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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
1 février 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/07632 A1

(51) Classification internationale des brevets[7]: C12N 15/63, 15/82, 5/10, A01H 5/00, 5/10

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02130

(22) Date de dépôt international: 25 juillet 2000 (25.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/09990 28 juillet 1999 (28.07.1999) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)*: **RHO-BIO** [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)*: **PEREZ, Pascual** [FR/FR]; 17, chemin de la Pradelle, Varennes, F-63450 Chanonat (FR). **GARCIA, Denise** [FR/FR]; 48, route de la Roche Blanche, F-63450 Le Crest (FR).

(74) Mandataires: **TETAZ, Franck** etc.; Aventis CropScience S.A., Dépt. Propriété Industrielle, 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).

(81) États désignés *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés *(régional)*: brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:
— *Avec rapport de recherche internationale.*
— *Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 01/07632 A1

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING ISOGENIC TRANSGENIC LINES

(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE LIGNEES ISOTRANSGENIQUES

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining isogenic transgenic lines, characterised in that it comprises a step for targeting the genome receiving a T-DNA after transformation of a hybrid. The invention also concerns commercial hybrids produced by cross-breeding of the resulting isogenic transgenic lines with other lines of interest.

(57) Abrégé: Cette invention concerne un procédé d'obtention de lignées isotransgéniques caractérisé en ce qu'il comprend une étape permettant de cibler le génome receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride. Rentrent également dans le cadre de l'invention les hybrides commerciaux produits par croisement des lignées isotransgéniques ainsi obtenues avec d'autres lignées d'intérêt.

Procédé d'obtention de lignées isotransgéniques

L'invention concerne un procédé d'obtention de lignées isotransgéniques caractérisé en ce qu'il comprend une étape permettant de cibler le génome receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride, ainsi que les hybrides commerciaux produits à partir de ces lignées isotransgéniques.

Par l'expression 'lignées isotransgéniques', on entend des lignées transgéniques isogéniques, l'isogénie étant définie par l'état d'un génotype ne différant d'un autre que par un très petit nombre de gènes (1 ou 2), souvent obtenu par rétrocroisement. Les lignées isotransgéniques selon l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont fixées en génotype pur 'lignée d'intérêt' sur l'ensemble du génome et ont intégré de façon stable l'ADN-T contenant le transgène. Elles ont la particularité d'être exemptes de tout fragment provenant de la lignée de transformation et pouvant constituer un fardeau génétique pour les étapes ultérieures de sélection.

Par 'ADN-T' ou ADN de transfert, on entend le fragment d'ADN contenant le gène d'intérêt et les séquences permettant son expression, qui est transféré et intégré dans le génome de l'hôte au cours de la transformation.

On distinguera dans le cadre de l'invention deux types de lignées : les lignées de transformation ou aptes à la transformation, de type A188 par exemple ; et les lignées non aptes à la transformation, nommées ci-après lignées d'intérêt ou lignées agronomiques. Par 'lignées élites', on désignera des lignées agronomiques présentant un potentiel commercial important à une période donnée. Les lignées élites présentent des propriétés agronomiques liées à l'expression de traits de caractère phénotypique relatifs notamment à leur croissance végétative et au rendement, ces propriétés agronomiques étant des caractéristiques techniques marquant leur potentiel commercial, c'est à dire leur aptitude à être employées dans des programmes de sélection variétale pour la mise sur le marché de lignées commerciales.

Le développement d'hybrides commerciaux implique généralement plusieurs étapes : (1) développement de lignées pures homozygotes parentales, à partir de matériel génétique sélectionné sur ses potentialités ; (2) croisement de ces lignées pour l'obtention

d'hybrides et (3) évaluation du potentiel commercial de ces hybrides, en fonction des traits de caractères phénotypiques acquis et de leur vigueur hybride ou hétérosis (croissance végétative et rendement). Ce potentiel commercial est d'autant plus grand que les lignées parentales appartiennent à des groupes hétérotiques variés et possèdent des caractéristiques intéressantes. D'où l'importance accordée à la Recherche et au Développement de lignées parentales améliorées, notamment par transgénèse.

Cependant, les techniques de transformation de plantes développées jusqu'ici, ne permettent pas aujourd'hui de transformer directement et efficacement la grande majorité des lignées agronomiques, dont les lignées élites, qui sont récalcitrantes ou non aptes à la transformation (efficacité nulle ou de l'ordre de 1/10 à 1/100), notamment chez le maïs.

De nombreux travaux ont donc porté d'une part, sur l'amélioration des conditions de culture *in vitro* pour les étapes de transformation et régénération et d'autre part, sur la recherche d'un matériel végétal de départ présentant une bonne efficacité de transformation.

Une meilleure connaissance des facteurs environnementaux a ainsi permis d'optimiser les conditions de culture *in vitro* (transformation et régénération) pour une adaptation à un plus grand nombre de génotypes ; mais ces améliorations ne suffisent pas à surmonter la récalcitrance de certains génotypes, notamment ceux d'intérêt agronomique (Armstrong et al., 1992).

Le choix d'un autre matériel végétal que les lignées pures, souvent récalcitrantes à la transformation, a donc été proposé pour la mise au point de procédés, notamment chez le maïs :

1) transformation d'une lignée donneuse apte à la transformation de type A188 (Armstrong et al., 1985) suivie de rétrocroisements successifs avec des lignées pures receveuses non aptes à la transformation, pour obtenir une lignée 'isotransgénique' (au moins 5 à 6 rétrocroisements nécessaires, si l'on veut atteindre l'isogénie parfaite). Dans la pratique, les lignées résultantes de ces rétrocroisements sont au mieux 'pseudo-isogéniques', car un fragment du génome de la lignée donneuse est irrémédiablement lié au transgène. Selon sa taille et sa nature, fonction des processus de recombinaison et/ou de la disponibilité limitée de marqueur moléculaire pour faire le tri, ledit fragment peut constituer un fardeau génétique gênant pour les étapes de sélection ultérieures ; de plus, les phénomènes de recombinaison qui permettraient de réduire ce fardeau sont des événements

rares, la recombinaison entre séquences homéologues étant moins efficace qu'entre séquences homologues, rendant obsolètes les gros efforts de rétrocroisements. Il y a donc un risque important de générer des effets génétiques négatifs dans le produit hybride final, via l'utilisation de matériel de départ de type A188 apte à la transformation.

2) transformation directe d'un hybride 'lignée de transformation x lignée d'intérêt agronomique' (Ishida et al., 1996). Celui-ci, associant les aptitudes à la transformation / régénération et les caractéristiques agronomiques de chacune des lignées parentales, peut apparaître comme un matériel végétal de départ plus favorable à la production d'hybrides commerciaux *in fine*. Mais les résultats obtenus par Ishida et al. (1996) montrent que l'efficacité de transformation de l'hybride est bien plus faible que celle obtenue pour la lignée de génotype A188. Par ailleurs, les risques de fardeau génétique dans le produit final ne sont pas évités, puisque le transgène peut s'intégrer sur l'un ou l'autre des chromosomes de l'hybride (c'est-à-dire sur le chromosome lignée donneuse de type A188 dans 50% des cas).

