(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
26 novembre 2015 (26.11.2015)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/177464 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/051319

(22) Date de dépôt international :
20 mai 2015 (20.05.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
14 54653 23 mai 2014 (23.05.2014) FR

(71) Déposant : **ANGANY GENETICS** [FR/FR]; Pharmaparc Ii Chaussée Du Vexin 1, Voie De L'innovation, 27100 Val de Reuil (FR).

(72) Inventeurs : **GOMORD, Véronique**; 61 rue Chasselièvre Parc Vivaldi Appt 115, 76000 Rouen (FR). **FITCHETTE, Anne-Catherine**; 650 rue du bourg Sud Mesnil Panneville, 76570 Pavilly (FR). **CATALA, Virginie**; 2 rue du four, 76100 Rouen (FR). **FAYE, Loïc**; 3056 Rue des Canadiens, 76160 St Jacques Sur Darnetal (FR).

(74) Mandataire : **CABINET PLASSERAUD**; 52 rue de la Victoire, 75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

WO 2015/177464 A1

(54) **Title** : COMMERCIAL PRODUCTION OF ALLERGEN AMB A 1 BY MEANS OF TRANSIENT EXPRESSION IN PLANTS

(54) **Titre** : PRODUCTION COMMERCIALE DE L'ALLERGÈNE AMB A1 PAR EXPRESSION TRANSITOIRE CHEZ LES PLANTES

(57) **Abstract** : The invention relates to a plant cell comprising a DNA molecule including at least one heterologous nucleotide sequence coding for a pre-protein of a pectate lyase selected from among Amb a 1, the alpha subunit of Amb a 1, the beta subunit of Amb a 1 and Amb a 1 homologues, and functionally bound to a strong promoter.

(57) **Abrégé** : La présente invention est relative à une cellule végétale comprenant une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1, liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort.

Production commerciale de l'allergène Amb A1 par expression transitoire chez les plantes

La présente invention se rapporte à une cellule végétale comprenant une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1, liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort. L'invention se rapporte également un procédé de production de la pectate lyase utilisant la cellule végétale.

L'ambroisie, en particulier *Ambrosia artemisiifolia*, est une plante annuelle, qui appartient à la famille des Composées tubuliflores (ou Astéracées). Cette plante sauvage, originaire d'Amérique du nord, fleurit de la fin de l´été jusqu'à l'automne. Son pollen a un pouvoir allergénique très élevé. Ainsi, l'ambroisie est la première cause d'allergie pollinique aux Etats-Unis, avec environ 30 millions de personnes sur 40 millions souffrant de pollinoses. Introduite involontairement en France au XIXème siècle, l'ambroisie est une plante fortement invasive qui a rapidement progressé à partir de la région Rhône-Alpes vers le nord de la France. Ainsi, en 2011, des pieds d'ambroisie ont été retrouvés dans l'Ile de France.

Le pollen de cette plante provoque chez les personnes sensibles une réaction allergique caractérisée par sa sévérité. Globalement, la rhinite allergique à l'ambroisie est beaucoup plus sévère que celle causée par d'autres pollens. Les symptômes tels que prurit, anosmie (perte ou diminution de la sensibilité aux odeurs), rhinorrhée, éternuements et obstruction nasale sont plus importants. De plus, dans 50% des cas, cette allergie évolue en un asthme, souvent plus sévère que celui provoqué par d'autres pollens. Ces symptômes sont d'autant plus prononcés que le taux de pollen dans l'air est élevé.

Dans la région Rhône-Alpes, l'allergie à l'ambroisie touche aujourd'hui 6 à 12% de la population entre fin août et début septembre. Ainsi, pour cette seule région, le nombre total de consommateurs de médicaments antiallergiques à l'ambroisie a fortement augmenté (+60%) entre 2008 et 2011, passant de 161 200 à 258 700 personnes, et les dépenses de santé engendrées par cette allergie représentent entre 5,6 et 8,6 millions d'euros. L'allergie à l'ambroisie représente donc aujourd'hui un véritable problème de santé publique. Le plus simple pour se protéger des risques d'allergie serait d'éviter les expositions au pollen

d'ambroisie, mais une éviction totale semble d'ores et déjà impossible malgré des arrêtés préfectoraux rendant obligatoire la destruction de l'ambroisie. Ces mesures n'ont pas permis d'enrayer la propagation de cette plante invasive dans un grand nombre de régions.

Les traitements dits « symptomatiques » soit par voie locale (gouttes, collyres, sprays), soit par voie générale (comprimés, gélules), permettent de soulager les symptômes pendant la période où les pollens sont présents dans l'air. Mais les symptômes reviennent rapidement dès l'arrêt du traitement. A l'inverse des traitements "symptomatiques", l'immunothérapie allergénique (ou désensibilisation) est le seul traitement susceptible de modifier l'évolution de la maladie allergique. Cette voie thérapeutique permet de traiter la cause de l'allergie contrairement aux médicaments dits « symptomatiques ». Toutefois, comme pour les autres allergies, les extraits utilisés aujourd'hui pour la désensibilisation des patients allergiques à l'ambroisie sont d'une qualité insuffisante pour que ce traitement soit efficace. Plusieurs allergènes d'ambroisie ont été caractérisés, en particulier Amb a 1 qui est responsable de plus de 80% des cas d'allergie à l'ambroisie. Différentes tentatives de production d'un Amb a 1 recombinant destiné à une désensibilisation spécifique ont échoué. En effet, Amb a 1 est une protéine végétale complexe présentant des maturations post-traductionelles typiquement végétales, et seul un système d'expression végétale sera capable de produire cet allergène sous une forme utilisable et efficace en immunothérapie allergénique.

Il existe donc un besoin pour produire cet allergène Amb a 1 sous forme recombinante, avec une bonne qualité, et de façon reproductible et efficace (avec un bon rendement). Par « bonne qualité », on entend que l'allergène est très fortement similaire, dans sa séquence et sa structure, à l'allergène présent naturellement dans l'ambroisie. Il existe également un besoin pour produire cet allergène à des niveaux commercialement et économiquement acceptables.

De façon surprenante, les inventeurs ont maintenant découvert que la production de l'allergène Amb a 1, bien que toxique *in vivo*, sous forme recombinante est possible, par expression transitoire chez les plantes. Cette production, qui se fait dans une cellule végétale, permet l'obtention de l'allergène Amb a 1 sous forme mature et active, avec un bon rendement, de façon très simple et reproductible. En outre, l'allergène Amb a 1 obtenu n'est pas contaminé par des protéases et/ou d'autres contaminants d'origine végétale. Les inventeurs ont ainsi pu obtenir une production, à des niveaux commercialement acceptables, de l'allergène Amb a 1.

L'invention a donc pour objet une cellule végétale comprenant une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1, liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S. La molécule d'ADN liée au promoteur fort permet d'exprimer de façon transitoire la pectate lyase mature et active dans la cellule. De préférence, ladite cellule végétale est une cellule de *Nicotiana benthamiana*. De préférence, la cellule végétale selon l'invention comprend une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine de la pectate lyase liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S, ladite molécule d'ADN n'étant pas intégrée dans le génome de la cellule végétale.

La pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1 est appelée « pectate lyase selon l'invention » dans la présente demande.

L'invention a également pour objet une plante comprenant au moins une cellule végétale selon l'invention.

Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé de production d'une pectate lyase selon l'invention, comprenant l'expression de ladite pectate lyase dans une cellule végétale selon l'invention, ou dans une plante comprenant une telle cellule.

