



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/56, 1/21, 5/10 A01H 5/00, C12N 9/24</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 92/16632 (43) Date de publication internationale: 1er octobre 1992 (01.10.92)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00268 (22) Date de dépôt international: 25 mars 1992 (25.03.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/03588 25 mars 1991 (25.03.91) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): ELF SANOFI [FR/FR]; 32-34, rue Marbeuf, F-75008 Paris (FR). SOCIÉTÉ NATIONALE ELF AQUITAINE [FR/FR]; Tour Elf - 2 Place de la Coupole, La Défense 6, F-92400 Courbevoie (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : SASS, Catherine [FR/CA]; 720 Rielle, Verdun, Québec H4G 2T1 (CA). LEGUAY, Jean-Jacques [FR/FR]; 3, allée des Fiacres, F-31320 Auzeville-Tolosan (FR). GRISON, René [FR/FR]; 13, rue de Naurouze, F-31750 Escalquens (FR). TOPPAN, Alain [FR/FR]; 2, rue de Crabinet, F-31700 Cornebarrieu (FR).</p>		<p>(74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc. ; Cabinet Beau de Lomenie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: RECOMBINANT DNA CODING FOR A NOVEL PROTEIN HAVING BETA-1,3-GLUCANASE ACTIVITY OF SOYA</p>		
<p>(54) Titre: ADN RECOMBINANT CODANT POUR UNE NOUVELLE PROTEINE A ACTIVITE BETA-1,3-GLUCANASE DE SOJA</p>		
<pre> Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Asn Asp Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg Leu Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly Ile Glu Leu Ile Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala Thr Asn Pro Asp Thr Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn Phe Trp Pro Ser Val Lys Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala Ile Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln Ile Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp Val Arg Ser Tyr Leu Asp Pro Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala Pro Leu Leu Val Asn Val Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg Asp Ile Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp Asp Gly Gln Tyr Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val His Ala Ala Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser Glu Ser Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala Arg Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro Arg Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro Asn Lys Gln Lys Lys </pre>		
<p>(57) Abstract</p> <p>A recombinant DNA coding for a protein having β-1,3-glucanase activity, or a precursor thereof, which includes sequence (a₁) or a sequence having a high level of homology therewith. Application: recombinant DNA coding for a new protein having β-1,3-glucanase activity.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne un ADN recombinant qui code pour une protéine à activité β-1,3-glucanase ou pour un précurseur de cette dernière qui comprend la séquence (a₁) ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence (a₁). Application: ADN recombinant codant pour une nouvelle protéine à activité β-1,3-glucanase.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	RO	Roumanie
CA	Canada	IT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

ADN RECOMBINANT CODANT POUR UNE NOUVELLE PROTEINE A ACTIVITE
BETA-1,3-GLUCANASE DE SOJA

05 L'invention concerne un ADN recombinant codant pour une
nouvelle protéine à activité β -1,3-glucanase, ou pour un précurseur
de cette protéine, une bactérie contenant cet ADN recombinant, une
cellule végétale, une plante ou une partie de plante, en parti-
culier une semence végétale, transformées par cet ADN recombinant,
10 ainsi que cette nouvelle protéine et un procédé pour la préparer.

Il est connu que les plantes cultivées sont soumises à
des attaques par des parasites, tels que les champignons phyto-
pathogènes, qui sont responsables de pertes importantes de
récoltes. Le principal moyen actuel de lutte contre ces champignons
15 réside dans l'utilisation de substances chimiques à activité fongi-
cide. On sait aujourd'hui que les plantes réagissent naturellement
à ces attaques par divers mécanismes de défense, malheureusement en
général à déclenchement trop tardif et d'intensité trop faible,
pour être suffisamment efficaces.

20 L'un de ces mécanismes comprend l'induction d'une enzyme
appelée β -1,3-glucanase E.C.3.2.1.39 (Kombrink et al., 1988, Pr Ntl
Acad. Sci. USA, 85, 982-986 et Pegg et al., 1981, Physiol. Plant.
Pathol. 19,371-382). Cette induction peut être artificiellement
déclenchée sous l'effet d'éliciteurs, c'est-à-dire de composés
25 d'origine biologique capables d'induire dans une plante saine les
réactions de défense qu'elle déploie naturellement lors d'une
infection par des agents pathogènes, ou d'un déséquilibre hormonal
provoqué par l'auxine, les cytokinines ou l'éthylène (Abeles et
al., 1971, Plant Physiol. 47,129-134 et de Loose et al., 1988,
30 Gene, 70,13-23).

Les β -1,3-glucanes sont des polymères linéaires poly-
saccharidiques constitués d'unités de glucose associées par des
liaisons β -1,3 présentant parfois des ramifications de type β -1,4
ou β -1,6 (Farka 1982, in "Fungal protoplasts", Peberdy et Ferencry
35 éditions Dekker Inc). Ces polysaccharides constituent un composant
typique du squelette de la paroi de la plupart des champignons et

notamment des champignons phytopathogènes. Les β -1,3-glucanases sont capables de les dégrader par fragmentation des chaînes de β -1,3-glucane. La plupart des β -1,3-glucanases végétales connues sont de type endo.

05 Il est connu d'autre part que les progrès récents des technologies dites d'ADN recombinant et de la transformation des cellules végétales ainsi que de la régénération de plantes entières à partir de ces dernières, permettent l'introduction d'un gène d'intérêt dans des cellules végétales, une plante ou une partie de
10 plante, de façon à obtenir un phénotype avantageux.

Des séquences d'ADN codant pour plusieurs β -1,3-glucanases végétales, notamment une β -1,3-glucanase de Nicotiana plumbaginifolia (De Loose et al., 1988, Gene, 70,13-23) et une
15 β -1,3-glucanase de soja (Takeuchi et al., 1990, Plant Physiol, 93,673-682) ont été isolées, clonées et déterminées. La demande de brevet EP-A-0 353 191 décrit l'isolement et le clonage de différents fragments d'ADN complémentaire dont l'assemblage permet de déduire la séquence d'ADN complémentaire codant pour une β -1,3-glucanase de tabac, ainsi que de la séquence d'ADN génomique codant
20 pour cette enzyme. Le document EP-0 392 225 divulgue notamment la construction d'un gène chimérique codant pour cette β -1,3-glucanase de tabac, la transformation du tabac par ce dernier et la vérification par Western Blot et révélation à l'aide d'anticorps polyclonaux, de la surexpression de cette protéine endogène dans les
25 plantes transformées. Cette demande de brevet ne montre pas que la β -1,3-glucanase de tabac recombinante est active biologiquement ni a fortiori qu'elle confère une résistance desdites plantes transformées aux agents pathogènes.

On sait, par ailleurs, que les β -1,3-glucanases, telles
30 que par exemple la β -1,3-glucanase de Bacillus subtilis, sont des enzymes utiles dans la conversion de la biomasse, notamment dans certains secteurs de l'industrie papetière et dans l'industrie agroalimentaire, en particulier la brasserie (Meaden, 1986, Brewers
Guardian, 115, 7 et MacQueen, octobre 1987, New Scientist, 66).

35 Il est connu enfin que de nombreuses protéines recombinantes peuvent être produites par des cellules eucaryotes et des

bactéries, suite à l'introduction dans celles-ci de gènes codant pour lesdites protéines à l'aide des techniques classiques de génie génétique.

La présente invention concerne un nouvel ADN recombinant
05 caractérisé en ce qu'il code pour une protéine à activité β -1,3-
glucanase ou pour un précurseur de cette dernière, cette protéine à
activité β -1,3-glucanase comprenant la séquence d'acides aminés
(a₁) suivante :

10 Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Asn Asp
Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg Leu Tyr Asp
Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly Ile Glu Leu Ile
Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala Thr Asn Pro Asp Thr
Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn Phe Trp Pro Ser Val Lys
15 Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser
Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala Ile Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile
Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln Ile Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met
Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp
Val Arg Ser Tyr Leu Asp Pro Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala
20 Pro Leu Leu Val Asn Val Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg
Asp Ile Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp
Asp Gly Gln Tyr Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val
His Ala Ala Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser
Glu Ser Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala
25 Arg Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro Arg
Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn
Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro Asn Lys
Gln Lys Lys

30 ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la
séquence (a₁).

Un degré d'homologie élevé signifie ici une homologie
(rapport entre les acides aminés identiques et le nombre total
d'acides aminés) d'au moins 80 %, et de préférence d'au moins 90 %,
35 des séquences d'acides aminés, lorsqu'elles sont alignées d'après
l'homologie maximale, selon la méthode d'alignement optimal des

séquences de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453. Cette méthode est notamment utilisée dans le logiciel UWGCG de l'Université de Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721 - option GAP.

05 La séquence peptidique déjà connue la plus proche de celle de la séquence (a₁) de 307 acides aminés est celle de la protéine de 369 acides aminés déduite de l'ADN complémentaire d'une β-1,3-glucanase de Nicotiana plumbaginifolia (cf. la banque de données Swissprot réf. Gub§Nipl. et De Loose et al., 1988, Gene, 10 70,13-23). Une comparaison de ces deux séquences à l'aide de la méthode de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48,443-453, montre que 213 acides aminés sont identiques sur 307, soit une homologie d'environ 69 %. Cette méthode algorithmique, qui considère tous les alignements possibles et crée un alignement, 15 représenté sur la figure 7, dans lequel le plus possible d'acides aminés identiques sont appariés et le nombre de trous dans les séquences alignées est minimal, est notamment utilisée dans le logiciel UWGCG de l'Université de Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721 - option GAP.

20 Ce nouvel ADN recombinant peut servir à l'expression de cette protéine à activité β-1,3-glucanase, soit pour conférer à une plante ou une partie de plante qui exprime celle-là, une résistance accrue aux agents pathogènes, soit pour produire cette protéine à l'aide de cellules eucaryotes, notamment les ascomycètes, tels que 25 la levure ou les champignons filamenteux, par exemple, Cryphonectria parasitica ou les cellules végétales, ou de micro-organismes procaryotes, tels que par exemple Escherichia coli.

Cet ADN recombinant peut comporter immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour la séquence d'acides 30 aminés (a₁) la séquence nucléotidique codant pour la séquence d'acides aminés (a₄) ci-après :

Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu Gly Lys Val Val Ile Asp Asp
Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser Asp Val

35

tronquée dans sa partie carboxyterminale de 0 à 27 acides aminés.

Il est avantageux que cet ADN recombinant comporte immédiatement en amont de la séquence nucléotidique codant pour la séquence d'acides aminés (a_1), un codon pour le Gln.

Un ADN de ce type apprécié est celui qui code pour une protéine à activité β -1,3-glucanase ou pour un précurseur de cette protéine, qui comporte la séquence (a_5) suivante :

Gln

Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Asn Asp
 Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg Leu Tyr Asp
 10 Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly Ile Glu Leu Ile
 Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala Thr Asn Pro Asp Thr
 Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn Phe Trp Pro Ser Val Lys
 Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser
 Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala Ile Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile
 15 Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln Ile Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met
 Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp
 Val Arg Ser Tyr Leu Asp Pro Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala
 Pro Leu Leu Val Asn Val Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg
 Asp Ile Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp
 20 Asp Gly Gln Tyr Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val
 His Ala Ala Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser
 Glu Ser Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala
 Arg Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro Arg
 Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn
 25 Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro Asn Lys
 Gln Lys Lys Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu Gly Lys Val Val
 Ile Asp Asp Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser Asp Val

Cet ADN recombinant comporte de préférence en amont de la séquence codant pour la séquence (a_1) précédée éventuellement d'un codon pour Gln une séquence signal, choisie en fonction de la cellule hôte, qui a pour fonction de permettre l'exportation de la protéine hors du cytoplasme.

Pour une expression dans les micro-organismes procaryotes, tels que par exemple Escherichia coli, cette séquence signal peut être, soit une séquence dérivée d'une séquence codant

pour un précurseur naturel d'une protéine exportée par un micro-organisme procaryote, par exemple le peptide signal OmpA (Ghrayeb et al., 1984, EMBO Journal, 3, 2437-2442) ou un précurseur de la phosphatase alcaline (J. Bact. 1983, 154, 366-3747), soit une
 05 séquence non endogène provenant d'une séquence codant pour pré-
 curseur eucaryote (par exemple le peptide signal de l'un des pré-
 curseurs naturels de l'hormone de croissance humaine), soit une
 séquence codant pour un peptide signal synthétique (par exemple
 celui décrit dans la demande de brevet FR n° 2 636 643, de
 10 séquence :

Met Ala Pro Ser Gly Lys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Cys
 Leu Pro Ser Trp Asn Ala Gly Ala .

