

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 07.11.97.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.05.99 Bulletin 99/19.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RHONE POULENC AGROCHIMIE —
FR.

⑦② Inventeur(s) : SAILLAND ALAIN, BOUDEC
PHILIPPE, DUMAS FLORENCE et BOURDON
HELENE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ SEQUENCE ADN D'UN GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET OBTENTION DE
PLANTES CONTENANT UN TEL GENE, TOLERANTES AUX HERBICIDES.

⑤⑦ 1. Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl py-
ruvate dioxygénase mutée obtenue par mutation d'un gène
codant pour l'HPPD.

2. Gène chimère contenant cet ADN et vecteur conte-
nant ce gène chimère pour la transformation des plantes.

3. Cellules et plantes transformées contenant cet ADN,
tolérantes aux herbicides.

FR 2 770 854 - A1



Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant un tel gène, tolérantes aux herbicides.

5 La présente invention concerne un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), un gène chimère contenant ce gène comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

On connaît certains herbicides tels que les isoxazoles décrites notamment dans les demandes de brevets français 95 06800 and 95 13570 et notamment l'isoxaflutole,
10 herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO CH₃-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones décrites dans les demandes européennes 0 625 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione. Cependant aucun gène de tolérance à de
15 tels herbicides n'a été décrit.

L'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate en homogentisate.

Par ailleurs, la séquence en acides aminés de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase issue de *Pseudomonas sp.* P.J. 874 a été décrite, sans qu'il y ait une
20 description de son rôle dans la tolérance des plantes aux herbicides (Rüetschi et col: Eur. J. Biochem. 205, 459-466, 1992). Ce document ne donne pas de description du gène codant pour cette protéine.

Il est connu, d'après la demande WO 96/38567, d'insérer un gène d'HPPD dans des plantes pour les rendre tolérantes aux inhibiteurs de l'HPPD, par surexpression de
25 l'HPPD dans les plantes conférant à ces dernières une tolérance intéressante à certains herbicides récents, tels que ceux de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones.

Il a maintenant été découvert qu'on peut obtenir une tolérance intéressante aux inhibiteurs de l'HPPD à l'aide d'une séquence ADN d'HPPD mutée au moins une fois. De manière préférée cet ADN est muté dans sa zone C-terminale.

30 La présente invention a donc tout d'abord pour objet une séquence d'ADN pouvant s'hybrider avec une séquence d'ADN codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), caractérisée en ce qu'elle est mutée au moins une fois. De manière préférée cette HPPD est mutée dans sa zone C-terminale. De préférence cette mutation est effectuée entre l'acide aminé équivalent à la phénylalanine en position 155 et le
35 dernier acide aminé, celui en C terminal. On a en particulier obtenu des effets intéressants avec un gène d' HPPD mutée au moins une fois entre la phénylalanine en position 333 et l'asparagine 337 ou encore au niveau de la proline 215.

Le gène HPPD de base, c'est à dire non muté, peut être d'origine quelconque. En particulier elle peut être d'origine bactérienne. Comme exemples intéressants on peut citer des bactéries du type *Pseudomonas sp*, par exemple *Pseudomonas fluorescens* ou encore des cyanobactéries du type *Synechocystis*. Le gène peut être aussi d'origine végétale, notamment issu de plantes dicotyledones telles que tabac, *Arabidopsis*..., d'ombellifères telles que *Daucus carotta* ou encore monocotyledones telles que *Zea mays*. Ce gène de base peut également être tel qu'il code pour une HPPD dont la partie C-terminale et la partie N- terminale proviennent de deux HPPD différentes. Les gènes de base synthétiques d'HPPD non mutées font également partie de l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une séquence mutée telle que décrite ci-dessus par modification de la séquence d'un gène codant pour une HPPD, modification qui entraîne le changement d'un ou plusieurs acides aminés dans la protéine exprimée dans la cellule hôte. Ce changement de séquence primaire de la protéine permet l'expression de l'activité HPPD dans des conditions où l'enzyme non modifiée est inhibée en partie ou en totalité.

Ces modifications peuvent être effectuées sur n'importe quelle région codante pour une HPPD, qu'elle soit animale, végétale ou originaire d'un micro-organisme. Plusieurs procédés de la biologie moléculaire permettent de réaliser ce travail:

Un premier procédé consiste à soumettre des cultures de cellules à une pression de sélection longue avec un inhibiteur de l'HPPD, le gène de l'HPPD mutant alors spontanément sous l'effet de cette pression de sélection,

Un second procédé consiste à soumettre des cultures de cellules à une pression de sélection longue avec un inhibiteur de l'HPPD pour isoler/sélectionner un clone, dont le gène HPPD a évolué de telle sorte qu'il code pour une enzyme permettant l'expression de l'activité HPPD dans des conditions où l'enzyme non modifiée est inhibée en partie ou en totalité,

Un troisième procédé consiste à soumettre des cellules végétales à une pression de sélection longue avec un inhibiteur de l'HPPD, le gène de l'HPPD mutant alors spontanément sous l'effet de cette pression de sélection et permettant alors aux plantes régénérées à partir de ces cellules (quelque soit la technique de régénération) de tolérer des doses agronomiques de ces herbicides.

Un quatrième procédé consiste à soumettre des plantes à une pression de sélection longue avec un inhibiteur de l'HPPD, le gène de l'HPPD mutant alors spontanément sous l'effet de cette pression de sélection et permettant alors à ces plantes de tolérer des doses agronomiques de ces herbicides.

Le choix de cette modification de la séquence ADN codant pour une protéine ayant une activité l'HPP, c'est à dire le choix de la/des base/s à modifier peut être réalisée soit:

- au hasard, à l'aide des nombreux agents mutagènes aujourd'hui disponibles... il suffit de disposer d'un outil de criblage efficace en fonction de l'objectif poursuivi pour pouvoir isoler un mutant correspondant à cet objectif.

- à partir des alignements de séquence des nombreuses protéines HPPD décrites dans la littérature. En effet, si l'on aligne les séquences protéiques d'HPPD divergentes, les quelques acides aminés conservés pour toutes ces séquences sont des acides aminés indispensables à la réaction (catalyse de l'HPP ou inhibition). Par mutagenèse dirigée il est possible de tester l'effet de la modification de ces acides aminés conservés et ce grâce à un outil de criblage.

- à partir d'un résultat déjà existant: une mutation du gène codant pour l'HPPD n°1 peut être connue pour induire la tolérance de cette HPPD n°1 aux inhibiteurs de l'HPPD, cette mutation peut alors être transposée au gène codant pour l'HPPD n°2 et entraîner le même effet.

- à partir de la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine. En effet cette structure peut indiquer s'il est nécessaire de muter tous les acides aminés qui la composent ou bien si seulement une partie de la séquence est à tester par mutagenèse dirigée pour espérer obtenir une enzyme moins sensible à ses inhibiteurs. On a découvert par une analyse de la structure tridimensionnelle de l'enzyme de *Pseudomonas fluorescens* strain A32 (structure non publiée), que, sur chaque monomère, la partie C-terminale de la protéine (débutant à l'acide aminé Alanine en position 155 et se terminant à l'acide aminé acide Aspartique en position 358) contient le site catalytique de l'enzyme. C'est donc les acides aminés de ce domaine C-terminal qu'il faut mutagéniser en priorité pour modifier l'interaction protéine inhibiteur et obtenir ainsi une enzyme plus tolérante. Grâce à l'outil de criblage, il est possible de montrer que le changement de la séquence protéique par mutagenèse dans des régions proches du site actif, confère à certains mutants une tolérance significative aux inhibiteurs d'activité HPPD, en particulier les herbicides décrits ci-dessus.

L'invention a encore pour objet une séquence protéique d'HPPD mutée telle qu'obtenue ci-dessus ou tel que codée par la séquence d'ADN décrite ci-dessus.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'un gène codant pour l'HPPD dans un procédé pour la transformation des plantes, comme gène marqueur ou comme séquence codante permettant de conférer à la plante une tolérance à certains herbicides. Il peut également être utilisé en association avec d'autre(s) gène(s) marqueur(s) et/ou séquence(s) codante(s) pour une ou plusieurs propriétés agronomiques.

Le gène codant peut être de toute origine, natif ou sauvage ou éventuellement muté tout en gardant fondamentalement une propriété de tolérance herbicide contre les inhibiteurs de l'HPPD, tels que les herbicides de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones. Comme séquence codante on peut notamment utiliser celle selon l'invention telle que décrite ci-dessus.

La transformation des cellules végétales peut être obtenue par tout moyen connu approprié. Une série de procédés consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN.

5 Une autre série de procédés consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante d'un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

La présente invention a encore pour objet un gène chimère comprenant, dans le sens de la transcription, au moins une séquence de régulation promotrice, une séquence codante hétérologue qui exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et au moins une
10 séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation.

Comme séquence de régulation promotrice on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO), de l' α tubuline (demande
15 européenne EP 0 652 286), ou encore d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), mais tout promoteur convenable connu peut être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande européenne
20 EP 0507698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription "enhancer", comme par exemple l'activateur de translation du virus etch du tabac (TEV) décrit dans Carrington J.C.
25 et Freed D.D. 1990. Journal of Virology Avril 1590-1597, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant
30 pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. constituée d'une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande européenne 0 508 909.

35 Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande européenne EP 0 633 317.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales, de plantes (y compris les parties de plantes, les semences et autres formes de progéniture) monocotylédones ou dicotylédones, notamment des cultures, transformées selon l'un des procédés décrits ci-dessus et contenant dans leur génome une quantité efficace d'un gène codant l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) mutée selon l'invention. On a observé que des plantes transformées de cette façon présentent une tolérance importante à certains herbicides récents tels que le *se isoxazoles* décrites notamment dans les demandes de brevets français 9506800 and 95 13570 et notamment du 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfoyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole, et notamment l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones décrites dans les demandes européennes 0 625 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre et le maïs ou dicotylédones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, la betterave.