La demande internationale WO 98/32326 (Pioneer) propose de jouer sur les deux paramètres- conditions de culture in vitro et matériel végétal- pour améliorer l'efficacité de transformation d'une part, et rendre d'autre part le procédé de base décrit par Ishida et al. (1996) applicable à d'autres lignées que A188. Cette équipe mentionne une efficacité de transformation meilleure que celle obtenue avec le protocole de base, mais cette efficacité reste encore faible dans le cas des lignées non aptes à la transformation.

On ne disposait donc pas à ce jour de procédé global ni de matériel végétal pour l'obtention de lignées 'isotransgéniques' vraies, intégrant à la fois les besoins en haute fréquence de transformation (excluant l'utilisation de lignées pures non aptes à la transformation) et la nécessité d'avoir une isogénie vraie pour les lignées transgéniques produites (indiquant au contraire l'utilisation de ces lignées pures, pour éviter tout fardeau génétique provenant de la lignée de transformation).

La présente invention permet d'apporter une solution originale à ce problème en mettant au point un nouveau procédé d'obtention de lignées isotransgéniques intégrant une étape qui permet de cibler le génome receveur de l'ADN-T. Ce procédé, basé sur la transformation d'hybride, est en fait caractérisé par une étape de sélection des transformants primaires qui ont intégré uniquement l'ADN-T dans le génome de type non apte à la transformation (*a priori* 50% des transformants). Ces transformants sélectionnés

conduiront à la création de lignées isotransgéniques après rétrocroisements desdits transformants avec la lignée d'intérêt agronomique parentale.

Cette étape de sélection des transformants ayant intégré le transgène dans le génome de type non apte à la transformation n'avait jamais été suggérée ni décrite dans l'art antérieur. Elle est avantageuse en ce qu'elle permet d'obtenir *in fine* une lignée isotransgénique 'vraie', c'est-à-dire exempte de tout fragment provenant de la lignée apte à la transformation, tout en gardant un niveau d'efficacité de transformation acceptable. De plus, elle permet d'améliorer la rapidité du transfert du gène d'intérêt dans un génome pur, en diminuant le nombre de rétrocroisements nécessaires.

Le procédé selon l'invention, intégrant cette étape de sélection des transformants primaires, permet de mieux répondre aux exigences industrielles, en matière de rapidité et efficacité, que ne le faisaient les procédés décrits jusqu'à lors.

De plus, ce procédé présente un grand intérêt, notamment lorsque la lignée d'intérêt entre dans de nombreuses formules hybrides ou lorsqu'il s'agit de lignées dominant un marché important. Il permet la production de plantes transgéniques pouvant exprimer, à titre d'exemples, un ARN antisens, un ribozyme ou une protéine d'intérêt lui conférant une résistance aux maladies/pathogènes et/ou une qualité agronomique ou nutritionnelle améliorée (acides aminés, huile, amidon...).

L'utilisation de ce procédé permet également de varier les sources génétiques des lignées de grands groupes hétérotiques, utilisées comme lignées parentales pour la production d'hybrides commerciaux. Elle rend également possible l'empilement de plusieurs caractères transgéniques dans les lignées agronomiques sans addition de fragments provenant de la lignée de transformation, et pouvant faire l'objet d'un fardeau génétique. Cette perspective intéresse notamment la diversification des sources génétiques pour la production d'hybrides commerciaux ayant conservé une bonne vigueur hybride, voire même améliorée.

Selon un premier mode de réalisation, le procédé d'obtention de lignées isotransgéniques de plantes selon l'invention comprend les étapes suivantes de :

a) transformation des cellules végétales d'un hybride de plante constitué par le croisement de deux lignées parentales, une lignée d'intérêt et une lignée apte à la transformation, avec un vecteur porteur d'un ADN-T contenant un transgène;

b) sélection des transformants primaires hybrides ayant intégré ledit ADN-T uniquement, dans le génome de la lignée d'intérêt ;

c) rétrocroisements avec la lignée parentale d'intérêt desdits transformants primaires sélectionnés en b), et sélection des individus issus de ces rétrocroisements jusqu'à l'obtention de lignées isotransgéniques.

De préférence, parmi les transformants primaires hybrides, sont préalablement choisis ceux qui présentent une insertion monolocus ou monocopie de l'ADN-T, c'est-à-dire ayant intégré de préférence une copie du transgène (monocopie) ou éventuellement plusieurs copies en tandem, au même locus chromosomique. Les individus monocopies sont notamment préférés en ce qu'ils ne sont pas affectés par le phénomène d'extinction de gènes, connu pour les insertions multicopies et qu'ils permettent un suivi simplifié du transgène. Par l'expression 'insertion sans séquence extrabordure', on entend des transformants qui ont intégré uniquement l'ADN-T contenant le transgène, sans le transfert de séquences plasmidiques extérieures à l'ADN-T, nommées extrabordures.

La sélection des transformants monolocus, monocopie de préférence, et dépourvus de séquence extrabordure, peut notamment être réalisée par la technique Southern avec plusieurs enzymes de restriction et plusieurs sondes (Southern, 1975), permettant d'identifier et caractériser l'insertion dans le génome de la plante, et de différencier ainsi les événements de transformation.

Le procédé est caractérisé en ce que l'étape de sélection des transformants primaires hybrides consiste à identifier les séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré pour déterminer le génome parent receveur dudit ADN-T.

Pour chaque transformant primaire qui s'est révélé conforme au phénotype attendu et qui a été sélectionné suivant les critères- monolocus ou monocopie et absence d'extrabordures- les séquences génomiques de l'hôte adjacentes à l'ADN-T peuvent être isolées et identifiées, par exemple via une méthodologie basée sur la PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki Rk. et al., 1988), de préférence IPCR (Inverse PCR, Does Mp. Et al., 1991). Le but étant d'identifier l'origine parentale du génome accepteur du transgène (lignée d'intérêt agronomique ou lignée de transformation).

Enfin l'identification, pour chaque transformant, du génome de la lignée parentale ayant intégré l'ADN-T, peut notamment être basée sur la mise en évidence d'un polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP, Restriction Fragment

Length Polymorphism, Burr B. et al., 1983) entre les lignées parentales et le transformant, en utilisant comme sondes, le ou les fragments génomiques adjacents, précédemment identifiés.

De façon alternative, le séquençage des bordures génomiques de l'ADN-T et la mise en évidence de SNP (Single Nucleotid Polymorphism) par comparaison avec les séquences des lignées parentales, peuvent également permettre l'identification du génome parent receveur.