15 Pour une expression dans les cellules eucaryotes telles
 que les ascomycètes, par exemple la levure Saccharomyces cerevisiae
 ou le champignon filamenteux Cryphonectria parasitica, cette
 séquence signal est de préférence une séquence dérivée d'une
 séquence codant pour un précurseur naturel d'une protéine sécrétée
 20 par ces cellules, par exemple pour la levure le précurseur de
 l'invertase (demande de brevet EP-0 123 289) ou le précurseur de la
 séquence prépro de la phéromone alpha (demande de brevet
 DK 2484/84), ou pour Cryphonectria parasitica, le précurseur de la
 séquence prépro de l'endothiaepsine, de séquence suivante, décrite
 25 dans la demande de brevet FR-2 666 590 :

Met Ser Ser Pro Leu Lys Asn Ala Leu Val Thr Ala Met Leu Ala Gly Gly
 Ala Leu Ser Ser Pro Thr Lys Gln His Val Gly Ile Pro Val Asn Ala Ser
 Pro Glu Val Gly Pro Gly Lys Tyr Ser Phe Lys Gln Val Arg Asn Pro Asn
 30 Tyr Lys Phe Asn Gly Pro Leu Ser Val Lys Lys Thr Tyr Leu Lys Tyr Gly
 Val Pro Ile Pro Ala Trp Leu Glu Asp Ala Val Gln Asn Ser Thr Ser Gly
 Leu Ala Glu Arg

35 Pour une expression dans les cellules végétales, on uti-
 lise comme séquence signal, soit une séquence codant pour le

peptide signal d'une protéine de cellule végétale connue pour être exportée, par exemple, la séquence suivante décrite dans la demande de brevet FR 2 665 177 :

05 Met Arg Arg Thr Ser Lys Leu Thr Thr Phe Ser Leu Leu Phe Ser Leu Val
Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ala

soit une séquence signal codant pour le peptide signal de séquence
(a₂) suivante

10

Met Pro Ser Leu Phe Ala Arg Asn Gln Arg Phe Ser Leu Ala Thr Leu Leu
Leu Leu Leu Glu Leu Leu Thr Gly Asn Leu Arg Met Ala Asp Ala

15 Les séquences d'acides aminés (a₁), (a₂) et (a₄) peuvent,
par exemple, être codées par les séquences nucléotidiques (Na₁),
(Na₂) et (Na₄) ci-après :

(Na₁) :

20 ATTGGTGTGT GTTATGGCAT GCTGGGCAAC AATCTACCGT CAGCAAACGA TGTTATAGGT
CTTTATAGAT CAAATAACAT AAAGAGAATG AGACTCTATG ATCCTAATCA AGCTGCTCTA
GAAGCACTTA GAAATTCTGG CATTGAACTC ATTCTTGGGG TGCCAAACTC TGACCTTCAA
GGCCTTGCCA CCAATCCTGA CACTTCTCGT CAATGGGTGC AAAAAACGT GTTGAACTTT
TGGCCTAGTG TCAAAATCAA GTACGTGGCA GTTGGAAATG AAGTGAGTCC CGTTGGAGGC
25 TCTTCTTCGG TAGCCCAATA TGTTCTACCT GCCATCCAAA ATGTATACCA AGCAATAAGA
GCTCAAGGCC TTCATGATCA AATCAAGGTT TCAACATCTA TTGACATGAC CCTAATAGGA
AACTCTTTCC CTCCATCGCA AGGTTCTTTC AGGGGTGATG TGAGATCATA CCTAGATCCC
ATAATTGGGT ACTTGGTATA TGCAAATGCA CCATTACTAG TCAATGTGTA CCCTTATTTT
AGTTACTG GTAACCCCG TGACATATCA CTTCCCTATG CTCTTTTCAC AGCACCAAAT
30 GTTGTGGTAT GGGATGGTCA ATATGGGTAC CAAATTTGT TTGATGCTAT GTTGGATTCA
GTACATGCAG CCATTGATAA CACTAAGATT GGTTATGTGG AGTTGTTGT ATCCGAGAGT
GGGTGGCCAT CAGATGGAGG ATTTGCTGCC ACTTATGACA ACGCACGCGT GACTTAGAC
AATTTGGTTC GTCGTGCTAA TAGAGGAAGC CCAAGAAGGC CTTCGAAGCC CACTGAGACT
TATATATTTG CCATGTTTGA TGAAAATCAA AAAAATCCAG AGATAGAGAA ACATTTTGGG
35 CTCTTCAATC CCAACAAACA AAAAAA

(Na₂) :

ATGCCTTCTC TCTTCGCTAG AAACCAGAGG TTCTCATTGG CTA CTCTCCT GCTTCTTCTG
GAACTATTGA CAGGAAACCT TCGCATGGCA GATGCT

05

(Na₄) :

TACC CATTGGGTT TGGAGGAAAG AGGCTAGGGA AAGTTGTTAT TGACGACTTC
AATGCAACAA CTTCCATTAA GAGTGATGTG

10

L'invention concerne aussi une unité d'expression de l'ADN recombinant défini précédemment, portée avantageusement par un vecteur, dit vecteur d'expression.

Pour une expression dans les micro-organismes proca-
15 ryotes, en particulier dans Escherichia coli, l'ADN recombinant doit être inséré dans une unité d'expression comportant notamment un promoteur efficace, suivi d'un site de fixation des ribosomes en amont du gène à exprimer, ainsi qu'une séquence d'arrêt de trans-
cription efficace en aval du gène à exprimer. Cette unité doit éga-
20 lement comporter un marqueur de sélection ou être introduite dans la cellule hôte en même temps qu'une unité d'expression d'un marqueur de sélection (par exemple à l'aide d'un vecteur d'expres-
sion qui porte ces deux unités). Toutes ces séquences doivent être
choisies en fonction de la cellule hôte.

25 Pour une expression dans les cellules eucaryotes, telles que les ascomycètes, l'unité d'expression selon l'invention comprend l'ADN recombinant défini précédemment avec les moyens nécessaires à son expression.

Pour une expression dans les cellules ascomycètes, telles
30 que la levure, par exemple Saccharomyces cerevisiae, il convient d'insérer l'ADN recombinant entre, d'une part, des séquences reconnues comme promoteur efficace, d'autre part, un terminateur de transcription. L'unité d'expression porte un marqueur de sélection ou est introduite dans la cellule hôte en même temps qu'un marqueur
35 de sélection. De préférence, ce marqueur de sélection est un marqueur auxotrophe (qui complémente une mutation des cellules

réceptrices) qui permet la sélection des cellules qui ont intégré l'ADN recombinant en un nombre de copies élevé, soit dans leur génome, soit dans un vecteur multicopie. Pour une expression dans les cellules ascomycètes, telles que celles des champignons filamenteux, par exemple ceux des genres Aspergillus, Neurospora, Podospora, Trichoderma ou Cryphonectria, l'unité d'expression selon l'invention porte l'ADN recombinant défini précédemment avec les moyens nécessaires à son expression, et éventuellement un marqueur de sélection et/ou des séquences télomériques. Il est en effet possible de sélectionner les transformants ayant intégré un ADN d'intérêt à l'aide d'un marqueur de sélection situé soit sur la même unité que l'ADN d'intérêt, soit sur une autre unité, ces deux unités étant alors introduites par cotransformation. L'ADN recombinant de l'invention peut être soit intégré au génome des champignons filamenteux, soit conservé sous forme extrachromosomique grâce à des séquences permettant la répllication et la partition de cet ADN.

Pour une expression dans les cellules végétales, il convient d'insérer l'ADN recombinant défini précédemment entre un promoteur et un terminateur efficaces dans les végétaux.

Le promoteur est de préférence un promoteur constitutif fort, par exemple le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou un promoteur commandant une expression tissu - ou organe - spécifique comme le promoteur de la petite sous-unité de la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase-oxygénase qui s'exprime préférentiellement dans les feuilles et tout particulièrement les tissus du mésophylle (Kuhlemeier et al., 1987, Ann Rev Plant Physiol 38 : 221-257). On peut également utiliser un promoteur spécifique commandant par exemple une expression dans les graines ou au cours d'un stade précis du développement de la plante, ou un promoteur inductible à la suite d'un choc thermique, d'une blessure ou de l'interaction entre la plante et des parasites (Kuhlemeier et al., 1987 référence citée ci-dessus), si une expression de l'ADN recombinant est recherchée dans ces situations.

On utilise la séquence terminatrice, comportant des sites de polyadénylation pouvant être isolée de gènes végétaux ou de

gènes s'exprimant dans les végétaux, comme par exemple le terminateur de la nopaline synthase d'Agrobacterium tumefaciens.

L'invention concerne également une bactérie, par exemple de l'espèce E. coli, qui contient l'ADN recombinant défini précédemment, avec les moyens nécessaires à sa réplication et son expression. Cette bactérie peut être utilisée dans la préparation d'une protéine à activité β -1,3-glucanase.

L'invention a également trait à une bactérie, par exemple de l'espèce E. coli, qui contient l'ADN recombinant défini ci-dessus avec les moyens permettant sa réplication, laquelle donc peut servir au clonage de cet ADN recombinant et ainsi qu'à une bactérie susceptible d'infecter une plante avec transfert de matériel génétique, par exemple de l'une des espèces Agrobacterium rhizogenes et Agrobacterium tumefaciens, qui contient cet ADN dans un contexte permettant sa réplication et donc peut servir à transformer des cellules végétales. La transformation des cellules végétales par l'ADN recombinant ci-dessus peut également être effectuée par une autre méthode biologique telle que la voie du tube pollinique (Zhong-xun Luo et al., Plant Molec. Biol. Rep., 1988, 6, 165-176) et la transformation directe de graines en germination (Toepfer R. et al., 1989, The Plant Cell., 1, 133-139), ou par une méthode physique telle que l'utilisation de polyéthylèneglycol, l'électroporation (Christou P. et al., 1987, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 84, 3662-3699) et le bombardement à l'aide de microprojectiles (Klein T.M. et al., 1988, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 85, 8502-8505).

L'invention concerne également une cellule végétale caractérisée en ce qu'elle est transformée par l'ADN recombinant défini précédemment, avec les moyens nécessaires à son expression. Cette cellule végétale peut provenir d'une espèce de grande culture, telle que par exemple le maïs, le soja, la betterave, le blé, l'orge, le pavot, le colza, le tournesol, la luzerne et le sorgho, d'une espèce florale telle que le rosier, l'oeillet, le gerbera ou d'une espèce potagère telle que la carotte, la tomate, la salade, la chicorée, le poivron, le melon et le chou. Des

espèces particulièrement appréciées sont le colza Brassica napus, le tournesol Helianthus annuus et le tabac Nicotiana tabacum.

L'étape de transformation qui concerne une ou quelques cellules est suivie d'une étape de multiplication de ces cellules transformées de façon à obtenir des cals, lesquels peuvent donner naissance à des plantes transformées, par des processus d'organogénèse ou d'embryogénèse.

L'invention concerne donc aussi une plante ou une partie de plante, caractérisée en ce qu'elle contient, avec les moyens nécessaires à son expression, l'ADN recombinant défini précédemment. Une partie de plante particulièrement appréciée est la partie apte à former une nouvelle plante complète, notamment après semis, enfouissement ou repiquage, ou à produire des semences. Une telle partie est par exemple un grain, une graine, une semence, une bouture, une marcotte, etc. Ces plantes peuvent être l'une quelconque des espèces ci-dessus et plus particulièrement des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

L'invention a également trait à un procédé pour obtenir des plantes résistantes aux parasites, tels que les champignons phytopathogènes, qui comprend une étape de transformation de cellules végétales par cet ADN recombinant, suivie d'une étape de multiplication des cellules transformées et d'une étape de régénération des plantes.

De préférence, l'étape de transformation des cellules végétales est effectuée in vitro à l'aide d'une agrobactérie (c'est-à-dire d'une bactérie du genre Agrobacterium) ayant intégré l'ADN recombinant d'intérêt.

L'invention concerne aussi les plantes résistantes aux agents pathogènes susceptibles d'être obtenues à l'aide du procédé défini ci-dessus.

L'invention a également trait à l'utilisation d'une plante contenant, avec les moyens nécessaires à son expression, l'ADN recombinant défini précédemment, comme géniteur dans un programme de sélection pour créer de nouvelles variétés végétales.

L'invention concerne aussi une nouvelle protéine à activité β -1,3-glucanase, qui comprend la séquence (a_1) éventuellement

immédiatement suivie de la séquence (a_4) tronquée dans sa partie carboxyterminale de 0 à 27 acides aminés, et une nouvelle protéine qui comprend la séquence (a_5).

05 Cette protéine présente de préférence une masse moléculaire apparente de 36 ± 3 , 37 ± 3 ou 39 ± 3 kDa.

Cette protéine présente un intérêt comme enzyme de conversion de la biomasse qui contient des β -1,3-glucanes, notamment dans certains secteurs de l'industrie papetière et dans l'industrie agroalimentaire, en particulier la brasserie.

10 L'invention a également trait à un procédé de préparation de cette protéine qui comprend la mise en culture de bactéries, cellules végétales, cals végétaux, de plantes ou de parties de plantes contenant l'ADN recombinant défini précédemment, la lyse de ceux-ci, l'isolement et la purification de cette protéine.

15 L'invention sera mieux comprise à l'aide de l'exposé ci-après, divisé en sections, qui comprend des résultats expérimentaux et une discussion de ceux-ci. Certaines de ces sections concernent des expériences effectuées dans le but de réaliser l'invention et d'autres des exemples de réalisation de l'invention donnés bien sûr à titre purement illustratif.

20 Une grande partie de l'ensemble des techniques ci-après, bien connues de l'homme de l'art, est exposée en détail dans l'ouvrage de Sambrook et al. : "Molecular cloning : a Laboratory manual" publié en 1989 par les éditions Cold Spring Harbor Press à New York (2e édition).

25 La description ci-après sera mieux comprise en se reportant aux figures 1 à 7.

30 La figure 1 représente une carte de restriction du fragment HindIII-EcoRI contenu dans le plasmide pBR1310 et contenant l'ADN complémentaire codant pour la β -1,3-glucanase de soja.

35 La figure 2 représente la séquence nucléotidique de l'insert HindIII-HindIII, partie de l'ADN complémentaire de la β -1,3-glucanase de soja, les sites de restriction utilisés pour le clonage dans M13mp19 et pour les constructions ultérieures étant indiqués par des flèches, ainsi que la séquence peptidique déduite de cet ADN complémentaire.