L'invention a enfin pour objet un procédé de désherbage de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD notamment un herbicide du type ci-dessus, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

L'invention a encore pour objet l'utilisation du gène HPPD comme gène marqueur au cours du cycle "transformation-régénération" d'une espèce végétale et sélection sur l'herbicide ci-dessus

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989) ou dans Molecular cloning, T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook,1982.

Exemple 1 : Test de criblage colorimétrique de mutants présentant une tolérance à la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃phényl) propane-1,3-dione

pRP C : Le vecteur pRP A (décrit dans la demande WO 96/38567) contenant un
5 fragment d'ADN génomique et la région codante du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 a été digéré par NcoI, purifié puis ligué dans le vecteur d'expression pKK233-2 (Clontech) lui-même digéré par NcoI, site de clonage unique de ce vecteur. L'orientation du gène dans le vecteur pRP C ainsi obtenu, permettant l'expression sous le contrôle du promoteur *trc* à été vérifiée.

10 Un milieu de culture de type YT broth à 1% d'agarose (ultra pur Gibco BRL) et à 5mM de L-Tyrosine (Sigma), et contenant l'agent de sélection du vecteur pRP C ci-dessus est dispensé en plaque de 96 puits à raison de 100ul par puits. 10ul d'une culture de E.Coli en phase exponentielle de croissance contenant le vecteur pRP C est dispensée dans chaque puits. Après 16 heures à 37°C, les puits ne contenant que le milieu de culture ou ceux
15 ensemencés avec une culture d'E.Coli contenant le vecteur PKK233-2 sont translucides, alors que les puits ensemencés avec une culture de E.Coli contenant le vecteur pRP C sont de couleur brune.

20 Une gamme a été réalisée avec milieu de culture identique contenant des concentrations variables (0mM à 14mM) du 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione (EP 0 496 631) solubilisé dans l'eau et amené à pH7,5. Cette molécule est un dicétonitrile, reconnu comme étant un inhibiteur efficace d'activité HPPD (Pallett, K.E. et al 1997. Pestic. Sci. 50, 83-84). On observe une absence totale de coloration pour la culture bactérienne contenant le vecteur pRP C à 7mM du
25 composé ci-dessus.

Des mutants d'HPPD obtenus par mutagenèse dirigée aussi bien que par mutagenèse au hasard ont été sélectionnés par brunissement du milieu contenant du 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione à la
30 concentration de 7mM comme cela sera montré ci-après.

Des résultats identiques ont été obtenus en substituant, à la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthyl-4-trifluorométhylphényl)propan-1,3-dione, la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl -4-(méthylthio) phényl) propan-1,3-dione, et la 2-(2-chloro-3-ethoxy-4-
35 (éthylsulfonyl) benzoyl)-5-méthyl-1,3-cyclohexadione,(WO 93/03009). Les deux molécules sont en solution dans du DMSO en concentration finale respectivement à 3,5mM et 7mM.

Ces résultats confirment qu'un test basé sur l'activité HPPD quelle que soit l'origine de cette activité, permet d'identifier des activités HPPD présentant une tolérance à des inhibiteurs d'activité HPPD de famille des isoxazoles aussi bien que des tricétones.

5 Exemple 2: Mutagenèse au hasard du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 à l'aide de l'hydroxylamine.

L'ADN plasmidique d'une culture de *E.Coli* contenant le vecteur pRP C décrit ci-dessus a été extrait en utilisant le protocole standard. Cet ADN a été mis en présence d'hydroxylamine, agent chimique mutagène provoquant la substitution de la Cytosine en
10 Thymidine, pendant une heure à 80°C, en utilisant un protocole standard de la référence ci-dessus. La souche DH10B de *E.Coli*. K12 a été transformée avec l'ADN plasmidique potentiellement muté ainsi obtenu. L'utilisation du test de criblage colorimétrique décrit dans l'exemple 1 a permis d'identifier après criblage de plusieurs milliers de clones potentiellement mutés plusieurs colonies capables de brunir le milieu, c'est à dire de
15 transformer l'HPP en homogentisate même en présence de 7mM de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione .

Après séquençage de ces divers mutants il s'est révélé que l'utilisation de cet outil de mutagenèse/criblage a permis d'isoler 4 mutants distincts correspondants à trois sites de mutations. distincts:

20 - Premier site: la proline 215 remplacée par une leucine, mutant appelé Pfl215 (Voir tableau récapitulatif).

- Deuxième site:

- la glycine 334 remplacée par une sérine, mutant appelé Pfs334 (Voir
tableau récapitulatif)

25 - la glycine 334 remplacée par un acide aspartique, mutant appelé
Pfd334(Voir tableau récapitulatif)

- Troisième site: la glycine 336 remplacée par un acide sérine, mutant appelé
Pfs336(Voir tableau récapitulatif)

30 Ces trois sites mutagénisés permettant d'obtenir une tolérance sont situés dans ce qu'on définit, dans la présente demande, comme le domaine C-terminale de la protéine.

La ou les modifications par mutagenèse au hasard peuvent être effectuées sur toute protéine ayant une activité de type HPPD c'est à dire transformant le 4-hydroxy
phénylpyruvate en homogentisate, dont la région codante est ou pourrait être clonée. Les
HPPD décrites dans ce texte sont entre autres celle de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*,
35 *Daucus carota*, *Zea mais* et *Synechocystis*, mais bien sûr il est évident pour l'homme de
métier que toutes ces modifications sont applicables aux autres HPPD.

Exemple 3: Mutagenèse dirigée du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 par analogie de séquence.

Par alignement des séquences protéiques des HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32, *Arabidopsis thaliana*, de souris de cochon et de *Coccicoides*, il est possible de choisir parmi les acides aminés que l'on retrouve conservés dans différentes séquences un certain nombre d'entre eux pour les mutagéniser et obtenir des HPPD tolérantes; on aurait pu ajouter à l'alignement, présenté dans le schéma SEQ N°1 ci- après, des séquences d'autres HPPD comme celle de *Daucus carota* ou comme celle de *Zea mays*:

SEQ N°1

ara MGHQNAAVSENQNHDDGAASSPGFKLVGFSKFVRKNPKSDKFKVKRFHHI
coc M APAADS PTLQPAQPS DLNQYRGYDHVHWYVGNAK QAA
pig M TSYSDK GE KP ERG RFLHFHS VTFW VGNAK QAA
mou M TTYNNK GP KP ERG RFLHFHS VTFW VGNAK QAA
psf M ADL YENP MGL

ara EFWCGDATNVARRFSWGLGMRFSKSDLSTGNMVHASYLSTSGDLRFLFT
coc TYYV TRMG FE RVAY RGETGSKAVASHVVRNGNITFILF
pig SYYC SKIG FE PLAY KGETGSREVVSHVVKQDKIVFVFS
mou SFYC NKMGE FE PLAY RGETGSREVVSHVIKRGKIVFVLC
psf MG FE FIEF ASPTPGTLEPIFEIMGFTKVATHRS

ara APYSPSL SAGEIKPTTTASIPSFHDHGSCRSFF SSHGLGVRAVAIEVEDAE
coc SPLRS VEQASRFPEDEALLKEIH AHL ERHGDGVKDVAFEVDCVE
pig SALNP WN KEMG DHL VKHGDGVKDIAFEVEDCD
mou SALNP WN KEMG DHL VKHGDGVKDIAFEVEDCD
psf KNVHL YRQGEINLILNNEPNSIA SYFAAEHGSPVCGMAFRVKDSQ

ara SAFSISVANGAIPSSPPIVLNEAVTIAEVKLYGDVVLRYVSYKAEDTEKSE
coc SVFSAAVRNGAEVVDVVRTVEDEDGQIKMATIRTYGETTHTLIERSGYRGG
pig YIVQKARERGAIVREEVCCAADVGRHHTPLDRARQVWEGTLVEKMTFCLD
mou HIVQKARERGAIVREPWEQDKFGKVKFAVLQTYGDTTHTLVEKINYTGR
psf KAYNRALELGAQPIHIDTGPMELNLPAIKGIGGAPLYLIDRFG EGS

ara FLPGFERVE DASSFP L DYGIRRLDHAVGNVT ELGPVVEYIKGFTGF
coc FMPGYRMESNADATSKFLPKVVLERIDHCVGNQDWDDEMERCVDYIEKILGF
pig SRPQPSQTLLHRLLLSKLPKCGLEIIDHIVGNQPDQEMESASQWYMRNLQF
mou FLPGFEAPTYKDTLLPKLPRCNLEIIDHIVGNQPDQEMQSASEWYLKNLQF
psf SIYDIDFVYLEGVERN PVGAGLKVIDHLTHNVYRGRMVYWANFYEKL F

car HEFAEFTAEDVGTLESGLNSVVLANNEEMVLLPINEPVHGTKRKSQIQTYL
coc HRFWSVDDKDICTEFSALKSIVMASPNDIVKMPINEPAKGKKQ SQIEEYV
pig HRFWSVDDTQIHTEYSALRSVVMANYEESIKMPINEPAPGKKK SQIQEYV
mou HRFWSVDDTQVHTEYSSLRSIVVTNYEESIKMPINEPAPGRKK SQIQEYV
psf NFREARYFDIKGEYTGTLTSKAMSAPDGMIRIPLNE ESSKGA GQIEEFL

ara EHNEGAGLQHLALMSIEDIFRTLREMRKRSSIGGFDFMPSPPPTYQNLKKR
coc DFYNGAGVQHIALRTNNIIDAITNLKAR GTEFIKVP ETTYEDMKIR
pig DYNGGAGVQHIALKTEDIITAIRSLRER GVEFLAVP FTYYKQLQEK

mou DYNGGAGVQHIALKTEDIITAIRHLRER GTEFLAAP SSYYKLLREN
 psf MQFNAGEGIQHVAFLLTDDLKTKWDALKKI GMRFMTAPPDYYEMLEGR

5 ara V GDVLSDDQIKECEELGILVDRDD QG TLLQIFTKPLGDRPTIFIE
 coc LKRQGLVLDEDFETLKSLDILIDFDE NG YLLQLFTKHLMDRPTVFIE
 pig LKSAKIRVKESIDVLEELKILVDYDE KG YLLQIFTKPMQDRPTVFLE
 mou LKSAKIQVKESMDVLEELHILVDYDE KG YLLQIFTKPMQDRPTLFLE
 psf LP DHGEPVDQLQARGILLDGSSVEGDKRLLQIFSETLMG P VFFE