Un autre objet de l'invention se rapporte à une pectate lyase susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, avec une cellule végétale selon l'invention, ou avec une plante selon l'invention. La pectate lyase ainsi obtenue peut être utilisée comme médicament. Elle peut également être utilisée en immunothérapie allergique, seule ou en combinaison avec au moins un autre allergène d'Asteracée. Elle peut également être utilisée dans le diagnostic d'allergies, et être intégrée dans un kit de diagnostic d'allergies.

La cellule végétale selon l'invention comprend une molécule d'ADN liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S. Par « lié de manière fonctionnelle », on entend que la molécule d'ADN est fusionnée avec le promoteur fort, de telle sorte que le promoteur fort induise la transcription de la molécule d'ADN.

Cela permet l'expression de ladite molécule d'ADN sous forme transitoire, i.e. sans intégration de l'ADN, notamment l'ADNc, dans le génome de la cellule végétale. En effet, l'utilisation de l'expression transitoire dans une cellule végétale ou une plante selon l'invention permet d'augmenter les rendements de production de la pectate lyase selon l'invention sous forme active jusqu'à des niveaux élevés, compatibles avec une exploitation commerciale, mais incompatibles avec la survie d'une plante qui exprimerait ces pectates lyases toxiques de façon stable. Dans le cas d'une expression transitoire, la récolte de la biomasse végétale a lieu lors du pic d'expression de la protéine recombinante, i.e. typiquement 4 à 6 jours après la transfection.

De préférence, la cellule végétale selon l'invention comprend un vecteur d'expression comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S.

Amb a 1 est une pectate lyase provenant d'*Ambrosia artemisiifolia*. Reconnu par plus de 80 % des patients sensibilisés à l'ambroisie, cet allergène est responsable de plus de 90 % de l'activité allergénique du pollen d'ambroisie. C'est une protéine de 38 kDa décrite comme non glycosylée appartenant à la famille des pectates lyases. Douze isoformes de Amb a 1 sont recensées, de Amb a 1.0101 à Amb a 1.0502 (d'après le site www.allergome.org).

Les séquences nucléique et d'acides aminés des douze isoformes sont détaillées dans le tableau 1 ci-dessous :

Isoallergènes	**N° d'accession (GenBank) Séquence nucléique**	**N° d'accession (UniProt) Séquence d'acides aminés**
Amb a 1.0101	M80558	P27759
Amb a 1.0201	M62981	P27760
Amb a 1.0202	FR669658	E1XUL3
Amb a 1.0301	M62961	P27761
Amb a 1.0302		P27761 (variant L48Y)
Amb a 1.0303	M80560	P27761 (variant H392R)
Amb a 1.0304	FR669659	E1XUL4
Amb a 1.0305	FR669660	E1XUL5
Amb a 1.0401	M80562	P28744
Amb a 1.0402	FR669664	E1XUL9
Amb a 1.0501	M80561	P27762
Amb a 1.0502	FR669666	E1XUM1

Tableau 1 : les douze isoformes d'Amb a 1, leurs séquences nucléiques et protéiques

Par « Amb a 1 » selon l'invention, on entend les douze isoformes précitées dans le tableau 1 ci-dessus. Les séquences protéiques décrites dans ce tableau 1 correspondent aux préproprotéines des différentes isoformes.

Amb a 1 subit une protéolyse dans le grain de pollen et/ou au cours du processus d'extraction ou de purification résultant en deux chaînes, alpha (26 kDa) et bêta (12 kDa), associées de façon non covalente (King et al, 1974, 1981). Il a été démontré que des modifications chimiques d'Amb a 1, y compris la réduction et l'alkylation des ponts disulfures ainsi que le processus de dénaturation/renaturation par l'urée ou la succinylation des résidus lysine, réduit sa réactivité vis-à-vis des IgE (King, 1976; Smith et al, 1988). Les sous-chai nes alpha et be ta d'Amb a 1 ont une réactivité différente sur les IgE et les lymphocytes T. En effet, Amb a 1 bêta contient un nombre important d'épitopes fixant les IgE, tandis que Amb a 1 alpha se comporte comme un hypoallergène et stimule l'activité des cellules T.

De préférence, Amb a 1 a pour séquence protéique SEQ ID NO :7 (préproprotéine). De préférence, la sous-unité bêta a pour séquence protéique SEQ ID NO :8. De préférence, la sous-unité alpha a pour séquence protéique SEQ ID NO :9.

Par « homologues d'Amb a 1 », on entend des protéines de la famille des Astéracées qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1. De préférence, l'homologue d'Amb a 1 est une protéine de plante du genre *Ambrosia* ou *Artemisia*, plus préférentiellement d'*Artemisia vulgaris*, d'*Ambrosia psilostachya* ou d'*Ambrosia trifida,* qui présente au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1. De préférence, l'homologue d'Amb a 1 est choisi parmi Amb p 1 (provenant d'*Ambrosia psilostachya*, de code d'accession 9064 sur www.allergome.org) et Art v 6 (provenant d'*Artemisia vulgaris*, de numéro d'accession A0PJ16 dans Uniprot).

Par "pourcentage d'identité" entre deux séquences d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur

toute leur longueur. Par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", on entend l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981, J. Mol Evol., 18:38-46), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988, PNAS, 85: 2444-2448), au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).

Ainsi, de préférence, la pectate lyase selon l'invention est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines de la famille des Astéracées qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

Plus préférentiellement, la pectate lyase selon l'invention est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines d'*Artemisia vulgaris*, d'*Ambrosia psilostachya* ou d'*Ambrosia trifida,* qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

La molécule d'ADN comprend au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine de la pectate lyase selon l'invention.

La préproprotéine de la pectate lyase selon l'invention comprend un peptide signal, un propeptide et la pectate lyase mature. La séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine selon l'invention comprend donc une séquence codant le peptide signal, une séquence codant le propeptide et une séquence codant la pectate lyase mature. De préférence,

la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine selon l'invention comprend une séquence codant le peptide signal, une séquence codant le propeptide de la sous-unité bêta, une séquence codant la sous-unité bêta, une séquence codant le propeptide de la sous-unité alpha et une séquence codant la sous-unité alpha.

Le peptide signal est notamment tout peptide signal reconnu par la cellule végétale, provenant ou non d'une pectate lyase. Il cible notamment la pectate lyase selon l'invention dans le milieu intercellulaire. De préférence, le peptide signal est celui de la chitinase de tabac, ou le peptide signal naturel de la pectate lyase.

Le propeptide est, quant à lui, le propeptide naturel d'une pectate lyase, ou bien le propeptide d'une peptidase C1A. Dans un mode de réalisation préféré, le propeptide est un propeptide de peptidases C1A, notamment d'acariens ou d'origine végétale. De préférence, le propeptide de peptidase C1A est le propeptide naturel ou le propeptide muté ou non de Der p1. De préférence, le propeptide de peptidase C1A est choisi parmi le propeptide naturel de peptidase C1A et la séquence SEQ ID NO :6 (i.e. les acides aminés 19 à 98 de la séquence Uniprot p08176). Dans un mode de réalisation préférée de la présente invention, la pectate lyase selon l'invention est produite en fusion avec son propre propeptide ou en fusion avec le propeptide de peptidase C1A d'acariens ou en fusion avec un propeptide de peptidase C1A végétale, afin d'augmenter les rendements de production de la protéine.

De préférence, la séquence de la préproprotéine de pectate lyase est choisie parmi les séquences protéiques listées dans le tableau 1 ci-avant et les séquences présentant au moins 57%, de préférence au moins 60%, de préférence au moins 64% d'identité avec l'une de ces dernières.

De préférence, la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine est choisie parmi SEQ ID NO :1 à 5. De préférence, elle a pour séquence SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4 ou SEQ ID NO :5.