La figure 3 représente la séquence nucléotidique du fragment HindIII-HindIII de l'ADN complémentaire de la β -1,3-glucanase de soja, après mutagénèse (à l'issue de la section 6c), les sites de restriction utilisés pour le clonage dans M13mp19 et pour les constructions ultérieures étant indiqués par des flèches, ainsi que la séquence peptidique de la protéine traduite.

La figure 4 représente la séquence nucléotidique du fragment NdeI-HindIII de la partie codante du plasmide pBR59, plasmide d'expression dans E. coli, encadrée par les sites de restriction NdeI et HindIII et la séquence peptidique de la protéine traduite.

La figure 5 représente la séquence nucléotidique du gène recombinant complet et la séquence peptidique de la protéine traduite.

La figure 6 représente la séquence peptidique de la partie commune des protéines traduites dans E. coli et dans le tabac.

La figure 7 représente un alignement d'après la méthode de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443-453, de la séquence peptidique déduite de l'ADN complémentaire de la β -1,3-glucanase de soja (cf. figure 2) et de la séquence peptidique connue la plus proche, celle déduite de l'ADN complémentaire de la β -1,3-glucanase de Nicotiana plumbaginifolia (banque de données Swissprot réf. Gub§-Nipl).

25 Section 1 : Préparation d'anticorps polyclonaux contre la β -1,3-glucanase de tabac

a) Purification de la β -1,3-glucanase de tabac.

Une β -1,3-glucanase de tabac a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir de cals de tabac comme décrit ci-après. Des cals de tabac ont été cultivés in vitro sur un milieu de Murashige et Skoog (Murashige T. et Skoog F., 1962, Physiol. Plant., 15, 473-497). Des extraits cellulaires sont obtenus par broyage du matériel végétal dans une solution tampon Tris-HCl 50mM pH 8,4 contenant 35 15 mM de β -mercaptoéthanol et 5 % de polyvinylpyrrolidone.

La protéine est purifiée à partir de cet extrait par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie en phase liquide sur une colonne échangeuse de cations à base de polymère synthétique, et chromatographie d'exclusion (tamisage moléculaire) sur un agarose réticulé selon le protocole décrit ci-après :

Etape 1 :

L'extrait protéique est traité par le sulfate d'ammonium (43 % de saturation). Les protéines ayant précipité sont recueillies par centrifugation (15 000 g pendant 30 min), solubilisées dans une solution tampon (acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2) et dialysées pendant une nuit à 4°C contre une solution tampon acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2.

Extemporément, la concentration en acétate de la solution tampon de l'extrait protéique est ramenée à 10 mM par passage sur des mini-colonnes prêtes à l'emploi (PD10 Pharmacia).

Etape 2 :

L'extrait protéique est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions à base de polymère synthétique (colonne Mono-S de Pharmacia) selon la technique FPLC de Pharmacia.

L'extrait est déposé sur la colonne Mono-S équilibrée avec un tampon d'acétate d'ammonium 10 mM pH 5,2. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un gradient linéaire de 10 à 500 mM d'acétate d'ammonium.

A chaque étape, la β -1,3-glucanase est identifiée par son poids moléculaire (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS - révélation à l'argent) et son activité est mesurée par une méthode colorimétrique (cf. section 8, ci-après) utilisant la laminarine (β -1,3-glucane extrait de Laminaria digitata - Sigma - réf. L9634) comme substrat.

b) Préparation d'anticorps polyclonaux.

On a ensuite injecté à des lapins 25 μ g de β -1,3-glucanase de tabac dans 500 μ l d'adjuvant complet de Freund. Trois injections de rappel de 25 μ g dans l'adjuvant incomplet de

Freund (500 μ l) ont été réalisées à 3 semaines d'intervalle. L'immunsérum a été prélevé 3 semaines après la dernière injection.

Cet immunsérum reconnaît la β -1,3-glucanase de tabac, il reconnaît également la β -1,3-glucanase de soja. On a en effet
05 vérifié qu'il permet de révéler cette dernière protéine par la technique de Western Blot (décrite dans la section 13 ci-après) à partir d'un extrait des protéines totales de soja (Glycine max cv Mandarin).

10 Section 2 : Construction d'une banque phagique d'ADN complémentaire à partir d'ARN messagers de cultures cellulaires de soja.

a) Préparation d'ARN messagers de cellules de soja.

15 Les ARN totaux de cellules de soja âgées de 5 jours (Glycine max cv Mandarin), cultivées in vitro en absence d'auxine selon la méthode décrite par Leguay et al., 1987, Develop. Genetics 8 : 351-364, ont été extraits selon la méthode décrite par Jouanneau et al., 1984 Plant Physiol 74 ; 663-668, résumée ci-
20 après. Les cellules préalablement lavées dans une solution saline sont broyées dans l'azote liquide ; l'homogénéisat est ensuite extrait par un mélange de phénol redistillé et de chloroforme. Après une étape de précipitation éthanolique, les ARN totaux sont
25 dissous dans une solution tamponnée à pH 7,6.

La fraction poly (A)⁺ des ARN messagers (ARNm) a été isolée après 2 cycles de chromatographie d'affinité sur une colonne d'oligo (dT) cellulose comme décrit dans Sambrook et al. ("Molecular cloning : A Laboratory manual", second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory 1989). La quantification des ARN messagers
30 est réalisée par spectrophotométrie selon un protocole bien connu de l'homme de l'art.

b) Synthèse des ADN complémentaires.

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés selon
35 la méthode décrite par Gübler et Hoffman, 1983 (Gene, 25 : 263-

269), méthode qui favorise la synthèse et le clonage d'ADNc complets : 7 µg d'ARNm ont ainsi été traités pour la fabrication du premier brin d'ADNc à l'aide du kit "Protoclone GT system" de Promega (réf. P3010).

05

c) Clonage des ADN complémentaires.

L'ADNc double brin synthétisé est ensuite méthylé à l'aide de la méthylase EcoRI dans les conditions décrites dans l'ouvrage de référence Sambrook et al. (op cité). Cette enzyme permet de protéger les sites éventuels EcoRI de l'ADNc contre une coupure par l'endonucléase EcoRI, cette protection disparaissant pour les répliques de l'ADNc (qui ne sont pas méthylées).

10

Des linkers synthétiques EcoRI (fragments d'ADN double brin contenant le site EcoRI) sont alors rajoutés par ligation aux extrémités de l'ADNc. Après coupure par l'endonucléase EcoRI et élimination des linkers par chromatographie sur une colonne de tamis moléculaire G50 (Pharmacia), l'ADNc est ligué à l'aide de la T4 DNA ligase dans le phage lambda gt11, vecteur de clonage et d'expression décrit par Huynh et al., "DNA cloning : a practical approach" IRL Press, D.M. Glover 1985, p. 49, selon le protocole "lambda gt11 system", de Promega (réf-T3011), l'ADN phagique étant préalablement ouvert par l'endonucléase de restriction EcoRI et déphosphorylé. Des parties aliquotes du milieu de ligation sont ensuite empaquetées dans des particules phagiques en utilisant le kit commercialisé par Amersham ("In vitro packaging system for lambda DNA", réf. N334).

15

20

25

Le nombre de recombinants est ensuite estimé par comptage des plages de lyse obtenues sur un tapis bactérien de la souche E. coli Y1090 (Sambrook, et al., réf. ci-dessus, op. cité). Environ 10^6 clones ont été obtenus. L'étalement d'une partie aliquote de la suspension phagique sur un tapis bactérien en présence de X-gal- (bromo-5-chloro-4-indolyl-3-β-D-galactoside) et d'isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG), selon la technique décrite par Huynh et al., réf. ci-dessus, a permis de déterminer que 81 % de ces phages ont intégré un ADNc de soja.

30

35

Section 3 : Criblage immunologique de la banque phagique d'ADN complémentaire construite à partir des ARN messagers de cellules de soja.

05 La réalisation d'une banque dans le vecteur lambda gt11 permet de réaliser l'expression des ADNc clonés, c'est-à-dire de faire synthétiser les protéines codées par les ARN messagers qui ont servi à construire cette banque. Cette synthèse se fait après
10 induction par l'IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) ; les protéines synthétisées peuvent alors être reconnues par les anticorps obtenus contre la β -1,3-glucanase de tabac (cf. section 1). Les clones produisant ces protéines peuvent ensuite être repérés et isolés selon un protocole connu de l'homme de l'art et décrit par exemple dans Sambrook et al. (op. cité).

15 10^6 phages de la banque d'ADNc de soja sont étalés sur des boîtes de Pétri et des plages de lyse sont obtenues au bout de 2 h 30 min d'incubation à 42°C. Un filtre de nitrocellulose (Schleicher et Schüll, BA 85) imprégné d'IPTG est déposé sur la surface des boîtes et laissé en contact avec le milieu gélosé
20 pendant 4 h à la température de 37°C, puis remplacé par un second filtre qui est laissé pendant 6 h sur le même milieu.

Les filtres retirés de la boîte sont ensuite immergés pendant 30 min dans une solution, appelée solution TNT, composée de
25 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % du détergent Tween 20, puis pendant 30 min dans un tampon appelé tampon de blocage, composé de gélatine en solution à 1 % dans la solution TNT. Les filtres sont alors traités pendant 3 h dans une solution renfermant les anticorps polyclonaux anti β -1,3-glucanase obtenus précédemment (cf. section 1), dilués dans le tampon de blocage. Ils ont ensuite
30 été immergés pendant 10 min successivement dans chacune des solutions suivantes :

- . Solution TNT + 0,1 % BSA (albumine de sérum bovin)
- . Solution TNT + 0,1 % BSA + 0,1 % de détergent Nonidet P40 (Sigma)
- 35 . Solution TNT + 0,1 % BSA.

Le complexe antigène-anticorps formé est ensuite révélé à l'aide d'anticorps secondaires conjugués par couplage avec une peroxydase ("Immuno conjugate GAR/IgG (H+L)/Po" de Nordic Immunology, Tilburg, Pays-Bas). La réaction chimique de révélation
05 utilise le chloro-4 naphthol-1 comme substrat chromogène (donnant un précipité bleu). Les plages de lyse positives, c'est-à-dire correspondant à des clones qui synthétisent la β -1,3-glucanase, sont alors repérées sur la boîte de Pétri et les bactériophages sont prélevés pour être purifiés grâce à un criblage immunologique
10 secondaire, conduit de façon strictement identique au criblage primaire. Un de ces clones a été retenu pour la suite de l'étude.

Section 4 : Caractérisation partielle de l'ADN phagique du clone de β -1,3-glucanase du soja.

15

a) Préparation de l'ADN phagique.

Le clone phagique retenu est amplifié et son ADN est extrait selon le protocole décrit dans le kit d'Amersham "cDNA cloning system GT11" (réf. RPN 1280), résumé ci-après. Les phages
20 sont prélevés par carottage et transférés dans une culture de la souche E. coli Y1090 ; au bout de 15 min, 5 ml de milieu Luria (Gibco) contenant 5 mM de CaCl_2 et 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline sont rajoutés. Après une incubation pendant 4 h à 43°C sous agitation, la culture est centrifugée à 3 000 tr/min pendant 10 min. L'ADN des
25 particules phagiques présentes dans le surnageant est ensuite extrait et purifié par traitement au polyéthylèneglycol et chlorure du sodium NaCl, centrifugation, traitement à la protéinase K et précipitation.

30 b) Analyse de l'ADN phagique des clones sélectionnés

L'ADN des clones de β -1,3-glucanase a été hydrolysé par l'enzyme de restriction EcoRI. On obtient ainsi un seul fragment EcoRI-EcoRI de 2 300 pb environ par coupure au niveau des sites de clonage. Il n'y a donc pas de site EcoRI dans l'ADN complémentaire.

35 L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus par l'action de plusieurs endonucléases sur le frag-

ment EcoRI-EcoRI d'environ 2 300 pb a permis de montrer que celui-ci contient un site PvuII à quelques paires de bases d'un des sites EcoRI.

05 Section 5 : Construction du plasmide pBR1310, isolement de l'insert d'ADN complémentaire codant pour la β -1,3-glucanase de soja et détermination de sa séquence.

a) Clonage dans le plasmide pGEM-3Z

10 Par hydrolyse du clone retenu à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et PvuII, le fragment EcoRI-PvuII d'environ 2 300 pb contenant l'ADNc de β -1,3-glucanase de soja a été isolé, après une électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion.

15 Le plasmide pGEM-3Z (Promega, Madison, Wi, E.U.A.) a été ouvert à l'aide des endonucléases de restriction EcoRI et SmaI, puis purifié et isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion. Ce plasmide comprend un "polylinker" (multisite de clonage) comportant successivement les sites de restriction EcoRI, SmaI et HindIII.

20 La ligation à l'aide de l'ADN ligase T4 dans ce plasmide ainsi ouvert du fragment EcoRI-PvuII d'environ 2 300 pb contenant l'ADNc codant pour la β -1,3-glucanase de soja permet d'obtenir un plasmide, appelé plasmide pBR1310 (ligation des extrémités franches SmaI et PvuII avec disparition de ces sites) qui est cloné dans la bactérie E. coli souche JM109 (Sambrook et al., op. cité). Le vecteur obtenu a ensuite été extrait et purifié par la méthode de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, dans Sambrook et al., op. cité).

30 L'utilisation de plusieurs enzymes de restriction a permis d'établir la carte de restriction du fragment HindIII-EcoRI contenu dans le plasmide pBR1310 et contenant l'ADNc codant pour la β -1,3-glucanase, représentée sur la figure 1.