10 ara IIQRVGCMMKDEEGKAYQSGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYEKTLEAKQLVG
 coc IIQR NNFSG FGAGNFRALFEAIE RE QALR G
 pig VIQR NNHQG FGAGNFNSLFKAFEEEEQELRGNLTDTD
 mou VIQR HNHQG FGAGNFNSLFKAFEEEEQALRGNLTDLE
 psf FIQR KGDDG FGEGNFKALFESIE RD QVRR G

15 * *

20 ara IIQRVGCMMKDEEGKAYQSGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYEKTLEAKQLVG
 coc TLI
 pig NGVPFRL
 mou NGVRSGM
 psf VLTAD

25 ara = *Arabidopsis thaliana* (WO 96/38567)
 coc = *Coccicoides* (ref sequence Genebank)
 pig = cochon (ref sequence Genebank)
 mou = souris (ref sequence Genebank)
 psf = *Pseudomonas fluorescens* A32 (WO 96/38567)

30 L'alignement de ces différentes séquences met nettement en évidence qu'une des régions les mieux conservées est située entre la phénylalanine en position 333 et l'asparagine 337. Non seulement cette région est très conservée mais en plus elle englobe les deux glycines en position 334 et 336 identifiées par mutagenèse au hasard (en gras sur l'alignement de séquences et marqués d'une étoile). On a réalisé la mutagenèse sur le vecteur pRP C en utilisant l'U.S.E. Mutagenesis Kit, Pharmacia. Les oligonucléotide M-
 35 ont été utilisés pour les mutagenèses de la phénylalanine 333, de la glycine 334, de la glycine 336 et de l'asparagine 337, mais aussi pour celles des doubles mutants des glycines 334 et 336.

comme indiqué dans les schémas SEQ N° 1 à 12 ci-après.

40 SEQ N°2

Mutagenèse de PHE # 333, remplacée uniquement par W
 MC GAAGTTGCCCTCGCCCCACCCATCGTCGCCCTT

45 Mutagenèse de PHE # 333, remplacée uniquement par LEU & ILE
 MC GAAGTTGCCCTCGCCRAKCCCATCGTCGCCCTT

50 Mutagenèse de GLY # 334, remplacée uniquement par TRP
 MD CTTGAAGTTGCCCTCCCAAACCCATCGTCGCC

Mutagenèse de GLY # 334, remplacée uniquement par ASP
 MK CTTGAAGTTGCCCTCGTCAAACCCATCGTCGCC

Mutagenèse de GLY # 334, remplacée uniquement par SER
ML CTTGAAGTTGCCCTCGCTAAACCCATCGTCGCC

5 Mutagenèse de GLY # 334, remplacée uniquement par LEU & ILE
ME CTTGAAGTTGCCCTCRAKAAACCCATCGTCGCC

Mutagenèse de GLY # 336, remplacée uniquement par ASP
MN CAGCGCCTTGAAGTTGTCCTGCCAAACCCATC

10 Mutagenèse de GLY # 336, remplacée uniquement par GLU
MU CAGCGCCTTGAAGTTYTCCTGCCAAACCCATC

Mutagenèse de GLY # 336, remplacée uniquement par TRP
15 MW CAGCGCCTTGAAGTTCCACTGCCAAACCCATC

Mutagenèse de GLY # 336, remplacée uniquement par Ile
MX CAGCGCCTTGAAGTTDACTGCCAAACCCATC

20 Mutagenèse de GLY # 334 & GLY # 336, remplacées par tous les autres acides
aminés, donc avec possibilité d'obtenir un double mutant
MA CGCTTGAAGTTNNNCTCNNNAAACCCATCGTC

Mutagenèse de ASN # 337, remplacée uniquement par LEU & ILE
25 MM GAACAGCGCCTTGAARAKGCCCTGCCAAACCC

Après criblage avec la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione de plusieurs centaines de mutants potentiels, on a identifié 13 mutants, dont 10 simples mutants et 3 doubles mutants (Voir tableau récapitulatif), présentant une tolérance à l'inhibiteur 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione dans notre test de détection colorimétrique. Il faut ajouter que certains des mutants identifiés au cours de ces mutagenèses dirigées sont identiques bien sûr aux mutants identifiés dans l'exemple 2 (c'est le cas de PfS334 et de PfD334).

Les mutants obtenus sont identifiés comme suit:

35 Simple mutants:

Phenylalanine #333 remplacé par tryptophane	appelé PfW333
Phenylalanine #333 remplacé par leucine	appelé PfL333

Glycine #334 remplacé par tryptophane	appelé PfW334
40 Glycine #334 remplacé par acide aspartique	appelé PfD334
Glycine #334 remplacé par serine	appelé PfS334
Glycine #334 remplacé par proline	appelé PfP334

Glycine #334 remplacé par leucine	appelé PfL334
Glycine #334 remplacé par Isoleucine	appelé PfI334

5	Glycine #336 remplacé par acide aspartique	appelé PfD336
	Glycine #336 remplacé par glutamine	appelé PfQ336
	Glycine #336 remplacé par acide glutarique	appelé PfE336
	Glycine #336 remplacé par tryptophane	appelé PfW336
	Glycine #336 remplacé par isoleucine	appelé PfI336

10	Asparagine #337 remplacé par leucine	appelé PfL337
----	--------------------------------------	---------------

Doubles mutants:

15	Glycine #334 remplacé par alanine et Glycine #336 remplacé par alanine	appelé PfA334-A336
	Glycine #334 remplacé par alanine et Glycine #336 remplacé par arginine	appelé PfA334-R336
20	Glycine #334 remplacé par serine et Glycine #336 remplacé par histidine	appelé PfS334-H336

Ce résultat montre qu'il est possible, par mutagenèse des acides aminés conservés entre les séquences protéiques de différentes HPPD situés dans la partie C-terminale de la protéine, d'obtenir des HPPD présentant une tolérance aux inhibiteurs d'activité HPPD.

25 Donc toute région conservée entre différentes séquences en acides aminés d'HPPD est une bonne cible pour obtenir des mutants qu'il est intéressant d'analyser pour déterminer leur tolérance. Il est clair que fait partie de l'invention toute mutation ou mutation multiple qui permettrait d'obtenir une HPPD tolérante même si cette protéine n'est pas exemplifiée dans ce texte.

30 Il est là aussi démontré que le domaine C-terminal est bien la cible privilégiée de la mutagenèse d'une HPPD en vue d'une bonne tolérance de l'enzyme à ces différents inhibiteurs. En effet dans le domaine N-terminal défini comme allant de l'acide aminé n°1 à l'alanine n°155 chez *Pseudomonas fluorescens* A32 ou à ces correspondants dans les HPPD d'autres espèces il est très difficile de définir une région conservée.

35 La ou les modifications, par mutagenèse dirigée à partir d'informations déduites d'un alignement de séquence, peuvent être faites sur toutes protéine ayant une activité de type HPPD c'est à dire transformant le 4-hydroxyphénylpyruvate en homogentisate, dont la région codante est ou pourrait être clonée. Les HPPD décrites dans ce texte sont entre autres celle de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* et

Synechocystis, mais bien sûr il est évident que toutes ces modifications sont applicables aux autres HPPD.

Exemple 4: Mutagenèse dirigée du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32.

5 Les résultats obtenus par mutagenèse au hasard comme décrit à l'exemple 2, ainsi que de ceux obtenus après alignement des différentes séquences d'HPPD, montrent clairement que le peptide allant de F#333 à F#338 (numérotation sur HPPD de *P. fluorescens*) est une région particulièrement intéressante en terme de mutagenèse pour obtenir une tolérance.

10 Parallèlement à cette information, on a découvert, par une analyse de la structure tridimensionnelle de l'enzyme de *Pseudomonas fluorescens* strain A32 par exemple, que la partie C-terminale de la protéine, de son monomère (débutant à l'acide aminé Alanine en position 155 et se terminant à l'acide aminé Aspartique en position 358) contient le site catalytique de l'enzyme. Ce sont donc les acides aminés de ce domaine C-terminal
15 qu'il faut mutagéniser en priorité pour espérer modifier l'interaction protéine inhibiteur et obtenir ainsi une enzyme plus tolérante.

On a donc recherché, par analyse de la structure tridimensionnelle de la protéine HPPD de *P. fluorescens*, des mutations ponctuelles qui pourraient entraîner un changement conformationnel de l'hexapeptide F#333 à F#338 sans muter directement ce peptide. L'idée
20 directrice est que la mutation d'un acide aminé assez éloigné du site actif, un acide aminé non conservé peut influencer le positionnement dans l'espace de ce peptide de F#333 à F#338 et donc induire une tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD par effet "ricochet".