De plus, lesdites séquences génomiques adjacentes identifiées peuvent encore être utilisées comme sondes sur une population de cartographie connue de l'homme de l'art, pour identifier le chromosome porteur de l'insertion et la position de celle-ci, selon les techniques de cartographie (par exemple Murigneux et al., 1993). Ceci permet de choisir quelques marqueurs autour de cette position, à utiliser avantageusement dans les étapes ultérieures de sélection des individus backcrossés.

La construction de vecteurs d'expression pour la transformation (étape a) est à la portée de l'homme du métier suivant les techniques standards, comme décrit par exemple dans Sambrook et al. (1989). Lesdits vecteurs d'expression peuvent contenir une séquence nucléotidique en sens ou en antisens codant par exemple pour une protéine d'intérêt (qualité agronomique, nutritionnelle ou thérapeutique), ou protéine de résistance à des maladies et/ou pathogènes (herbicide, insecticide), ou un marqueur de sélection, ou un ARN antisens ou un ribozyme..., ainsi que des séquences régulatrices permettant son expression chez la plante (promoteur- constitutif ou inductible ou spécifique/ peptide adressage/ terminateur). Weising et al. (1988) décrit notamment des promoteurs, séquences de polyadénylation, gènes marqueurs de sélection, gènes reporteurs, enhancers, introns utilisables dans le cadre de l'invention. Parmi les séquences nucléotidiques d'intérêt, on peut citer tous les acides nucléiques permettant de donner ou améliorer un trait de caractère bénéfique chez la plante transgénique résultante. Par exemple, l'acide nucléique peut coder pour des protéines ou des transcrits ARN antisens pour favoriser une augmentation des valeurs mutritionnelles, du rendement, de la résistance aux pathogènes, aux maladies.... De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128.

A titre d'exemple, on peut citer :

- le gène bactérien dapA pour augmenter le taux de lysine ;

- le gène de l'endotoxine Bt ou d'un inhibiteur de protéase ou de protéines extraites de bactéries comme Photorabus (WO 97/17432 & WO 98/08932) pour la résistance aux insectes ;
- parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases (WO92/01792), les glucanases (WO 93/02197), l'oxalate oxydase (WO 94/13790), ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et WO 99/09189), la drosomicine (WO 99/02717), la thanatine (WO 99/24594) ou l'héliomicine (WO 99/53053). Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun et al., 1993 ; Panabières et al., 1995).
- le gène *bar* ou *pat* conférant une tolérance au bialaphos, un gène bactérien ou végétal codant pour une EPSPS pour la résistance à l'herbicide glyphosate (US 4,940,835, US 5, 188, 642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,312,910, US5,633,435, US5,627,061, US 5,310,667, WO 97/04103) ; le gène codant pour la glyphosate oxydioréductase (US 5,463,175), un gène bactérien ou végétal codant pour une HPPD native, mutée ou chimère (WO 96/38567, WO 98/02562, WO 99/24585, WO 99/24586) conférant une tolérance aux herbicides ayant pour cible l'HPPD (i.e diketones, isoxazoles, mésotrione, etc) ;
- des gènes impliqués dans les procédés de biosynthèse conduisant à un changement de la qualité des produits de la plante transgénique, tels que les gènes codant pour des enzymes de la biosynthèse ou la dégradation de l'amidon (i.e synthases, enzymes de branchement de l'amidon...) ; gènes codant pour des protéines de stockage du grain (i.e sous-unités de gluténines, gliadines, hordéines) ; gènes liés à la force du grain dans le blé (i.e puroindolines).
- les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On

citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés (Korit, A.A. et al. ; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et WO 99/09189), la drosomicine (WO 99/02717), la thanatine (WO 99/24594) ou l'héliomicine (WO 99/53053).

- des gènes de la stérilité mâle artificielle (i.e barnase, and PR-glucanase sous contrôle d'un promoteur approprié) peuvent également être utilisées pour la production de semences hybrides.

Les séquences nucléiques d'intérêt peuvent également être introduites en tant qu'outil génétique pour générer des mutants et/ou assister l'identification, le marquage moléculaire ou l'isolation de segments de gènes de plantes. D'autres exemples sont décrits dans Weising et al.

Le vecteur d'expression comprenant la séquence nucléique d'intérêt à introduire dans la plante contiendra généralement un marqueur de sélection ou un gène rapporteur ou les deux, pour faciliter l'identification ou la sélection des cellules transformées. De façon alternative, le marqueur de sélection peut être porté par un second vecteur et utilisé en cotransformation. Ces séquences doivent être flanquées de séquences régulatrices appropriées pour permettre leur expression dans les plantes. Les marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme de métier et incluent, par exemple, des gènes de résistance aux antibiotiques et aux herbicides. Des exemples particuliers sont décrits dans Weising et al ou les demandes de brevets EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103. Un marqueur de sélection préféré est l'hygromycine B phosphotransferase (hpt), qui peut être dérivée de E. Coli. On peut également citer le gène de l'aminoglycoside phosphotransferase du transposon n5 (AphII) qui code pour la résistance aux antibiotiques kanamycine, neomycine, et G418, ainsi que

les gènes qui codent pour la résistance ou la tolérance au glyphosate, bialaphos, methotrexate, imidazolinones, sulfonylurées, bromoxynil, dalapon et dérivés. Les gènes marqueurs de sélection conférant une tolérance aux herbicides présentent également une utilité commerciale dans les plantes transformées résultantes. Le gène rapporteur est généralement un gène qui n'est pas présent ou exprimé dans l'organisme ou tissu receveur et qui code pour une protéine dont l'expression est mise en évidence par des propriétés détectables, comme un changement phénotypique ou une activité enzymatique. Des exemples sont donnés dans Weising et al. Parmi les gènes préférés, on peut citer le gène de la Chloramphenicol Acetyl Transferase (cat) de tn9 de *E. Coli*, le gène de la beta-glucuronidase (gus) au locus uidA de *E. Coli*, le gène de la Green Fluorescent Protein (GFP) de *Aequoria victoria*, et le gène de la luciferase de *Photinus pyralis*.

Les séquences régulatrices incluent également des promoteurs constitutif, inductible, spécifique d'un tissu ou d'un organe, ou spécifique du stade développement et qui peuvent être exprimés dans la cellule végétale. De tels promoteurs sont décrits dans Weising et al.