Selon l'invention, la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine peut être obtenue à partir d'un gène connu déjà cloné codant pour une pectate lyase selon l'invention, ou bien par criblage d'une banque d'ADNc avec des anticorps anti-pectate lyase. Les méthodes utilisées sont bien connues de l'homme de l'art, et incluent notamment l'identification du gène par hybridation avec des sondes, PCR, séquençage et clonage moléculaire. Il est également possible de synthétiser le gène pour refléter l'utilisation des

codons préférés chez les plantes ; dans ce cas, on parle d'optimisation de codons, souvent utile pour une forte expression des protéases sélectionnées (Murray et al, Nucleic Acid Res. 17:477 498 (1980)).

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la séquence nucléotidique hétérologue codant la préproprotéine comprend en outre une séquence, appelée séquence d'adressage intracellulaire. Cette séquence permet de cibler un compartiment de stockage de la pectate lyase selon l'invention, afin de contrôler sa maturation. Cette maturation est nécessaire pour l'obtention des pectates lyases sous la forme la plus adaptée pour le diagnostic d'allergie et l'immunothérapie. De préférence, cette séquence peptidique d'adressage cible la pectate lyase selon l'invention sous forme soluble ou membranaire vers le réticulum endoplasmique ou les différents compartiments constitutifs du système endomembranaire de sécrétion de la cellule végétale.

Une fois que le gène d'intérêt a été isolé et modifié pour contenir tout ou partie des modifications décrites ci-dessus et obtenir la séquence nucléotidique hétérologue, cette dernière est placée dans un vecteur d'expression par des méthodes classiques. La sélection d'un vecteur d'expression approprié dépendra de la méthode d'introduction du vecteur d'expression dans des cellules hôtes. Un vecteur d'expression typique contient des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de réplication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique à fournir pour la croissance et la sélection du vecteur d'expression dans l'hôte bactérien, un site de clonage pour l'insertion d'une séquence d'ADN exogène codant pour la pectate lyase; des éléments d'ADN eucaryotes comme une séquence d'initiation de la transcription du gène exogène, comme un promoteur, et des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation et une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing. Il contient également des séquences telles que des t-DNA qui sont nécessaires pour l'intégration d'un morceau d'ADN dans la plante ou dans la cellule végétale.

De préférence, le vecteur d'expression comprend :

- des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de réplication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique ;
- au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S ;

- une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing, de préférence p19 ; et
- des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation, de préférence la séquence Tnos (séquence de terminaison de la nopaline synthase).

De préférence, le vecteur d'expression est pAG01.

Les promoteurs utilisés pour contrôler l'expression de la pectate lyse sont des promoteurs forts, et peuvent être des promoteurs de gènes de plantes, tels que par exemple, le promoteur de l'ubiquitine, le promoteur de la petite sous-unité de la ribulose-1, 5-bis-phosphate carboxylase, des promoteurs *d'Agrobacterium tumefaciens*, les promoteurs de la nopaline-synthase et de l'octopine synthase, ou encore des promoteurs viraux comme les 19S et 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). De préférence, le promoteur fort est le 35S.

L'expression élevée et la qualité des pectates lyases recombinantes produites dans l'invention permettent de concevoir leur production commerciale. En effet, la pectate lyase selon l'invention est typiquement exprimée en une quantité égale à au moins 0,1 % des protéines solubles totales de la plante, mais souvent en une quantité beaucoup plus élevée, pouvant atteindre 5 à 10%.

La plante comprenant les cellules végétales selon l'invention peut être une plante entière, mais peut également être une partie de plante, telle que des feuilles.

La plante ou les cellules végétales selon l'invention peuvent être utilisées en tant que telles, comme médicament.

La plante ou les cellules végétales selon l'invention peuvent être utilisées en tant que telles, pour des applications comme biocarburant, dans la nutrition animale, ou encore dans la production de papier ou de textile (fibres de coton notamment).

Dans d'autres applications, la pectate lyase recombinante est purifiée après extraction à partir de la plante ou des cellules végétales qui l'expriment. Afin de faciliter sa purification, l'enzyme pourra être exprimée en fusion avec des tags (His6, GST, MBP, FLAG etc..) qui seront localisés de préférence en position N- ou C-terminale de la protéine mature.

La pectate lyase selon l'invention susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, avec une cellule végétale selon l'invention, ou avec une plante selon l'invention, peut être utilisée comme médicament. Elle peut également être utilisée en immunothérapie allergique, seule ou en combinaison avec au moins un autre allergène d'Asteracée. Cet autre allergène d'Asteracée peut être choisi parmi Amb a 11, Amb a 5 et leurs mélanges.

Elle peut également être utilisée dans le diagnostic d'allergies, notamment d'allergies aux pollens. L'invention a donc également pour objet un kit de diagnostic d'allergies, comprenant la pectate lyase selon l'invention, et des moyens de mesure des anticorps dirigés contre cette protéine. L'invention a également pour objet un kit de diagnostic d'allergies, comprenant la pectate lyase selon l'invention, des moyens de mesure des anticorps dirigés contre cette protéine, et des moyens de mesure des anticorps dirigés contre un autre allergène d'Asteracée, par exemple l'allergène Amb a 11 ou Amb a 5.

Les méthodes générales de culture de plantes, ainsi que les procédés pour introduire des vecteurs d'expression dans un tissu végétal, sont à la disposition de l'homme de l'art. Ils sont variés et dépendent de la plante sélectionnée. De préférence, les plantes seront cultivées selon les techniques propres à la plateforme Allergopur. Ce procédé de production de protéines recombinantes est décrit dans la demande FR1255510, et comprend une première étape de culture de la plante, en aéroponie ou en hydroponie, de préférence culture sur flotteur libre, et sous éclairage LEDs. Après cette première étape, notamment cinq semaines de culture en hydroponie sur des flotteurs libres, l'agroinfiltration des plantes est réalisée sous vide, par des agrobactéries comprenant un fragment d'ADN codant pour la pectate lyase selon l'invention. Cette étape d'agroinfiltration peut être mise en œuvre par tout moyen permettant de faire le vide. De préférence, dans le procédé utilisé selon l'invention, elle est réalisée sous vide par effet Venturi. Parmi les agrobactéries utilisables selon l'invention, on peut citer de préférence, les souches LBA4404, GV3101, EHA 101/105 ou C58. Selon une première alternative, une fois l'étape d'agroinfiltration réalisée, les plantes sont typiquement égouttées tête en bas pendant 15 minutes, puis remises en culture, typiquement 3 à 6 jours, idéalement en assurant une brumisation fréquente de ces dernières pendant les 6 premières heures de culture qui suivent l'agroinfiltation. Enfin, la protéine est extraite et purifiée. De préférence, la protéine est extraite et purifiée comme décrit dans la demande FR1255510. Selon une seconde alternative, une fois l'étape d'agroinfiltration réalisée, les plantes sont directement remises en culture, typiquement 3 à 6 jours, puis la protéine est extraite et purifiée.

L'extraction de la protéine peut être effectuée par broyage des feuilles, ou encore selon un procédé faisant appel à une infiltration enzymatique.