On a donc recherché dans la structure des acides aminés proches de cet hexapeptide; un petit nombre d'acides aminés répondent à ce critère, comme l'acide
25 aspartique 287 et la glycine 298 [pour information, l'atome de carbone alpha de la glycine 334 de l'hexapeptide est à 9,61 angström de celui du fer situé dans le site catalytique et le carbone alpha la glycine 298 est à 5,75 angström de celui de la glycine 334]. Cette glycine 298 a paru être des deux acides aminés le meilleur candidat car toute mutagenèse va conduire à un acide aminé avec une chaîne latérale plus grosse et on a remplacé cette
30 glycine par un acide glutamique (dont la chaîne latérale est chargée négativement) en vu d'une modification suffisamment sensible pour que l'effet soit visible.

De plus quand on mute la glycine 298 par un acide glutamique, la chaîne latérale de cet acide glutamique qui est très encombrée 'cogne' sur la structure secondaire en feuillet Beta dans laquelle on trouve le motif conservé LLQIF. La phénylalanine 312 de ce motif se
35 trouve elle même très proche du fer.

On a testé la mutation G 298 en E 298.

Cette mutations G 298 en E298 a été créée par mutagenèse dirigée (U.S.E. Mutagenesis Kit, Pharmacia) du vecteur pRP C en utilisant l'oligonucléotide MO décrit sous SEQ N° 13.

SEQ N°13

GLY # 298 remplacé par acide glutamique

MO GCCTTCCACGGAAGATTTCGTCCAGCAGGATACC

5

Ce mutant appelé PfE298 provoque le brunissement du milieu de criblage contenant 7mM de RPA202248 (Voir tableau récapitulatif).

10 Ceci confirme qu'avec la connaissance de la structure tridimensionnelle de l'HPPD, on peut déterminer un certain nombre de mutations efficaces en terme de tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD, qu'elle soit d'origine bactérienne végétale ou autre. En effet il est tout à fait possible de modéliser la structure de n'importe quelle HPPD dont on a la séquence protéique puisque on connaît la structure précise dans le cas de l'HPPD de *P. fluorescens*. Cette modélisation sera surtout intéressante dans le cas de la modélisation du domaine C-terminale, le mieux conservé en terme de séquence primaire et surtout le plus prometteur en terme de tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD.

15 La ou les modifications, par mutagenèse dirigée à partir d'informations déduites de la structure tridimensionnelle d'une HPPD modélisée ou déterminée par analyse de cristaux obtenus en présence ou en absence d'un inhibiteur, peuvent être faites sur toute protéine ayant une activité de type HPPD c'est à dire transformant le 4-hydroxyphénylpyruvate en homogentisate, dont la région codante est ou peut être clonée. Les HPPD décrites dans la présente demande sont entre autres celle de *P. fluorescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Zea mais* et *Synechocystis*, mais bien sûr il est évident pour l'homme de métier que toutes ces modifications sont applicables aux autres HPPD.

25 Exemple 5: Expression d'HPPD mutantes de *Pseudomonas fluorescens* dans le tabac

A) Construction de gènes chimères.

30 pRP-VB3 : L'ADN du vecteur binaire pBI121 (Clontech) a été digéré HindIII et XbaI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la pfu polymérase (Stratagène), le vecteur purifié. L'ADN du clone pRP-S décrit à l'exemple 2 de la demande dans la demande PCT 96/38567 et comprenant l'enchaînement " promoteur double histone - TEV - OTP - gène HPPD - terminateur Nos" a été digéré HindIII et SacI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la pfu polymérase (Stratagène), l'insert purifié puis ligué dans le vecteur purifié précédemment décrit. L'orientation a été vérifiée par digestion SalI. Le clone pRP-VB3 a donc la structure de gène chimérique suivante :

35

Bordure droite-promoteurNos-NPTII-terminateur Nos-promoteur double histone-
tev-otp-HPPD-terminateurNos-

pRP-VB3-b : L'ADN du clone pRP-VB3 a été digéré par BamHI purifié, puis ligué dans le vecteur pZERO-1 (Invitrogen) qui ne contient pas les sites de restriction BstEII et SalI, digéré BamHI et purifié. Une partie de l'OTP, le gène de l'HPPD et le terminateur Nos sont ainsi transférés dans pZERO-1.

5

pRP-VB3-c : L'ADN du clone pRPVB3-b a été digéré SalI, purifié, puis ligué en présence de l'adaptateur présenté ci-dessous, de façon à remplacer le site de restriction SalI par le site BstEII.

10 5' TCGAGAGAGAGGTGACCGAGAGA 3'
3' CTCTCTCCACTGGCTCTCTAGCT 5'

pRP-VB3-d : L'ADN du clone pRP-VB3-c a été digéré BamHI, l'insert purifié, puis cloné dans le vecteur PUC19 (Biolabs) digéré BamHI. Une partie de l'OTP, le gène de l'HPPD et le terminateur Nos sont ainsi transférés dans PUC19.

15

pRP-VB3-e : Le vecteur PUC19 ne possédant pas les sites de restriction PmlI et StuI, l'ADN du clone pRP-VB3-d a été digéré PmlI et StuI, purifié, puis ligué sur lui-même permettant ainsi de supprimer le site Not dans le gène de l'HPPD et de tronquer la partie codante de l'HPPD de 500 paires de bases environ, afin de rendre aisé par la suite, le criblage des colonies transformées ayant intégré les HPPD mutantes.

20

pRP-VB3-f : Le vecteur pRP-VB3-e a été digéré NotI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la pfu polymérase (Stratagène), purifié, digéré BamHI, purifié, puis cloné dans le vecteur PUC19 digéré KpnI, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la pfu polymérase (Stratagène), purifié, digéré BamHI, purifié.

25

pRP-VB3-g : L'ADN du clone pRP-VB3 a été digéré BstEII, les extrémités complétées avec des dNTP à l'aide de la pfu polymérase (Stratagène), le vecteur purifié puis ligué sur lui-même permettant ainsi la disparition du site unique BstEII de ce vecteur.

30

pRP-RD224 : L'ADN du clone pRP-VB3-f a été digéré BamHI et SacI, purifié, puis ligué dans le vecteur pRP-VB3-g digéré par BamHI et SacI et purifié. Le clone pRP-RD224 a donc la structure suivante :

35

RB-promoteurNos-NPTII-terminateurNos-promoteurdoublehistone-tev-otp- HPPDtronquée-terminateurNos LB

pRP-RD224mutants : Les ADN des vecteurs portant les HPPD mutées ainsi que l'HPPD non mutée contenues dans le vecteur PKK233-2, ont été digérées par KpnI et BstEII, purifiées puis liguées dans le vecteur pRP-RD224, digéré par KpnI et BstEII et purifié. Les transformants ayant intégré le gène de l'HPPD muté ont été sélectionnés pour la
 5 taille de l'insert par digestion KpnI et BstEII. Les clones obtenus sont notés pRP-RD224 auquel on ajoute le type de mutation effectuée sur l'HPPD, on a ainsi créé par exemple pRP-RD224 Pf (pour l'enzyme non mutée) pRP RD224 PfD336 (pour l'enzyme avec un acide aspartique en 336), pRP RD224 PfQ336 (pour l'enzyme avec une glutamine en 336), pRP RD224 Pfl333 (pour l'enzyme avec une leucine en 333), pRP RD224 PfA334~A336 (pour
 10 l'enzyme avec une alanine en 334 et en 336, double mutant).

B) Transformation du Tabac "Petit havana".

Les gènes chimères décrits précédemment ont été transférés dans du tabac "Petit havana" selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

1) Transformation:

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA101.

2) Régénération:

La régénération du tabac "Petit havana" à partir d'explants foliaires est réalisée sur
 20 un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 350mg/l de céfotaxime et des doses variables de la 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione (EP 496630) , 10ppm, 20ppm, 40ppm qui est un analogue de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione ou directement des doses de 2 ou 4 ou 8 ppm de
 25 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione . Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 1985, Vol 227, p1229-1231) en trois étapes successives :

- la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2mg/l de
 30 benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours et des doses variables d'herbicide, la 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione (EP 496630) ou la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione).

- Les pousses vertes formées au cours de cette étape sont ensuite développées par
 35 culture sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose et des doses variables d'herbicide , mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours.

- Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et des doses variables

d'isoxaflutole et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

C) Mesure de la tolérance à l'herbicide des plantules *in-vitro*.

Les expériences sont réalisées par action d'un agent de sélection avec les mutants pRP RD224 Pfl333, pRP RD224 PfA334~A336, pRP RD224 Pfd336 et pRP RD224 PfQ336 montrent que si l'on n'obtient pas de pousses/plantules aux doses les plus élevées d'herbicide dans les essais de transformation/régénération avec une HPPD non mutée, par contre les mutants permettent grâce à une meilleure tolérance de l'enzyme d'obtenir des plantules même à des doses élevées 40 ppm de la 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione(EP 496630) ou 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluoro méthylphényl) propan-1,3-dione des plantules. Ces plantules obtenues à fortes concentration de l'agent de sélection avec une HPPD mutée et que l'on ne peut obtenir avec l'HPPD sauvage sont tout à fait normales.

Ajoutons que les mutants pRP RD224,Pfd336 et pRP RD224 Pfl333 sont de manière statistique plus efficaces que les mutants pRP RD224,PfQ336 et pRP RD224 PfA334~A336, puisqu'ils permettent d'obtenir un plus grand nombre de plantules tolérantes.