On peut également citer :

- les séquences régulatrices de l'ADN-T de *A. tumefaciens*, incluant la mannopine synthase, la nopaline synthase, l'octopine synthase
- le promoteur de l'aclcohol dehydrogénase de maïs ;
- les promoteurs induits par la lumière tels que le gène de la petite sous-unité de la ribulose-biphosphate-carboxylase d'une variété d'espèces et le promoteur du gène de la protéine de liaison chlorophylle a/b ;
- les promoteurs d'histone (EP 507 698), éventuellement combinés avec le premier intron de l'actine de riz (WO 99/34005) ;
- le promoteur de l'ubiquitine 1 de maïs (Christensen et al., 1996)
- le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou le promoteur 19S ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S), décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;
- le promoteur pCRU du gène de la cruciférine de radis permettant l'expression des séquences associées uniquement dans les semences (ou graines) de la plante transgénique obtenue (Depigny-This et al., 1992) ;

- les promoteurs pGEA1 et pGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'Arabidopsis thaliana (Gaubier et al., 1993) et permettant une expression spécifique dans les graines ;
- le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (pAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1990 ;
- le promoteur HMWG (High Molecular Weight Glutenin) de blé par Robert et al., 1989 ;
- les promoteurs régulés au cour du développement tels que les promoteurs waxy, zéine ou bronze du maïs ;
- les promoteurs spécifiques d'un organe ou d'un stade de développement, tels que le promoteur de l'alpha-tubuline décrit dans US 5,635,618.
- le promoteur du gène de zéine de maïs (Pzéine) permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs (Reina et al., 1990) ;
- le promoteur N d'un clone génomique de maïs, dont le cDNA est référencé dans la publication de Shen et al. (1994).

On peut encore utiliser une séquence de régulation promotrice spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines (Datla, R. et al., 1997), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460), de l'oélosine (WO 98/45461), de l'ATS1 ou de l'ATS3 (WO 99/20775).

On peut également employer un promoteur inductible avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de proteinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'amino cyclopropane carboxylate syntase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

D'autres éléments tels que les introns, enhancers, séquences de polyadénylation et dérivées, peuvent également être présentes dans la séquence nucléique d'intérêt, pour obtenir améliorer l'expression ou le fonctionnement du gène transformant. A titre d'exemple d'enhancer, l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (VET) décrit par

Carrington & Freed (1990). Parmi les introns utilisables, le premier intron Adh1S de maïs peut être placé entre le promoteur et la séquence codante d'une séquence nucléique d'intérêt. Cet intron, inclus dans une construction génétique, est connu pour augmenter l'expression d'une protéine dans les cellules de maïs (Callis et al., 1987). On peut également utiliser le premier intron du gène shrunken-1 de maïs (Maas et al., 1991), le premier intron du gène de la catalase du pois castor (cat-1) (Ohta et al., 1990) ; le second intron du gène ST-LS1 de la catalase de pomme de terre (Vancanneyt et al., 1990) ; l'intron du virus DSV nain jaune du tabac(Morris et al. 1992) ; l'intron actine –1 (act-1) du riz (McElroy et al. 1990) et l'intron 1 de la triose phosphate isomérase (TPI) (Snowden et al., 1996). Cependant, une expression suffisante peut souvent être obtenue sans intron (Battraw et al., 1990).

Le vecteur d'expression peut aussi comprendre des séquences codant pour un peptide de transit, pour amener la protéine codée par le gène hétérologue dans les chloroplastes des cellules de plante. Ces peptides de transit bien connus de l'homme de métier peuvent inclure les peptides de transit simples ou multiples, obtenus par la combinaison de séquences codant pour au moins deux peptides de transit. Le peptide de transit peut être simple, comme un peptide de transit d'EPSPS (décrit dans le brevet US 5,188,642) ou un peptide de transit de celui de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (ssu RuBisCO) d'une plante, éventuellement comprenant quelques acides aminés de la partie N-terminale de la ssu RuBisCO mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la séquence N-terminale d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la ssu RuBisCO de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la ssu RuBisCO de maïs fusionnée au peptide de transit de la ssu RuBisCO de maïs tel que décrit avec sa séquence codante dans le brevet EP 508 909. Un peptide transit préféré est Peptide de Transit Optimisé (OTP) décrit dans le brevet US 5,635,618.

La transformation de cellules végétales de l'hybride peut être réalisée par les techniques connues de l'homme de métier.

On peut citer notamment les méthodes de transfert direct de gènes telles que la microinjection directe dans des embryoides de plante (Neuhaus et Coll., 1987), l'infiltration sous vide (Bechtold et al., 1993) ou l'électroporation (Chupeau et Coll., 1989) ou encore la précipitation directe au moyen de PEG (Schocher et Coll., 1986) ou le bombardement par canon de particules (Fromm M. et al., 1990).

On peut également infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'*Agrobacterium*. Selon un mode de réalisation du procédé de l'invention, les cellules végétales sont transformées par un vecteur selon l'invention, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné. Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite dans l'article d'An et al.(1986), ou encore *Agrobacterium* rhizogenes, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin et al., 1987.

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti *d'Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al). Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces deux vecteurs, la région de l'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droits et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence vir, nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

De manière préférentielle, la transformation de cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole décrit par Ishida et al (1996), notamment à partir d'embryons immatures de 10 jours après la fécondation.

De façon alternative, on peut utiliser la méthode de transformation d'embryons immatures décrite dans la demande internationale WO 98/32326, ou la méthode de transformation des inflorescences de plantes monocotylédones décrite dans la demande de brevet WO 99/67357.

Les deux lignées parentales de l'hybride sont ainsi choisies : pour l'une, sur son aptitude à la transformation (lignée parentale de transformation) et pour l'autre, sur sa polyvalence ou son importance commerciale sur le marché (lignée parentale d'intérêt).

Actuellement, la lignée présentant la meilleure aptitude à la transformation par *Agrobacterium* est la lignée A188 ; c'est celle qui est généralement utilisée pour la production de transformant. Parmi les lignées de transformation et les lignées élites commerciales connues, on peut citer notamment celles décrites par Ishida et al (1996) et Pioneer (WO 98/32326).

Parmi les cellules susceptibles d'être transformées selon le procédé de l'invention, on peut citer à titre d'exemples des cellules de plantes de grandes cultures (maïs, blé, colza, tournesol, pois, soja, orge...) ou des plantes potagères et fleurs.

Les étapes de transformation (a) et sélection (étape b- procédé selon l'invention) décrites précédemment ont permis de sélectionner des transformants qui ont intégré le transgène dans le génome de type non apte à la transformation . Lesdits transformants sélectionnés contiennent 50% du génome de la lignée parentale de transformation et 50% du génome de la lignée parentale agronomique.

La reconversion vers une lignée fixée en génome d'intérêt pur (étape c), passe par des rétrocroisements (backcross) successifs avec la lignée parentale d'intérêt et une sélection des individus obtenus selon la méthode classique d'analyse phénotypique ou préférentiellement la sélection assistée par marqueurs (Hospital et al., 1992).