35 Le fragment HindIII-HindIII (de 1490 pb environ), a été préparé par digestion du fragment HindIII-EcoRI par l'endonucléase HindIII, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion et isolé. Ce fragment a été cloné dans l'ADN de la forme

répliquative du phage simple brin M13mp19 (Pharmacia) ouvert au site de restriction HindIII. Le vecteur M13 renfermant l'insert HindIII-HindIII de 1490 pb est appelé M13BR137. La séquence de cet insert a été déterminée selon la méthode des didéoxyribonucléotides (Sanger et al., PNAS-USA, 14, 5463-5467, 1977).

b) Analyse de la séquence de l'ADNc de la β -1,3-glucanase de soja.

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide de la figure 2.

Cette séquence renferme une seule phase de lecture ouverte (non interrompue par un codon stop) compatible avec le poids moléculaire apparent observé par électrophorèse sur gel d'agarose : la séquence commençant par un codon ATG en position 114 et terminée par le codon stop TAA en position 1224-1226 codant pour une protéine de 370 acides aminés.

Le logiciel UWGCG de l'Université de Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl.Ac.Res., 12, 8711-8721- option : Recherche de peptide-signal d'après la méthode de G. von Heijne, 1986, Nucl.Ac.Res., 14, 483-490, prévoit dans cette séquence une seule partie codant pour un peptide signal pour une expression dans les cellules eucaryotes, la séquence suivante (α_2) appelée séquence pré (commençant au nucléotide 114 et se terminant au nucléotide 209) :

ATGCCTTCTC TCTTCGCTAG AAACCAGAGG TTTCATTGG CTA CTCTCTCT GCTTCTTCTG
GAACTATTGA CAGGAAACCT TCGCATGGCA GATGCT

codant pour le peptide-signal de 32 acides aminés de séquence (α_2) suivante :

Met Pro Ser Leu Phe Ala Arg Asn Gln Arg Phe Ser Leu Ala Thr Leu Leu
Leu Leu Leu Glu Leu Leu Thr Gly Asn Leu Arg Met Ala Asp Ala

Un peptide-signal est attendu par l'homme de l'art car les β -1,3-glucanases sont des protéines qui peuvent être naturelle-

ment, soit accumulées dans les vacuoles de cellules végétales, soit sécrétées, ce qui exige la présence d'un peptide-signal.

La β -1,3-glucanase mature (c'est-à-dire clivée de son peptide signal) prévue comprend donc 338 acides aminés.

05 Ce logiciel prévoit pour une expression dans les cellules procaryotes une partie codant pour un peptide-signal, la même séquence (Na₂) codant pour le même peptide signal de 32 acides aminés.

10 La séquence peptidique déjà connue la plus proche de celle de la protéine de 370 acides aminés déduite de l'ADN complémentaire de la β -1,3-glucanase de soja est celle de la protéine de 369 aminés déduite de l'ADN complémentaire d'une β -1,3-glucanase de Nicotiana plumbaginifolia (cf. la banque de données Swissprot réf. Gub \S Nipl. et De Loose et al., 1988, Gene, 70, 13-23).

15 Une comparaison de ces deux séquences à l'aide de la méthode de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol, 48,443-453, mise en oeuvre dans le logiciel UWGCG de l'université de Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl.Ac.Res. 12,8711-8721, option GAP, montre que 224 acides aminés sont identiques, soit une
20 homologie d'environ 60 %. Cette méthode algorithmique considère tous les alignements possibles et crée un alignement, représenté sur la figure 7, dans lequel le plus possible d'acides aminés identiques sont appariés et le nombre de trous dans les séquences alignées est minimal.

25

Comparaison de la région aminotermale de la β -1,3-glucanase de soja mature prévue aux séquences aminotermiales publiées de β -1,3-glucanases

30 On connaît, à ce jour, quatre β -1,3-glucanases végétales dont les séquences aminotermiales ont été déterminées expérimentalement. Il s'agit des β -1,3-glucanases de tabac Nicotiana tabacum (H. Shinshi et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5541-5545), de Nicotiana plumbaginifolia (M. De Loose et al., 1988, Gene, 70, 13-23), de haricot Phaseolus vulgaris (B.V. Edington et al., 1991, Plant Molecular Biology, 16, 81-94) et d'orge Hordeum
35 vulgare (P.B. Hoj et al., 1988, Febs Lett., 230, 67-71).

Leurs séquences aminotermiales présentent une forte homologie de l'ordre de 80 % pour les 15 acides aminés aminotermiaux. S'agissant des dicotylédones (Nicotiana tabacum, Nicotiana plumbaginifolia et Phaseolus vulgaris) elles commencent
05 toutes par un Gln, suivi, après un Ser éventuel, de la séquence Ile Gly Val Cys Tyr Gly. On peut remarquer que la séquence de β -1,3-glucanase de soja (dicotylédone) mature prévue par le logiciel ci-dessus commence aussi par la séquence Gln Ile Gly Val Cys Tyr Gly

10

Section 6 : Construction d'un vecteur d'expression dans E. coli :
Le plasmide pBR59.

15 a) Mutagénèse silencieuse de la partie codante pour éliminer le site de restriction SacI (en position 575) de la partie codante.

La séquence GAG CTC du site de restriction SacI situé en position 575 du vecteur M13BR137, est remplacée par mutagénèse dirigée comme décrit ci-après, par la séquence GA \bar{G} CAC. Le codon GCT, correspondant à un résidu alanine dans la séquence initiale
20 d'ADNc, est donc remplacé par le codon GCA correspondant également à un résidu alanine (mutation silencieuse).

La forme simple brin du vecteur M13BR137 est isolée selon le protocole décrit par Sambrook et al., op cité à partir d'une culture de la souche bactérienne E. coli DH5 α F' (Gibco-BRL) préalablement transformée par ce vecteur selon le protocole préconisé par
25 le fabricant. Sur cette matrice simple brin, la mutagénèse est effectuée suivant le protocole du kit "Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system" (Amersham-réf. RPN 1523-version 2), à l'aide d'un oligonucléotide synthétisé chimiquement sur le syn-
30 thétiseur d'ADN Biosearch 8700 de Millipore, dont la séquence est représentée ci-dessous :

GATCATGAAG GCCTTGTGCT CTTATTGCTT GG

35 La technique de mutagénèse dirigée décrite en détail dans le livret accompagnant ce kit et résumée ci-après, consiste à

hybrider l'oligonucléotide ci-dessus avec la forme simple brin du vecteur M13BR137, puis à faire agir la polymérase de Klenow et l'ADN ligase T4 en présence de thionucléotide dCTP- α -S (α -thio-désoxycytidine triphosphate) de façon à obtenir une forme circulaire double brin du phage recombinant, dont l'un des brins porte la mutation souhaitée et est protégé vis-à-vis de la coupure par l'endonucléase NciI et de la dégradation par l'exonucléase III. On induit alors sur l'autre brin (ayant servi de matrice) une césure à l'aide de l'endonucléase NciI, puis ce brin est éliminé par l'action ultérieure de l'exonucléase III.

Le vecteur résultant, appelé vecteur M13BR138, a été cloné dans la souche E. coli DH5 α F' et séquencé ; il présente, comme attendu, une séquence mutée par remplacement d'un codon GCT par un codon GCA, lequel a supprimé le site de restriction SacI de la partie codante.

b) Mutagénèse de la partie 5' de l'insert codant pour la β -1,3-glucanase de soja pour introduire les sites de restriction NdeI et BamHI.

La forme simple brin du vecteur M13BR138 est isolée comme décrit plus haut, une mutagénèse dirigée est ensuite réalisée dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant l'oligonucléotide synthétisé chimiquement et dont la séquence est reportée ci-après :

GAGAAGGCAT GGATCCAAAC ATATGAATAC ACCAC

Le vecteur issu de cette mutagénèse, appelé vecteur M13BR139, est cloné dans la souche bactérienne E. coli DH5 α F' ; il a été séquencé, ce qui a confirmé l'introduction en amont du codon ATG d'initiation de la traduction, des sites de restriction NdeI et BamHI.

c) Mutagénèse de la partie 3' de l'insert du vecteur M13BR139 pour introduire les sites de restriction HindIII et SacI.

La forme simple brin du vecteur M13BR139 est isolée, une mutagénèse dirigée est ensuite réalisée sur la partie 3' de

L'insert à l'aide de l'oligonucléotide de séquence suivante et dans les conditions déjà décrites :

CAGAGATTTT GAAGCTTAGG AGCTCAACCT TACACATC

05

Le vecteur résultant de cette mutagénèse appelé vecteur M13BR140, est cloné dans la souche bactérienne E. coli DH5 α F'. Sa séquence a été déterminée, ce qui a confirmé la création en aval du codon stop TAA des sites de restriction HindIII et SacI. Cette

10 séquence est représentée sur la figure 3.

d) Construction du plasmide pBR141.

La forme répliquative du vecteur M13BR140 est isolée et purifiée selon le protocole de Birnboim et Doly décrit dans

15 Sambrook et al., op. cité. L'insert NdeI-HindIII renfermant la partie codante de la β -1,3-glucanase a été isolé par digestion par les enzymes de restriction NdeI et HindIII et purifié par électrophorèse sur gel d'agarose et électroélution (Sambrook et al., op. cité). Cet insert est ensuite ligué à l'aide de T4 DNA ligase dans

20 le grand fragment NdeI-HindIII du plasmide p373,2, dont la construction et les éléments constitutifs sont décrits dans la demande de brevet EP-A-0360641 (la figure 3 de ce document représente la carte de restriction de ce plasmide), préalablement ouvert par

25 digestion avec les enzymes de restriction NdeI et HindIII. Ce grand fragment contient notamment, successivement de l'extrémité NdeI à l'extrémité HindIII, un promoteur analogue du promoteur "tac" (Sambrook et al., op. cité) inductible par l'isopropyl- β -D-galactoside, un gène codant pour la β -lactamase (conférant la résistance à l'ampicilline) dans un contexte permettant son expression, une

30 origine de répllication dans E. coli et un terminateur de transcription dérivé du phage fd. Le vecteur obtenu, appelé plasmide pBR141 est cloné dans la souche E. coli RR1. La structure du plasmide est vérifiée par la réalisation d'une carte de restriction.

e) Construction du plasmide pBR59

L'ADN plasmidique du clone contenant le plasmide pBR141 est extrait selon le protocole de Birnboim et Doly (Sambrook et al., op. cité).

05 L'élimination de la séquence pré-procaryote prévue (cf. section 5) de la β -1,3-glucanase de soja est réalisée par élimination de la séquence comprise entre les sites de restriction NdeI et SphI et remplacement de cette séquence par le linker synthétique de séquence donnée ci-après :

10

TATGATTGGT GTGTGTTATG GCATGACTAA CCACACACAA TACC

de façon à reconstituer la séquence codant pour la protéine dépourvue du peptide-signal prévu dans les cellules procaryotes, le premier acide aminé de cette dernière : le résidu glutamine (susceptible de se cycliser en pyroglutamate, ce qui rend impossible la détermination de la séquence amino-terminale) étant remplacé par un résidu méthionine initiateur de traduction.

15 La ligation de ce linker à l'aide de T4 DNA ligase permet d'obtenir un plasmide, appelé plasmide pBR59, lequel est cloné dans la souche bactérienne E. coli RR1. Dans ce vecteur, la β -1,3-glucanase est sous le contrôle d'un promoteur (décrit dans la demande de brevet EP-A-0360641) analogue du promoteur "tac" (Sambrook et al., op. cité) inductible par l'isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). La séquence de la partie codante du plasmide pBR59, encadrée par les sites NdeI et HindIII, est représentée sur la figure 4.

25 Section 7 : Expression de la β -1,3-glucanase de soja dans E. coli.

30 La souche de E. coli RR1 contenant le vecteur d'expression pBR59 et une souche E. coli RR1 contenant le plasmide p373,2 sont cultivées dans le milieu Luria (Gibco) contenant 100 mg/l de l'antibiotique ampicilline pendant une nuit à 37°C. Après une dilution de la culture au 1/100ème dans le même milieu, les bactéries sont remises en culture durant 1 heure à 37°C, puis de l'IPTG est ajouté à une concentration finale 1 mM. La culture est alors pour-

35

suivie pendant 3 heures et les bactéries sont récoltées par centrifugation.

Les bactéries sont remises en suspension dans un tampon, appelé tampon de charge de composition suivante :

05

- 0,125 M Tris-HCl pH 6,8
- 4 % dodécyl sulfate de sodium
- 20 % glycérol
- 0,02 % bleu de bromophénol
- 10 % β -mercaptoéthanol

10

puis le mélange est porté à 100°C pendant 10 min. (Ce qui provoque la lyse des bactéries et la dénaturation des protéines.) 10 μ g de protéines solubilisées sont déposés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide selon le protocole décrit par Laemmli (U.K. Laemmli, Nature 227, 1970, 680-685). Après l'électrophorèse, le gel est coloré à l'aide de bleu de Coomassie. On constate pour le clone de β -1,3-glucanase la présence de trois bandes surnuméraires absentes pour la souche témoin.

20

Section 8 : Mesure de l'activité enzymatique de la β -1,3-glucanase recombinante de soja exprimée dans E. coli, isolement et purification de trois formes de cette protéine et détermination de leurs séquences amino-terminales.

25

1. Mesure de l'activité enzymatique de la β -1,3-glucanase recombinante.

L'activité de la β -1,3-glucanase est mesurée par une méthode colorimétrique permettant d'estimer la quantité de monomères ou d'oligomères libérés par l'enzyme à partir d'un substrat (la laminarine) en déterminant le pouvoir réducteur des sucres ainsi libérés. Cette méthode, décrite par G. Ashwell, 1957, dans "Methods in Enzymology III", 73-105, S.P. Colowick et N.U. Kaplan Eds. est résumée ci-après.

