insoluble ;
- elle est N-glycosylée par au moins un glycanne de type polymannosidique, et/ou par au moins un glycanne de type complexe comportant au sein de sa structure un ou plusieurs résidus de xylose β -1,2, et/ou un ou plusieurs résidus de fucose lié en α -1,3, et étant dépourvu de résidus d'acide sialique.

Les propriétés antigéniques de la glycoprotéine de l'invention sont, au moins en partie, celles de la glycoprotéine correspondante naturelle. En effet, la glycoprotéine de l'invention est reconnue par des anticorps spécifiques à la glycoprotéine de la rage ou d'un virus apparenté à la rage. Il peut s'agir d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre

le virus, ou contre la glycoprotéine purifiée à partir du virus.

La glycoprotéine de l'invention a un poids moléculaire de 66 kDa approximativement. Dans le contexte de la présente invention, « approximativement » signifie la variabilité résultant des techniques de mesure. Plus particulièrement, la glycoprotéine de l'invention a un poids moléculaire de 66 kDa en moyenne lorsque plusieurs essais de Western Blot sont effectués, par exemple, au moins 3 ou 5 essais, dans les mêmes conditions. Par exemple le poids moléculaire peut être entre 65 et 80 kDa, par exemple 66 à 67 kDa. Le poids moléculaire est un poids moléculaire apparent, déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, selon la technique de Laemmli et al. (1970). De préférence, le gel de polyacrylamide est un gel à 10 ou 12.5%, mais des concentrations moins élevées peuvent être utilisées pour obtenir une résolution plus nette des zones entre 60 et 65 kDa.

La glycoprotéine de l'invention est fortement insoluble. Dans le contexte de l'invention, le terme « insoluble » signifie que la molécule n'est pas soluble dans le milieu extracellulaire, mais se trouve associée aux membranes cellulaires. En effet, il a été constaté que la présence de détergent, par exemple SDS, Triton X-100, est indispensable pour extraire et solubiliser la glycoprotéine. La nature « insoluble » de la glycoprotéine est liée à la présence du domaine transmembranaire C-terminal. La présence de la région C-terminale, c'est-à-dire la région se trouvant environ 40 à 60 acides aminés de l'extrémité carboxy de la glycoprotéine, est importante pour obtenir une réponse protectrice lorsque la glycoprotéine est utilisée en tant que vaccin.

La glycoprotéine de l'invention se montre insoluble indirectement par son association aux membranes cellulaires. En l'absence de détergent, elle ne peut pas se trouver dans le surnageant de cultures de cellules produisant la glycoprotéine.

La glycoprotéine de l'invention est glycosylée par au moins un glycanne de type polymannosidique, et/ou par au moins un glycanne de type complexe comportant au sein de sa structure un ou plusieurs résidus de xylose β -1,2, et/ou un ou plusieurs résidus de fucose lié en α -1,3, et étant dépourvu de résidus d'acide sialique.

La glycosylation de glycoprotéines produites dans des cellules végétales est différente de celles produites dans des cellules animales. Bien que les étapes de glycosylation conduisant aux glycanes polymannosidiques soient réalisées de manière identique chez les plantes et chez les mammifères, la maturation des glycanes polymannosidiques en glycanes complexes est très différente. Les N-glycanes des glycoprotéines végétales diffèrent principalement des glycanes de mammifères par l'absence d'acide sialique, également connu sous le nom d'acide N-acétylneuraminique, et la présence d'un résidu de β 1,2 xylose et d'un résidu de fucose lié en α 1,3 au résidu de GlcNAc proximal du "core" (Driouich et al., Regard sur la biochimie, 1993, vol. 3, pages 33-42).

La glycosylation joue un rôle important dans la mise en place de la structure spatiale de la protéine, dans la protection contre les attaques protéolytiques et dans les mécanismes de reconnaissance immunitaire.

Selon une variante préférée, la protéine de l'invention est glycosylée à au moins deux sites naturels de N-glycosylation. Par exemple, pour la

souche ERA, la glycosylation est de préférence aux positions 247 et 319. La glycosylation est de type mannosidique, polymannosidique ou de type complexe, ou un mélange des deux.

Le ou les glucanne(s) de type mannosidique ont la structure GlcNAc2-Man1. Le ou les glucanne(s) polymannosidique(s) ont la structure GlcNAc2-Man2-9, par exemple GlcNAc2-Man9, GlcNAc2-Man8, GlcNAc2-Man6 ou GlcNAc2-Man5, ou GlcNAc2-Man3.

Le ou les glucanne(s) de type complexe sont biantennés et ont une structure de base GlcNAc2-Man3 à laquelle sont éventuellement associés des résidus de xylose (Xyl), fucose (Fuc) et éventuellement galactose (Gal) ou N-acétylglucosamine (GlcNAc). Ils sont normalement exempts de résidus d'acide sialique, ce composé n'ayant pas jusqu'alors été mis en évidence dans les cellules végétales.

De préférence, le glycanne complexe est de type "phytohémagglutinine" (PHA) constitué d'une structure "core" GlcNAc2Man3 dont le mannose lié en β porte un résidu de β 1,2-xylose et dont le GlcNAc proximal porte un résidu d' α 1,3 fucose. Ce genre de structure est fréquent pour les glycoprotéines de localisation vacuolaire ou extracellulaire. Le résidu de fucose α 1,3-lié peut éventuellement être absent.

Le glycanne complexe peut aussi être du type "Laccase" composé d'une structure de base GlcNAc2 (Fuc) Man3 (Xyl) associée à deux chaînes latérales. Chaque chaîne latérale est constituée d'un résidu de β 1,2 GlcNAc auquel est lié un résidu d' α 1,6 fucose et un résidu de β 1,4 galactose.

La glycoprotéine de l'invention peut être glycosylée aux trois sites naturels ou seulement à l'un ou deux d'entre eux. Parmi les variantes

préférées, l'on peut citer des glycoprotéines portant exclusivement des glycanes polymannosidiques. Ce type de glycosylation existe sous forme identique chez la plante et chez l'animal. Par conséquent, l'apparition de réaction immunologique indésirable est évitée. Ce type de glycosylation est obtenue par l'utilisation d'un peptide signal N-terminal en association avec un signal de rétention endoplasmique.

On peut aussi citer les glycoprotéines portant exclusivement des glycanes de type complexe, par exemple deux ou trois glycanes de type PHA : GlcNAc₂(Fuc)Man₃(Xyl).

La partie glucidique représente, normalement, entre 2 et 30%, par exemple 5 à 20% de la masse totale de la glycoprotéine de l'invention, la molécule naturelle comportant 11% de glycosylation.

La composition des glycanes de la glycoprotéine peut être déterminée par digestion des oligosaccharides par N-glycanase, telle que décrite par Tuchiya K. et al. (1992).

La glycoprotéine de l'invention est capable d'induire la formation d'anticorps neutralisants et une immunité protectrice contre le virus de la rage ou contre un virus apparenté au virus de la rage.

Le caractère protecteur de la glycoprotéine est mis en évidence par l'administration, à un animal, du vaccin contenant la glycoprotéine, suivie par une épreuve virulente avec le virus rabique. Le taux d'anticorps neutralisants produit chez l'animal est déterminé par un test tel que le test RFFIT (« Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test » décrit par Smith et al. (1973).

La glycoprotéine de l'invention peut comporter un ou plusieurs des signaux d'adressage décrits ci-dessus. Lorsqu'il s'agit de la glycoprotéine mature, le seul signal peptidique restant est le signal de

rétention endoplasmique de type HKDEL, les autres signaux d'adressage étant clivés dans la cellule. La glycoprotéine comportant un signal de rétention endoplasmique a un poids moléculaire supérieur à 66 kDa en raison de la présence des acides aminés supplémentaires.

La partie protéique de la glycoprotéine de l'invention peut correspondre à celle de la glycoprotéine naturelle, ou il peut s'agir d'une protéine « analogue » à la protéine naturelle. Dans le contexte de l'invention, une protéine « analogue » signifie une protéine qui présente au moins 90% d'homologie avec la molécule de référence. Il s'agit par exemple d'une glycoprotéine rabique dont certains acides aminés ont été remplacés, délétés ou insérés. Les modifications ont lieu de préférence du côté N-terminal de la molécule. Les protéines analogues sont également insolubles, reconnues par des anticorps spécifiques à la glycoprotéine de la rage ou à un virus apparenté au virus de la rage et capable d'induire la formation d'anticorps neutralisants.

L'invention vise également les acides nucléiques, ARN ou ADN, mis en oeuvre dans la production de la glycoprotéine. En particulier, l'invention vise un acide nucléique comportant une séquence codante chimérique comprenant d'une part une séquence codante pour la protéine G mature du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage, ou pour une protéine analogue, et d'autre part, une séquence codante pour un peptide signal N-terminal autre que celui naturellement associé au virus, ou les séquences complémentaires aux sus-dites séquences codantes.

Les séquences régulatrices décrites ci-dessus, ainsi que les séquences codantes pour les signaux d'adressage sont, le cas échéant, également compris dans la molécule d'acide nucléique.

L'invention concerne en outre les vecteurs et plasmides employés pour l'introduction de l'acide nucléique dans les cellules végétales. Il peut s'agir de plasmides Ti d'Agrobacterium, ou de vecteurs viraux tels que les Geminivirus ou le CaMV.

L'invention vise également les cellules végétales transformées de manière stable et capables de produire la glycoprotéine de l'invention. Ces cellules sont sous forme de culture cellulaire, comme indiqué plus haut, ou font partie de plantes transgéniques ou chimériques. Comme plantes appropriées, on peut citer les Angiospermes comprenant les monocotylédones et les dicotylédons. Plus particulièrement, on peut citer le tabac, les espèces appartenant aux familles botaniques telles que les légumineuses (par exemple les haricots, pois, etc...), les crucifères (par exemple les choux, radis, le colza etc...), les solanacées (par exemple les tomates, pommes de terre, etc...), les cucurbitacées (par exemple le melon, courgette, concombre), les chénopodiacées (par exemple la betterave potagère), les ombellifères (par exemple les carottes, céleris, etc...). On peut également citer les céréales telles que le blé, le maïs, l'orge, le triticale et le riz, et les oléagineux tels que le tournesol et le soja.