Cette sélection est basée notamment sur les critères suivants :

(i) variabilité autour du site d'intégration du transgène, avec élimination de tout fragment lié provenant de la lignée donneuse de transformation (sélection d'événements de recombinaison). La recombinaison génétique souhaitée est sélectionnée d'un côté du gène à une génération de rétrocroisement et de l'autre côté à la génération suivante.

(ii) recherche du meilleur ratio génome d'intérêt (rapport du % génome d'intérêt agronomique sur le % du génome global) pour l'ensemble du génome.

L'étape (i) s'avère limitante dans le cas où le transgène est inséré dans un génome de type A188 par exemple, car il est nécessaire d'éliminer tout fragment provenant de cette lignée de transformation en sélectionnant les événements de recombinaison les plus proches du transgène (événements rares). Cela requiert : d'effectuer les étapes de rétrocroisements sur un grand nombre de plantes pour sélectionner au moins une plante

recombinée correctement des deux côtés de l'insertion (2è rétrocroisement ou backcross) ; d'attendre un backcross supplémentaire pour appliquer, sur un nombre suffisant de plantes, une pression de sélection sur l'ensemble du génome. S'il est possible d'obtenir *in fine* des plantes fixées en génome d'intérêt à plus de 99% dès le 4è backcross, ces plantes resteront au mieux pseudoisogéniques au site d'insertion du transgène.

Dans le cas où le transgène est inséré dans un génome de type agronomique (lignée parentale d'intérêt), et que les transformants primaires sont sélectionnés pour cette caractéristique selon l'invention, cette étape (i) de sélection d'événements rares de recombinaison n'est plus nécessaire. En conséquence, on obtient une réduction potentielle du nombre de rétrocroisements nécessaires et/ou du nombre d'individus à tester et/ou du nombre de marqueurs pour la sélection, ainsi qu'il sera décrit à l'exemple 4. L'allègement du procédé global de reconversion vers le génome d'intérêt pur s'ajoute au bénéfice majeur de l'invention, qui est l'obtention d'une isogénie vraie pour les lignées transgéniques produites.

L'invention a également pour objet un procédé dans lequel sont sélectionnés dès le premier rétrocroisement en c) les individus dont le chromosome receveur de l'ADN-T a conservé un génotype entièrement de type lignée d'intérêt et qui ont un ratio génome d'intérêt sur l'ensemble du génome d'au moins 75%.

Rentre également dans le cadre de l'invention l'utilisation du procédé pour introgresser plusieurs caractères transgéniques dans une plante sans addition de fragments liés au transgène pouvant faire l'objet d'un fardeau génétique.

L'invention concerne également un procédé permettant de cibler le génome parent receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride, comprenant l'identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré.

Elle a également pour objet toute plante ou partie de plante, notamment semence transgénique obtenues selon l'invention, à l'une ou l'autre des étapes décrites précédemment.

Font également partie de l'invention les lignées isotransgéniques vraies obtenues à partir de transformants hybrides caractérisées en ce qu'elles sont fixées en génotype 'lignée d'intérêt' pur sur l'ensemble du génome et ont intégré de façon stable l'ADN-T contenant le transgène. En particulier, les lignées isotransgéniques vraies obtenues selon l'invention sont des lignées élites.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une étape ultérieure de croisement entre la lignée isotransgénique selon l'invention et une autre lignée d'intérêt, notamment une autre lignée isotransgénique selon l'invention contenant un transgène différent, pour l'obtention d'hybrides commerciaux.

L'invention concerne également les hybrides commerciaux ainsi produits.

Les figures et exemples ci-après illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : carte plasmidique d'un construit dérivé de pBIOS273

Figure 2 : Mise en évidence par analyse RFLP sur les transformants primaires, du génome parental receveur de l'ADN-T.

EXEMPLES

La transformation du maïs à titre d'exemple, peut notamment être réalisée selon le protocole de Ishida et al (1996) qui utilise les propriétés naturelles *d'Agrobacterium tumefaciens* et la stratégie du système binaire (Hiei et al., 1994).

Exemple 1 : Préparation des vecteurs

Le plasmide superbinaire est le résultat d'une recombinaison homologue entre un vecteur intermédiaire porteur de l'ADN-T contenant le gène d'intérêt et/ou le marqueur de sélection, et le vecteur pSB1 de Japan Tobacco (EP 672 752) qui contient : les gènes virB et virG du plasmide pTiBo542 présent dans la souche supervirulente A281 *d'Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 37349) et une région homologue retrouvée dans le vecteur intermédiaire permettant cette recombinaison homologue.

Le vecteur intermédiaire pour l'introduction du gène d'intérêt est le vecteur pBIOS 273. Ce vecteur a été généré en 2 grandes étapes :

- clonage du fragment BspDI/XhoI (pAct-Bar-terNos) du vecteur pDM 302 (Cao et al., 1992) dans le vecteur pSB12 (Komari T. et al, 1996) digéré par SmaI / BspDI : le vecteur pDM302 est digéré avec l'enzyme XhoI (site unique sur le vecteur), générant ainsi des extrémités cohésives 5' sortantes. Ces extrémités sont rendues franches après traitement à la Klenow. Une seconde digestion est ensuite effectuée avec BspDI (extrémités cohésives). La jonction des sites XhoI 'franc' et SmaI permet de recréer le site de coupure XhoI (en position 2363). Ces différentes étapes permettent un clonage orienté dans pSB12 et le vecteur résultant est appelé pBIOS 272.

- délétion du site XhoI en position 3363 du vecteur pBIOS 272 par digestion partielle avec XhoI et action de la DNA Polymerase I large fragment. Le vecteur obtenu, possédant un site unique XhoI, est nommé pBIOS 273.

Selon les techniques de clonage bien connues de l'homme de métier, un grand nombre de séquences codant pour un gène d'intérêt peuvent être clonées dans ce vecteur pBIOS 273, aux fins de l'invention (Figure 1).

Le vecteur intermédiaire est introduit dans les cellules *d'A. tumefaciens* souche LBA 4404 (Hoekema et al, 1983) contenant le vecteur pSB1 par électroporation selon les méthodes bien connues. Les agrobactéries contenant les vecteurs superbinaires sont sélectionnées sur milieu YT CaCl2 en présence d'antibiotiques (dont les gènes de résistance sont portés respectivement par les plasmides des différents types), par exemple tétracycline et spectinomycine à une concentration de 50mg/l. Seuls les plasmides superbinaires recombinants porteront la résistance à la spectinomycine (gène initialement sur les plasmides intermédiaires, ne possédant pas d'origine de réplication dans *Agrobacterium*, étant de ce fait incapables de se répliquer dans cette bactérie). Ces plasmides sont ensuite caractérisés par restriction enzymatique et analyse Southern.