Tableau récapitulatif des mutants de l'HPPD de *P. fluorescens*

Type d'HPPD	Activité dans test de criblage* avec une dose d'agent de sélection de	
	0 mM	7mM
Sauvage	10	0
Mutée		
PfL215	10	7
PfE298	8	3
PfL333	5	4
PfW333	-	-
PfS334	7	7
PfD334	1	1
PfW334	6	6
PfP334	5	5
PfL334	5	4
PfI334	5	4
PfS336	-	-
PfD336	2	1
PfQ336	8	8
PfE336	10	8
PfW336	10	10
PfI336	10	8
PfL337	8	8
PfA334-A336	8	8

PfA334-R336	8	7
PfS334-H336	5	5

5 Le chiffre 10 correspond à une activité forte de même niveau que l'HPPD non mutée et sans inhibiteur, le chiffre 0 correspond à une activité nulle soit due à une inhibition complète par le 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione soit due à une mutation entraînant la non activité de l'enzyme, les chiffres 1 à 9 correspondent à des activités intermédiaires plus forte quand
10 le chiffre augmente.

*: test de criblage décrit dans l'exemple 1.

'-' données non disponibles.

Ces résultats confirment que l'introduction d'une HPPD présentant une tolérance
15 aux inhibiteurs d'activité HPPD dans les plantes, confère à celles-ci une tolérance à ces même inhibiteurs, tolérance qui semble donc meilleure que celle obtenue avec une HPPD non mutée.

Exemple 6 : Mutagenèse dirigée du gène de l'HPPD de *Synechocystis*.

20 On choisit un site de mutation efficace sur l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* en terme de tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD et le transposons à une autre HPPD.

Cette transposition est faite à une HPPD la plus divergente possible de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* et des autres HPPD connues. Pour ce faire on travaille avec le gène codant pour l'HPPD de *Synechocystis* connue grâce au séquençage systématique du
25 génome de cette cyanobactérie jamais cloné en tant que tel. On a donc d'abord isolé le gène puis on l'a fait exprimer dans *E. coli*.

1) obtention du gène.

L'ADN génomique de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803 a été extrait et purifié en utilisant les protocoles standards on supprime cela par le rajout en exemple 1).
30 200µg de cet ADN génomique ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant 1,25U de *Taq* polymérase (Boehringer) dans son tampon dans un volume réactionnel de 50 µl avec 200µM de dNTP(désoxyribonucleotide-triphosphate). Les séquences des oligonucléotides synthétiques SYN1 et SYN3 utilisés comme amorces ont été déduites de la séquence publiée dans Genebank de l'HPPD de *Synechocystis*.

35

SYN1 ATTATGGAATTCGACTATCTT

SYN3 CAGTATTCATAATGTTAATTATG

Le programme d'amplification, 5 minutes 94°C, puis 50 cycles 1 minute 94°C, 1 minute 49°C, 1 minute 72°C, puis 5 minutes 72°C, a été réalisé sur un appareil Perkin-Elmer 9600.

2) Clonage du gène et expression.

5 Le fragment amplifié obtenu par PCR a été purifié, digéré EcoRI, repurifié, puis cloné dans le vecteur ptrc-99A (Pharmacia) préalablement digéré EcoRI et SmaI. La bactérie JM105 a été transformée par le plasmide recombinant. Le séquençage a permis de vérifier la conformité du fragment cloné avec la séquence de l'HPPD de *Synechocystis* publiée.

10 L'activité d'oxygénase de l'HPPD de *Synechocystis* ainsi obtenue a été observée par brunissement du milieu en utilisant le test colorimétrique décrit précédemment (cf exemple 1) avec ajout d'IPTG(isopropyl- β -D-thio-galactopyrazonide) à la concentration de 1mM afin d'induire l'expression de la protéine. Dans les mêmes conditions, sur un milieu contenant 7mM de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, il n'y pas brunissement du milieu, ce qui confirme l'inhibition de l'activité HPPD de *Synechocystis* par le 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione .

3) Mutagenèse dirigée.

20 Par alignement des séquences protéiques de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 et de l'HPPD de *Synechocystis* PCC6803, on a estimé que les Glycines en position 334 et 336 de l'HPPD de *Pseudomonas* (glycines indiquées par des étoiles dans la figure de l'exemple 3 et qui sont très fortement conservées) sont en position 318 et 320 sur l'HPPD de *Synechocystis* (en gras sur l'alignement de séquences protéiques SEQ N°14 ci après).

SEQ N°14

30 Seq_1: 357 aa HPPD de *Pseudomonas fluorescens* (Bactérie)
Seq_2: 339 aa HPPD de *Synechocystis* (Cyanobactérie)

Seq_1MADLYENPMGL MGFEFIELAS PTPNTLEPIF E.IMGFTKVA THRSKD..VH
Seq_2 MEFDYLHLYV DDYQSAHRCY QRQWGFTCVN KIITDQGITG

35 Seq_1 LYRQGAINLI LNNEPHSVAS Y..FAAEHGP SVCGMAFRVK DSQKAYKRAL
Seq_2 IYQQGQILLI ISASESSLR YADYLQKHPP GVGEVAWQVA NWQKIQHQLS

40 Seq_1 ELGAQPIHIE TGPMEINLPA IKGIGGAPLY LIDRFEGEGSS IYDIDFVLE
Seq_2 EL....Q.IE TTPVIH..PL TKAEGLTFLW WGDVH...HS IYPVRSELNQ

Seq_1 GVDRHPVGAG LKIIDLH LTHN VYRGRMAYWA N FYEKLNFNR
EIRYFDIKGE

Seq_2 NKTLH..GVG LTTIDHVVLN IAADQFTQAS QWYQQVFGWS VQQSFTVNT

Seq_1 YTGLTSKAMT APDGMIRIPL NESSKGAGQ IEEFLMQFNG EGIQHVAFLS
Seq_2 HSGLYSEALA SANGKVQFNL NCPTNN.SSQ IQTFLANNHG AGIQHVAFST

5

Seq_1 DDLIKTWDHL KSIGMRFMFTA PPDTYYEMLE GRLPNHG.EP VGELQARGIL
Seq_2 TSITRTVAHL RERGVNFKI PTGYYQQQRN SSYFNYASLD WDTLQCLEIL

10

Seq_1 LDGSSES GDK RLLQIFSET LMGP.. VFFE FIQRKG.DDG FGEGNFKALF
Seq_2 LDDQDNTG.E RLLQIFSQP CYGVGTLFWE IIERRHRAKG FGQGNFQALY
* *

Seq_1 ESIERDQVRR GVLSTD
Seq_2 EAVETLEKQL EVP..

15

Plusieurs mutants de la position 334 chez *Pseudomonas fluorescens* ayant été obtenus, deux expériences de mutagenèse dirigée (U.S.E., Pharmacia), utilisant les oligonucléotides MUGLYA et MUGLYB destinée à remplacer la Glycine 318 (de *Synechocystis* correspondant à la glycine 334 de *P. fluorescens*) soit en Asparagine ou en Sérine, soit en Proline ou Alanine, ont été réalisées cf SEQ N°15 et SEQ N°16.

20

GLY # 318, remplacement possible par SER & ASN
MGA CGGGCAAAAGGATTARCCAAGGAACTTTCAAG

25

GLY # 318, remplacement possible par PRO & ALA
MGB CGGGCAAAAGGATTSCNCAAGGAACTTTCAAG

30

Dans les deux expériences, des clones obtenus après mutagenèse ont provoqué le brunissement du milieu de criblage à 7mM de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione (test décrit dans l'exemple 1). Un mutant de chaque expérience a été séquencé.

Glycine #318 remplacé par asparagine, appelé SyN318 similaire au PfD334 (dans exemple 3)

Glycine #318 remplacé par alanine, appelé SyA318 similaire au PfA334 (dans exemple 3)

35

Ces résultats confirment que les mutations conduisant à une tolérance, mise en évidence pour une HPPD donnée sont transposables à une autre HPPD, d'une autre espèce, d'un autre règne.

40

Ces résultats confirment aussi que des modifications de la séquence protéique dans la partie C-terminale d'une HPPD qu'elle que soit son origine (bactérienne ou autre) peuvent entraîner une tolérance aux inhibiteurs d'HPPD.

Exemple7: Etude biochimique d'une HPPD mutée, mutants de *Synechocystis*.

Les mutants SyN318 et SyA318 obtenus dans l'exemple précédent ont été étudiés, en comparaison avec l'HPPD non mutée de *Synechocystis* pour les caractéristiques

biochimiques K_m et I_{50} vis à vis d'un inhibiteur de l'HPPD qui est le 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione . Cette analyse a été faite en utilisant le protocole suivant:

a) Mesure de l'activité

5 L'activité HPPD est mesurée en déterminant par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) la quantité de produit formé, c'est à dire d'homogentisate, après incubation de l'enzyme avec son substrat, l'HPP. L'injection de différentes doses d'homogentisate variant de 12 à 48 nmoles dans la colonne permettent de déterminer le temps de rétention de l'homogentisate et de corrèler l'aire du pic avec la quantité de produit
10 injecté.