Dans un tel procédé faisant appel à une infiltration enzymatique, l'extraction de la protéine est effectuée par les étapes suivantes :

- infiltration sous vide (notamment comme il a été décrit ci-dessus pour l'agroinfiltration) de la partie aérienne des plantes, dans une solution enzymatique contenant une pectinase ou de la macérozyme, qui ne présente pas d'activité protéolytique. De préférence, la pectinase est la P162L commercialisée par Biocatalyst, formulée à 4% dans un milieu comprenant 50mM de citrate de sodium pH5.2, 0.5M NaCl et 0.04% métabisulfite. De préférence, la macérozyme est formulée à 0.5% dans un milieu comprenant 50mM de citrate de sodium pH5.2, 0.5M NaCl et 0.04% métabisulfite,prélèvement des feuilles des plantes infiltrées, et incubation dans une solution enzymatique de pectinase ou de macérozyme, pendant une durée comprise entre 2h30 et 5h, de préférence de 3h ou 4h30, à une température comprise entre 24°C et 30°C, de préférence 26°C, puis
- mise sous agitation du mélange obtenu entre 20 et 30 rpm à température ambiante (i.e. environ 20-23°C) pendant une durée comprise entre 30 minutes et 2h,
- le digestat est ensuite filtré, de préférence sur une toile de 250µm, puis éventuellement centrifugé (par exemple à 250xg pendant 10 minutes),
- le surnageant est récupéré afin d'effectuer une filtration en profondeur de préférence sur filtre K100 (commercialisé par Pall). De préférence, le filtrat est concentré 20 fois sur une cassette 5kDa et son pH est ajusté à 7 avec du Na3PO4.

Les allergènes Amb a 1 et Amb a11 peuvent être purifiés par chromatographie à partir des extraits comme il a été décrit dans la demande FR 1255510.

Ainsi, de préférence, l'invention a également pour objet un procédé de production d'une pectate lyase selon l'invention dans une cellule végétale ou une plante, comprenant les étapes suivantes :

a) transformation d'agrobactéries avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort ; et
b) transfection de la cellule végétale ou de la plante avec les agrobactéries obtenues à l'étape a).

De préférence, les agrobactéries utilisables dans l'étape a) sont choisies parmi les souches LBA4404, GV3101, EHA 101/105 et C58. De préférence, le vecteur d'expression utilisé dans l'étape a) comprend :

- des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de réplication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique ;
- au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase selon l'invention liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort, de préférence un promoteur 35S ;
- une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing, de préférence p19 ; et
- des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation, de préférence la séquence Tnos.

La transformation de l'étape a) se fait typiquement par des méthodes connues de l'art antérieur, par exemple par chocs thermiques avec passages successifs à 4°C, -80°C et 37°C.

La transfection de l'étape b) comprend de préférence les étapes suivantes :

b1) culture de la cellule végétale ou de la plante, en aéroponie ou en hydroponie, et sous éclairage LEDs, de préférence pendant cinq semaines en hydroponie sur des flotteurs libres,

b2) agroinfiltration de la cellule végétale ou plante obtenue en b1) sous vide, par les agrobactéries obtenues à l'étape a). Cette étape d'agroinfiltration est, de préférence, réalisée sous vide par effet Venturi.

b3) remise en culture de la cellule végétale ou de la plante obtenue en b2), typiquement pendant 3 à 6 jours.

Enfin, de préférence, la pectate lyase selon l'invention ainsi produite est extraite et purifiée.

De préférence, le procédé de production d'une pectate lyase selon l'invention dans une cellule végétale ou une plante, comprend en outre une étape c) d'extraction de la pectate lyase produite, ladite étape c) comprenant les étapes suivantes :

- infiltration sous vide de la cellule végétale ou des feuilles (i.e. partie aérienne) de la plante, dans une solution enzymatique contenant une pectinase ou de la macérozyme, qui ne présente pas d'activité protéolytique. De préférence, la pectinase ou la macérozyme sont telles que décrites ci-avant,
- prélèvement de la cellule végétale infiltrée ou des feuilles de la plante infiltrées et incubation, dans une solution enzymatique de pectinase ou de macérozyme, pendant

une durée comprise entre 2h30 et 5h, à une température comprise entre 24°C et 30°C, puis

- mise sous agitation du mélange obtenu entre 20 et 30 rpm à température ambiante pendant une durée comprise entre 30 minutes et 2h,
- filtration puis éventuellement centrifugation du digestat obtenu, et
- récupération du surnageant.

Les exemples qui suivent, illustrent, mais ne visent pas à limiter la portée de l'invention. Il sera évident pour l'homme de l'art que des variantes et modifications sont possibles et entrent dans le cadre et l'esprit de l'invention.

Les légendes des figures sont les suivantes :

Figure 1 : Représentation schématique des différentes cassettes permettant de produire une pectate lyase Amb a 1 mature et active (A, B, C, F et G) ou la sous-unité alpha (E et I) ou la sous-unité bêta (D et H), en utilisant soit le peptide signal et le propeptide naturel de la protéine (A-F), soit le peptide signal de la chitinase de tabac et un propeptide de la famille des peptidases C1A (G-I) afin d'augmenter les rendements.

La pectate lyase est également produite sous forme mutée sur la lysine 180 (K180) afin de limiter la protéolyse permettant la production des sous-unités alpha et bêta (F).

A (SEQ ID NO :1): ADNc codant pour la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265,

B (SEQ ID NO : 2): ADNc optimisé pour une utilisation chez *N.benthamiana*, codant pour la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265,

C (SEQ ID NO : 3): ADNc harmonisé codant pour la forme la préproprotéine naturelle (de séquence SEQ ID NO :7). Cet ADNc contient des codons optimisés pour une utilisation chez *N.benthamiana*, mais comprend également des codons rares, afin de préserver le rythme de synthèse de la protéine pour une meilleure conservation de la structure 3D. Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265,

D (SEQ ID NO : 4) : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité bêta (de séquence SEQ ID NO :8). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

E (SEQ ID NO : 5) : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité alpha (de séquence SEQ ID NO :9). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

F : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la forme mutée (K180) de la protéine. Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

G : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la forme mature de la protéine fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M., 1996) et au propeptide Der p1 (p08176 – aa 19 à 98 ou SEQ ID NO :6). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

H : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité bêta de la protéine fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M., 1996) et au propeptide Der p1 (p08176 – aa 19 à 98 ou SEQ ID NO :6). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

I : ADNc natif/optimisé/harmonisé codant pour la sous-unité alpha de la protéine fusionnée à la séquence signal de la chitinase de tabac (Neuhaus, J.-M., 1996) et au propeptide Der p1 (p08176 – aa 19 à 98 ou SEQ ID NO :6). Cet ADNc pourra être fusionné à des signaux d'adressage décrits dans la demande WO2008/056265.

Figure 2 : La plateforme AllergoPur utilisée pour l'expression et la production des différentes formes de pectate lyase selon l'invention.

Figure 3: Expression de la protéine Amb a 1. Les protéines extraites de plantes transfectées par l'ADNc natif (F1-F3), par l'ADNc optimisé (F4-F6) ou par l'ADNc harmonisé (F7-F9) codant la protéine Amb a 1 ont été séparées par SDS-PAGE et analysées immmuno-détection avec un anticorps dirigé contre une étiquette Flag. L'analyse par immuno-détection met en évidence la production spécifique de la protéine Amb a 1 et de la sous-unité alpha. La sous-unité bêta clivée n'est pas immunodétectée sur ce blot.

Figure 4: Purification de l'allergène Amb a 1. Les protéines extraites de plantes ont été transfectées sous vide avec l'ADNc harmonisé codant la protéine Amb a 1 par chromatographie IMAC. Puis les fractions retenues sur la colonne ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE. Compte tenu de la position C-terminale du Flag, deux polypeptides correspondant à la forme précurseur (préproprotéine) (Amb a 1p) et à la sous-

unité alpha sont purifiés à partir de l'extrait transfecté par l'ADNc complet (piste 3). Ces deux polypeptides (Amb a 1 alpha et Amb a 1p) sont ensuite séparés (pistes 4 et 5 respectivement) par chromatographie de tamisage moléculaire. Les deux polypeptides produits présentent une mobilité électrophorétique légèrement plus faible que les protéines natives. Cette différence s'explique par la présence du flag en position C-terminale.