L'invention concerne également les graines des plantes transgéniques capables de produire la glycoprotéine G rabique, ainsi que leurs descendances.

L'invention vise également l'utilisation de la glycoprotéine G comme produit thérapeutique, notamment comme vaccin contre l'infection par la rage, ou par des virus apparentés.

En particulier, l'invention vise une composition pharmaceutique comprenant :

- une ou plusieurs glycoprotéine(s) selon l'invention, ou

- des cellules selon l'invention, ou
- toute ou partie d'une plante selon l'invention,

en association avec un excipient acceptable du point de vue physiologique.

La composition pharmaceutique contient au moins 1 μg de glycoprotéine. Par exemple, elle contient 1 μg à 1 mg, ou de préférence de 10 μg à 200 μg , ou de préférence de 25 à 100 mg, de la glycoprotéine purifiée, par dose, par exemple 200 ou 300 μg . Si la glycoprotéine est employée sous une forme autre que purifiée, par exemple sous forme d'extrait de la plante, ou la plante elle-même, la quantité administrée doit être adaptée afin que la dose de principe actif atteigne au moins 100 μg .

L'excipient utilisé dans la composition est un excipient normalement utilisé pour les vaccins rabiques, par exemple le gel d'alumine.

Normalement, le vaccin est formulé pour une administration par voie orale, ou parentérale. Il peut également prendre la forme d'un produit alimentaire élaboré à partir de la matière végétale de l'invention.

L'invention comprend également une méthode d'immuniser des mammifères, y compris l'homme, contre l'infection par ce virus de la rage, ou par un virus apparenté au virus de la rage, comprenant l'administration d'une glycoprotéine de l'invention, ou d'une matière végétale comprenant cette glycoprotéine.

Différents aspects de l'invention sont illustrés dans les figures.

Figure 1 :

Western Blot de protéines de feuilles de tabac transformées avec le cDNA de la glycoprotéine G rabique (construit pBIOC110 = PPS-RabG)

Gel à 12% :

Piste 1 : Feuilles de tabac non transformées ;
Piste 2 : Feuilles de tabac transformées avec pBIOC110 ;
Piste 3 : Glycoprotéine G rabique de référence ;
Piste 4 : Marqueur de poids moléculaire.

Figure 2 :

Western Blot de protéines de feuilles de tabac transformées avec pBIOC110 (PPS-RabG) et de graines de colza transformées avec pBIOC114 (PPS-RabG).

Gel à 10% :

Piste 1 : Reconstruction glycoprotéine G rabique de référence dans du jus de tabac ;
Piste 2 : Graines de colza transformées avec pBIOC114 ;
Piste 3 : Graines de colza non transformées ;
Piste 4 : Feuilles de tabac transformées avec pBIOC110 ;
Piste 5 : Feuilles de tabac non transformées ;
Piste 6 : Glycoprotéine G rabique de référence ;
Piste 7 : Marqueur de poids moléculaire.

Figure 3 :

Western Blot de protéines de cals de maïs transformés avec pBIOC116 (PS-RabG).

Gel à 10% :

Piste 1 : Glycoprotéine G rabique de référence ;
Piste 2 : Marqueur de poids moléculaire ;
Piste 3 : Reconstruction glycoprotéine G rabique de référence dans du jus de cals de maïs ;
Piste 4 : Cals de maïs transformés avec pBIOC116 ;

Piste 5 : Cals de maïs non transformés.

Figure 4 :

Gel à 8% :

Piste 1 : Reconstruction glycoprotéine G rabique de référence dans du jus de feuille de tabac ;
Piste 2 : Feuille de tabac non transformé ;

Piste 3 : Feuille de tabac transformé avec pBIOC110 (PPS-RabG) ;

Piste 4 : Feuille de tabac transformé avec pBIOC104 (PS-RabG) ;

Piste 5 : Marqueur de poids moléculaire.

EXEMPLES

A. EXEMPLES DE CONSTRUCTIONS MOLECULAIRES

I. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT POUR LA PROTEINE RECOMBINANTE DE LA GLYCOPROTEINE G RABIQUE ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES FEUILLES ET LES GRAINES DE TABAC.

L'expression dans les feuilles de tabac du gène viral codant pour la glycoprotéine G rabique (RabG) a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

1. un promoteur constitutif :

- soit le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur). Il correspond à une duplication des séquences activant la transcription situées en amont de l'élément TATA du promoteur 35S naturel (Kay et al., 1987).

- soit le promoteur chimérique super-promoteur (pSP ; Ni et al., 1995). Il est constitué de la fusion de la triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;

2. la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA 35S, qui correspond à la région en 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire

circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (Franck et al., 1980).

Les constructions des différents plasmides via l'utilisation de techniques d'ADN recombinant (Sambrook et al., 1989) dérivent de pBIOC4. Ce plasmide binaire dérive de pGA492 (An, 1986) qui contient entre les bordures droite et gauche, issues du plasmide pTiT37 d'*Agrobacterium tumefaciens*, sur son ADN de transfert, les séquences suivantes :

- le promoteur constitutif du gène nos codant pour la nopaline synthase (Depicker et al., 1982), la séquence codante du gène nptII codant pour la néomycine phosphotransférase II (Berg et Berg, 1983) délétée de la région des 8 premiers acides aminés dont le codon initiateur méthionine ATG et fusionnée à la séquence des 14 premiers acides aminés de la séquence codante du gène nos (Depicker et al., 1982), la séquence codante du gène nos dépourvue de la région des 14 premiers acides aminés, le terminateur nos (Depicker et al., 1982), un polylinker (HindIII-XbaI-SacI-HpaI-KpnI-ClaI-BglII) précédant le gène cat codant pour la chloramphénicol acétyltransférase (Close et Rodriguez, 1982) et les séquences terminatrices du gène 6 du plasmide pTiA6 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Liu et al., 1993).

Pour éliminer la quasi-totalité de la séquence codante du gène cat, le plasmide pGA492 a été doublement digéré par SacI (site de restriction du polylinker) et par ScaI (site de restriction présent dans la séquence du gène cat) puis soumis à l'action de l'enzyme T4 DNA polymérase (Biolabs) selon les recommandations du fabricant. La ligation du plasmide modifié (20 ng) a été réalisée dans un milieu réactionnel de 10 μ l contenant 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) ; 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures.

Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 μ g/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

Puis, le site de restriction HindIII de l'ADN plasmidique du clone retenu a été modifié en un site de restriction EcoRI à l'aide d'un adaptateur HindIII - EcoRI phosphorylé (Stratagene Cloning Systems). Pour réaliser cette modification, 500 ng d'ADN plasmidique du clone retenu ont été digérés par HindIII, déphosphorylés par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant et coprécipités en présence de 1500 ng d'ADN adaptateur HindIII-EcoRI, 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH4,8 et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min. Après centrifugation à 12000g pendant 30 min., l'ADN précipité a été lavé à l'éthanol 70%, séché, repris dans 8 μ l d'eau, porté à 65°C pendant 10 min., puis ligué en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Après inactivation de la T4 DNA ligase à 65°C pendant 10 min., le mélange réactionnel de ligation a été digéré par EcoRI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, puis, ligué comme décrit ci-dessus.

Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées

(Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 $\mu\text{g/ml}$ tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par HindIII et EcoRI notamment. Le plasmide binaire résultant, qui ne possède plus que les 9 derniers acides aminés de la séquences codante du gène cat et dont le site EcoRI est unique, a été appelé pBIOC4.

La cassette d'expression, constituée du promoteur pd35S et du terminateur polyA 35S, a été isolée à partir du plasmide pJIT163 Δ . Le plasmide pJIT163 Δ dérive du plasmide pJIT163 qui dérive lui-même du plasmide pJIT60 (Guerineau et Mullineaux, 1993). Le plasmide pJIT163 possède un codon ATG entre les sites HindIII et SalI du polylinker. Pour supprimer cet ATG et obtenir le plasmide pJIT163 Δ , l'ADN plasmidique pJIT163 a été digéré doublement par HindIII et SalI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, soumis à l'action de l'enzyme Klenow (Biolabs) selon les recommandations du fabricant, déprotéinisé par extraction avec 1 volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) puis 1 volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1), précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, et enfin, ligué en présence de 1 μl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été

transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 µg/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Pour isoler la cassette d'expression constituée du promoteur pd35S et du terminateur polyA 35S (fragment SacI-XhoI), l'ADN plasmidique du clone pJIT163Δ retenu a été digéré par SacI et XhoI. Le fragment SacI-XhoI, portant la cassette d'expression, a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, puis soumis à l'action de l'enzyme Mung Bean Nuclease (Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Cet insert purifié (200 ng) a été cloné dans l'ADN plasmidique de pBIOC4 (20 ng) digéré par EcoRI, traité par l'enzyme Mung Bean Nuclease et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La réaction de ligation a été effectuée dans 20 µl en présence de 2 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 µl de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 µg/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC21.

Pour obtenir un plasmide binaire similaire à pBIOC21 mais dont le promoteur pd35S a été remplacé par le promoteur pSP, le fragment PvuII - Sall soumis à l'action de la Klenow contenant le promoteur pSP, a été isolé à partir du plasmide pBISN1 (Ni et al., 1995), purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché et ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC81 doublement digéré par KpnI et EcoRI soumis à l'action de la T4 DNA polymérase et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. Le plasmide pBIOC81 correspond à pB10C21 dont le site XbaI a été délété. Pour ce faire, le plasmide pB10C21 a été digéré par XbaI puis soumis à l'action de la Klenow et ligué par action de la T4 DNA ligase.

La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé décrit ci-dessus et 200 ng de fragments d'ADN portant pSP décrits ci-dessus dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000, et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 μ g/ml tetracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC82.