35

A une solution contenant une concentration de β -1,3-glucanase choisie pour se situer dans une gamme de réponse

linéaire, on ajoute 50 µl d'une solution contenant 50 mg/ml de laminarine (β-1,3-glucane extrait de Laminaria digitata-Sigma-réf.L9634). Le volume du mélange réactionnel est ajusté à 500 µl à l'aide d'une solution tampon acétate de sodium 0,2 M, pH 5,0. Après
05 une heure d'incubation à 40°C, une partie aliquote de 200 µl est ajoutée à 200 µl de réactif de Somogyi (mélange de 25 ml de la solution aqueuse comprenant 2,5 % de Na₂CO₃, 2,5 % de KNaC₄H₄O₆, 4H₂O, 2 % de NaHCO₃, 20 % de Na₂SO₄ et de 1 ml de solution aqueuse contenant 15 % de CuSO₄, 5H₂O), puis portée à 100°C pendant 45 min.
10 Les tubes sont alors refroidis dans la glace avant d'ajouter 200 µl du réactif de Nelson (solution aqueuse de 5,5 % de molybdate d'ammonium, de 4,6 % d'acide sulfurique concentré et 12 % de Na₂SO₄, 7H₂O).

Le volume du mélange est ajusté à 5 ml avec de l'eau distillée et son absorbance est mesurée par spectrophotométrie à une
15 longueur d'onde de 500 nm.

La quantité de sucres réducteurs libérée est estimée par comparaison avec les valeurs d'absorbance obtenues avec une gamme étalon établie à l'aide d'une solution de glucose. L'activité enzymatique de la β-1,3-glucanase est exprimée en nanomoles d'équivalent
20 glucose libérées par minute, dans les conditions de l'essai enzymatique décrit ci-dessus.

25 2. Isolement et purification de trois formes de la β-1,3-glucanase recombinante :

a) Méthode

Les différentes formes de la protéine recombinante ont été isolées et purifiées à partir du centrifugat obtenu dans la
30 section 7 (fin du premier paragraphe). L'isolement et la purification comprennent des étapes d'extraction, de précipitation au sulfate d'ammonium, de chromatographie en phase liquide FPLC sur une colonne échangeuse de cations à base de polymère synthétique et de chromatographie d'exclusion (tamisage moléculaire) sur un agarose
35 réticulé, selon le protocole décrit ci-après :

ETAPE 1 :

Le culot bactérien est traité sous agitation à 4⁰C par une solution tampon pH 8 (Tris 30 mM, EDTA 1 mM). Après centrifugation (15 000 g, 30 min) le surnageant recueilli (lysate) constitue l'extrait brut.

ETAPE 2 :

L'extrait protéique est précipité par le sulfate d'ammonium (60 % de saturation). Les protéines ayant précipité sont recueillies par centrifugation (15 000 g pendant 30 min), solubilisées dans une solution tampon (acétate d'ammonium 100 mM, pH 5,2) et dialysées pendant une nuit à 4⁰C contre une solution tampon d'acétate d'ammonium 100 mM, pH 5,2.

Extemporément, la concentration de la solution tampon de l'extrait protéique est ramenée à 10 mM par passage sur des mini-colonnes prêtes à l'emploi (PD 10 Pharmacia).

ETAPE 3 :

L'extrait protéique est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne à base de polymère synthétique (colonne Mono-S de Pharmacia) selon la technique FPLC de Pharmacia.

L'extrait est déposé sur la colonne Mono-S équilibrée avec un tampon d'acétate d'ammonium 10 mM, pH 5,2. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un gradient linéaire de 10 à 500 mM d'acétate d'ammonium.

ETAPE 4 :

Les fractions contenant une activité β -1,3-glucanase sont concentrées par ultrafiltration sur une cartouche de concentration Centricon 10 (Amicron). La purification de la protéine est poursuivie par chromatographie (tamisage moléculaire) sur un agarose réticulé (colonne Superose 12 Pharmacia). L'éluion est réalisée par une solution tampon d'acétate d'ammonium 500 mM, pH 5,2.

A chaque étape, les différentes formes de la β -1,3-glucanase recombinante sont identifiées par leur poids moléculaire

(Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS -
révélation à l'argent), par leurs activités mesurées par la méthode
colorimétrique décrite précédemment et par leurs réactions posi-
tives avec les anticorps polyclonaux dirigés contre la β -1,3-
05 glucanase de tabac préparés dans la section 1.

b) Résultats

On isole et purifie ainsi trois formes de la protéine
recombinante présentant une activité β -1,3-glucanase de poids molé-
10 culaires apparents de 36 ± 3 , 37 ± 3 et 39 ± 3 kDa. (Le poids molé-
culaire de la protéine déduite de la séquence codante est de
37 387 Da.) Leurs activités spécifiques respectives mesurées sont
de 1,65, 1,75 et 1,76 nanomoles d'équivalent glucose libéré par
15 minute par microgramme de protéines, valeurs non différentes signi-
ficativement.

3. Détermination de la séquence amino-terminale des trois formes de la β -1,3-glucanase recombinante.

Le séquençage des extrémités amino-terminales des trois
20 formes de la β -1,3-glucanase recombinante a été réalisé. Les échan-
tillons à traiter sont portés à la surface d'un filtre PVDF
("polyvinylidenedifluoride" : difluorure de polyvinylidène) qui est
introduit dans un séquenceur de protéines (Modèle 470 A, commercia-
lisé par la Société Applied Biosystems E.U.A.) équipé d'un chroma-
25 tographe (Modèle 430 d'Applied Biosystems) qui analyse en continu
les dérivés phénylthiohydantoïques formés, après chaque cycle de
dégradation.

Les séquences amino-terminales respectives déterminées
sont représentées ci-après, le symbole X représentant un acide
30 aminé non déterminé :

Met Ile Gly Val X Tyr Gly Met Leu

Met Ile Gly Val X Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro

Met Ile Gly Val X Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro

Ces séquences correspondent à la séquence déduite de la partie codante du plasmide pBR59 (cf. figure 4). Il n'y a donc pas de maturation post-traductionnelle de la partie amino-terminale. Les différences observées de poids moléculaires pour une activité
05 spécifique voisine sont donc probablement le résultat d'une maturation carboxy-terminale post-traductionnelle. Celle-ci a lieu sur environ 27 acides aminés.

Section 9 : Construction d'un vecteur d'expression dans les
10 cellules végétales : Le vecteur binaire pBR60.

a) Préparation d'un gène recombinant complet de la β -1,3-glucanase de soja et clonage de celui-ci dans le vecteur binaire pBIN19.

L'ADN portant la séquence codante a été obtenu par coupe
15 pure du vecteur M13BR140, obtenu dans la section 6c) (cf. figure 3), à l'aide des enzymes de restriction BamHI et SacI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion. Cet ADN a été inséré entre une séquence promotrice comprenant le promoteur dit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (35S CaMV)
20 et une séquence terminatrice comprenant le terminateur de la nopaline synthase d'Agrobacterium tumefaciens.

b) Préparation de la séquence promotrice comprenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

25 A partir du plasmide pBI121 (Clontech) par coupure à l'aide des endonucléases HindIII et BamHI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment HindIII-BamHI d'environ 900 pb contenant le promoteur 35S est isolé. Ce fragment est recoupé par HindII. Le fragment d'environ 410 pb, portant le site BamHI, est traité par
30 l'ADN ligase T4 en présence d'un linker HindIII (séquence synthétique contenant un site HindIII). Après coupure par l'endonucléase HindIII et électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment HindIII-BamHI résultant (d'environ 420 pb) est isolé et purifié.

c) Préparation de la séquence terminatrice comprenant le terminateur de la nopaline synthase (NOS) d'Agrobacterium tumefaciens.

A partir du plasmide pBI121 (Clontech) par coupure à l'aide des enzymes de restriction SacI et EcoRI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, un fragment de 250 pb environ, renfermant le terminateur de la nopaline synthase, a été isolé.

On a ligué à l'aide de l'ADN ligase T4 la séquence promotrice, la séquence codante de l'ADN complémentaire de la β -1,3-glucanase et la séquence terminatrice dans le vecteur binaire pBIN19 ouvert à l'aide des endonucléases HindIII et EcoRI. Ce vecteur porte deux gènes de résistance à la kanamycine, l'un pouvant s'exprimer dans les bactéries, l'autre situé immédiatement en amont du gène recombinant complet (cf. Bevan, 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721) pouvant être transféré aux cellules végétales. Le gène de résistance à la kanamycine servira de marqueur de sélection au cours des étapes de transformation et d'analyse de la descendance des plantes transformées.

Le vecteur obtenu est appelé plasmide pBR60. La séquence nucléotidique du gène recombinant complet, vérifiée par séquençage, ainsi que la séquence peptidique déduite sont représentées sur la figure 5. Le plasmide est cloné dans la souche E. coli MC1061 (Clontech).

Section 10 : Transfert dans Agrobacterium tumefaciens du plasmide pBR60 contenant le gène recombinant de β -1,3-glucanase

a) Transfert dans Agrobacterium tumefaciens.

Ce transfert est réalisé comme décrit ci-après par conjugaison triparentale entre la souche E. coli MC1061 contenant le vecteur pBR60 et la souche Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Clontech) à l'aide de la souche E. coli HB101 contenant le plasmide mobilisateur pRK2013 (D.M. Figurski et al., 1979, Pro. Ntl. Ac. Sci. USA, 76, 1648-1652).

La souche E. coli MC1061 contenant le plasmide pBR60 et une souche E. coli HB101 (Clontech) contenant le plasmide mobilisa-

teur pRK2013 sont cultivées à 37°C dans du milieu Luria (Gibco) en présence de 25 mg/l de kanamycine.

05 La souche Agrobacterium tumefaciens LBA4404 est cultivée à 28°C dans du milieu Luria (Gibco) en présence de 100 mg/l de rifampicine (elle est résistante à cet antibiotique) ; 200 µl de chacune des trois cultures sont mélangés, étalés sur du milieu Luria gélosé (Gibco) et incubés toute la nuit à 28°C. Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans 5 ml de milieu Luria et des parties aliquotes sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum gélosé (décrit dans "Plant Molecular Biology Manual" 10 Gelvin et al., Kluwer Academic Press, 1988) en présence de 100 mg/l de rifampicine et 25 mg/l de kanamycine. Dans ces conditions, seules poussent les colonies d'Agrobacterium tumefaciens ayant intégré le plasmide pBR60 (les souches d'E. coli ne peuvent pas 15 pousser dans ces conditions). Celles-ci contiennent le gène recombinant de β-1,3-glucanase dans un contexte permettant sa réplication.

La résistance aux deux antibiotiques des colonies sélectionnées est vérifiée en repiquant celles-ci sur le même milieu de 20 sélection deux fois de suite. La présence du gène recombinant de β-1,3-glucanase dans Agrobacterium tumefaciens est vérifiée par la méthode de Southern Blot sur une préparation d'ADN total (Lyse des cellules, purification de l'ADN par extraction à l'aide du mélange phénol/chloroforme, selon le protocole décrit par Gelvin dans 25 l'ouvrage cité ci-dessus, coupure de l'ADN purifié à l'aide d'enzymes de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose, transfert sur membrane et hybridation selon les techniques bien connues de l'homme de l'art).

30 b) Transfert dans Agrobacterium rhizogenes

Ce transfert est réalisé de la même façon que le transfert dans Agrobacterium tumefaciens décrit en a), avec la souche Acrobacterium rhizogenes A4 décrite par GUERCHE et al., (1987) Mol. gen. genet. 206, 382.

Section 11 : Obtention de plantes de tabac transformées

Le tabac Nicotiana tabacum cultivé in vitro a été infecté par Agrobacterium tumefaciens contenant le plasmide pBR60 selon la procédure de Horsch et al., bien connue de l'homme du métier (Horsch R.B. et al., 1985, Science 227, 1229-1231), dont les principales étapes sont exposées ci-après.

Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac N. tabacum (variété Wisconsin Havana 38 sensible aux champignons pathogènes) sont incubés dans une culture d'A. tumefaciens hébergeant le plasmide pBR60. Les disques égouttés sur papier Whatman ont été transférés sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des cals, puis produire des bourgeons en présence de céfotaxime (500 µg/ml) destinée à éliminer Agrobacterium tumefaciens et de kanamycine (100 µg/ml).

Les bourgeons résistants à la kanamycine ont été ensuite transférés sur un milieu permettant l'induction des racines en présence de céfotaxime et de kanamycine. Les plantules sont ensuite repiquées en terrines dans un substrat composé de tourbe et de terreau et mises à croître en serre. Toutes les plantes transformées (génération R0) ayant survécu aux étapes de régénération et d'acclimatation en serre se sont révélées morphologiquement normales et fertiles. Elles ont été autofécondées et ont donné des graines (génération R1).

25

Section 12 : Analyse de l'ADN génomique des plantes de tabac transformées (génération R0) selon la technique de Southern Blot.

L'ADN génomique de haut poids moléculaire a été isolé à partir de feuilles matures de plantes transgéniques de la génération R0 selon la méthode d'extraction à l'aide de bromure de cetyltriméthylammonium et de purification par précipitation, décrite dans l'ouvrage "Plant Molecular Biology Manual" déjà cité.

10 µg de cet ADN génomique ont été digérés pendant une nuit à 37°C avec 20 unités des enzymes de restriction HindIII et EcoRI. Les fragments de restriction obtenus ont été séparés par

électrophorèse sur gel d'agarose (1 %). L'ADN a été transféré selon la méthode de Southern Blot sur un filtre de Nylon (Hybond N⁺ Amersham), et hybridé avec une sonde nucléotidique comprenant une partie de la séquence du gène recombinant, marqué par couplage à la peroxydase (kit ECL, Amersham). Les membranes sont ensuite lavées et révélées selon le protocole recommandé par Amersham.