Figure 5 : Expression de l'allergène Amb a 11. Les protéines extraites de 3 plantes (P1 – P3) transfectées par l'ADNc codant l'allergène Amb a 11 ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Les extraits protéiques sont analysés dès leur extraction (0H) ou après une incubation de 12h (12H) à température ambiante. L'incubation à température ambiante met en évidence l'accumulation de deux polypeptides correspondant à Amb a 11, ainsi que la dégradation quasi-totale des protéines de *N.benthamiana.* L'allergène Amb a 11 est donc produit sous forme active selon le même procédé que celui décrit présentement pour Amb a 1.

EXEMPLE :

Design moléculaire et synthèse de gène

Les ADNc sont synthétisés sous forme native, en optimisant l'usage des codons pour leur reconnaissance par le système végétal ou en harmonisant l'usage de codons (réintroduction de codons rares pour rythmer la synthèse de la protéine). Dans le cadre de cette invention, l'optimisation préférée est l'optimisation pour une expression chez *Nicotiana benthamiana*, comme indiqué en Figure 1.

Préparation des plasmides

Des sites de restriction Xba I/kpn I et Sal I/Sac I sont respectivement intégrés aux extrémités 5' et 3' de l'ADNc lors de la synthèse. Ces sites sont ensuite utilisés afin de cloner les ADNc dans le vecteur binaire d'expression pAG01 (Figure 1). Les ADNc sont clonés en amont d'un promoteur 35S (35S) et en aval d'une séquence de terminaison de la nopaline synthase (Tnos) ; le vecteur pAG01 contient en outre une cassette d'expression permettant d'exprimer l'inhibiteur de silencing p19 simultanément de la protéine recombinante afin d'augmenter les rendements de production. Les vecteurs sont ensuite utilisés pour transformer la souche LBA4404 *d'Agrobacterium tumefaciens*.

Expression transitoire de pectates lyases selon l'invention dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* – Utilisation de la plateforme AllergoPur

Pour la production par expression transitoire *Agobacterium tumefaciens LBA4404* est utilisé pour le transfert d'un ADNc codant la pectate lyase sans que le gène d'intérêt soit intégré dans le génome de la cellule végétale : on parle ici de transfection et non de transgenèse. Les plantes sont cultivées en condition hydroponique en présence d'un milieu nutritif (GHE, floragrow, floramicro, florabloom, 10mL/ 15mL/ 5mL pour 10 L d'eau osmosée) et sous éclairage LED.

L'agrobactérie est transférée dans le tissu foliaire par agro-infiltration selon deux procédés. Pour la production de petits lots de pectates lyases destinés au criblage de prototypes, les agrobactéries sont injectées manuellement grâce à une seringue appliquée contre l'épiderme de la face inférieure de la feuille. Des disques foliaires prélevés dans les feuilles 4 à 6 jours après l'agro-infiltration sont utilisés pour l'analyse des différents prototypes de pectates lyases. Cette étape de criblage permet de définir le vecteur d'expression qui sera utilisé pour l'obtention d'une pectate lyase de qualité optimale. Le même procédé est utilisé pour la production commerciale à grande échelle mais, dans ce cas, l'agro-infiltration s'effectue sous vide, dans des enceintes contenant plusieurs litres d'une culture d'agrobactéries et où plusieurs dizaines de plantes sont infiltrées simultanément. Ces plantes sont ensuite remises en culture pendant 4 à 6 jours avant la purification des pectates lyases à partir des extraits foliaires (Figure 2).

Expression de la pectate lyase Amb a 1 et de ses sous-unités

L'expression des protéines ainsi que les rendements sont respectivement analysés par Western blotting et ELISA. Les résultats sont illustrés pour les 3 formes d'ADNc codant la protéine naturelle (Figure 3).

Les protéines exprimées sont actives. En effet, l'expression d'Amb a 1 provoque des nécroses importantes dès le 4ème jour d'expression comparé à des plantes contrôles. Ces nécroses sont dues à une forte activité pectate lyase (Liu et al, 2010).

Purification et caractérisation

Comme l'illustre la figure 4, les pectates lyases sont extraites à partir de la biomasse fraîche ou congelée puis purifiées sur colonne IMAC (HisTrap Excell).

Cette purification permet la production de la forme précurseur (préproprotéine) et de la sous-unité alpha.

Enfin, comme le montre la figure 5, il est possible de combiner les allergènes Amb a 1 et Amb a 11 obtenus par le procédé selon l'invention, pour obtenir une composition utilisable en immunothérapie allergique. Ces allergènes peuvent être produits et purifiés après une extraction mécanique comme décrit dans la demande FR1255510, ou selon l'alternative d'extraction par infiltration enzymatique comme décrit dans la présente demande.

REVENDICATIONS

1. Cellule végétale comprenant une molécule d'ADN comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1, et les homologues d'Amb a 1, liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort.

2. Cellule végétale selon la revendication 1, dans laquelle ladite molécule d'ADN n'est pas intégrée dans le génome de la cellule végétale.

3. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle la pectate lyase est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines de la famille des Astéracées qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

4. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle la pectate lyase est choisie parmi Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les protéines d'*Artemisia vulgaris*, d'*Ambrosia psilostachya* ou d'*Ambrosia trifida,* qui présentent au moins 57% d'identité, de préférence au moins 60% d'identité, de préférence au moins 64% d'identité, avec l'une des isoformes d'Amb a 1.

5. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 4, dans laquelle la séquence nucléotidique hétérologue comprend une séquence codant le peptide signal, une séquence codant le propeptide et une séquence codant la pectate lyase mature.

6. Cellule végétale selon la revendication 5, dans laquelle :
- le peptide signal est choisi parmi le peptide signal naturel de la pectate lyase et le peptide signal de la chitinase de tabac ; et
- le propeptide est choisi parmi les propeptides naturels de pectates lyases et les propeptides de peptidases C1A.

7. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle la séquence nucléotidique hétérologue comprend en outre une séquence peptidique d'adressage intracellulaire qui cible la pectate lyase sous forme soluble ou membranaire vers le réticulum endoplasmique ou les différents compartiments constitutifs du système endomembranaire de sécrétion de la cellule végétale.

8. Cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 7, qui comprend un vecteur d'expression comprenant :

- des éléments d'ADN procaryote codant pour une origine de réplication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique ;
- la séquence nucléotidique hétérologue telle que définie dans l'une des revendications précédentes ;
- une cassette d'expression permettant l'expression d'un inhibiteur du silencing, de préférence p19 ; et
- des éléments d'ADN qui contrôlent le traitement des transcrits, comme des séquences de terminaison / polyadénylation, de préférence la séquence Tnos.

9. Plante comprenant au moins une cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 8.

10. Procédé de production d'une pectate lyase choisie parmi Amb a 1, la sous-unité alpha d'Amb a 1, la sous-unité bêta d'Amb a 1 et les homologues d'Amb a 1, comprenant l'expression de ladite pectate lyase dans une cellule végétale selon l'une des revendications 1 à 8, ou dans une plante selon la revendication 9.

11. Procédé de production d'une pectate lyase selon la revendication 10, comprenant les étapes suivantes :

a) transformation d'agrobactéries avec un vecteur d'expression comprenant une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une préproprotéine d'une pectate lyase liée de manière fonctionnelle à un promoteur fort ; et
b) transfection de la cellule végétale ou de la plante avec les agrobactéries obtenues à l'étape a).