La glycoprotéine G rabique (RabG), isolée à partir de la souche ERA, est naturellement synthétisée sous forme d'un précurseur. La protéine mature RabG est

constituée de 505 acides aminés. Son peptide signal est composé de 19 acides aminés.

Le cDNA codant pour la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la rage, souche ERA (A. Anilionis et al., Nature, 1981, 294, 275-278 et M.P. Kieny et al., Nature, 1984, 312, 163-166) a été amplifié par PCR selon les procédés usuels, à l'aide des deux oligonucléotides suivants :

Oligo 1 (30 mer) 5' AAA GGA TCC ATG GTT CCT CAG GCT CTC CTG 3'

Oligo 2 (30 mer) 5' AAA CTG CAG TCA CAG TCT GGT CTC ACC CCC 3'

Le fragment PCR de 1.69 kb a été digéré par BamHI et PstI puis cloné dans le vecteur pBlueScript préalablement digéré par BamHI et PstI, donnant ainsi le plasmide pPB010.

L'ADN complémentaire du précurseur de RabG est contenu dans le plasmide pPB010. Il a été utilisé pour la construction des plasmides binaires pBIOC104 et pBIOC105 contenant la séquence codant pour PS-RabG, pBIOC107 et pBIOC108 contenant la séquence codant pour BL-RabG et pBIOC110 et pBIOC111 contenant la séquence codant pour PPS-RabG où la séquence codant pour RabG est précédée de la séquence codant pour un peptide signal, PS et BL, et pour un prépropeptide N-terminal (PPS c'est-à-dire un peptide signal suivi des séquences N-terminales d'adressage vacuolaire) d'origine végétale respectivement. Les séquences PS et PPS, constituées respectivement de 23 et 37 acides aminés, sont celles d'une protéine de réserve des racines tubérisées de patate douce : la sporamine A (Murakami et al., 1986 ; Matsuoka et Nakamura, 1991). La séquence BL, composée de 26 acides aminés, est celle de la lectine d'orge (Lerner et Raikhel, 1989).

Afin d'obtenir une séquence codant pour la glycoprotéine G rabique ne possédant que le premier

codon stop, le cDNA RabG a été modifié en son extrémité 3' par mutagenèse dirigée par PCR en utilisant 2 oligodésoxynucléotides, 5' CTC AGG AGT TGA CTT GGG 3' (contenant le site HincII unique dans le plasmide pPB010) et 5' CCG GAT CCT CAC AGT CTG GTC TCA C 3' (contenant le site BamHI unique dans le plasmide pPB010).

L'amplification PCR du fragment HincII-BamHI a été réalisée dans 100 μ l de milieu réactionnel comprenant 10 μ l de tampon Taq DNA polymérase x10 (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH9,0 et 1% Triton x100), 6 μ l de 25 mM MgCl₂, 3 μ l de 10 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 100 pM de chacun des 2 oligodésoxynucléotides décrits ci-dessus, 5 ng d'ADN matrice (vecteur pPB010), 2,5 U de Taq DNA polymérase (Promega) et 2 gouttes d'huile de vaseline. L'ADN a été dénaturé à 94°C pendant 5 min., soumis à 30 cycles constitués chacun de 1 min. de dénaturation à 94°C, 1 min. d'hybridation à 44°C et de 1 min. d'élongation à 72°C, puis l'élongation à 72°C a été poursuivie pendant 5 min. Cette réaction PCR a été réalisée dans la machine "DNA Thermal Cycler" de PERKIN ELMER CETUS. L'huile a été éliminée par extraction au chloroforme. Puis, les fragments d'ADN du milieu réactionnel ont été précipités en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugés à 12000g pendant 30 min., lavés à l'éthanol 70%, séchés et digérés par les 2 enzymes de restriction HincII et BamHI. Les fragments d'ADN digérés issus de l'amplification par PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, électroélus (Sambrook et al., 1989), précipités en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugés à 12000g pendant 30 min., lavés à

l'éthanol 70%, séchés, puis ligués à l'ADN plasmidique de pPB010 doublement digéré par HincII et BamHI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, soumis à la précipitation alcoolique, séché. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur et 50 ng de fragments d'ADN digérés issus de l'amplification PCR, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μ l en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Certains des clones retenus ont été vérifiés par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). Le plasmide résultant a été appelé pBIOC102.

a. CONSTRUCTION DES PLASMIDES BINAIRES pBIOC104 ET pBIOC105 CONTENANT PS-RabG.

Le plasmide pBIOC102 a été digéré doublement par BglIII et HindIII afin de supprimer la séquence codant pour le peptide signal naturel de la glycoprotéine G rabique et les 9 premiers acides aminés de la protéine RabG mature (KFPIYTIPDKL). Cette séquence a été remplacée par celle codant pour le peptide signal PS de 23 acides aminés (ATG AAA GCC TTC ACA CTC GCT CTC TTC TTA GCT CTT TCC CTC TAT CTC CTG CCC AAT CCA GCC CAT TCC) fusionnée à celle codant pour les 9 premiers codons de la protéine RabG mature ("PS-9 premiers codons de RabG mature"). La séquence "PS-9 premiers

codons de RabG mature" a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pMAT103 (Matuoka et Nakamura, 1991) à l'aide des 2 oligodésoxynucléotides, 5' cgagatctgaattcaacaATG AAA GCC TTC ACA CTC GC 3' (contenant les sites BglII unique et EcoRI supplémentaire dans le plasmide pPB010) et 5' GG AAG CTT GTC TGG GAT CGT GTA AAT AGG GAA TTT GGA ATG GGC TGG ATT GGG CAG G 3' (contenant le site HindIII unique dans le plasmide pPB010) en suivant le protocole d'amplification PCR décrit précédemment. La température d'hybridation a été de 40 °C. Après double digestion enzymatique par BglII et HindIII, les fragments d'ADN issus de l'amplification PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, électroélus (Sambrook et al., 1989), précipités en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugés à 12000g pendant 30 min., lavés à l'éthanol 70%, séchés, puis ligués à l'ADN plasmidique de pBIOC101 doublement digéré par BglII et HindIII, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur et 50 ng de fragments d'ADN digérés issus de l'amplification PCR, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 µg/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Certains des clones retenus ont été vérifiés par séquençage à l'aide du kit de

séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). Les séquences codant pour PS et RabG mature ont été clonées en maintenant leurs phases de lecture ouverte (c'est-à-dire, de telle sorte qu'elles constituent une phase ouverte de lecture unique). La séquence de clivage entre les séquences PS et RabG mature est Ser-Lys. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC103.

A partir de pBIOC103, le fragment EcoRI portant la séquence PS-RabG a été isolé par digestion enzymatique par EcoRI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché, et ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC21 digéré au site EcoRI et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 100 ng de vecteur pBIOC21 déphosphorylé et 50 ng de fragments d'ADN contenant PS-RabG, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μ l en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 μ g/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le clone résultant a été appelé pBIOC104. La séquence nucléique du fragment codant pour la protéine recombinante PS-RabG a été vérifiée par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). L'ADN

plasmidique du vecteur binaire pBIOC104 a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters et al. (1978). La validité du clone retenu a été vérifiée par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique introduit.

L'obtention de pBIOC105 est similaire à celle de pBIOC104 excepté que le fragment EcoRI portant la séquence PS-RabG a été cloné au site XbaI de pBIOC82. Les sites EcoRI de l'insert et XbaI du vecteur ont été soumis à l'action de la Klenow. Les méthodes usuelles de clonages ont été appliquées.

b. CONSTRUCTION DES PLASMIDES BINAIRES pBIOC107 ET pBIOC108 CONTENANT BL-RabG.

Le plasmide pBIOC103 a été digéré doublement par BglII et HindIII afin de supprimer la séquence codant pour le peptide signal PS et les 9 premiers acides aminés de la protéine RabG mature (KFPIYTIPDKL). Cette séquence a été remplacée par celle codant pour le peptide signal BL de 26 acides aminés (ATG AAG ATG ATG AGC ACC AGG GCC CTC GCT CTC GGC GCG GCC GCC GTC CTC GCC TTC GCG GCG GCG ACC GCG CAC GCC) fusionnée à celle codant pour les 9 premiers codons de la protéine RabG mature ("BL-9 premiers codons de RabG mature"). La séquence "BL-9 premiers codons de RabG mature" a été amplifiée par PCR à partir du plasmide BLc3 (Lerner et Raikhel, 1989) à l'aide des 2 oligodésoxynucléotides, 5' ggagatctgaattcaacaATG AAG ATG ATG AGC ACC AGG 3' (contenant les sites BglII unique et EcoRI supplémentaire dans le plasmide pBIOC102) et 5' AGG AAG CTT GTC TGG GAT CGT GTA AAT AGG GAA TTT GGC GTC CGC GGT CGC CGC G 3' (contenant le site HindIII unique dans le plasmide pBIOC102) en suivant le protocole d'amplification PCR décrit précédemment. La température

d'hybridation a été de 65°C. Après double digestion enzymatique par BglII et HindIII, les fragments d'ADN issus de l'amplification PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, électroélués (Sambrook et al., 1989), précipités en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugés à 12000g pendant 30 min., lavés à l'éthanol 70%, séchés, puis ligués à l'ADN plasmidique de pBIOC102 doublement digéré par BglII et HindIII, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur et 50 ng de fragments d'ADN digérés issus de l'amplification PCR, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 µg/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Certains des clones retenus ont été vérifiés par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7™ commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). Les séquences codant pour BL et RabG mature ont été clonées en maintenant leurs phases de lecture ouverte (c'est-à-dire, de telle sorte qu'elles constituent une phase ouverte de lecture unique). La séquence de clivage entre les séquences BL et RabG mature est Ala-Lys. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC106.