L'analyse des films permet de tirer les conclusions suivantes :

- certaines plantes ne possèdent pas de copies du gène recombinant transféré (absence de signal),
- la plupart des plantes testées contiennent au moins une copie sans réarrangement de la construction : promoteur 35S CaMV - séquence codante de l'ADN complémentaire de β -1,3-glucanase - terminateur NOS,
- certains profils suggèrent qu'il existe des réarrangements internes dans la construction, mais ces événements sont rares.

Section 13 : Mise en évidence de l'expression de la β -1,3-glucanase de soja dans les plantes de tabac transformées (de la génération R0).

a) Préparation des extraits bruts de protéines de plantes de tabac transformées (génération R0).

Les extraits bruts de protéines ont été préparés à partir de différents tissus de la plante (racine, tige, feuille, etc.). Les fragments de tissus ont été congelés dans l'azote liquide, réduits en poudre et stockés à -20°C. La poudre a été extraite à 4°C en présence d'un tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 5,2 et soumise à une centrifugation à 10 000 g. La concentration des protéines totales a été déterminée sur les surnageants, appelés ci-après les extraits bruts de protéines, en suivant la technique de Bradford (Bradford, M.M., 1976, Anal. Biochem., 72, 248-254).

b) Mise en évidence par immuno-empreinte (Western Blot).

On soumet les extraits bruts de protéines de différentes plantes transformées et des plantes non transformées (témoins) à un

Western Blot, technique bien connue de l'homme de l'art et décrite notamment par H. Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1972, 4350-4354, qui comprend les étapes suivantes :

- 05 - dénaturation par chauffage à 100°C pendant 10 min dans un tampon, dénommé tampon de charge constitué de Tris HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %, β -mercaptoéthanol 10 % (selon le protocole décrit par Laemmli, U.K. Laemmli Nature, 227, 1970, 680-685) ;
- 10 - séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisé selon le protocole décrit par Laemmli (réf. ci-dessus) ;
- électrotransfert desdites protéines contenues dans le gel sur une membrane en PVDF (selon la technique de H. Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1979, 4350-4354).

15

L'immunodétection est réalisée selon un protocole qui comprend les étapes suivantes :

- 20 - saturation de la membrane PVDF sur laquelle les protéines ont été transférées par incubation pendant au minimum 2 heures à 37°C dans une solution de gélatine à 3 %,
- 3 lavages dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % du détergent Tween 20,
- incubation (pendant 1 heure à 37°C) en présence de l'immunsérum préparé précédemment (contenant les anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine recombinante) dilué au 1/10 000 dans du tampon phosphate salin,
- 25 - 3 lavages dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % du détergent Tween 20.

30

Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'Amersham ("Blotting detection kit"), utilisé selon les indications du fabricant.

35

L'empreinte obtenue montre la présence d'une protéine d'environ 37 ± 3 kDa pour les plantes transformées, absente des plantes témoins (la protéine déduite de la séquence de l'ADNc,

clivée de son peptide signal supposé pour une expression dans les cellules eucaryotes, a un poids moléculaire de 38 156 Da).

L'analyse selon la technique de Western Blot a été effectuée sur 30 plantes transformées (répondant positivement au Southern Blot). 28 plantes ont montré une expression de la β -1,3-glucanase recombinante en Western Blot.

c) Comparaison des migrations électrophorétiques des β -1,3-glucanases de soja (protéines recombinantes et protéine naturelle).

Le poids moléculaire apparent obtenu pour la protéine recombinante exprimée dans les plantes de tabac transformées a été comparé à celui obtenu pour la protéine naturelle présente dans un extrait de cellules de soja (cf. section 1) et la β -1,3-glucanase naturelle de tabac présente dans un extrait de cellules de tabac (cf. section 1), par migration électrophorétique sur des pistes parallèles selon le protocole décrit par Laemmli (UK. Laemmli, Nature 227, 1970, 680-685). Les tailles de ces protéines ont été comparées à celles de protéines de masses moléculaires connues (marqueurs de poids moléculaires compris entre 14 000 et 97 400 Da de Bio-Rad- réf. 61-0304).

Les empreintes obtenues après Western Blot montrent que la β -1,3-glucanase de soja synthétisée dans le tabac présente le même poids moléculaire apparent que celui de la protéine naturelle de soja : 37 ± 3 kDa. La maturation post-traductionnelle de cette protéine est donc effectuée de la même façon dans un autre végétal que le soja. Ce poids moléculaire apparent de la β -1,3-glucanase de soja est supérieur d'environ 3 kDa à celui de la β -1,3-glucanase de tabac dont le poids moléculaire est de 34 969 Da. (H. Shinshi et al., 1988, Proc. Natl. Aca. Sci. USA, 85, 5541-5545). Le poids moléculaire de la β -1,3-glucanase de soja est donc voisin de 38 kDa, ce qui est très proche du poids moléculaire prévu dans la section 5 pour la protéine mature de 338 acides aminés prévu dans la section 5, lequel est de 38 156 Da.

Section 14 : Mesure de la résistance aux champignons pathogènes de plantes de tabac transformées (génération R1)

Les tabacs régénérés (génération R0) en présence de kanamycine ont été autopollinisés. Les graines matures (génération R1) sont semées sur milieu de Murashige et Skoog complété de 100 µg/ml de kanamycine.

Les plantules de la génération R1 résistantes à la kanamycine issues des 13 plantes transformées choisies, d'une plante Nicotiana tabacum var. Wisconsin Havana 38 sensible au champignon Chalara elegans (également appelé Thielaviopsis basicola), abrégée W38, ont été transférées en serre pour évaluation de leur résistance à ce champignon. Ce dernier a été choisi car il est représentatif des champignons pathogènes du tabac possédant des β-1,3-glucanes dans leur paroi. L'étude a porté sur des effectifs de plantules variant de 16 à 25 selon les descendances des plantes transformées. Le protocole choisi dans cette étude est décrit ci-après :

Les plantules sont cultivées en godets (3 x 3 cm). A l'apparition de la 5ème feuille, les plantes sont inoculées en déposant au niveau du collet une suspension de 5×10^5 endoconidies de ce champignon.

Les endoconidies sont prélevées sur des cultures mycéliennes de ce champignon entretenues sur le milieu "potato dextrose agar" (Difco) à 22°C et à l'obscurité. On évalue la résistance à Chalara elegans 45 jours après l'inoculation.

Les plantes sont notées selon les symptômes d'infection et selon leur niveau de développement végétatif.

Deux notations sont effectuées :

- Mesure du poids (en grammes) de l'appareil aérien des plantes
- Mesure d'un indice de résistance tenant compte de l'impact de la maladie sur l'ensemble de la plante.

Les classes sont définies selon les critères suivants :

- Note 0 : plante morte
- Note 1 : bourgeon terminal encore vert, système racinaire détruit
- Note 2 : développement des plantes ne dépassant pas 25 % de celui du témoin, système racinaire entièrement nécrosé

Note 3 : développement des plantes atteignant 50 % du développement du témoin, système racinaire présentant des parties saines

Note 4 : développement des plantes identiques au témoin.

L'indice de résistance de la descendance d'une plante transformée représente la moyenne des notes effectuées sur les plantules issues de cette plante.

Le tableau ci-après rassemble les principaux résultats obtenus :

TABLEAU 1

Mesure de la résistance aux champignons pathogènes de descendance de plantes de tabac transformées.

	Effectif testé	Indice de résistance	Poids de l'appareil aérien	
15	Plantes transformées			
	N° 5	24	1	0,22
	N° 10	23	0,87	0,22
	N° 17	21	1,04	0,29
	N° 20	17	1,41	0,50
20	N° 22	23	1	0,35
	N° 29	19	1,1	0,46
	N° 30	16	0,5	0,14
	N° 37	20	0,25	0,46
	N° 43	25	0,56	0,075
25	N° 45	23	0,30	0,65
	N° 49	21	0,19	0,72
	N° 55	22	0,09	0,05
	N° 59	25	0,48	0,14
30	Plantes témoins			
	W38	25	0,12	0,06

W38 : Plante Nicotiana tabacum var. Wisconsin havana 38 non transformée

On constate à la lecture du tableau ci-dessus que 12/13 des descendances de plantes de tabac transformées ont un indice de résistance et un poids de l'appareil aérien supérieurs à ceux de la descendance de la plante non transformée W38.

05 La transformation du tabac avec l'ADN recombinant de l'invention confère donc à sa descendance une résistance accrue aux champignons pathogènes.

10 Section 15 : Purification de la β -1,3-glucanase recombinante des feuilles de tabac transformées (génération R1) et détermination de sa séquence aminotermale

1) Purification de la β -1,3-glucanase recombinante

15 La protéine recombinante a été purifiée à partir des extraits bruts de protéines de feuilles de tabac transformées, par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie en phase liquide FPLC sur une colonne échangeuse de cations à base de polymère synthétique sur un agarose réticulé, selon le protocole décrit ci-après :

20

Protocole de purification de la β -1,3-glucanase recombinante

Etape 1 :

25 L'extrait protéique est précipité par le sulfate d'ammonium (60 % de saturation). Les protéines ayant précipité sont récupérées par centrifugation (15 000 g pendant 30 min), solubilisées dans une solution tampon (acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2) et dialysées une nuit à 4°C contre une solution tampon d'acétate d'ammonium 100 mM pH 5,2.

30

Extemporément, la concentration de la solution tampon de l'extrait protéique est ramenée à 10 mM par passage sur des mini-colonnes prêtes à l'emploi (PD10. Pharmacia).

Etape 2 :

35 L'extrait protéique est ensuite purifié par chromatographie d'échange d'ions à base de polymère synthétique (colonne

Mono-S Pharmacia) à l'aide d'une technique FPLC (Pharmacia).

L'extrait est déposé sur la colonne Mono-S équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 10 mM pH 5,2. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un gradient linéaire de 10
5 a 500 mM d'acétate d'ammonium.

A chaque étape, la β -1,3-glucanase de soja est identifiée par son poids moléculaire (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS-révélation à l'argent), par son immuno-empreinte (cf. section 13b)) et son activité, mesurée par la méthode colorimétrique décrite dans la section 8.1).
10

2) Essai de détermination de la séquence aminotermine de la β -1,3-glucanase recombinante

Après purification de la β -1,3-glucanase recombinante selon le protocole décrit ci-dessus, le séquençage de l'extrémité aminotermine a été réalisé. Les échantillons à traiter sont portés à la surface d'un filtre PVDF (polyvinylidenedifluoride) par électrotransfert selon la méthode décrite par H. TOWBIN et al. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA (1979), 4350-4354, après électrophorèse
20 sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le filtre est introduit dans un séquenceur de protéines (modèle 470 A commercialisé par la société Applied Biosystems (E.U.A.)) équipé d'un chromatographe (modèle 430 d'Applied Biosystems) qui analyse en continu les dérivés phénylthiohydantoïques formés, après chaque
25 cycle de dégradation.

Aucune séquence aminotermine n'a pu être déterminée, malgré le bon fonctionnement du séquenceur, vérifié par la détermination de la séquence aminotermine d'une protéine témoin : la lactoglobuline.

Il est donc probable que la séquence aminotermine de la
30 β -1,3-glucanase recombinante commence par un Gln, comme prévu par comparaison avec les séquences aminotermine de dicotylédones déjà
35 déterminées (voir Section 5).

Il a en effet déjà été démontré que le Gln aminoterminal était bloqué pour une autre β -1,3-glucanase de soja (TAKEUCHI et al., 1990, Plant Physiol. 93, 673-682).

05 Section 16 : Obtention de plantes de colza transformées.

La transformation est réalisée selon le protocole de P. Guerche et al. (P. Guerche et al., 1987, Mol. Gen. Genet., 206, 382). Les différents milieux de culture sont ceux décrits par Pelletier et al. (Pelletier et al., 1983, Mol. Gen. Genet., 191, 10 244). Leur composition sera explicitée par la suite (tableau 1).

a) Obtention de racines transformées.

Des segments de tige sont prélevés sur l'extrémité apicale de plantes de colza (Brassica napus : variétés de printemps Brutor et Westar et variété d'hiver) de 1 m de haut environ. Ces 15 segments sont stérilisés en surface, rincés dans de l'eau stérile, découpés en segments de 1,5 cm de long environ et placés dans un tube contenant le milieu A.

L'inoculation de l'extrémité de ce segment est effectuée 20 par dépôt d'une suspension de la souche d'Agrobacterium rhizogenes contenant le plasmide pBR60.

Des racines transformées apparaissent sur le segment de tige au bout de 1 à 2 semaines, elles sont prélevées et placées sur le milieu B gélosé (15 g/l) et complété par 500 μ g de 25 céfotaxime/ml.

b) Régénération de plantes transformées.

Des fragments de racines sont incubés pendant 15 jours sur le milieu D contenant 3 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxy- 30 acétique, puis placés sur le milieu RCC d'induction de bourgeons. Des plantes racinées sont ensuite obtenues par passage des bourgeons sur les milieux F et G.

TABLEAU 2

Composition des différents milieux utilisés pour l'obtention de plantes de colza transformées.