Les mesures d'activité sont réalisées dans un volume final de 200 μ l contenant : de l'ascorbate à 12,6 mM, du fer ($\text{FeH}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2,6\text{H}_2\text{O}$) à 178 μ M (préalablement préparé dans du tampon Tris acétate 0,1 M pH 6), 50 μ g d'extrait brut contenant l'HPPD, de l'HPP à 352 μ M, et du tampon Tris acétate 0,1 M pH 7,5. L'enzyme est incubée 1 min à 30°C avec dans
15 un premier temps le fer puis 5 min à 30°C avec l'ascorbate avant le démarrage de la réaction par ajout du substrat, l'HPP. L'incubation est poursuivie durant 1 min 30 à 30°C, puis la réaction est arrêtée par addition de 70 μ l d'acide perchlorique 20 %. Les protéines sont ensuite éliminées par centrifugation 5 min à 15300 rpm à 20°C. Le surnageant est récupéré. La quantité d'homogentisate formé est alors analysée par injection de 75 μ l de
20 l'essai dans une colonne Pico Tag C18 connecté au système HPLC. L'élution est réalisée à un débit de 1ml/min. L'élution isochratique réalisée est la suivante: 1- 0% de tampon B (soit 100% de tampon A : eau, acétonitrile 3% (v/v), acide trifluoro acétique 0,1% (v/v)) durant 6 minutes ; 2- 100% de tampon B (acétonitrile 100%) jusqu'à la minute 11 ; 3- 0% de tampon B jusqu'à la minute 19. En sortie de colonne, l'homogentisate est détecté par
25 mesure de l'absorbance à 288 nm. La quantité de produit formé est définie par l'aire du pic sur le chromatogramme.

b) Détermination du K_M

Le K_M de l'HPPD pour l'HPP est déterminé en mesurant la vitesse initiale de la réaction avec différentes concentrations d'HPP. Les réactions sont réalisées dans les
30 conditions décrites ci-dessus avec des concentrations d'HPP allant de 5,5 μ M à 1400 μ M.

c) Détermination de l' IC_{50}

L' IC_{50} est déterminée par mesure de la vitesse initiale de la réaction dans les conditions décrites ci-dessus, après incubation de l'enzyme 10 min à 30°C avec le fer, l'ascorbate, le substrat à 1056micromolaire et des concentrations d'inhibiteur variables. Les
35 concentrations de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione utilisées varient de 10^{-10} à 10^{-4} M..

Les valeurs de K_m estimées de l'enzyme pour son substrat c'est à dire le 4-hydroxyphénylpyruvate, et les valeurs de I_{50} estimées à activités comparables, sont de l'ordre de:

	HPPD native	SyN318	SyA318
K_m	60uM	470uM	320uM
I_{50}	80nM	80uM	40uM

5

Ces résultats confirment que les mutations réalisées dans la partie C-terminale de la protéine, si elles influent en diminuant l'affinité de l'enzyme pour le substrat (K_m), influent encore plus fortement en diminuant l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur (I_{50}). En effet le rapport I_{50} d'une HPPD mutante sur I_{50} de l'HPPD non mutante (qui est l'image de la perte d'affinité pour l'inhibiteur) est de 1000 et 500 pour SyN 318 et SyA 318 respectivement alors que le rapport K_m d'une HPPD mutante sur K_m de l'HPPD non mutante (qui est l'image de la perte d'affinité pour le substrat) est de 8 et 5 pour SyN 318 et SyA 318 respectivement. Ceci est bien l'exemplification que ces deux mutants ont une affinité un peu moindre pour le substrat de l'enzyme mais surtout une affinité très nettement plus faible pour les inhibiteurs de l'enzyme dont la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione .

Ces résultats confirment que le test de criblage colorimétrique décrit dans l'exemple 1 permet bien de détecter des HPPD mutées présentant une tolérance aux inhibiteurs d'activité HPPD. Ils valident l'outil qu'on utilise pour cribler et identifier des mutants de l'HPPD tolérants aux inhibiteurs de l'HPPD. Cet outil de screening est rapide et simple d'utilisation et c'est pourquoi on l'utilise mais il est clair que tout autre outil peut être utilisé pour faire une analyse similaire; il serait possible d'utiliser

- un outil de criblage mesurant l'activité et son inhibition basé sur la disparition d'HPP (dosage radioactif, dosage spectrophotométrique ou autre) ou basé sur la consommation d'oxygène ou basé sur l'apparition d'homogentisate (avec couplage d'une autre activité enzymatique)

- un outil de criblage vivo, comme par exemple la croissance de bactéries sur HPP comme seule source de carbone en présence d'inhibiteurs de l'HPPD permettant de sélectionner les seuls clones avec une HPPD tolérantes

- il est de même tout à fait envisageable d'utiliser un screening vivo dans les plantes en utilisant des vecteurs de transformation des plantes, des systèmes de transformation, des systèmes de régénération et de sélection avec un inhibiteur de l'HPPD comme ceux décrits dans l'exemple 5 et 8.

Exemple 8: Evaluation de l'HPPD de *Synechocystis* non mutée et mutée, SyN318 et mutée SyA318, dans le tabac.

A) Construction des gènes chimères:

Le vecteur utilisé pour faire la construction permettant l'expression de l'HPPD de *Synechocystis* (sauvage ou mutantes) dans les plantes de tabac de type PBD6 s'appelle pRD224 (décrit dans l'exemple 5). Ce vecteur a été initialement conçu pour cloner tous les mutants de l'HPPD de *Pseudomonas* par simple remplacement du gène de l'HPPD tronquée de ce vecteur au niveau des sites Kpn I et BstE II. Il peut également servir au clonage du gène de l'HPPD de *Synechocystis* en vue de la création d'une plante transgénique.

B) Stratégie de clonage

La séquence codant pour l'HPPD de *Synechocystis* est clonée dans le vecteur pRD224 par remplacement de la séquence codant pour l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* tronquée. Cependant elle ne peut pas être clonée directement entre les sites Kpn I et BstE II, car les séquences N terminales des gènes d'HPPD de *Synechocystis* et de *Pseudomonas* sont très différentes. Mais le clonage entre le site Bam HI de l'OTP et le site BstE II est possible. Pour cela, il est nécessaire de recréer du côté 5', en amont de la séquence HPPD, le site Bam HI suivi de la partie codant pour l'OTP située en aval de Bam HI.

Le gène de l'HPPD de *Synechocystis* contenu dans le vecteur pTRC 99A est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide des amorces A et B. L'oligonucléotide A permet d'ajouter le site Bam HI en amont du gène de l'HPPD ainsi qu'une partie de la séquence de l'OTP entre le site Bam HI et le début du gène. L'oligonucléotide B permet d'ajouter le site BstE II en aval du gène. Les amorces A et B sont indiquées dans la SEQ N°17 SEQ N°18

SEQ N°17

oligonucléotideA:

5'NNNNNNNNNNGGATCCGGTGCATGGAATTCGACTATCTTC3'

SEQ N°18

oligonucléotideB:

5'NNNNNNNNNNGGTCACCAGTATTCATAATGTTAATTATG3'

La réaction d'amplification est réalisée à une température d'hybridation de 52°C. Les produits PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose. La bande d'ADN correspondant au gène HPPD est découpée puis purifiée.

Les fragments ainsi amplifiés sont digérés par Bam HI durant 1 heure à 37°C puis par BstE II durant 1 heure à 60°C. Cet insert est ensuite isolé sur gel d'agarose. La bande d'ADN correspondant au gène HPPD est découpée puis purifiée.

Ce fragment est ensuite cloné dans le vecteur binaire. Celui-ci est au préalable digéré par Bam HI et BstE II, puis séparé du fragment correspondant à l'HPPD tronquée sur gel d'agarose. Ce vecteur est alors purifié de la même manière que le gène de l'HPPD.

La ligation entre le vecteur binaire et l'insert est réalisée sur la nuit à 16°C par la T4 DNA ligase. Le mélange de ligation est utilisé pour transformer des cellules d'*E.coli*. DH10B électrocompétentes. Les clones positifs sont sélectionnés sur du milieu LB contenant de la kanamycine à 50µg/ml. La présence de l'insert d'intérêt dans le vecteur binaire est contrôlée sur gel d'agarose après minipréparation et digestion de l'ADN plasmidique par Bam HI et Sac I durant 1heure à 37°C. Le vecteur recombinant est alors utilisé pour transformer des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 électrocompétentes. La sélection se fait sur milieu LB contenant de la kanamycine à 50µg/ml. Ce vecteur recombinant est donc porteur d'un TDNA contenant le gène de résistance à la kanamycine, et une séquence codante pour un ensemble OTP-HPPD *Synechocystis* sous le contrôle du promoteur double histone et d'un terminateur Nos.

15 C) Transformation/Régénération du tabac variété PBD6

La transformation est réalisée comme cela est présentée dans l'exemple 5 sauf que la sélection est faite d'abord avec 200 mg/ml de kanamycine.

Par contre les jeunes pousses obtenues sur kanamycine sont excisées et transférées individuellement sur un milieu dépourvu d'hormones pour favoriser leur enracinement, et contenant du 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione pour sélectionner les plantules transgéniques tolérantes à cet herbicide. Il s'agit du milieu MS (SIGMA M-5519 4,4 g/l) contenant 350 mg/l de cefotaxine, 1% saccharose (p/v), et 0 ou 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione. La surproduction de l'HPPD dans les cellules transformées permet le développement de plantules chlorophylliennes tolérantes au 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, alors que les plantules issues de cellules non transformées, sensibles à l'herbicide, apparaissent totalement blanches.

Après deux semaines, les racines sont suffisamment développées pour que les plantules puissent être transférées en terre et cultivées en serre.

D) Résultats

A partir de 60 disques foliaires en moyenne, environ 40 pousses sont régénérées pour chaque construction. Après 2 jours de culture sur milieu en présence de la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, certaines plantules commencent à blanchir. Après 8 jours d'enracinement, ce blanchissement est assez significatif pour être interprétable. A 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, on constate que seules 40% des plantes contenant l'enzyme sauvage survivent, contre 72% pour les plantes contenant

l'enzyme SyA318 et 88% pour celle contenant l'enzyme SyN318. Les plantes contenant les enzymes mutées présentent donc une meilleure tolérance que celles contenant l'enzyme sauvage.

Après plus d'un mois sur 8 ppm de 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione, le nombre de plantules vertes pour la transformation avec l'HPPD sauvage est de 0%, pour SyN318 ce pourcentage est de 17 % et pour le mutant SyA318 il est de 19%.