A partir de pBIOC106, le fragment EcoRI portant la séquence BL-RabG a été isolé par digestion enzymatique

par EcoRI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché, et ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC21 digéré au site EcoRI et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 100 ng de vecteur pBIOC21 déphosphorylé et 50 ng de fragments d'ADN contenant BL-RabG, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μ l en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 μ g/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le clone résultant a été appelé pBIOC107. La séquence nucléique du fragment codant pour la protéine recombinante BL-RabG a été vérifiée par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). L'ADN plasmidique du vecteur binaire pBIOC107 a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters et al. (1978). La validité du clone retenu a été vérifiée par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique introduit.

L'obtention de pBIOC108 est similaire à celle de pBIOC107 excepté que le fragment EcoRI portant la séquence BL-RabG a été cloné au site XbaI de pBIOC82. Les sites EcoRI de l'insert et XbaI du vecteur ont été

soumis à l'action de la Klenow. Les méthodes usuelles de clonages ont été appliquées.

c. CONSTRUCTION DES PLASMIDES BINAIRES pBIOC110 ET pBIOC111 CONTENANT PPS-RabG.

Le plasmide pBIOC102 a été digéré doublement par BglIII et HindIII afin de supprimer la séquence codant pour le peptide signal naturel de la glycoprotéine G rabique et les 9 premiers acides aminés de la protéine RabG mature (KFPIYTIPDKL). Cette séquence a été remplacée par celle codant pour le peptide signal PPS de 37 acides aminés (ATG AAA GCC TTC ACA CTC GCT CTC TTC TTA GCT CTT TCC CTC TAT CTC CTG CCC AAT CCA GCC CAT TCC AGG TTC AAT CCC ATC CGC CTC CCC ACC ACA CAC GAA CCC GCC) fusionnée à celle codant pour les 9 premiers codons de la protéine RabG mature ("PS-9 premiers codons de RabG mature"). La séquence "PPS-9 premiers codons de RabG mature" a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pMAT103 (Matuoka et Nakamura, 1991) à l'aide des 2 oligodésoxynucléotides, 5' cgagatctgaattcaacaATG AAA GCC TTC ACA CTC GC 3' (contenant les sites BglIII unique et EcoRI supplémentaire dans le plasmide pPB010) et 5' GG AAG CTT GTC TGG GAT CGT GTA AAT AGG GAA TTT GGC GGG TTC GTG TGT GGT GGG GAG G 3' (contenant le site HindIII unique dans le plasmide pPB010) en suivant le protocole d'amplification PCR décrit précédemment. La température d'hybridation a été de 40°C. Après double digestion enzymatique par BglIII et HindIII, les fragments d'ADN issus de l'amplification PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, électroélusés (Sambrook et al., 1989), précipités en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugés à 12000g pendant 30 min., lavés à l'éthanol

70%, séchés, puis ligués à l'ADN plasmidique de pBIOC101 doublement digéré par BglII et HindIII, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur et 50 ng de fragments d'ADN digérés issus de l'amplification PCR, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μ l en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Certains des clones retenus ont été vérifiés par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). Les séquences codant pour PPS et RabG mature ont été clonées en maintenant leurs phases de lecture ouverte (c'est-à-dire, de telle sorte qu'elles constituent une phase ouverte de lecture unique). La séquence de clivage entre les séquences PPS et RabG mature est Ala-Lys. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC109.

A partir de pBIOC109, le fragment EcoRI portant la séquence PPS-RabG a été isolé par digestion enzymatique par EcoRI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché, et ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC21 digéré au site EcoRI et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 100 ng de vecteur pBIOC21 déphosphorylé

et 50 ng de fragments d'ADN contenant PPS-RabG, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μ l en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 μ g/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le clone résultant a été appelé pBIOC110. La séquence nucléique du fragment codant pour la protéine recombinante PPS-RabG a été vérifiée par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). L'ADN plasmidique du vecteur binaire pBIOC110 a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters et al. (1978). La validité du clone retenu a été vérifiée par digestion enzymatique de l'ADN plasmidique introduit.

L'obtention de pBIOC111 est similaire à celle de pBIOC110 excepté que le fragment EcoRI portant la séquence PS-RabG a été cloné au site XbaI de pBIOC82. Les sites EcoRI de l'insert et XbaI du vecteur ont été soumis à l'action de la Klenow. Les méthodes usuelles de clonages ont été appliquées.

II. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT POUR LA PROTEINE RECOMBINANTE DE LA GLYCOPROTEINE G RABIQUE ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES GRAINES DE COLZA.

L'expression dans les graines de colza du gène viral codant pour la glycoprotéine G rabique (RabG) a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

1. un des promoteurs décrits ci-dessous :

- le promoteur pCRU correspondant à la région 5' non codante du gène de la protéine de réserve de graines, la CRUCIFERINE A de radis (Depigny-This et al., 1992), et permettant une expression spécifique dans les graines;

- le promoteur pGEA1 correspondant à la région 5' non codante du gène de la protéine de réserve de graines, GEA1 d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993), et permettant une expression spécifique dans les graines ;

- le promoteur pGEA6 correspondant à la région 5' non codante du gène de la protéine de réserve de graines, GEA6 d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., 1993), et permettant une expression spécifique dans les graines ;

2. une des séquences terminatrices décrites ci-dessous :

- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA 35S, qui correspond à la région en 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (Franck et al., 1980) ;

- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

Pour obtenir un plasmide binaire similaire à pBIOC21 mais dont le promoteur pd35S a été remplacé par le promoteur pCRU, le fragment "EcoRI traité à la Klenow - BamHI", contenant le promoteur pCRU, a été isolé à partir du plasmide pBI221-CRURSP. Le plasmide pBI221-CRURSP dérive de pBI221 (commercialisé par Clontech) par remplacement du promoteur 35S par le promoteur pCRU.

Le fragment "EcoRI traité à la Klenow - BamHI" portant le promoteur pCRU a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché et ligué à l'ADN plasmidique de pJIT163 (décrit dans le paragraphe I.) digéré par KpnI, traité à la T4 DNA Polymérase (Biolabs) selon les recommandations du fabricant, puis digéré par BamHI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé décrit ci-dessus et 200 ng de fragments d'ADN "EcoRI traité à la Klenow - BamHI" décrits ci-dessus dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC27.

La cassette d'expression, constituée du promoteur pCRU et du terminateur polyA35S a été isolée à partir de pBIOC27 par digestion totale XhoI suivie d'une digestion partielle EcoRI. Elle a été purifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroéluée (Sambrook et al., 1989), soumise à la précipitation alcoolique, séchée, traitée à la Klenow (Biolabs) selon les recommandations du fabricant et liguée à l'ADN plasmidique de pBIOC4 au site EcoRI traité à la Klenow et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé décrit ci-dessus et 200 ng de fragments d'ADN XhoI-EcoRI décrits ci-dessus dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 μ g/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC28.

Pour obtenir le plasmide binaire pBIOC91, la cassette d'expression "pGEA1D - tNOS", isolée à partir de pBSII-pGEA1D, a été introduite dans le plasmide binaire pSCV1.2 lui-même obtenu par clonage du fragment HindIII portant la cassette d'expression "p35S - nptII - tNOS" décrite par Fromm et al. (1986) au site HindIII de pSCV1 construit par Edwards G.A. en 1990 en suivant les procédés usuels de clonage.

Le plasmide pBSII-pGEA1D a été obtenu en deux étapes :

- d'une part, le fragment SacI-EcoRI portant tNOS (terminateur du gène de la nopaline synthase) d'*Agrobacterium tumefaciens*, traité à l'enzyme T4 DNA polymérase (Biolabs) selon les recommandations du fabricant et purifié, a été cloné au site EcoRV de pBSIISK+ commercialisé par Stratagene, déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé et 200 ng de fragments d'ADN contenant tNOS décrits ci-dessus dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, *Escherichia coli* DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Certains des clones retenus ont été vérifiés par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). Le plasmide résultant a été appelé pBSII-tNOS.

- d'autre part, le fragment portant pGEA1D digéré doublement par HindIII traité à l'enzyme Klenow et BamHI, purifié, a été cloné aux sites "XbaI traité à la Klenow et BamHI" du plasmide pBSII-tNOS. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur décrit ci-dessus et 50 ng de fragments d'ADN décrits ci-dessus dans un milieu réactionnel de 10 μ l en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant

16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBSII-pGEA1D.

Puis, la cassette d'expression "pGEA1D - tNOS" portée par le fragment XbaI-HindIII traité à la Klenow, a été clonée au site SmaI de pSCV1.2 déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 20 ng de pSCV1.2 déphosphorylé et 200 ng de fragments portant la cassette d'expression "pGEA1D - tNOS", dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC91.

Pour obtenir le plasmide binaire pBIOC92 similaire à pBIOC21 mais dont le promoteur pd35S a été remplacé par le promoteur pGEA6D, le fragment EcoRI - BamHI traité à la Klenow, contenant le promoteur pGEA6, a été isolé à partir du plasmide pGUS2-pGEA6. Le clone pGUS-2-pGEA6 dérivant de pBI221 par remplacement du p35S par le promoteur pGEA6. Il comporte 2 ATG en phase : ATG du gène GEA6 (Em6) et

ATG du gène gus. L'ATG du gène GEA6 a été détruit. Le fragment d'ADN compris entre le site AccI et les séquences en amont de l'ATG du gène GEA6 du clone pGUS-2-pGEA6 a donc été amplifié par PCR à l'aide des 2 oligonucléotides : 5' AAGTACGGCCACTACCACG 3' et 5' CCCGGGGATCCTGGCTC 3'. La température d'hybridation a été adaptée.

Le fragment amplifié par PCR a été digéré par AccI et BamHI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, électroélué (Sambrook et al., 1989), précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, puis ligué à l'ADN plasmidique de pGUS-2-GEA6 doublement digéré par AccI et BamHI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur décrit ci-dessus et 50 ng de fragments d'ADN digérés issus de l'amplification PCR décrits ci-dessus dans un milieu réactionnel de 10 µl en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 µg/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Certains des clones retenus ont été vérifiés par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7TM commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger et al., 1977). Le clone résultant a été appelé pGUS-2-pGEA6D.