12. Procédé de production d'une pectate lyase selon la revendication 11, dans lequel les agrobactéries utilisées dans l'étape a) sont choisies parmi les souches LBA4404, GV3101, EHA 101/105 et C58, et dans lequel la transfection de l'étape b) comprend de préférence les étapes suivantes :

b1) culture de la cellule végétale ou de la plante, en aéroponie ou en hydroponie, et sous éclairage LEDs, de préférence pendant cinq semaines en hydroponie sur des flotteurs libres,

b2) agroinfiltration de la cellule végétale ou plante obtenue en b1) sous vide, par les agrobactéries obtenues à l'étape a) ; et

b3) remise en culture de la cellule végétale ou de la plante obtenue en b2), typiquement pendant 3 à 6 jours.

13. Procédé de production d'une pectate lyase selon la revendication 11 ou 12, comprenant en outre une étape c) d'extraction de la pectate lyase produite, ladite étape c) comprenant les étapes suivantes :

- infiltration sous vide de la cellule végétale ou des feuilles (i.e. partie aérienne) de la plante, dans une solution enzymatique contenant une pectinase ou de la macérozyme, qui ne présente pas d'activité protéolytique,
- prélèvement de la cellule végétale infiltrée ou des feuilles infiltrées de la plante et incubation, dans une solution enzymatique de pectinase ou de macérozyme, pendant une durée comprise entre 2h30 et 5h, à une température comprise entre 24°C et 30°C, puis
- mise sous agitation du mélange obtenu entre 20 et 30 rpm à température ambiante pendant une durée comprise entre 30 minutes et 2h,
- filtration puis éventuellement centrifugation du digestat obtenu, et
- récupération du surnageant.

14. Pectate lyase susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 10 à 13.

15. Pectate lyase selon la revendication 14, pour son utilisation comme médicament.

16. Pectate lyase selon la revendication 14 pour son utilisation en immunothérapie allergique, seule ou en combinaison avec au moins un autre allergène d'Astéracée.

17. Pectate lyase selon la revendication 14 ou 15 pour son utilisation en immunothérapie allergique, en combinaison avec au moins l'allergène d'Astéracée Amb a 11 et/ou Amb a 5.

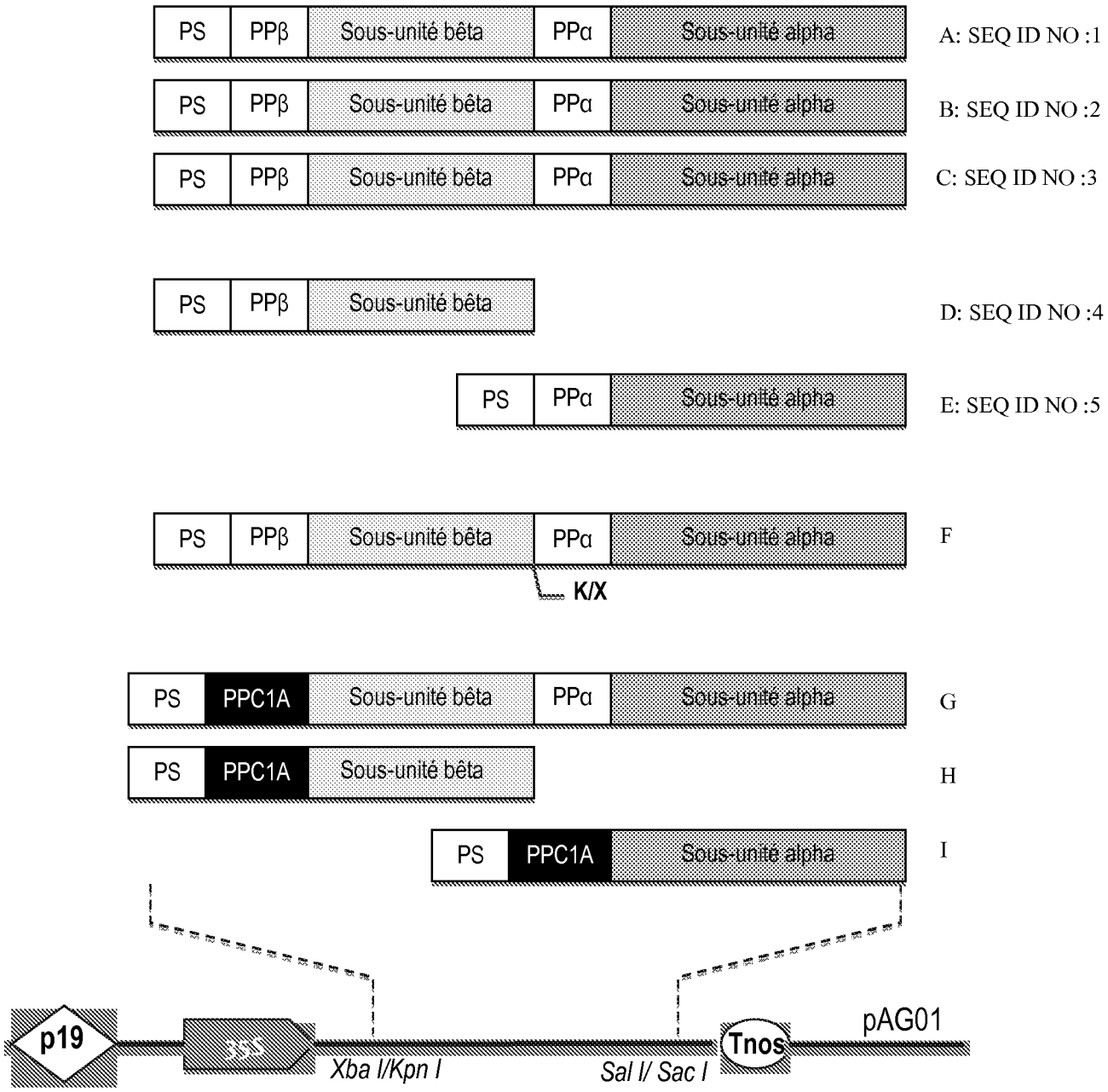

PS
PPβ
Sous-unité bêta
PPα
Sous-unité alpha
A: SEQ ID NO :1
B: SEQ ID NO :2
C: SEQ ID NO :3
D: SEQ ID NO :4
E: SEQ ID NO :5
F
K/X
PPC1A
G
H
I
p19
35S
Xba I/Kpn I
Sal I/ Sac I
Tnos
pAG01