Exemple 2 : Transformation d'hybride de maïs

a) Obtention de l'hybride

Les lignées choisies pour fabriquer l'hybride à transformer (lignée A188 et lignée d'intérêt) sont semées en serre puis cultivées au phytotron ou en serre après rempotage. Les plantes sont cultivées dans de la tourbe et arrosées quotidiennement avec une solution nutritive SuperPlantora (taux de NPK : 14-10-14 + 3% de MgO). Elles sont soumises à une photopériode de 16 ::8 et à une intensité lumineuse de 3 à 4000 Lux. La température moyenne est de 25°C. Dès l'émergence de l'épi, celui ci est couvert d'un sac en papier pour éviter toute contamination avec du pollen étranger. Ce sac est maintenu jusqu'au moment de la récolte de l'épi.

L'embryon hybride est produit soit en fécondant la lignée A188 avec du pollen de la lignée élite, soit en fécondant la lignée élite avec du pollen de A188.

9 à 10 jours après la fécondation l'épi est observé pour déterminer la taille des embryons. Si celle ci est comprise entre 1 et 1.2 mm, l'épi est récolté et les embryons seront aussitôt prélevés pour être mis en transformation selon le protocole décrit par Ishida et *al.*(1996).

b) Transformation et régénération

Le protocole de transformation décrit par Ishida et al. (1996) a été choisi dans le cadre de cet exemple ; tous les milieux utilisés sont référencés dans ce protocole. La transformation débute avec une phase de co-culture où les embryons immatures des plantes de maïs sont mis en contact pendant au moins 5 minutes avec *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 contenant les vecteurs superbinaires. Les embryons sont ensuite placés sur milieu LSAs pendant 3 jours à l'obscurité et à 25°C. Une première sélection est effectuée sur les cals transformés : les 'embryons-cals' sont transférés sur milieu LSD5 contenant de la phosphinotricine à 5 mg/l et de la céfotaxime à 250 mg/l (élimination ou limitation de la contamination par *Agrobacterium tumefaciens*). Cette étape est menée 2 semaines à l'obscurité et à 25°C. La deuxième étape de sélection est réalisée par transfert des embryons qui se sont développés sur milieu LSD5, sur milieu LSD10 (phosphinotricine à 10 mg/l) en présence de céfotaxime, pendant 3 semaines dans les mêmes conditions que précédemment. La troisième étape de sélection consiste à exciser les cals de type I (fragments de 1 à 2 mm) et à les transférer 3 semaines à l'obscurité et à 25°C sur milieu LSD 10 en présence de céfotaxime.

La régénération des plantules est effectuée en excisant les cals de type I qui ont proliféré et en les transférant sur milieu LSZ en présence de phosphinotricine à 5 mg/l et de céfotaxime pendant 2 semaines à 22°C et sous lumière continue.

Les plantules ayant régénéré sont transférées sur milieu RM + G2 contenant 100mg/l d'Augmentin pendant 2 semaines à 22°C et sous illumination continue pour l'étape de développement. Les plantes obtenues sont alors transférées au phytotron en vue de leur acclimatation.

De façon alternative on peut utiliser le protocole décrit dans la demande de brevet WO 98/32326pour transformer des embryons immatures de maïs.

Exemple 3 : Sélection des transformants qui ont intégré le transgène sur le génome d'intérêt (génome parental non apte à la transformation)

a) sélection des transformants monocopie et dépourvus de séquence plasmidique indésirable

Parmi les transformants primaires, sont donc préférentiellement choisis ceux qui présentent une insertion monolocus ou monocopie sans séquence plasmidique indésirable. La technique Southern avec plusieurs enzymes de restriction et plusieurs sondes

appropriées (Southern, 1975) peut notamment être utilisée pour identifier et caractériser l'insertion dans le génome de la plante, permettant ainsi de différencier les événements de transformation. Cette méthodologie permet en effet de mettre en évidence des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction obtenus avec une enzyme donnée et une sonde donnée, correspondant à des emplacements définis sur le génome.

On peut utiliser, à titre d'exemple, le protocole décrit dans Sambrook et al. (1989). L'ADN génomique est extrait à partir de feuilles des transformants primaires suivant un protocole d'extraction au CTAB (Dean C. et al., 1992). Cet ADN est ensuite digéré selon les techniques de biologie moléculaire bien connues, par une enzyme de restriction coupant au moins une fois à l'intérieur de l'ADN-T. A l'aide de sondes appropriées qui s'hybrident de part et d'autre du site de coupure, on peut ainsi caractériser l'insertion des deux côtés internes -bordures droite et gauche – de l'ADN-T suivant la procédure adaptée. Pour une même sonde et pour plusieurs individus, des différences observées dans la taille des bandes reflètent des sites d'insertion différents. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés sur un gel d'agarose de 0.9 à 1% puis transférés sur une membrane Hybond N+ (Amersham). L'ADN du plasmide intermédiaire comprenant l'ADN-T porteur du gène d'intérêt et du marqueur de sélection, est inclus dans l'analyse comme témoin. La membrane est hybridée avec des sondes homologues aux séquences du transgène étudié :

-une sonde spécifique du gène marqueur sélectif, dénommée S1.

-une sonde spécifique du gène d'intérêt, dénommée S2.

-deux sondes dénommées ex RB et ex LB (pour extra Right Border et extra Left Border) qui sont utilisées conjointement pour l'hybridation. Cette hybridation nous permet d'éliminer les plantes contenant des séquences externes à l'ADN-T (extra-bordures). Une intégration correcte suppose que seul l'ADN-T est inséré dans le génome de l'hôte, sans séquence extrabordure. Les séquences des plasmides de base étant connues (pBIOS273 dérivé de pSB12), les sondes ex RB et ex LB sont obtenues par amplification avec des oligonucléotides spécifiques des régions plasmidiques extra-bordures du T-DNA, RB2 et 3 pour ex RB, LB2 et 3 pour ex LB.

SEQ ID N°1 Oligo RB2 : 5' ATCATCCTGTGACGGAACTTTG 3'

SEQ ID N°2 Oligo RB3 : 5' AAGGGCGTGAAAAGGTTTATCC 3'

SEQ ID N°3 Oligo LB2 : 5' GCTCGGCACAAAATCACCAC 3'

SEQ ID N°4 Oligo LB3 : 5' CATAGTTCTCAAGATCGACAGC 3'

Les plantes retenues à l'issue de cette analyse moléculaire ne présentent pas de signal d'hybridation avec les sondes ex RB et ex LB, et présentent si possible une seule bande avec chacune des sondes S1 et S2, traduisant une insertion simple monocopie (une copie du gène de sélection et une copie du gène d'intérêt). Suivant la procédure adoptée, des différences dans la taille des bandes entre plantes seront le reflet d'insertions différentes et correspondant à des événements de transformation différents.

b) identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré

Pour chaque transformant primaire qui s'est révélé conforme au phénotype attendu et qui a été sélectionné suivant les critères- monolocus ou monocopie et absence d'extrabordures- les séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T peuvent être isolées et identifiées par exemple via une méthodologie basée sur la PCR. Le but étant d'identifier l'origine parentale du génome receveur du transgène (lignée d'intérêt ou lignée de transformation). Plusieurs techniques basées sur la PCR peuvent être utilisées, par exemple le PCR walking (Devic et al., 1997); de préférence, le kit commercial Universal GenomeWalker de la société Clontech peut être utilisé dans le cadre de cette invention. On peut suivre le protocole suivant, basé sur la notice d'utilisation de ce kit : l'ADN des transformants primaires précédemment sélectionnés est digéré séparément par 5 enzymes de restriction (enzymes qui génèrent des fragments d'ADN présentant des extrémités franches) ; les enzymes utilisées peuvent être celles préconisées par le fournisseur à site de restriction 6 paires de bases pb- DraI, Eco RV, PvuII, ScaI et StuI ou d'autres enzymes spécifiques de sites de restriction à 4 ou 5pb. Pour chaque échantillon, les fragments générés sont ensuite liés aux deux extrémités à l'adaptateur GenomeWalker fourni avec le kit. Chaque échantillon est ensuite séparé en deux (ech1 et ech2) pour pouvoir déterminer les séquences génomiques contiguës aux deux bordures de l'ADN-T. La récupération des régions génomiques flanquant les deux bordures de l'ADN-T permet non seulement de confirmer le résultat de l'intégration mais également de faciliter l'identification du parent receveur et de permettre une vérification de la cartographie génétique si nécessaire.

Deux types d'oligonucléotides sont désignés pour la mise en œuvre des amplifications PCR successives : les oligos AP pour Adaptor Primer, fournis par le kit ; et les oligos GSP pour Gene-Specific Primer, dont le choix dépend de la séquence du vecteur dérivé de pSB12 et des paramètres définis dans la notice d'utilisation du kit. Parmi les oligonucléotides GSP pouvant être utilisés selon l'invention, on peut citer les

oligonucléotides identifiés par le logiciel MacVector (version 6) à partir des caractéristiques décrites dans le Tableau ci-dessous.

Nom	Séquence	Taille	Tm(°C)	position (pBIOS273)	% GC
GSPLB1	ID NO 5	29	71,3	3020	58,6
GSPLB2	ID NO 6	29	64,9	3081	41,4
GSPLB3	ID NO 7	28	70,1	3021	57,1
GSPLB4	ID NO 8	27	70,1	3018	59,3
GSPLB5	ID NO 9	27	70,1	3019	59,3
GSPLB6	ID NO 10	27	68,7	3022	55,6
GSPLB7	ID NO 11	27	63,3	3064	40,7
GSPLB8	ID NO 12	27	63,3	3077	40,7
GSPLB9	ID NO 13	26	68,7	3019	57,7
GSPLB11	ID NO 14	26	68,7	3023	57,7
GSPLB13	ID NO 15	26	63,0	3078	42,3
GSPRB1	ID NO 16	29	67,5	571	48,3
GSPRB2	ID NO 17	29	67,5	592	48,3
GSPRB3	ID NO 18	29	67,5	655	48,3
GSPRB4	ID NO 19	29	66,2	656	44,8
GSPRB5	ID NO 20	28	67,4	570	50
GSPRB6	ID NO 21	28	66,1	591	46,4
GSPRB7	ID NO 22	28	66,1	654	46,4
GSPRB8	ID NO 23	28	66,1	655	46,4
GSPRB9	ID NO 24	27	67,4	569	51,9
GSPRB10	ID NO 25	27	66,0	590	48,1
GSPRB11	ID NO 26	27	70,1	614	59,3
GSPRB12	ID NO 27	27	64,6	653	44,4
GSPRB13	ID NO 28	27	64,6	654	44,4
GSPRB14	ID NO 29	26	65,9	568	50
GSPRB15	ID NO 30	26	64,5	589	46,2

Une première amplification PCR, utilisant par exemple les oligos de type GSPLB ou GSPRB selon qu'ils soient spécifiques d'une séquence interne de l'ADN-T côté RB ou LB, est effectuée comme suit :

-avec l'oligo AP1 spécifique de l'adaptateur et l'oligo GSPRBx pour échantillon1,

-avec l'oligo AP1 et l'oligo GSPLBx pour échantillon2.

Les produits d'amplification sont dilués puis soumis à une deuxième amplification:

- avec l'oligo AP2 spécifique de l'adaptateur et l'oligo GSPRBy pour échantillon1,

-avec l'oligo AP2 et l'oligo GSPLBy pour échantillon2.

Ces oligonucléotides GSP sont utilisables notamment pour tous les vecteurs dérivés de pBIOS273, dans lesquels seule la séquence du gène d'intérêt serait remplacée.

Des séquences spécifiques des gènes insérés à l'intérieur de l'ADN-T peuvent être également utilisées.

Les produits d'amplification PCR obtenus sont analysés sur gel et l'on choisit préférentiellement ceux qui sont supérieurs à 200-300 pb. Ces produits d'amplification PCR - qui contiennent une partie de séquence connue (entre oligo GSP et bordure de l'ADN-T) et une partie de séquence génomique inconnue (entre oligo AP et bordure de l'ADN-T) sont ensuite clonés par exemple dans le vecteur plasmidique pGEM-T (Promega) selon les recommandations du fournisseur puis séquencés avec les oligonucléotides universels direct et reverse. Le cas échéant, des oligonucléotides internes pourront être utilisés pour compléter les données. Il est ainsi possible de générer des sondes 'spécifiques' de la séquence génomique de l'hôte bordant l'ADN-T.

c) Identification du génome parent receveur.

Cette dernière étape conduisant à l'identification, pour chaque transformant, du génome de la lignée parentale ayant intégré l'ADN-T, peut notamment être réalisée selon le protocole suivant (Sambrook et al. 1989). Les bordures récupérées sont utilisées comme sondes et hybridées sur un transfert de gel d'électrophorèse contenant l'ADN digéré séparément par différentes enzymes de restriction des différents transformants et des deux lignées parentales. La mise en évidence d'un polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP) homologues à la sonde - et donc au locus d'insertion - entre les lignées parentales, nous permet de définir le parent receveur par comparaison avec le profil du transformant, hétérozygote pour l'insertion. Par l'expression 'hétérozygote (hémizygote) pour l'insertion', on entend que le transformant hybride porte l'ADN-T contenant le transgène sur un seul des deux chromosomes Une intégration dans la lignée parentale d'intérêt se traduit donc par un RFLP par rapport à la lignée d'intérêt et non par rapport à l'autre parent. Dans le cas d'une insertion simple dans la lignée d'intérêt, le profil du transformant primaire se caractérise par deux bandes : une bande de taille identique à celle du parent de transformation et une bande de taille différente de celle du parent d'intérêt. A

titre d'exemple la Figure 2 présente les profils attendus pour les parents et le transformant, dans le cas d'une insertion dans le chromosome de l'un ou l'autre des parents (2 cas).