Le fragment EcoRI - BamHI portant le promoteur pGEA6D isolé à partir de pGUS-2-pGEA6D, traité à la Klenow selon les recommandations du fabricant (Biolabs), a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook et al., 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché et ligué au site XhoI traité par l'enzyme Klenow de l'ADN plasmidique de pBIOC21 modifié. Le plasmide pBIOC21 modifié a été obtenu par double digestion par HindIII traité à la Klenow et KpnI de pBIOC21 pour déléter le fragment portant le promoteur pd35S et le remplacer par le fragment KpnI-EcoRV portant le polylinker composé des sites KpnI-XhoI-SalI-ClaI-HindIII-BamHI-SmaI-EcoRI-EcoRV de pBSIISK+.

La ligation a été réalisée avec 20 ng de pBIOC21 modifié déphosphorylé et 200 ng de fragments d'ADN EcoRI-BamHI, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 μ g/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC92.

Puis, la cassette d'expression "pGEA6D - t35S" a été isolée à partir de pBIOC92. Cette cassette d'expression portée par le fragment KpnI-EcoRV traité à l'enzyme T4 DNA polymérase (Biolabs) selon les recommandations du fabricant et purifié, a été clonée au site SmaI de pSCV1.2 déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La

ligation a été réalisée avec 20 ng de pSCV1.2 déphosphorylé et 200 ng de fragments portant la cassette d'expression "pGEA1D - tNOS", dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC112.

CONSTRUCTION DES PLASMIDES BINAIRES pBIOC113, pBIOC114 ET pBIOC115 CONTENANT PPS-RABG SOUS CONTROLE DE PROMOTEURS PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES SEMENCES.

Le plasmide pBIOC109, décrit précédemment en I.c., contient le fragment EcoRI portant la séquence PPS-RabG.

Ce fragment a été isolé par digestion enzymatique par EcoRI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, soumis à la précipitation alcoolique, séché et ligué à pBIOC28, pBIOC91 et pBIOC112 digéré par EcoRI et déphosphorylé pour résulter en pBIOC113, pBIOC114 et pBIOC115 respectivement.

III. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT POUR LA PROTEINE RECOMBINANTE DE LA GLYCOPROTEINE G RABIQUE ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES SEMENCES DE MAIS.

a. CONSTRUCTION DES PLASMIDES pBIOC116 ET pBIOC117 CONTENANT RS-LGC ET PERMETTANT UNE EXPRESSION CONSTITUTIVE DANS LES SEMENCES DE MAIS.

L'expression constitutive dans les semences de maïs du gène viral codant pour la glycoprotéine G rabique (RabG) a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

1. un des deux promoteurs permettant une expression constitutive :

- promoteur actine de riz suivi de l'intron actine de riz (pAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par McElroy et al. (1991) ;

- promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur). Il correspond à une duplication des séquences activant la transcription situées en amont de l'élément TATA du promoteur 35S naturel (Kay et al., 1987);

2. un des deux terminateurs :

- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA 35S, qui correspond à la région en 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (Franck et al., 1980) ;

- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

Le plasmide pBIOC116 où la séquence codant pour PS-RabG est placée sous contrôle de pAR-IAR a été

obtenu par clonage du fragment EcoRI portant la séquence codant pour PS-RabG aux sites "NcoI et SaliI" de pBSII-pAR-IAR-tNOS.

Le fragment EcoRI portant la séquence codant pour PS-RabG a été isolée à partir de pBIOC103 par digestion enzymatique par EcoRI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, soumis à la précipitation alcoolique, séché, puis traité par l'enzyme Klenow. Le plasmide pBSII-pAR-IAR-tNOS a été digéré doublement par SaliI et NcoI, purifié, traité à l'enzyme Mung Bean Nucléase (Biolabs) et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations des fabricants. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé et 200 ng de fragments d'ADN contenant la séquence codant pour RS-LGC, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC116.

Le plasmide pBSII-pAR-IAR-tNOS résulte du clonage aux sites "Eco0109I traité à la Klenow et KpnI" de pBSII-tNOS du fragment SnaBI-KpnI portant la séquence correspondant à "pAR-IAR-début de la séquence codante pour le gène gus" isolé à partir du plasmide pAct1-F4. La ligation a été réalisée avec 100 ng de vecteur et 50 ng de fragments d'ADN, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μ l digérés en présence de 1

μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml amplicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

Le plasmide pBSII-tNOS a été obtenu par clonage au site EcoRV déphosphorylé de pBSIISK+ commercialisé par Stratagene, du fragment SacI-EcoRI portant la séquence tNOS isolé à partir de pBI121 commercialisé par Clontech par double digestion enzymatique par SacI et EcoRV, soumis à une purification par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, et traité à l'enzyme T4 DNA polymérase. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé et 200 ng de fragments d'ADN contenant la séquence tNOS, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 20 μ l en présence de 2 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 μ l de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml amplicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

Le plasmide pBIOC117 où la séquence codant pour PS-RabG est placée sous contrôle de pd35S a été obtenu par clonage aux sites "KpnI et XbaI" du plasmide pBSIISK+ commercialisé par Stratagene, du fragment KpnI-XbaI portant la séquence correspondant à "pd35S-

PS-RabG" isolé à partir de pBIOC103. La ligation a été réalisée avec 100 ng de vecteur et 50 ng de fragments d'ADN, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μ l digérés en présence de 1 μ l de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μ g/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction.

b. CONSTRUCTION DES PLASMIDES pBIOC118 ET pBIOC119 CONTENANT PS-RabG ET PS-RabG-KDEL RESPECTIVEMENT ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS L'ALBUMEN DES SEMENCES DE MAIS.

L'expression dans l'albumen des semences de maïs du gène viral codant pour la glycoprotéine G rabique (RabG) a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

1. le promoteur du gène de γ zéine de maïs (γ zéine) contenu dans le plasmide py63 (Reina et al., 1990, N.A.R., 18, 6426). Le plasmide py63 résulte du clonage de γ zéine aux sites HindIII et XbaI d'un plasmide pUC18 renfermant, entre ses sites HindIII et EcoRI, la cassette d'expression "p35S-gus-tNOS" de pBI221 commercialisé par Clontech. Il permet une expression dans l'albumen des semences de maïs.

2. la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide

Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (Depicker et al., 1982).

Le plasmide pBIOC118 où la séquence codant pour PS-RabG est placée sous contrôle du pyzéine, a été obtenu par clonage aux sites "SacI traité par l'enzyme T4 DNA polymérase et BamHI" du plasmide pγ63, du fragment "BamHI traité à la Klenow - BglII" isolé à partir de pBIOC103. La ligation a été réalisée avec 100 ng du vecteur et 50 ng de fragments d'ADN, décrits ci-dessus, dans un milieu réactionnel de 10 μl en présence de 1 μl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et de 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries, Escherichia coli DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 μg/ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le clone résultant a été appelé pBIOC118.

Le plasmide pBIOC119 résulte de la substitution du fragment BamHI-HincII de pBIOC118 par le fragment BamHI-HincII portant la séquence codant pour KDEL placée avant le codon stop obtenu par amplification PCR selon les procédés décrits ci-dessus. Les 2 oligodésoxynucléotides utilisés lors de cette réaction ont été : 5' GGT CTC AGG AGT TGA CTT GGG TCT CCC GAA CTG GG 3' (site HincII unique) et 5' CCC GGA TCC TCA TAG CTC ATC TTT CAG TCT GGT CTC ACC CCC ACT C 3' (séquence codant pour KDEL et site BamHI unique). La température d'hybridation a été de 50°C. Le clonage a été effectué comme décrit précédemment.

B. EXEMPLES DE TRANSFORMATION GENETIQUE DU TABAC, DU COLZA ET DU MAIS

I. OBTENTION DE PLANTES DE TABAC TRANSGENIQUES

Les plantes de tabac utilisées pour les expériences de transformation (Nicotiana tabacum var. Xanthi NC et PDB6) sont cultivées in vitro sur le milieu de base de Murashige et Skoog (1962) additionné des vitamines de Gamborg et al. (1968, Sigma référence M0404), de saccharose à 20g/L et d'agar (Merck) à 8g/L. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avec une solution de potasse avant autoclavage à 120°C pendant 20 min. Les plantules de tabac sont repiquées par bouture des entre-noeuds tous les 30 jours sur ce milieu de multiplication MS20.

Toutes les cultures in vitro sont réalisées en enceinte climatisée, dans les conditions définies ci-dessous :

- Intensité lumineuse de $30\mu E.m^{-2}.s^{-1}$; photopériode de 16h;

- Thermopériode de 26°C le jour, 24°C la nuit.

La technique de transformation utilisée est dérivée de celle de Horsch et al. (1985).

Une préculture d'Agrobacterium tumefaciens souche LBA4404 contenant les plasmides binaires, est réalisée durant 48h à 28°C sous agitation, dans du milieu LB additionné des antibiotiques adéquats (rifampicine et tétracycline). La préculture est ensuite diluée au 50ème dans le même milieu et cultivée dans les mêmes conditions. Après une nuit, la culture est centrifugée (10 min, 3000 rpm), les bactéries sont reprises dans un volume équivalent de milieu MS30 (30g/L saccharose) liquide et cette suspension est diluée au 10ème.

Des explants d'environ 1cm² sont découpés à partir des feuilles des plantules décrites ci-dessus. Ils sont ensuite mis au contact de la suspension bactérienne pendant 1h, puis séchés rapidement sur papier filtre et placés sur un milieu de coculture (MS30 solide).