Figure 1

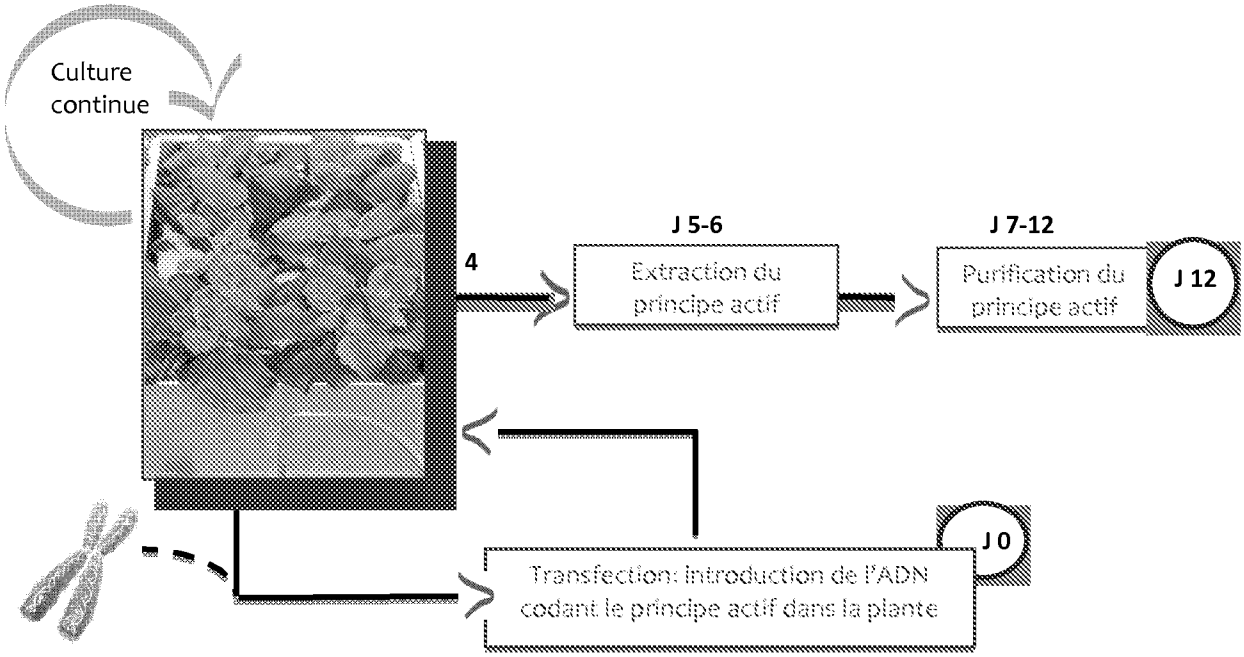

Culture continue
4
J 5-6
Extraction du principe actif
J 7-12
Purification du principe actif
J 12
J 0
Transfection: introduction de l'ADN codant le principe actif dans la plante

Figure 2

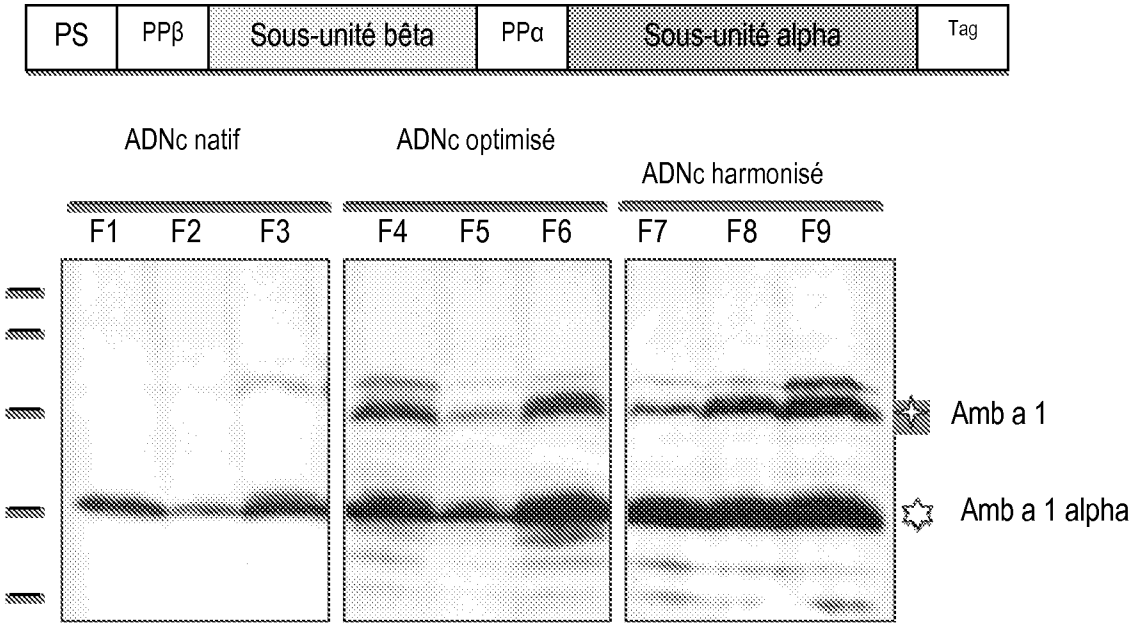

PS
PPβ
Sous-unité bêta
PPα
Sous-unité alpha
Tag
ADNc natif
ADNc optimisé
ADNc harmonisé
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
Amb a 1
Amb a 1 alpha

Figure 3

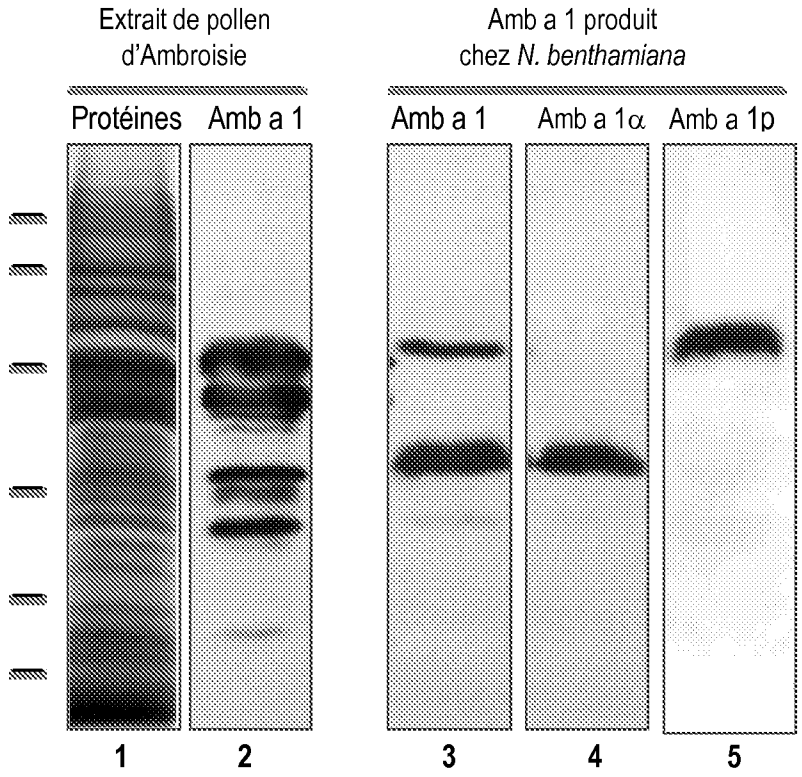

Extrait de pollen
d'Ambroisie
Amb a 1 produit
chez N. benthamiana
Protéines
Amb a 1
Amb a 1
Amb a 1α
Amb a 1β
1
2
3
4
5