Composition (mg/l)	A	B	RCC	F	G
NH_4NO_3	1 650		1 650	1 650	825
KNO_3	1 900	2 500	1 900	1 900	950
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		134			
NaH_2PO_4		150			
KH_2PO_4	170		170	170	85
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	750	440	440	220
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	370	370	165
H_3BO_3	12,4	3	12,4	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	33,6	10	33,6	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21	2	21	8,6	8,6
KI	1,66	0,75	1,66	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,025	0,05	0,25	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,025	0,05	0,25	0,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,24	27,8	27,8	27,8	22,24

TABLEAU 2 (suite 1)

Composition (mg/l)	A	B	RCC	F	G
Na ₂ EDTA	29,84	37,3	37,3	37,3	29,84
Inositol	100	100	100	100	100
Acide nicotinique	0,5	1	0,5	1	0,5
Pyridoxine HCL	0,5	1	0,5	1	0,5
Thiamine	2	10		10	
Glicine			2		2
Glucose	10 000	20 000			10 000
Saccharose	10 000		10 000	10 000	
D-mannitol		70 000	10 000		
N.A.A.		1	1	0,1	0,1
B.A.		1	0,5	0,5	
2,4D		0,25			
Adénine sulfate			0,5		
I.P.A.			0,02		
GA3					
Tween 80		10			

TABLEAU 2 (suite 2)

Composition (mg/l)	Milieu	A	B	RCC	F	G
Agar		8000		8000	8000	8000
pH		5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Gentamicine (sulfate)		10				

- NAA - acide naphthalène acétique
- BA - benzyl-6-aminopurine
- 2,4D - acide dichloro-2,4-phénoxyacétique
- IPA - N⁶-(2-iso-pentényl) adénine
- GA₃ - acide gibbérellique
- EDTA - acide éthylènediaminetétraacétique.

Section 17 : Mise en évidence de l'expression de la β -1,3-glucanase de soja dans les plantes de colza transformées.

05 a) préparation des extraits bruts de protéines de plantes de colza transformées (génération R0)

Les extraits bruts de protéines ont été préparés à partir de feuilles de la plante. Ces extraits ont été congelés dans l'azote liquide, réduits en poudre et stockés à -20°C . La poudre a été extraite à 4°C en présence d'un tampon acétate d'ammonium 10 0,1 M, pH 5,2 et soumise à une centrifugation de 10 000 g. La concentration des protéines totales a été déterminée sur les surnageants, appelés ci-après les extraits bruts de protéines, en suivant la technique de Bradford (Bradford, M.M., 1976, Anal. Biochem., 72, 248-254).

15

b) Mise en évidence par immuno-empreintes (Western Blot)

On soumet les extraits bruts de protéines de différentes plantes transformées et des plantes non transformées (témoins) à un Western Blot, technique bien connue de l'homme de l'art et décrite 20 précédemment.

Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'Amersham ("Blotting detection kit"), utilisé selon les indications du fabricant.

25

L'empreinte obtenue montre la présence d'une protéine d'environ 37 ± 3 kDa pour les plantes transformées, absente des plantes témoins.

L'analyse selon la technique de Western Blot a été effectuée sur 50 plantes transformées (répondant positivement au Southern Blot). 38 plantes ont montré une expression de la β -1,3- 30 glucanase recombinante en Western Blot.

35

REVENDEICATIONS

1. ADN recombinant, caractérisé en ce qu'il code pour une protéine à activité β -1,3-glucanase ou pour un précurseur de cette dernière qui comprend la séquence (a_1) suivante :

05 Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Asn Asp
 Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg Leu Tyr Asp
 Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly Ile Glu Leu Ile
 Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala Thr Asn Pro Asp Thr
 10 Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn Phe Trp Pro Ser Val Lys
 Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser
 Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala Ile Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile
 Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln Ile Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met
 Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp
 15 Val Arg Ser Tyr Leu Asp Pro Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala
 Pro Leu Leu Val Asn Val Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg
 Asp Ile Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp
 Asp Gly Gln Tyr Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val
 His Ala Ala Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser
 20 Glu Ser Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala
 Arg Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro Arg
 Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn
 Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro Asn Lys
 25 Gln Lys Lys
 ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la
 séquence (a_1).

2. ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend immédiatement en aval de la séquence nucléotidique codant pour la séquence d'acides aminés (a_1) la séquence
 30 nucléotidique codant pour la séquence d'acides aminés (a_4)
 ci-après :

Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu Gly Lys Val Val Ile
 Asp Asp Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser Asp Val

35

tronquée dans sa partie carboxy-terminale de 0 à 27 acides aminés.

3. ADN recombinant selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comporte, immédiatement en amont de la séquence nucléotidique codant pour la séquence d'acides aminés (a₁), un codon pour Gln.

05 4. ADN recombinant selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il code pour une protéine à activité β -1,3-glucanase ou pour un précurseur de cette protéine qui comprend la séquence (a₅) suivante :

10 Gln
 Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Asn Asp
 Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg Leu Tyr Asp
 Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly Ile Glu Leu Ile
 Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala Thr Asn Pro Asp Thr
 15 Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn Phe Trp Pro Ser Val Lys
 Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser
 Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala Ile Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile
 Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln Ile Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met
 Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp
 20 Val Arg Ser Tyr Leu Asp Pro Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala
 Pro Leu Leu Val Asn Val Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg
 Asp Ile Ser Leu Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp
 Asp Gly Gln Tyr Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val
 His Ala Ala Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser
 25 Glu Ser Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala
 Arg Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro Arg
 Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu Asn
 Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro Asn Lys
 Gln Lys Lys Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu Gly Lys Val Val
 30 Ile Asp Asp Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser Asp Val

5. ADN recombinant selon l'une des revendications 3 à 4, caractérisé en ce qu'il comporte, en amont du codon pour Gln précédant la séquence nucléotidique codant pour la séquence d'acides aminés (a₁), une séquence signal.

35

6. ADN recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que la séquence signal est une séquence codant pour le peptide signal de séquence (a_2) suivante :

05 Met Pro Ser Leu Phe Ala Arg Asn Gln Arg Phe Ser Leu Ala Thr Leu Leu
Leu Leu Leu Glu Leu Leu Thr Gly Asn Leu Arg Met Ala Asp Ala

7. ADN recombinant selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour la
10 séquence d'acides aminés (a_1) est la séquence (Na_1) suivante :

ATTGGTGTGT GTTATGGCAT GCTGGGCAAC AATCTACCGT CAGCAAACGA TGTTATAGGT
CTTTATAGAT CAAATAACAT AAAGAGAATG AACTCTATG ATCCTAATCA AGCTGCTCTA
GAAGCACTTA GAAATTCTGG CATTGAACTC ATTCTTGGGG TGCCAAACTC TGACCTTCAA
15 GGCCTTGCCA CCAATCCTGA CACTTCTCGT CAATGGGTGC AAAAAACGT GTTGAACHTT
TGGCCTAGTG TCAAAATCAA GTACGTGGCA GTTGGAAATG AAGTGAGTCC CGTTGGAGGC
TCTTCTTCGG TAGCCCAATA TGTTCTACCT GCCATCCAAA ATGTATACCA AGCAATAAGA
GCTCAAGGCC TTCATGATCA AATCAAGGT TCAACATCTA TTGACATGAC CCTAATAGGA
AACTCTTTCC CTCCATCGCA AGGTTCTTTC AGGGGTGATG TGAGATCATA CCTAGATCCC
20 ATAATTGGGT ACTTGGTATA TGCAAATGCA CCATTACTAG TCAATGTGTA CCCTTATTTT
AGTTACACTG GTAACCCCGG TGACATATCA CTTCCCTATG CTCTTTTTCAC AGCACCAAT
GTTGTGGTAT GGGATGGTCA ATATGGGTAC CAAAATTTGT TTGATGCTAT GTTGGATTCA
GTACATGCAG CCATTGATAA CACTAAGATT GGTTATGTGG AGGTTGTTGT ATCCGAGAGT
GGGTGGCCAT CAGATGGAGG ATTTGCTGCC ACTTATGACA ACGCACGCGT GACTTAGAC
25 AATTTGGTTC GTCGTGCTAA TAGAGGAAGC CCAAGAAGGC CTTCGAAGCC CACTGAGACT
TATATATTTG CCATGTTTGA TGAATCAA AAAAAATCCAG AGATAGAGAA ACATTTTGGG
CTCTTCAATC CCAACAAACA AAAAAAA

8. ADN recombinant selon la revendication 6, caractérisé
30 en ce que la séquence nucléotidique codant pour la séquence
d'acides aminés (a_2) est la séquence (Na_2) suivante :

ATGCCTTCTC TCTTCGCTAG AAACCAGAGG TTCTCATTGG CTA CTCTCTCT GCTTCTTCTG
GAACTATTGA CAGGAAACCT TCGCATGGCA GATGCT

9. ADN recombinant selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour la séquence d'acides aminés (a_4) est la séquence (Na_4) suivante :

05 TACC CATTGGGTT TGGAGGAAAG AGGCTAGGGA AAGTTGTTAT TGACGACTTC
AATGCAACAA CTTCCATTAAGAGTGATGTG

10 10. Bactérie caractérisée en ce qu'elle contient, avec les moyens nécessaires à sa réplication et son expression, l'ADN recombinant selon l'une des revendications 1 à 2.

11. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un ADN recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, avec les moyens nécessaires à son expression.

15 12. Cellule végétale selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

13. Plante ou partie de plante, caractérisée en ce qu'elle contient un ADN recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, avec les moyens nécessaires à son expression.

20 14. Plante ou partie de plante selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle appartient à l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

25 15. Partie de plante selon l'une des revendications 13 et 14, caractérisée en ce qu'elle est apte à former une nouvelle plante complète ou à produire des semences.

16. Partie de plante selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'elle est une semence.

17. Protéine à activité β -1,3-glucanase, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence (a_1).

30 18. Protéine selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comporte immédiatement en aval de la séquence (a_1) la séquence d'acides aminés (a_4) tronquée dans sa partie carboxy-terminale de 0 à 27 acides aminés.

35 19. Protéine à activité β -1,3-glucanase, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence (a_5).

20. Protéine selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce qu'elle présente une masse moléculaire apparente de 36 ± 3 kDa.

05 21. Protéine selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce qu'elle présente une masse moléculaire apparente de 37 ± 3 kDa.

22. Protéine selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisée en ce qu'elle présente une masse moléculaire apparente de 39 ± 3 kDa.

10 23. Procédé pour préparer la protéine selon l'une des revendications 17 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture de bactéries, de cellules végétales, de cals végétaux, de plantes, ou de parties de plantes contenant, avec les moyens nécessaires à son expression, un ADN recombinant selon l'une des revendications 1 à 9, la lyse de ceux-ci, l'isolement et la purification de cette protéine.

15



100 pb

FIG. 1

370
 CTCATTCTGGGGTCCAAACTCTGACCTTCAAGGCCTTGCCACCAATCCTGACACTTCT
 390
 LeuIleLeuGlyValProAsnSerAspLeuGlnGlyLeuAlaThrAsnProAspThrSer
 410
 CGTCAATGGGTGCAAAAACGTTGAACTTTGGCCTAGTGTCAAAATCAAGTACGTG
 430
 ArgGlnTrpValGlnLysAsnValLeuAsnPheTrpProSerValLysIleLysTyrrVal
 450
 GCAGTTGGAAATGAAGTGAGTCCCGTTGGAGGCTCTTCTTCGGTAGCCCCAAATATGTTCTA
 470
 AlaValGlyAsnGluValSerProValGlyGlySerSerValAlaGlnTyrrValLeu
 490
 510
 530
 550
 CCTGCCATCCAAAATGTATACCAAGCAATAAGAGCTCAAGGCCTTCATGATCAAATCAAG
 570
 ProAlaIleGlnAsnValTyrrGlnAlaIleArgAlaGlnGlyLeuHisAspGlnIleLys
 590
 SacI
 610
 GTTCAACATCTATTGACATGACCCCTAATAGGAAACTCTTCCCTCCATCGCAAGGTTCC
 630
 ValSerThrSerIleAspMetThrLeuIleGlyAsnSerPheProProSerGlnGlySer
 650
 670
 TTCAGGGGTGATGTGAGATCATACCTAGATCCCATAAATTGGGTAATGCAAAAT
 690
 PheArgGlyAspValArgSerTyrrLeuAspProIleIleGlyTyrrLeuValTyrrAlaAsn
 710

3/21

FIG. 2 (SUITE)

730	750	770
GCACCA	TACTAGTCAATGTGTACCCCTTATT	TTAGTTACACTGGTAACCCCGTGACATA
AlaPro	LeuValAsnValTyrProTyrPheSerTyr	ThrGlyAsnProArgAspIle
790	810	830
TCACTTCCCTATGCTCTTTTCACAGCACCA	AAATGTTGTGGTATGGGATGTC	AATATGGG
SerLeu	ProTyrAlaLeuPheThrAlaProAsnVal	ValValTyrPaspGlyGlnTyrGly
850	870	890
TACCAA	AAATTTGTTGATGCTATGTTGGATT	CAGTACATGCAGCCATTGATAACACTAAG
TyrGln	AsnLeuPheAspAlaMetLeuAspSerVal	HisAlaAlaIleAspAsnThrLys
910	930	950
ATTGGT	TATGTGGAGGTTGTTGTATCCGAGAGT	GGTGGCCATCAGATGGAGGATTGCT
IleGly	TyrValGluValValValSerGluSerGly	TrpProSerAspGlyGlyPheAla
970	990	1010
GCCACT	TATGACAACGCACCGGTGACTTAGACA	AATTTGGTTCCGTCCTAATAGAGGA
AlaThr	TyrAspAsnAlaArgValTyrLeuAspAsn	LeuValArgAlaAsnArgGly
1030	1050	1070
AGCCCA	AAGAAGCCTTCGAAGCCCACTGAGACT	TATATATTGCCCATGTTCCGATGAAAAT
SerPro	ArgArgProSerLysProThrGluThrTyr	IlePheAlaMetPheAspGluAsn