Après 2 jours, les explants sont transférés en boîtes de Pétri sur le milieu de régénération MS30, contenant un agent sélectif, la kanamycine (200mg/L), un bactériostatique, l'augmentin (400mg/L) et les hormones nécessaires à l'induction de bourgeons (BAP, 1mg/L et ANA, 0,1mg/L). Un repiquage des explants est effectué sur le même milieu après 2 semaines de culture. Après 2 nouvelles semaines, les bourgeons sont repiqués en boîtes de Pétri sur le milieu de développement composé du milieu MS20 additionné de kanamycine et d'augmentin. Après 15 jours, les bourgeons sont repiqués en pots sur le même milieu dont la concentration en kanamycine a été diminuée de moitié. L'enracinement prend environ 20 jours, au terme desquels les plantules peuvent être clonées par bouture d'entre-noeuds ou sorties en serre.

II. OBTENTION DE PLANTES DE COLZA TRANSGENIQUES

Les graines de colza de printemps (Brassica napus cv WESTAR ou lignées Limagrain) sont désinfectées pendant 40 minutes dans une solution de Domestos à 15%. Après 4 rinçages à l'eau stérile, les graines sont mises à germer, à raison de 20 graines par pots de 7 cm de diamètre sur 10cm de haut, sur du milieu minéral de Murashige et Skoog (Sigma, référence M 5519) avec 30 g/l de saccharose et solidifié avec de l'agargel à 5 g/l. Ces pots sont placés dans une chambre de culture à 26°C avec une photopériode de 16h/8h et sous une intensité lumineuse de l'ordre de

80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Après 5 jours de germination, les cotylédons sont prélevés stérilement en coupant chaque pétiole environ 1 mm au dessus du noeud cotylédonaire.

Parallèlement une culture d'Agrobacterium tumefaciens souche LBA4404, contenant le plasmide pBIOC114, est cultivée en erlen meyer de 50 ml, pendant 36h à 28°C dans 10 ml de milieu bactérien YT complémenté avec les antibiotiques utiles à la sélection de la souche utilisée. Cette préculture sert à ensemercer à 1% une nouvelle culture bactérienne effectuée dans les mêmes conditions. Au bout de 14h la culture est centrifugée 15 min à 3000 rpm et les bactéries sont reprises dans un volume équivalent de milieu de germination liquide. Cette suspension est distribuée dans des boîtes de pétri de 5 cm de diamètre à raison de 5 ml/ boîte.

L'extrémité sectionnée du pétiole est immergée quelques secondes dans la solution d'agrobactéries ainsi préparée, puis le pétiole est enfoncé de quelques millimètres dans le milieu de régénération. Ce milieu a la même composition de base que le milieu de germination avec en plus 4 mg/l de benzyl-amino-purine, phytohormone favorisant la néoformation de bourgeons. Douze explants (cotylédon avec pétiole) sont mis en culture par boîte de pétri de 9 cm de diamètre (Greiner, référence 664102).

Après 2 jours de coculture dans les mêmes conditions environnementales que les germinations, les explants sont repiqués dans des boîtes phytatray (Sigma, référence P1552) contenant le milieu précédent complémenté avec un agent sélectif: 45 mg/l du sulfate de kanamycine (Sigma, référence K4000) et un bactériostatique: mélange de 1/6 (en poids) de sel de potassium d'acide clavulanique et de 5/6 sel d'ammonium d'amoxicilline (Augmentin injectable) à raison de 600 mg/l.

Deux fois de suite, à 3 semaines d'intervalle, les explants sont repiqués stérilement sur du milieu neuf dans les mêmes conditions.

Les bourgeons verts apparus à la fin du deuxième ou du troisième repiquage sont séparés de l'explant et mis en culture individuellement dans des pots transparents de 5 cm de diamètre et de 10 cm de haut contenant un milieu identique au précédent mais dépourvu de BAP. Après 3 semaines de culture la tige du bourgeon transformé est sectionnée et le bourgeon est repiqué dans un pot de milieu frais. Au bout de trois à quatre semaines les racines sont assez développées pour permettre l'acclimatation de la plantule au phytotron. Les bourgeons qui ne sont pas verts ou enracinés sont éliminés. Ces plantules sont alors transplantées dans des godets de 7 cm de côté remplis de terreau (norme NF U44551: 40 % tourbe brune, 30 % bruyère tamisée et 30 % sable) saturé en eau. Après deux semaines d'acclimatation en phytotron (température 21°C, photopériode 16h/8h et 84 % d'humidité relative), les plantules sont rempotées dans des pots de 12 cm de diamètre remplis du même terreau enrichi en engrais retard (Osmocote, à raison de 4g/l de terreau) puis transportées en serre (classe S2) régulée à 18°C, avec deux arrosages quotidiens de 2 minutes à l'eau.

Dès l'apparition des fleurs celles-ci sont ensachées (Crispac, référence SM 570y 300 mm * 700 mm) de façon à empêcher la fécondation croisée.

Lorsque les siliques sont arrivées à maturité, elles sont récoltées, séchées, puis battues. Les graines obtenues servent au dosage de l'activité biochimique. La sélection de la descendance transgénique se fait par germination sur un milieu contenant du sulfate de kanamycine à raison de 100 à 150 mg/l (selon les géotypes). Les conditions

opératoires sont identiques à celles décrites au début de ce document à ceci près que les germinations sont effectuées en tubes de verre avec une seule graine par tube. Seules les plantules développant des racines secondaires les trois premières semaines sont acclimatées en phytotron avant d'être passées en serre.

III. OBTENTION DE PLANTES DE MAÏS TRANSGENIQUES

a) Obtention et utilisation de cal de maïs comme cible pour la transformation génétique :

La transformation génétique du maïs, quelle que soit la méthode employée (électroporation, Agrobacterium, microfibres, canon à particules), requiert généralement l'utilisation de cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal friable embryogène (dit de type II) de maïs.

Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype HI, II ou (A188 x B73) selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (Malze Handbook, 1994, M. Freeling, V. Walbot Eds., pages 665-671). Les cals ainsi obtenus sont multipliés et maintenus par repiquages successifs tous les quinze jours sur le milieu d'initiation.

Des plantules sont ensuite régénérées à partir de ces cals en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain et al. (Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989, 18 : 143-151). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

b) Utilisation du canon à particules pour la transformation génétique du maïs :

Le paragraphe précédent décrit l'obtention et la régénération des lignées cellulaires nécessaires à la transformation ; on décrit ici une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules identique à celui décrit par J. Finer (Plant Cell Report, 1992, 11 : 323-328) ; les cellules cibles sont des fragments de cals décrits dans le paragraphe 1. Ces fragments d'une surface de 10 à 20 mm² ont été disposés, 4 heures avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une boîte de pétri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0.2M de mannitol + 0.2 M de sorbitol. Les plasmides portant les gènes à introduire sont purifiés sur colonne Qiagen®, en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungsten (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (Nature, 1987, 327 :70-73). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. Finer (Plant Cell Report, 1992, 11 : 323-328).

Les boîtes de cals ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais® puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24 heures après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif dont la nature et la concentration peuvent varier selon le gène utilisé (voir paragraphe 3). Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en composés actifs de certains

herbicides (Basta®, Round up®) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine...)

On obtient après 3 mois, ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélection, habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0.8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules (cf. paragraphe a). Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées, toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

C. MISE EN EVIDENCE DE LA GLYCOPROTEINE G RABIQUE

I. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA GLYCOPROTEINE G RABIQUE DANS LES FEUILLES , LES GRAINES DE TABAC ET LES GRAINES DE COLZA.

Le protocole d'extraction de la glycoprotéine G de la rage à partir des feuilles est le suivant:

- 1 g de feuilles (poids frais) de tabac est broyé dans l'azote liquide puis suspendu, à 4°C, dans 4 ml de tampon Tris-HCl 100 mM pH 7.5, additionné d'EDTA 1 mM, Triton X100 0.2% et NaCl 250 mM.

L'homogénat ainsi obtenu est immédiatement centrifugé à 4°C pendant 10 min à 10 000 rpm.

Pour les graines de tabac ou de colza, l'extraction est réalisée à raison de 100 mg de

graines pour 4 ml de tampon. Pour les cals de maïs, l'extraction est effectuée à raison de 0.5 g dans 1 ml de tampon.

Après centrifugation, le surnageant est récupéré puis filtré sur MIRACLOTH (CALBIOCHEM). Un dosage des protéines solubles est alors réalisé par la méthode de Bradford (1976).

La glycoprotéine G rabique est mise en évidence par immunodétection de type "Western" ("Western blots") (Renart et Sandoval, 1984) et dosée par un test ELISA.

II. IMMUNODETECTION PAR WESTERN BLOT DE LA GLYCOPROTEINE G RABIQUE EXPRIMEE DANS LES FEUILLES DE TABAC, DANS LES GRAINES DE TABAC ET DE COLZA TRANSGENIQUES ET DANS LES CALS DE MAIS TRANSFORMES.

Les protéines extraites selon le protocole ci-dessus sont dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 min, en présence de tampon Tris HCl 50 mM ph 6.8; SDS 4%; BSH 1%; Saccharose 20% et bleu de bromophénol 0.01%.

Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse, sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes à 8%, 10% ou 12.5%, selon la technique de Laemmli U.K. (1970) à raison de 50 ug de protéines totales par échantillon.

Après migration les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Un anticorps anti-glycoprotéine G de la rage, obtenu chez le mouton est utilisé comme sonde et la révélation est effectuée au moyen d'un anticorps anti-IgG de mouton marqué à la phosphatase alcaline.

Les essais ont été réalisés sur les plantes transformées avec les construits suivants : pBIOC104, pBIOC110, pBIOC114, pBIOC116.

La protéine témoin migre sous la forme de 2 bandes de poids moléculaires apparents 66 et 61 KDa. La forme la plus légère correspond à une protéine, tronquée au niveau de l'extrémité C terminale (Wunner and al, 1983), plus soluble que la protéine complète.

L'analyse des extraits de feuilles et de graines de tabac, ainsi que dans les graines de colza et les cals de maïs, révèle une bande de poids moléculaire d'environ 66 KDa, (Fig 1, 2, 3 et 4) ce qui correspond à celui de la glycoprotéine G du virus.