Parallèlement si la régénération est faite sur la 2-cyano-1-[4-(méthylsulphonyl)-2-trifluorométhylphényl]-3-(1-méthylcyclopropyl)propan-1,3-dione (EP 496630), à des doses de 5 à 10 ppm (un inhibiteur moins fort des HPPD), les trois gènes permettent d'obtenir des plantes morphologiquement tout à fait conformes. Ceci confirme si besoin était que la surexpression d'une HPPD mutée ou non mutée permet d'obtenir une tolérance au laboratoire.

Ces résultats semblent en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par cinétiques enzymatiques et il semble bien possible d'établir une corrélation entre les mesures biochimiques *in vitro* et les résultats *in vivo*.

Ce dernier exemple confirme la cohérence au moins partielle entre screening *in vitro* (exemple 1), analyse biochimique (exemple 6) et tolérance d'une plante.

Exemple 9: Evaluation de l'activité d'HPPD synthétiques; mutagenèse en masse.

L'objectif est de faire des fusions entre HPPD d'organismes phylogénétiquement distincts comme les plantes monocotylédones et dicotylédones ou alors comme les plantes les bactéries, ceci ayant plusieurs avantages:

- obtenir des HPPD ayant des caractéristiques en terme d'usage de codons plus favorables pour l'expression dans les hôtes pour lesquelles une tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD est souhaitable mais difficile à obtenir avec une HPPD non chimérique,
- obtenir des HPPD ayant des caractéristiques en terme de faible affinité pour les inhibiteurs plus favorables,
- obtenir une activité HPPD *in vitro* ou *in vivo* avec un gène intéressant mais dont on ne dispose que d'un clone partiel.

On a testé des fusions de domaines N- et C-terminaux de plantes.

Fusion de domaines N et C terminaux de plantes

1) Construction

On réalise les fusions entre les régions N-terminales des dicotylédones, et la région C-terminal du maïs. On a permuté ces régions au sein des dicotylédones, proches phylogénétiquement.

La recherche de la zone de fusion s'est appuyée sur des comparaisons de séquences protéiques des différentes HPPD. Par homologie avec l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens*, dont la demanderesse connaît la structure tridimensionnelle, on a identifié les parties N-terminales d'*Arabidopsis thaliana* et de *Daucus carota*, elles se terminent respectivement aux tyrosines 219 et 212. Le gène partiel de *Zea maïs* correspond donc à 80% de la partie C-terminale de la protéine.

(cf SEQ N°18)

SEQ N°18

15	Maïs	-----	-----	-----	-----	-----	
	A.t.	MGHQNAAVSE	NQNHDDGAAS	SPGFKLVGFS	KFVRKNPKSD	KFKVKRFHHI	50
	Car 13	MGKKQSE-AE	ILSSNSSNTS	PATFKLVGFN	NFVRANPKSD	HFAVKRFHHI	49
	Ps f.	-----	-----	-----M	ADLYENPMGL	MGFEF----I	34
20	Maïs	-----	-----	-----	-----	-----	
	A.t.	EFWCGDATNV	ARRFSWGLGM	RFSAKSDLST	GNMVHASVLL	TSGDLRFLFT	100
	Car 13	EFWCGDATNT	SRRFSWGLGM	PLVAKSDLST	GNSVHASVLL	RSANLSFVFT	99
	Ps f.	EFASPTPG--	-TLEPIFEIM	-GFTKVATHR	SKNVH---LY	RQGEINLIL-	59
25	Maïs	-----	-----	-----	-----	-----	
	A.t.	APYSPSLSAG	EIKPTTTASI	PSFDHGSCRS	FFSSHGLGVR	AVAIEVEDAE	150
	Car 13	APYSPS----	TTTSSGSAAI	PSFSASGFHS	FAAKHGLAVR	AIALEVADVA	145
	Ps f.	-----	---NNEPNSI	ASY-----	FAAEHGPSVC	GMAFRVKDSQ	89
30	Maïs	-----	-----	-----	-----	-----	
	A.t.	SAFSISVANG	AIPSSPPIVL	NEAVTIAEVK	LYGDVVLRYV	SYKAEDTEKS	200
	Car 13	AAFEASVARG	ARPASAPVEL	DDQAWLA EVE	LYGDVVLRFV	SFGREE---G	192
35	Ps f.	KAYNRALELG	AQPIHIDTG-	PMELNLPAIK	GIGGAPLYLI	DRFGEG--SS	136
	Maïs	-----	-----	-----	-----	-----	
	A.t.	EFLPGFERVE	DASSFP-LDY	GIRRLDHAVG	NVPELGPALT	YVAGFTGFHQ	249
	Car 13	LFLPGFEAVE	GTASFPDLDY	GIRRLDHAVG	NVTELGPVVE	YIKGFTGFHE	242
40	Ps f.	IYDIDFVYLE	GVERN-PGA	GLKVIDHLTH	NVYR-GRMVY	WANFYEKLFN	184
	Maïs	-----	-----NSAR	--DNSENVLL	PLNEPVHGK	RRSQIQTFLD	32
	A.t.	FAEFTADDVG	TAESGLNSAV	LASNDENVLL	PINEPVHGK	RKSQIQTYLE	299
	Car13	FAEFTAEDVG	TLESGLNSV	LANNEENVLL	PLNEPVYGT	RKSQIQTYLE	292
45	Ps f.	FREARYFDIK	GEYTGLT SKA	MSAPDGMIRI	PLNE--ESSK	GAGQIEEFLM	232
	Maïs	HHGGPGVQHM	ALASDDVLRT	LREMQARSAM	GGFEFMAPPT	SDYYDGVRRR	82
	A.t.	HNEGAGLQHL	ALMSDIFRT	LREMRKRSSI	GGFDFMPSP	PTYYQNLKKR	349
	Car 13	HNEGAGVQHL	ALVSEDIFRT	LREMRKRSC	GGFEFMPSP	PTYYKNLKNR	342
50	Ps f.	QFNGEGIQHV	AFLTDDL VKT	WDALKK---I	-GMRFMTAPP	DTYYEMLEGR	278
	Maïs	AGDVLTEAQI	KECQELGVLV	DRDDQGVLLQ	-----I	FTKPVGD--R	121
	A.t.	VGDVLSDDQI	KECEELGILV	DRDDQGTLLQ	-----I	FTKPLGD--R	388
	Car 13	VGDVLSDEQI	KECEDLGILV	DRDDQGTLLQ	-----I	FTKPVGD--R	381
55	Ps f.	LPD--HGEPV	---DQL----	--QARGILLD	GSSVEGDKRL	LLQIFSETLM	317
	Maïs	PTLFLEIIQR	IGCMEXDEKG	QEYQKGGCGG	FGKGNFSQLF	KSIEDYEKSL	171

A.t.	PTFIEIIR VGCMMKDEEG KAYQSGGCGG FGKGNFSELF KSIEEYEKTL	439
Car13	PTLFIEIIR VGCMLKDDAG QMYQKGGCGG FGKGNFSELF KSIEEYEKTL	431
Ps f.	GPVFFEFIQR KG----DD-- -----G FGEGNFKALF ESIER-DQVR	351
5	Maïs EAKQAAAAAA AQGS	185
A.t.	EAKQLVG--- ----	445
Car13	EAKQITGSAA A---	442
Ps f.	RGVLTAD--- ----	358

10 Comparaison de séquences peptidiques des HPPD de *Zea maïs*, , et .

Maïs HPPD de *Zea maïs*,

A.t. HPPD de *Arabidopsis thaliana*

Car13 HPPD de *Daucus carota*

Ps f. HPPD de *Pseudomonas fluorescens*

15

On a choisi, comme zone d'échange, la région PINEP, très conservée chez les plantes. Ce qui est avant est notre N-terminal et ce qui est après est notre C-terminal. Par l'étude des séquences nucléotidiques, on a cherché à introduire un site de restriction, si possible unique, et qui ne modifie pas ou peu la séquence protéique, dans cette région. Le site de restriction AgeI qui répond à ces critères peut être obtenu en modifiant l'usage de codons pour les acides aminés E et P adjacents.

20

Le site AgeI a été introduit par mutagenèse dirigée en utilisant la méthode USE pour les HPPD d'*Arabidopsis thaliana* et de *Daucus carota*, à l'aide des oligonucléotides dégénérés AgeAra, AgeCar et avec l'oligonucléotide de sélection USE AlwNI utilisable avec le vecteur pTRc.

25

AgeAra (5'pCCGATTAACGAACCGGTGCACGGAAC3')

AgeCar (5'pCCCTTGAATGAACCGGTGTATGGGACC3')

30

USE AlwNI (5'pCTAATCCTGTTACCGTTGGCTGCTGCC3')

On a utilisé la mutagenèse par PCR pour introduire, dans le même, temps le site SalI en fin de gène et le site AgeI chez *Zea maïs*, afin de faciliter le sous-clonage de toutes les fusions, dans le même vecteur, aux mêmes sites. Les amorces utilisées sont AgeMaïs et SalMaïsRev.

35

AgeMaïs (5'CCGCTCAACGAACCGGTGCACGGCACC3')

SalMaïsRev (5'GCAGTTGCTCGTCGACAAAGCTCTGTCC3')

Après remplacement du fragment AgeI/SalI du clone d'HPPD d'*Arabidopsis thaliana* par le fragment AgeI/SalI de *Zea maïs* ou de *Daucus carota*, on a obtenu les clones codant pour les HPPD chimériques d'*Arabidopsis thaliana* / *Zea maïs* et d'*Arabidopsis thaliana* / *Daucus carota* notés pFAM et pFAC (pour Fusion de N-terminal d'*Arabidopsis thaliana* avec un C-terminal de Maïs ou de Carotte). De la même façon, avec le clone d'HPPD de *Daucus carota*, on a obtenu les clones pFCM et pFCA.