FIG. 2 (SUITE)

NdeI 10 30 50
 CATATGATTGGTGTGTTATGGCATGCTGGCAACAATCTACCGTCAGCAACGATGTT
 MetIleGlyValCysTyrglyMetLeuGlyAsnAsnLeuProSerAlaAsnAspVal
 70 90 110
 ATAGGTCTTTATAGATCAAAATAACATAAAGAGAAATGAGACTCTATGATCCTAATCAAGCT
 IleGlyLeuTyrArgSerAsnAsnIleLysArgMetArgLeuTyrAspProAsnGlnAla
 130 150 170
 GCTCTAGAAGCACTTAGAAATCTGGCAATTGAACTCAATTCTTGGGGTGCCAAACTCTGAC
 AlaLeuGluAlaLeuArgAsnSerGlyIleGluLeuIleLeuGlyValProAsnSerAsp
 190 210 230
 CTTCAAGGCCTTGCCACCAATCCTGACACTTCTCGTCAATGGGTGCAAAAACCGTGTG
 LeuGlnGlyLeuAlaThrAsnProAspThrSerArgGlnTrpValGlnLysAsnValLeu
 250 270 290
 AACTTTGGCCCTAGTGTCAAAATCAAGTACGTGGCAGTTGGAATGAAGTGAGTCCCCTT
 AsnPheTrpProSerValLysIleLysTyrValAlaValGlyAsnGluValSerProVal
 310 330 350
 GGAGGCTCTTTCGGTAGCCCAAATATGTTCTACCTGCCATCCAAAATGTATACCAAGCA
 GlyGlySerSerValAlaGlnTyrValLeuProAlaIleGlnAsnValTyrglnAla

10/ 21

FIG. 4 (A SUIVRE)

730 750 770
 GAGAGTGGGTCATCAGATGGAGGATTTGCTGCCACTTATGACAAACGACGCGGTGAC
 GluSerGlyTrpProSerAspGlyGlyPheAlaAlaThrTyraSpAsnAlaArgValTyr

790 810 830
 TTAGACAATTTGGTTCGTCTGCTAATAGAGGAGCCCAAGAGCCCTTCGAAGCCCACT
 LeuAspAsnLeuValArgArgAlaAsnArgGlySerProArgArgProSerLysProThr

850 870 890
 GAGACTTATATTTGCCATGTTCCGATGAAAATCAAAAAATCCAGAGATAGAGAAACAT
 GluThrTyrIlePheAlaMetPheAspGluAsnGlnLysAsnProGluIleGluLysHis

910 930 950
 TTTGGGCTCTCAATCCCAACAACAAAAATAACCCATTTGGGTTTGGAGGAAAGAGG
 PheGlyLeuPheAsnProAsnLysGlnLysLysTyrProPheGlyPheGlyLysArg

970 990 1010
 CTAGGAAAGTTGTTATTGACGACTTCAATGCAACAACCTCCATTAAGAGTGTGTAA
 LeuGlyLvsValValIleAspAspPheAsnAlaThrThrSerIleLysSerAspValEnd

1030 HindIII
 GGTGAGCTCCTAAGCTT

12/21

FIG. 4 (FIN)

HindIII 10 30 50
 .AAGCTTGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAATAATCAAGAATACAGTCCCTCAGAAGAC
 70 90 110
 CAAAGGCCCAATTGAGACTTTTCAACAAGGGTAATAATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCA
 130 150 170
 TTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAGGAAAGGTGGCTCCTACAA
 190 210 230
 ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCCATCGTTGAAGATGCCCTCTGCCCGACAGTGGTCC
 250 270 290
 CAAAGATGGACCCCAACGAGGAGCATCGTGGAAGGAAAGGACGTTCCCAACCACGTC
 310 330 350
 TTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACCGTAAGGGATGACCGCACAAATCCCA
 370 390 410
 CTATCCTTCGCAAGACCCTTCCCTCTATAAAGGAAGTTCAATTTCATTGGAGAGAACACG

13/21

FIG. 5 (A SUIVRE)

430 BamHI 450 470
 GGGACTCTAGAGGATCCATGCCCTTCTCTTCGCTAGAAACCAGAGGTTCTCATTTGGCT
 MetProSerLeuPheAlaArgAsnGlnArgPheSerLeuAla
 490 510 530
 ACTCTCCTGCTTCTTCTGGAACTATTGACAGGAAACCTTCGCATGGCAGATGCTCAAATT
 ThrLeuLeuLeuLeuGluLeuLeuThrGlyAsnLeuArgMetAlaAspAlaGlnIle
 550 570 590
 GGTGTGTTATGGCATGCTGGGCAACAATCTACCGTCAGCAAACGATGTTATAGGTCTT
 GlyValCysTyrGlyMetLeuGlyAsnAsnLeuProSerAlaAsnAspValIleGlyLeu
 610 630 650
 TATAGTCAAATAACATAAAGAGAAATGAGACTCTATGATCCTAATCAAGCTGCTTAGAA
 TyrArgSerAsnAsnIleLysArgMetArgLeuTyrAspProAsnGlnAlaAlaLeuGlu
 670 690 710
 GCACTAGAAATTCTGGCATTGAACTCATTTCTTGGGGTCCCAAACCTCTGACCTTCAAGGC
 AlaLeuArgAsnSerGlyIleGluLeuIleLeuGlyValProAsnSerAspLeuGlnGly
 730 750 770
 CTTGCCACCAATCCTGACACTTCTCGTCAATGGGTGCAAAAACCGTGTGAACCTTTTGG
 LeuAlaThrAsnProAspThrSerArgGlnTrpValGlnLysAsnValLeuAsnPheTrp

14/ 21

FIG. 5 (SUITE)

790
 CCTAGTCAAAATCAAGTACGTGGCAGTTGCAAAATGAAGTGAGTCCCGTTGGAGGCTCT
 810
 ProSerValIleLysTyrValAlaValGlyAsnGluValSerProValGlyGlySer
 830
 850
 TCTTCGGTAGCCCAATATGTTCTACCTGCCATCCAAATGTATACCAAGCAATAAGAGCA
 870
 SerSerValAlaGlnTyrValLeuProAlaIleGlnAsnValTyrGlnAlaIleArgAla
 890
 910
 CAAGGCCTTTCATGATCAAAATCAAGGTTTCAACATCTATTGACATGACCCCTAATAGGAAAC
 930
 GlnGlyLeuHisAspGlnIleLysValSerThrSerIleAspMetThrLeuIleGlyAsn
 950
 970
 TCTTCCCTCCATCGCAAGGTTCCCTTCAGGGTGATGTGAGATCATACCTAGATCCCATA
 1010
 SerPheProProSerGlnGlySerPheArgGlyAspValArgSerTyrLeuAspProIle
 1030
 1050
 ATTGGTACTTGGTATATGCAAATGCACCATTAAGTCAATGTGTACCCCTTATTTAGT
 1070
 IleGlyTyrLeuValTyrAlaAsnAlaProLeuLeuValAsnValTyrProTyrPheSer
 1090
 1110
 TACACTGGTAACCCCGTGACATATCACTTCCCTATGCTCTTTTCACAGCACCAATGTT
 1130
 TyrThrGlyAsnProArgAspIleSerLeuProTyrAlaLeuPheThrAlaProAsnVal

15/21

FIG. 5 (SUITE)

IleGlyValCysTyrGlyMet
LeuGlyAsnAsnLeuProSerAlaAsnAspValIleGlyLeuTyrArgSerAsnAsnIle
LysArgMetArgLeuTyrAspProAsnGlnAlaAlaLeuGluAlaLeuArgAsnSerGly
IleGluLeuIleLeuGlyValProAsnSerAspLeuGlnGlyLeuAlaThrAsnProAsp
ThrSerArgGlnTrpValGlnLysAsnValLeuAsnPheTrpProSerValLysIleLys
TyrValAlaValGlyAsnGluValSerProValGlyGlySerSerValAlaGlnTyr
ValLeuProAlaIleGlnAsnValTyrGlnAlaIleArgAlaGlnGlyLeuHisAspGln
IleLysValSerThrSerIleAspMetThrLeuIleGlyAsnSerPheProProSerGln
GlySerPheArgGlyAspValArgSerTyrLeuAspProIleIleGlyTyrLeuValTyr

18/21

FIG. 6 (A SUIVRE)

19/21

AlaAsnAlaProLeuLeuValAsnValTyrProTyrPheSerTyrThrGlyAsnProArg
AspIleSerLeuProTyrAlaLeuPheThrAlaProAsnValValValTrpAspGlyGln
TyrGlyTyrGlnAsnLeuPheAspAlaMetLeuAspSerValHisAlaAlaIleAspAsn
ThrLysIleGlyTyrValGluValValValSerGluSerGlyTrpProSerAspGlyGly
PheAlaAlaThrTyrAspAsnAlaArgValTyrLeuAspAsnLeuValArgArgAlaAsn
ArgGlySerProArgArgProSerLysProThrGluThrTyrIlePheAlaMetPheAsp
GluAsnGlnLysAsnProGluIleGluLysHisPheGlyLeuPheAsnProAsnLysGln
LysLysTyrProPheGlyPheGlyGlyLysArgLeuGlyLysValValIleAspAspPhe
AsnAlaThrThrSerIleLysSerAspVal

FIG. 6

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	PLANT PHYSIOLOGY Vol. 93, 1990, ROCKVILLE, US pages 673 - 682; Y.TAKEUCHI ET AL: "Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, beta-1,3-endoglucanase, in soybean" cited in the application see the whole document	1-5,7, 9-21,23
Y	PLANT PHYSIOLOGY Vol. 71, 1983, ROCKVILLE, USA pages 460 - 465; N.KEEN AND M-YOSHIKAWA: "beta-1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls" *discission* see abstract	1-5,7, 9-21,23
Y	PLANT PHYSIOLOGY Vol. 68, 1981, ROCKVILLE; USA pages 221-228; K. CLINE AND P. ALBERSHEIM: "Host-pathogen interactions. XVII. Hydrolysis of biologically active fungal glucans by enzymes isolated from soybean cells" cited in the application see page 221, column 1, paragraph 3	1-5,7, 9-21,23
Y	EP,A,0 392 225 (CIBA-GEIGY) 17 October 1990 cited in the application *examples 11b, 18b, 31b-d* see claims	1-5,7, 9-21,23
Y	GENE. Vol. 70, 1988,AMSTERDAM NL pages 13-23; M.DE LOOSE ET AL: "Primary structure of a hormonally regulated beta-glucanase of Nicotiana plumbaginifolia." cited in the application see the whole document	1-5,7, 9-21-23
	./.	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	<p>PLANT PHYSIOLOGY Vol. 68, No. 1, 1981, ROCKVILLE, USA pages 207 - 220; K.CLIN AND P. ALBERSHEIM: "Host pathogen interactions, XVI. Purification and characterization of a beta-glucosyl hydrolase/transferase present in the walls of soybean" see abstract</p> <p style="text-align: center;">--- -----</p>	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200268
SA 58643**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 11/06/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0392225	17-10-90	AU-A- 5218390 CA-A- 2012778 JP-A- 3035783	27-09-90 24-09-90 15-02-91

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/56; C12N9/24	C12N1/21; C12N5/10;	A01H5/00
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	<p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY. vol. 16, Janvier 1991, DORDRECHT NL pages 81 - 94; B.V. EDINGTON ET AL: 'cDNA cloning and characterization of a putative 1,3-beta-D-glucanase transcript induced by fungal elicitor in bean cell suspension cultures' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p align="center">--- -/-</p>	1-3, 5, 9-18
<p>° Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à 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</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"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.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
2 11 JUIN 1992	15. 07. 92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	VAN DER SCHAAL C.A.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁶		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	PLANT PHYSIOLOGY vol. 93, 1990, ROCKVILLE, US pages 673 - 682; Y.TAKEUCHI ET AL: 'Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, beta-1,3-endoglucanase, in soybean' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-5,7, 9-21,23
Y	PLANT PHYSIOLOGY vol. 71, 1983, ROCKVILLE, USA pages 460 - 465; N.KEEN AND M.YOSHIKAWA: 'beta-1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls' *discussion* voir abrégé ---	1-5,7, 9-21,23
Y	PLANT PHYSIOLOGY vol. 68, 1981, ROCKVILLE, USA pages 221 - 228; K. CLINE AND P. ALBERSHEIM: 'Host-pathogen interactions. XVII. Hydrolysis of biologically active fungal glucans by enzymes isolated from soybean cells' cité dans la demande voir page 221, colonne 1, alinéa 3 ---	1-5,7, 9-21,23
Y	EP,A,0 392 225 (CIBA-GEIGY) 17 Octobre 1990 cité dans la demande *exemples 11b, 18b, 31b-d* voir revendications ---	1-5,7, 9-21,23
Y	GENE. vol. 70, 1988, AMSTERDAM NL pages 13 - 23; M.DE LOOSE ET AL: 'Primary structure of a hormonally regulated beta-glucanase of Nicotiana plumbaginifolia.' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-5,7, 9-21-23
	-/--	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	<p>PLANT PHYSIOLOGY vol. 68, no. 1, 1981, ROCKVILLE, USA pages 207 - 220; K.CLIN AND P. ALBERSHEIM: 'Host pathogen interactions. XVI. Purification and characterization of a beta-glucosyl hydrolase/transferase present in the walls of soybean' voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200268
SA 58643

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 11/06/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0392225	17-10-90	AU-A- 5218390	27-09-90
		CA-A- 2012778	24-09-90
		JP-A- 3035783	15-02-91

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82