Figure 4

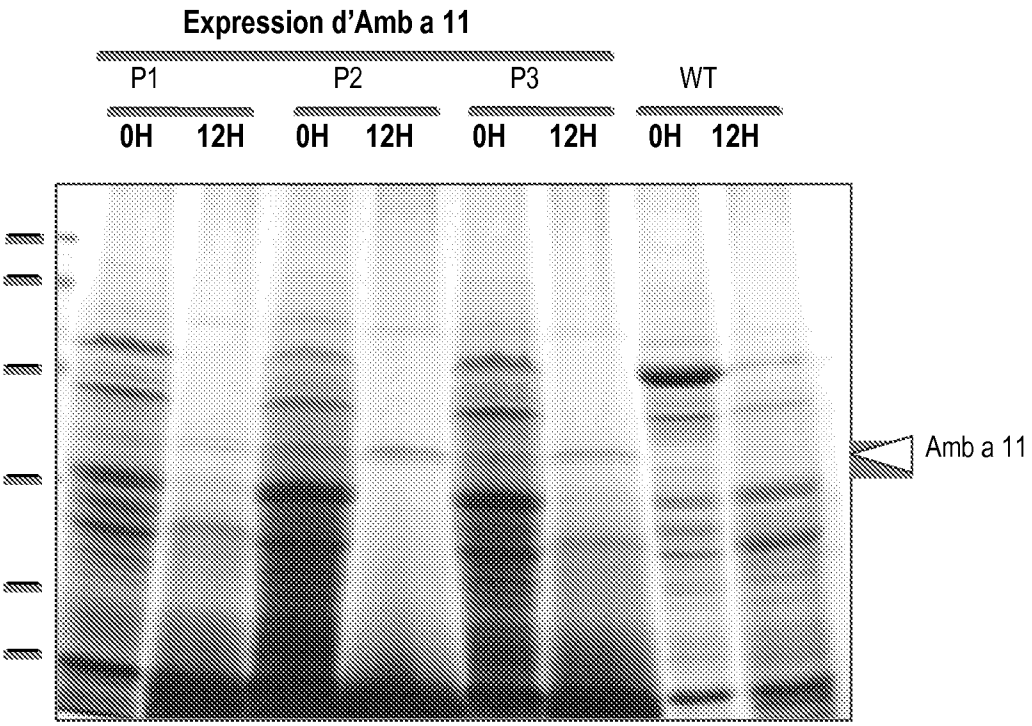

Expression d'Amb a 11
P1
P2
P3
WT
0H
12H
0H
12H
0H
12H
0H
12H
Amb a 11

Figure 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/051319

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/415 C12N15/82
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/20612 A2 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH [AT]; HEIFETZ PETER BER) 13 April 2000 (2000-04-13) abstract page 3 - page 7 page 9 page 28 - page 30 page 35 - page 36 example 1 example 11 examples 33-46 claims 1-58 ----- -/--	1-17

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 August 2015	26/08/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Keller, Yves

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 692 732 A1 (STALLERGENES SA [FR]) 5 February 2014 (2014-02-05) abstract paragraph [0005] paragraph [0075] paragraph [0096] - paragraph [0110] claims 1-18	1-17
Y	FR 2 809 413 A1 (TABACS & ALLUMETTES IND [FR]) 30 November 2001 (2001-11-30) the whole document	1-17
Y	GRIFFITH I J ET AL: "SEQUENCE POLYMORPHISM OF AMB A I AND AMB A II, THE MAJOR ALLERGENS IN AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA (SHORT RAGWEED)", INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, BASEL, CH, vol. 96, no. 4, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 296-304, XP000647685, ISSN: 0020-5915 the whole document	1-17
T	GREGORY P. POGUE ET AL: "Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 8, no. 5, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 638-654, XP055038517, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00495.x	
T	VOINNET O ET AL: "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus", THE PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 33, no. 5, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 949-956, XP002367694, ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1046/J.1365-313X.2003.01676.X the whole document	
T	LOÏC FAYE ET AL: "Success stories in molecular farming-a brief overview", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 8, no. 5, 9 May 2010 (2010-05-09), pages 525-528, XP055038398, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00521.x the whole document	

-/--

1

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jos Cantillo ET AL: "From Molecular Cloning to Vaccine Development for Allergic Diseases" In: "An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications", 1 July 2013 (2013-07-01), InTech, XP055161355, ISBN: 978-9-53-511151-1 DOI: 10.5772/52821, -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2015/051319

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0020612 A2	13-04-2000	AR 020717 A1	22-05-2002
		AU 758817 B2	03-04-2003
		AU 2003200126 A1	17-04-2003
		BR 9915919 A	21-08-2001
		CA 2344269 A1	13-04-2000
		CN 1330718 A	09-01-2002
		EP 1117817 A2	25-07-2001
		HU 0103616 A2	28-01-2002
		JP 2002526116 A	20-08-2002
		PL 347904 A1	22-04-2002
		TR 200101032 T2	22-10-2001
		WO 0020612 A2	13-04-2000
EP 2692732 A1	05-02-2014	CA 2881039 A1	06-02-2014
		EA 201590303 A1	30-07-2015
		EP 2692732 A1	05-02-2014
		EP 2880049 A1	10-06-2015
		US 2015210742 A1	30-07-2015
		WO 2014020179 A1	06-02-2014
FR 2809413 A1	30-11-2001	AU 7414801 A	11-12-2001
		FR 2809413 A1	30-11-2001
		WO 0192546 A1	06-12-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2015/051319

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C07K14/415 C12N15/82
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 00/20612 A2 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH [AT]; HEIFETZ PETER BER) 13 avril 2000 (2000-04-13) abrégé page 3 - page 7 page 9 page 28 - page 30 page 35 - page 36 exemple 1 exemple 11 exemples 33-46 revendications 1-58 ----- -/--	1-17

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
10 août 2015	26/08/2015

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Keller, Yves

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 2 692 732 A1 (STALLERGENES SA [FR]) 5 février 2014 (2014-02-05) abrégé alinéa [0005] alinéa [0075] alinéa [0096] - alinéa [0110] revendications 1-18	1-17
Y	FR 2 809 413 A1 (TABACS & ALLUMETTES IND [FR]) 30 novembre 2001 (2001-11-30) le document en entier	1-17
Y	GRIFFITH I J ET AL: "SEQUENCE POLYMORPHISM OF AMB A I AND AMB A II, THE MAJOR ALLERGENS IN AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA (SHORT RAGWEED)", INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, BASEL, CH, vol. 96, no. 4, 1 janvier 1991 (1991-01-01), pages 296-304, XP000647685, ISSN: 0020-5915 le document en entier	1-17
T	GREGORY P. POGUE ET AL: "Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 8, no. 5, 1 juin 2010 (2010-06-01), pages 638-654, XP055038517, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00495.x	
T	VOINNET O ET AL: "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus", THE PLANT JOURNAL, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 33, no. 5, 1 mars 2003 (2003-03-01), pages 949-956, XP002367694, ISSN: 0960-7412, DOI: 10.1046/J.1365-313X.2003.01676.X le document en entier	
T	LOÏC FAYE ET AL: "Success stories in molecular farming-a brief overview", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 8, no. 5, 9 mai 2010 (2010-05-09), pages 525-528, XP055038398, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00521.x le document en entier	

-/--

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	Jos Cantillo ET AL: "From Molecular Cloning to Vaccine Development for Allergic Diseases" In: "An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications", 1 juillet 2013 (2013-07-01), InTech, XP055161355, ISBN: 978-9-53-511151-1 DOI: 10.5772/52821, -----	1-17

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2015/051319

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0020612 A2	13-04-2000	AR 020717 A1	22-05-2002
		AU 758817 B2	03-04-2003
		AU 2003200126 A1	17-04-2003
		BR 9915919 A	21-08-2001
		CA 2344269 A1	13-04-2000
		CN 1330718 A	09-01-2002
		EP 1117817 A2	25-07-2001
		HU 0103616 A2	28-01-2002
		JP 2002526116 A	20-08-2002
		PL 347904 A1	22-04-2002
		TR 200101032 T2	22-10-2001
		WO 0020612 A2	13-04-2000
EP 2692732 A1	05-02-2014	CA 2881039 A1	06-02-2014
		EA 201590303 A1	30-07-2015
		EP 2692732 A1	05-02-2014
		EP 2880049 A1	10-06-2015
		US 2015210742 A1	30-07-2015
		WO 2014020179 A1	06-02-2014
FR 2809413 A1	30-11-2001	AU 7414801 A	11-12-2001
		FR 2809413 A1	30-11-2001
		WO 0192546 A1	06-12-2001