45

2) Activité in vivo

AgeMaïs (5'CCGCTCAACGAACCGGTGCACGGCACC3')

SalMaïsRev (5'GCAGTTGCTCGTCGACAAGCTCTGTCC3')

Après remplacement du fragment AgeI/SalI du clone d'HPPD d'*Arabidopsis thaliana* par le fragment AgeI/SalI de *Zea maïs* ou de *Daucus carrota*, on a obtenu les clones codant pour les HPPD chimériques d'*Arabidopsis thaliana* / *Zea maïs* et d'*Arabidopsis thaliana* / *Daucus carrota* notés pFAM et pFAC (pour Fusion de N-terminal d'*Arabidopsis thaliana* avec un C-terminal de Maïs ou de Carotte). De la même façon, avec le clone d'HPPD de *Daucus carrota*, on a obtenu les clones pFCM et pFCA.

2) Activité in vivo

Le brunissement des colonies isolées, reflet de l'activité de l'HPPD, a été observé pour les fusions FAM, FAC, FCA et FCM. En comparaison avec les HPPD d'origine d'*Arabidopsis thaliana* (FAA) et de *Daucus carrota* (FCC), le brunissement a été noté sur une échelle de 1 à 10, 10 représentant le plus fort brunissement (comme décrit dans l'exemple 1)

fragment N-terminal	fragment C-terminal		
	**C	**M	**A
FC*	5	2	2
FA*	9	9	10

Globalement, l'activité baisse pour chaque fusion en comparaison à l'HPPD fournissant le domaine N-terminal complet et début du domaine C-terminal.

Dans le cas où le N-terminal provient d'*Arabidopsis thaliana*, la baisse d'activité est faible mais dans le cas où le N-terminal provient de *Daucus carrota*, l'activité mesurée chute plus nettement.

Ces expériences démontrent néanmoins que les HPPD chimères sont des enzymes actives, et qu'il est aujourd'hui tout à fait possible d'exprimer ces chimères dans les plantes, et par exemple d'exprimer une HPPD avec un N-terminal de dicot et un C-terminale de monocot dans les plantes.

L'invention comprend en outre:

- un gène chimère comprenant au moins deux gènes chimères élémentaires comprenant chacun des éléments de régulation nécessaires à sa transcription dans les plantes et une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide autre qu'un inhibiteur de la phényl pyruvate dioxygénase(HPPD) ;
- un vecteur utilisable pour la transformation génétique des plantes comprenant un gène chimère selon l'invention;

- un procédé de transfert de gène dans une cellule par électroporation et
- un procédé de criblage d'inhibiteurs de l'HPPD utilisant comme cible une séquence d'ADN selon l'invention.

REVENDICATIONS

1. Séquence d'ADN pouvant s'hydrider avec une séquence d'ADN codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), caractérisée en ce qu'elle est mutée au moins une fois.
2. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle code pour une HPPD mutée au moins une fois dans sa partie C-terminale.
3. Séquence selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle code pour une HPPD mutée au moins une fois entre l'acide aminé équivalent à la phénylalanine en position 155 de l'HPPD de *P. fluorescens* strain A32 et l'acide aminé équivalent à l'acide aspartique en position 358 de l'HPPD de *P. fluorescens* strain A32.
4. Séquence selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle code pour une HPPD mutée au moins une fois entre l'acide aminé équivalent à la phénylalanine en position 333 de l'HPPD de *P. fluorescens* strain A32 et l'acide aminé équivalent à l'asparagine 337 de l'HPPD de *P. fluorescens* strain A32.
5. Séquence selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle code pour une HPPD mutée au moins une fois au niveau de la proline 215.
6. Séquence selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est d'origine bactérienne.
7. Séquence selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est issue de *Pseudomonas sp.*
8. Séquence selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle est issue de *Synechocystis*.
9. Séquence selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est d'origine végétale.
10. Séquence selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle est issue d'*Arabidopsis*.

11. Séquence selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'elle est issue d'une ombellifère.
- 5 12. Séquence selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'elle est issue de *Daucus carotta*
13. Séquence selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'elle est issue de *Zea mays*.
- 10 14. Séquence d'ADN pouvant s'hydrider avec une séquence d'ADN codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), caractérisée en ce que celle-ci comprend une partie C-terminale d'une première séquence d'ADN codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) et une partie N- terminale d'une seconde séquence d'ADN, codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) différente de la première.
- 15 15. Séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisée en ce que la séquence non mutée de base est une séquence selon la revendication 14.
- 20 16. Procédé d'obtention d'une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 13 et 15, caractérisé en ce qu'on isole un gène d'origine quelconque codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) et on effectue une mutation dans la partie C-terminale de cette séquence.
- 25 17. Gène chimère pour la transformation génétique des plantes comprenant, dans le sens de la transcription:
 - au moins une séquence de régulation promotrice issue d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes,
 - une séquence codante hétérologue,
 - au moins une séquence de polyadénylation,
- 30 caractérisé en ce que la séquence codante est une séquence d'un gène, qui code pour l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), selon l'une des revendications 1 à 13.
- 35 18. Gène chimère selon la revendication 17, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice favorise la surexpression de la séquence codante.
19. Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce que la séquence de régulation promotrice comprend au moins un promoteur d'histone.

20. Gène chimère selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit.
- 5
21. Gène chimère selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit optimisé comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.
- 10
22. Gène chimère selon l'une des revendications 17 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, une séquence d'un activateur de transcription (enhancer).
- 15
23. Gène chimère selon l'une des revendications 17 à 22 comprenant au moins deux gènes chimères élémentaires comprenant chacun des éléments de régulation nécessaires à sa transcription dans les plantes et une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide autre qu'un inhibiteur de la phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).
- 20
24. Vecteur utilisable pour la transformation génétique des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 17 à 23.
- 25
25. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend un gène chimère selon l'une des revendications 17 à 23.
- 30
26. Plante, caractérisée en ce qu'elle est à base de cellules selon la revendication 25.
27. Plante, selon la revendication 26, caractérisée en ce qu'elle appartient à la famille des dicotylédones.
- 35
28. Séquence d'acides-amino de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), caractérisée en ce qu'elle est mutée au moins une fois.

29. Séquence d'acides-amino selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle est mutée au moins une fois dans sa partie C-terminale.
- 5 30. Séquence d'acides-amino de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle est mutée au moins une fois entre l'acide aminé équivalent à la phénylalanine en position 155 de l'HPPD de *P. fluorescens* strain A32 et l'acide aminé équivalent à l'acide aspartique en position 358 de l'HPPD de *P. fluorescens* strain A32.
- 10 31. Séquence d'acides-amino de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle est mutée au moins une fois au niveau de la proline 215.
- 15 32. Procédé de transformation de plantes pour les rendre tolérantes aux inhibiteurs de l'HPPD, caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule végétale une séquence selon l'une des revendications 1 à 13 d'un gène exprimant un HPPD exogène.
- 20 33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que le transfert est effectué avec *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*.
34. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que le transfert est effectué par apport par bombardement à l'aide de particules chargées de l'ADN.
- 25 35. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que le transfert est effectué par électroporation.
- 30 36. Procédé de transformation de plantes, caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule végétale un gène exprimant un HPPD exogène selon l'une des revendications 1 à 13 comme marqueur de sélection.
37. Procédé de traitement herbicide sélectif de plantes, caractérisé en ce qu'on applique au lieu de culture d'une plante selon l'une des revendications 26 et 27 un inhibiteur de l'HPPD.
- 35 38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène de l'HPPD est un isoxazole.

39. Procédé selon la revendication 38, caractérisé en ce que l'isoxazole est le 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfoyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.
- 5 40. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène de l'HPPD est un dicétonitrile.
- 41 Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène de l'HPPD est 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl)propan-1,3-dione.
- 10 42. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est une tricétone.
43. Procédé selon la revendication 42, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène 15 l'HPPD est la sulcotrione.
44. Procédé de criblage d'inhibiteurs de l'HPPD caractérisé en ce qu'on utilise comme cible une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 13.

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

de la

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 552100
FR 9714264

PROPRIETE INDUSTRIELLE

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	LEE M. ET AL.: "The C-terminal of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is indispensable for enzyme activity" FEBS LETTERS, vol. 393, no. 2,3, 16 septembre 1996, pages 269-272, XP002070559	1,2, 14-16, 28,29
Y	* le document en entier *	6-13, 17-22, 24-27
Y,D	--- WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ;SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5 décembre 1996 * le document en entier *	6-13, 17-22, 24-27
A	--- WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 juillet 1997 * le document en entier, pref. p.13 l.20 - p.14 l.4 *	1-44
A	--- GARCIA I. ET AL.: "Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA" BIOCHEMICAL JOURNAL, (1997 AUG 1) 325 (PT 3) 761-9. JOURNAL CODE: 9Y0. ISSN: 0264-6021., XP002070560 * le document en entier, pref. p.767 col. droite l.44 - p.768 col. gauche l.45 *	1-44
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N C12Q A01H
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
6 juillet 1998		Kania, T
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 552100

FR 9714264

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	PADGETTE S R ET AL: "SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF A CONSERVED REGION OF THE 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVE SITE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 33, 25 novembre 1991, pages 22364-22369, XP002023053 * le document en entier *	1-44
E	WO 98 04685 A (HIRAYAMA LYNNE MIYO ;SINGH BIJAY (US); BASCOMB NEWELL (US); STURNE) 5 février 1998 * le document en entier *	1,9,10, 17-28, 32-44
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
6 juillet 1998		Kania, T
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 B3.92 (P04C13)