Aucune bande correspondant à la glycoprotéine G rabique n'est détectée dans les extraits protéiques de feuilles et de graines de tabac et de colza non transformées.

III. DOSAGE PAR TEST ELISA DE LA GLYCOPROTEINE G RABIQUE EXPRIMEE DANS LES FEUILLES DE TABAC ET LES GRAINES DE TABAC ET DE COLZA TRANSGENIQUES.

Pour le dosage de la glycoprotéine G exprimée dans les feuilles et dans les graines de tabac, le protocole suivant a été mis en oeuvre :

- extraction de la glycoprotéine : les échantillons de feuilles ou de graines, prélevés sur glace le jour du test, sont broyés à raison de 1g pour 4ml de tampon d'extraction pour les feuilles et 100mg pour 4ml de tampon d'extraction pour les graines.

La quantité de protéines totales est alors déterminée par la méthode de Bradford et tous les extraits sont ramenés à une concentration de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ces extraits sont dilués extemporainement au 1/1000. La gamme de référence (glycoprotéine G : 0 à 20 mg/ml) est préparée dans un extrait de plante non transformée broyé, standardisé et dilué au 1/1000 de la même façon.

Graines : Technique ELISA sandwich

La glycoprotéine de la rage, après avoir été retenue par un anticorps monoclonal anti-glycoprotéine G de la rage adsorbé sur une plaque de polychlorure de vinyl, est mise en contact avec un anticorps polyclonal anti-glycoprotéine G de la rage. Celui-ci est révélé à l'aide d'IgG, marqués à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline et dirigés contre le fragment F(ab')₂ de l'anticorps polyclonal précédent.

Le dosage s'effectue alors par lecture directe sur une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions, avec de la glyco-protéine G purifiée.

Feuilles : Technique ELISA directe

Chacun de ces échantillons est absorbé sur la plaque (150 µl/puits) pendant 2 heures à 37°C, puis marqué, sans étape de saturation préalable, par un anticorps polyclonal de cheval purifié (100 µl/puits, 1 heure, température ambiante), et enfin, révélé par un anticorps marqué à la phosphatase alcaline (SIGMA réf. A6063), dirigé contre le précédent et dilué au 1/1000 (100 µl/puits, 30 minutes, température ambiante). Entre chaque étape, les lavages sont effectués avec du PBS additionné de Tween 20 à 0.1% (P/V). Les résultats sont ramenés à une quantité de glycoprotéine par mg de protéines totales.

La quantité de glycoprotéine G varie de 1.5 à 0.4 µg/ml pour les différents extraits testés.

REFERENCES

- Kay R., Chan A., Daly M., McPherson J., 1987, *Science*, 236 : 1299 ;
- Franck A., Guilley H., Jonard G., Richards K., Hirth L., 1980, *Cell*, 21 : 285 ;
- An G., 1986, *Plant Physiol.*, 81 : 86 ;
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989, *Molecular Cloning. A laboratory Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press ;
- Depicker A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P., Goodman H.M., 1982, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1 : 561 ;
- Berg D. E., Berg C. M., 1983, *Biotechnology*, 1 : 417 ;
- Close, Rodriguez, 1982, *Gene*, 20 : 305 ;
- Liu C-N., Steck T. R., Habeck L. L., Meyer J. A., Gelvin S. B., 1993, *Mol. Plant Microbe Interactions*, 6 : 144 ;
- Hanahan D., 1983, *J. Mol. Biol.*, 166 : 557 ;
- Birnboim H. C., Doly J., 1979, *Nucl. Acids Res.*, 7 : 1513 ;
- Matsuoka K., Nakamura K., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 : 834 ;
- Guerineau F., Mullineaux P., 1993, *Plant Molecular Biology LABFAX*, Croy R. R. D. (ed), BIOS Scientific Publishers, Blackwell Scientific Publications ;
- Murakami S., Hattori T., Nakamura K., 1986, *Plant Mol. Biol.*, 7 : 343 ;
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 : 5463 ;
- Holster M., de Waele D., Depicker A., Messens E., van Montagu M., Schell J., 1978, *Mol. Gen. Genet.*, 163 : 181 ;
- Depigny-This D., Raynal M., Aspart L., Delseny M., Grellet F., 1992, *Plant Mol. Biol.*, 20 : 467 ;
- Ni M., Cui D., Einstein J., Narasimhulu S., Vergara C. E., Gelvin S.B., 1995, *Plant J.*, 7 : 661 ;

- Lerner D. R., Raikhel N. V., 1989, *Plant Physiol.*, 91 : 124 ;
- Wunner W. H., Dietzschold B., Curtis P. J., Wiktor T. J., 1983, *J. Gen. Virol.*, 64 : 1649 ;
- Bradford M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72 : 248 ;
- Renart J., Sandoval I. V., 1984, *Meth. Enzymol.*, 104 : 455 ;
- Laemmli U. K., 1970, *Nature*, 227 : 680 ;
- Kieny M. P., Lathe R., Drillien R., Spehner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H., Lecocq J. P., 1984, *Nature*, 312 : 163 ;
- Anilionis A., Wunner W. H., Curtis P. J., 1981, *Nature*, 294, 275-278 ;
- Yelverton E., Norton S., Obijeski J. F., Goeddel D. V., 1983, *Science*, 219, 614-620 ;
- Prehaud C. et al., 1989, *Virology*, 173, 390-399 ;
- Tordo N., Bourhy H., Sather S., Ollo R., 1993, *Virology*, 194, 59-69 ;
- McGarvey P. B. et al., 1995, *Bio/Technology*, 13, 1484-1487 ;
- Bourhy H. et al., 1993, *Virology*, 194, 70-81 ;
- Dietzschold B. et al., 1983, *Virology*, 124, 330-337 ;
- Coslett G. et al., 1980, *J. Gen. Virol.*, 49, 161-190 ;
- Cox J. et al., 1980, *Infection and Immunity*, 30, 572-577 ;
- Atanasiu et al., 1976, *Ann. Microbiol.*, 127B, 257-267 ;
- Tuchiya et al., 1992, *Virus Research*, 25, 1-13 ;
- Smith et al., « Laboratory Techniques in Rabies », W.H.O. Monograph Series n° 23 (M. Kaplan and H. Koprowski, Eds), 3rd ed., pages 354-357, Geneva, Switzerland.

REVENDEICATIONS

1 - Procédé pour la production de la glycoprotéine G du virus de la rage, ou d'un virus apparenté au virus de la rage, caractérisé par :

i) l'introduction, dans une cellule végétale, d'une molécule d'acide nucléique comprenant une séquence codante chimérique, comportant d'une part une séquence codant pour ladite protéine G virale mature, ou pour une protéine analogue, et d'autre part, une séquence codant pour un peptide signal N-terminal autre que celui naturellement associé à la protéine G virale, l'introduction de la séquence codante chimérique permettant l'expression dans la cellule de la protéine G ;

ii) la multiplication, sous forme de culture cellulaire, des cellules transformées, ou la régénération de plantes entières transgéniques ou chimériques à partir de ces cellules ;

iii) éventuellement l'extraction et la purification de la glycoprotéine G à partir des cellules ou des tissus végétaux ainsi obtenus.

2 - Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence codant pour le peptide signal N-terminal code pour un peptide signal d'origine végétale.

3 - Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'acide nucléique introduit dans la cellule comprend en outre des séquences régulatrices de la transcription reconnues par la cellule végétale.

4 - Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que les séquences régulatrices comprennent au moins un signal d'initiation de transcription et un signal de terminaison de transcription.

5 - Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que les signaux d'initiation et de terminaison de transcription sont d'origine végétale, ou proviennent d'un virus végétal, ou d'Agrobacterium.

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence codante chimérique comprend en outre une séquence codant pour un signal de rétention endoplasmique d'origine végétale, ou pour un signal d'adressage vacuolaire.

7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'une séquence codant pour un agent permettant la sélection des cellules transformées est également introduite dans la cellule végétale.

8 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'étape d'extraction de la glycoprotéine G comprend l'utilisation d'un ou plusieurs détergent(s), de préférence non-ionique(s).

9 - Glycoprotéine, caractérisée en ce que :

- elle est reconnue par des anticorps spécifiques à la glycoprotéine G du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage ;
- elle a un poids moléculaire de 66 kDa approximativement ;
- elle est insoluble ;
- elle est N-glycosylée par au moins un glycanne de type polymannosidique, et/ou par au moins un glycanne de type complexe comportant au sein de sa structure un ou plusieurs résidus de xylose β -1,2, et/ou un ou plusieurs résidus de fucose lié en α -1,3, et étant dépourvu de résidus d'acide sialique.

10 - Glycoprotéine selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un signal de rétention endoplasmique végétale.

11 - Glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10 caractérisée en ce qu'elle est capable d'induire la formation d'anticorps protecteurs contre le virus de la rage ou contre un virus apparenté au virus de la rage.

12 - Glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 caractérisée en ce qu'il s'agit de la glycoprotéine G du virus rabique, ayant un poids moléculaire d'environ 66 kDa.

13 - Glycoprotéine selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une analogue de la glycoprotéine G du virus rabique présentant une homologie d'environ 90% à 95% avec la protéine G du virus rabique.

14 - Glycoprotéine susceptible d'être produite par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

15 - Acide nucléique comportant une séquence codante chimérique comprenant d'une part une séquence codant pour la protéine G mature du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage, ou pour une protéine analogue, et d'autre part, une séquence codant pour un peptide signal N-terminal autre que celui naturellement associé au virus, ou les séquences complémentaires aux sus-dites séquences codantes.

16 - Acide nucléique selon la revendication 15 caractérisé en ce que la séquence codant pour le peptide signal N-terminal code pour un peptide signal d'origine végétale.

17 - Acide nucléique selon la revendication 16 caractérisé en ce qu'il s'agit d'ADN.

18 - Acide nucléique selon la revendication 16 caractérisé en ce qu'il s'agit d'ARN.

19 - Acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce qu'il comporte en outre des séquences régulatrices de transcription reconnues par une cellule végétale.

20 - Vecteur comprenant un acide nucléique selon les revendications 16 à 19.

21 - Cellules végétales transformées de manière stable par un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 16 à 19 et capable de produire la glycoprotéine G du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage, ou une glycoprotéine analogue.

22 - Cellules végétales selon la revendication 21 caractérisées en ce qu'il s'agit d'une culture de cellules végétales, par exemple en milieu liquide ou immobilisées.

23 - Cellules végétales selon la revendication 21 caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules faisant partie d'une plante transformée entière.

24 - Plante chimérique ou transgénique capable de produire la glycoprotéine G du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage, ou une glycoprotéine analogue, caractérisée en ce qu'elle comporte des cellules selon la revendication 21.

25 - Graines de plante transgénique selon la revendication 24.

26 - Anticorps monoclonaux ou polyclonaux capable de reconnaître spécifiquement la glycoprotéine selon les revendications 9 à 14.

27 - Composition pharmaceutique comprenant :

- une ou plusieurs glycoprotéine(s) selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, ou
- des cellules selon l'une des revendications 21 à 23, ou
- toute ou partie d'une plante selon la revendication 24,

en association avec un excipient acceptable du point de vue physiologique.

28 - Composition pharmaceutique selon la revendication 27 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vaccin.

29 - Composition pharmaceutique selon la revendication 28 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin pour administration par voie orale ou injectable, éventuellement en association avec un ou plusieurs adjuvant(s).

30 - Glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 9 à 14 pour une utilisation en thérapie et notamment en tant que vaccin humain ou vétérinaire contre une infection par le virus de la rage, ou par un virus apparenté au virus de la rage.

31 - Cellules végétales selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 pour une utilisation en thérapie et notamment en tant que vaccin humain ou vétérinaire contre une infection par le virus de la rage, ou par un virus apparenté au virus de la rage.

32 - Plante transgénique ou chimérique selon la revendication 24, ou extrait d'une plante selon la revendication 24, pour une utilisation en thérapie et notamment en tant que vaccin humain ou vétérinaire contre une infection par le virus de la rage, ou par un virus apparenté au virus de la rage.

33 - Utilisation d'une glycoprotéine selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, des cellules selon l'une quelconque des revendications 21 à 23, des plantes selon la revendication 24, ou d'un extrait de ladite plante, pour la préparation d'un médicament contre le virus de la rage, ou un virus apparenté au virus de la rage.

34 - Produit alimentaire caractérisé en ce qu'il comprend une glycoprotéine qui a les caractéristiques suivantes :

- elle est reconnue par des anticorps spécifiques à la glycoprotéine G du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage ;
- elle a un poids moléculaire de 66 kDa approximativement ;
- elle est insoluble ;
- elle est N-glycosylée par au moins un glycanne de type polymannosidique, et/ou par au moins un glycanne de type complexe comportant au sein de sa structure un ou plusieurs résidus de xylose β -1,2, et/ou un ou plusieurs résidus de fucose lié en α -1,3, et étant dépourvu de résidus d'acide sialique.

35 - Produit alimentaire caractérisé en ce qu'il comprend des cellules végétales transformées de manière stable par un acide nucléique, ledit acide nucléique comportant une séquence codante chimérique comprenant d'une part une séquence codant pour la protéine G mature du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage, ou pour une protéine analogue, et d'autre part, une séquence codant pour un peptide signal N-terminal autre que celui naturellement associé au virus, ou les séquences complémentaires aux sus-dites séquences codantes.

36 - Produit alimentaire caractérisé en ce qu'il comprend une plante transgénique ou chimérique, ou un extrait d'une plante transgénique ou chimérique, ladite plante étant capable de produire la glycoprotéine G du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage, ou une glycoprotéine analogue, les cellules de la plante étant transformées par un acide nucléique comportant une séquence codante chimérique comprenant d'une part une séquence codant pour la protéine G mature du virus de la rage ou d'un virus apparenté au virus de la rage, ou pour une protéine analogue, et d'autre part, une séquence

codant pour un peptide signal N-terminal autre que celui naturellement associé au virus, ou les séquences complémentaires aux sus-dites séquences codantes.

FIGURE 1

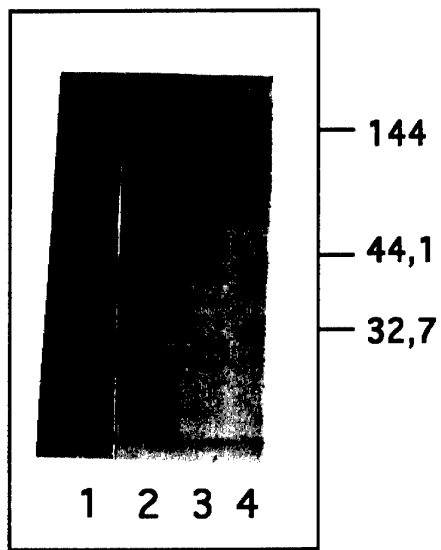


FIGURE 2

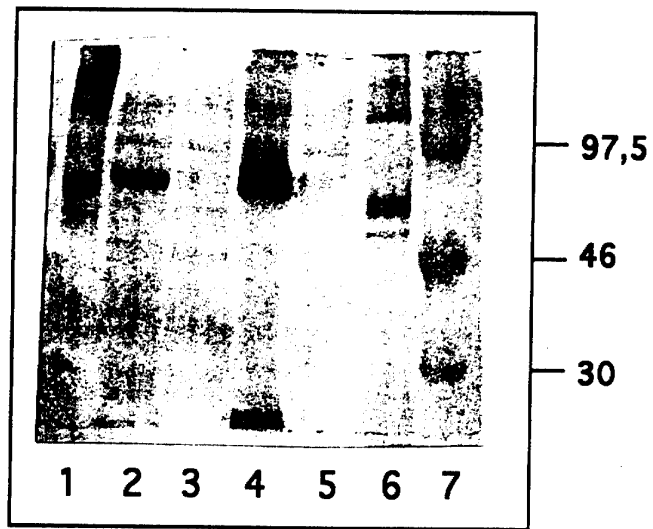
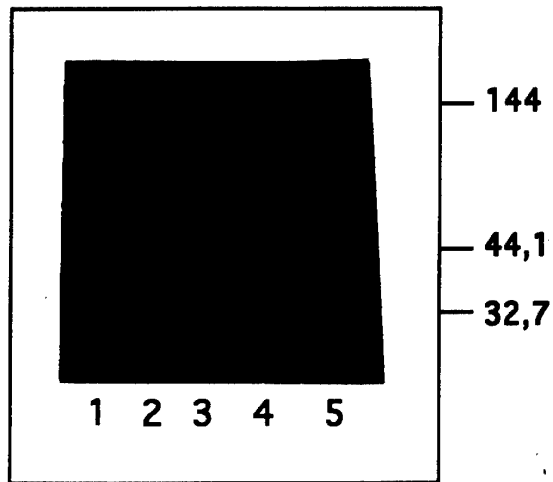


FIGURE 3



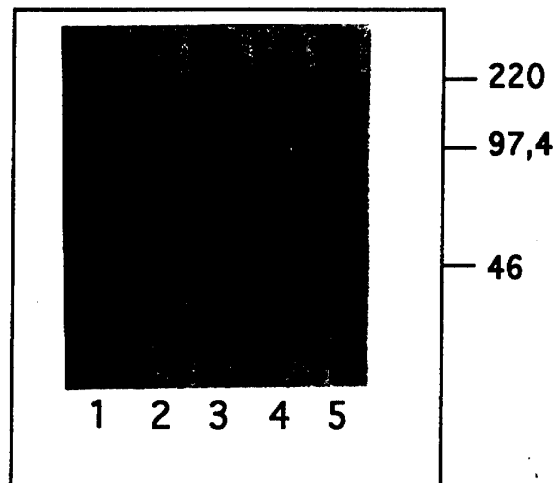


FIGURE 4

Gel à 8 %

- Piste 1 : Reconstruction glycoprotéine G rabique de référence dans du jus de feuille de tabac**
- Piste 2 : Feuille de tabac non transformé**
- Piste 3 : Feuille de tabac transformé avec pBIOC110**
- Piste 4 : Feuille de tabac transformé avec pBIOC104**
- Piste 5 : Marqueur de poids moléculaire**

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	BIOTECHNOLOGY, vol. 13, Décembre 1995, pages 1484-1487, XP002024000 MCGARVEY, P.B., ET AL.: "Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes" * page 1486, colonne de droite * ---	1-34
A	VACCINE , vol. 11, 1993, pages 925-928, XP002024001 FU, Z.F., ET AL.: "Oral vaccination of racoons (Procyon lotor) with baculovirus-expressed rabies virus glycoprotein" * le document en entier * ---	1-34
A	WO 85 01516 A (TRANSGENE SA) 11 Avril 1985 * page 22 - page 29 * ---	9,11-14
A	WO 96 12801 A (TEXAS A & M UNIVERSITY SYST ;UNIV TULANE (US); ARNTZEN CHARLES J () * le document en entier * ---	1-34
A	WO 94 20135 A (EDIBLE VACCINES INC ;LAM DOMINIC MAN KIT (US); ARNTZEN CHARLES JOE) * le document en entier * ---	1-34
A	WO 91 02066 A (MOGEN INT) 21 Février 1991 * le document en entier * ---	1-34
A	WO 91 13993 A (UPJOHN CO) 19 Septembre 1991 * page 21, ligne 16 - ligne 19 * ---	1-34
A	EP 0 462 065 A (CIBA GEIGY AG) 18 Décembre 1991 * le document en entier * ---	6,10
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
28 Janvier 1997		Maddox, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>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</p> <p>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</p>		

1
EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, Avril 1995, WASHINGTON US, pages 3358-3361, XP002024002 THANAVALA, Y., ET AL.: "Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen" * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-34
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
28 Janvier 1997		Maddox, A
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>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</p> <p>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</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (F04C13)