L'identification du parent receveur peut également être obtenue selon une autre alternative, qui consiste à utiliser les données de séquençage des bordures génomiques de l'ADN-T obtenues en b) pour mettre en évidence des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) entre les lignées parentales. Après clonage dans pGEM-T de la séquence adjacente génomique récupérée et détermination de la séquence complète, des oligonucléotides peuvent être désignés sur la séquence et utilisés pour de nouvelles amplifications PCR sur les lignées parentales et le transformant. S'il existe un polymorphisme nucléotidique entre les deux parents pour la portion génomique ayant servi à désigner les oligonucléotides, une insertion dans la lignée d'intérêt se traduira par une amplification pour la lignée d'intérêt et le transformant et pas d'amplification pour l'autre parent. Si par contre, aucun polymorphisme n'est détecté (amplification d'un même fragment chez les deux lignées parentales, dans le cas d'un fragment génomique conservé), le séquençage desdits fragments amplifiés chez les lignées parentales sera nécessaire. L'analyse comparative avec les séquences adjacentes génomiques du transformant, identifiées et séquencées en b), déterminera alors le parent receveur du transgène. Selon l'une ou l'autre méthode, il sera possible de différencier les lignées pseudo-isogéniques obtenues par les procédés décrits dans l'art antérieur des lignées isotransgéniques vraies obtenues selon l'invention.

Exemple 4 : Rétrocroisements avec le parent d'intérêt et sélection des individus jusqu'à l'obtention de lignées isotrangéniques.

Les étapes précédentes ont permis de sélectionner des transformants qui ont intégré le transgène dans le génome d'intérêt; par ailleurs lesdits transformants contiennent 50% en génome parent de transformation et 50% en génome d'intérêt.

Préférentiellement, la sélection des plantes issues des rétrocroisements avec la lignée parentale d'intérêt, est assistée par marqueurs selon les méthodes connues, notamment celle décrite par Ragot et al. (1995).

A titre comparatif et démonstratif des avantages de la sélection des transformants primaires selon l'invention, sera décrit en préambule le cas d'un processus de sélection après insertion du transgène dans le génome de type A188.

Cas d'une insertion sur un chromosome de type A188 (pas de sélection des transformants primaires)

Classiquement, la recombinaison génétique souhaitée est sélectionnée d'un côté du gène à une génération de rétrocroisement et de l'autre côté à la génération suivante. La taille du génome du maïs étant estimée à 2000 centimorgans (cM), les événements de recombinaisons à sélectionner lors des deux premiers rétrocroisements (BC1 et BC2), pour ne transférer que 1/1000^{ième} du génome non-élite lié au transgène, devront se situer à 1cM de part et d'autre de l'insertion, respectivement.

La sélection des événements de recombinaison assistée par des marqueurs prédéfinis (proches du transgène) est effectuée en BC1 et BC2 sur un nombre de plantes calculé comme suit : le nombre N de plantes à tester pour obtenir 1 plante recombinée à 1cM avec une probabilité de 95%, est N= (log0,05) / (log(1-0,01)) ~300 plantes, selon la loi de probabilité bien connue. Sachant qu'une seule plante recombinée est obtenue à l'issue de ces 2 rétrocroisements, il paraît difficile d'appliquer de surcroît une sélection pour un ratio génome d'intérêt optimal. Les ratios génome d'intérêt attendus en BC1 et BC2 sont en moyenne de 75% et 87,5% respectivement. Une pression de sélection sur l'ensemble du génome ne pourra véritablement être appliquée qu'en BC3, avec une centaine de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome de maïs (banque de donnée de l'Université du Missouri).

La reconversion en génome d'intérêt, pour ce cas particulier, nécessite d'effectuer les étapes de rétrocroisements sur un grand nombre de plantes (sélection d'événements rares sur le chromosome porteur) et d'attendre au moins le 3è backcross pour exercer la seconde pression de sélection, sur l'ensemble du génome. Enfin, les plantes obtenues *in fine* restent au mieux pseudo-isogéniques (fardeau génétique potentiel).

Backcross	Sélection événement recombinaison au site d'insertion du transgène		Caractérisation de l'ensemble génome pour le génotype d'intérêt	
	Nb plantes testées	Plante avec bonne recombinaison	Nb marqueurs à tester sur génome hétérozygote résiduel	% génome d'intérêt
BC1	**300**	1	100	75
BC2	300	1	50	87,5
BC3	100		25	96,8
BC4	100		7	99,2

Nb total tests : (300x1)+100+(300x1)+50+(100x25)+(100x7)=**3950 tests**, pour sélectionner **1 plante** qui soit **pseudoisogénique** au site du transgène (porte 1/1000 du génome A188 lié au transgène soit en moyenne 50 à 80 gènes, le génome de maïs possédant en moyenne 50000 à 80000 gènes) et **fixée à plus de 99% en génome d'intérêt en BC4**.

Cas d'une insertion sur un chromosome de la lignée parentale d'intérêt (sélection selon l'invention du transformant primaire correspondant, avant rétrocroisements avec le parent d'intérêt).

Selon les orientations choisies en fonction des priorités accordées à la biotechnologie, et/ou la production/rendement et/ou la sélection, plusieurs schémas de sélection sont possibles, intégrant le cas échéant une présélection sur le chromosome receveur de l'insertion. Contrairement au cas d'une insertion dans un génome de type A188, on sélectionnera ici des événements de recombinaison situés loin du transgène ou aucune recombinaison sur le chromosome receveur du transgène.

A titre d'exemples, on peut citer les options suivantes.

Option 1 : Pas de sélection au site d'intégration du transgène ; sélection ratio génome d'intérêt dès BC1.

Backcross	Sélection événement recombinaison au site d'insertion du transgène		Caractérisation de l'ensemble génome pour le génotype d'intérêt	
	Nb plantes testées	Plante avec bonne recombinaison	Nb marqueurs	% génome d'intérêt
BC1	**100**		100	87,5
BC2	100		25	≈ 100
BC3	100		7	≈ 100

Nb total tests : (100x100)+(100x25)+(100x7)=**13200 tests**, pour sélectionner **1 plante isogénique vraie** au site du transgène et **fixée à ≈ 100% en génome d'intérêt en BC3** (gain de un rétrocroisement).

Option 2 : Sélection en BC1 de l'individu ayant le chromosome porteur du transgène qui soit entièrement de type lignée d'intérêt ; sélection en BC3 pour le ratio génome d'intérêt.

Connaissant le chromosome sur lequel est inséré l'ADN-T (cartographie), il est possible de sélectionner en BC1, à l'aide de 10 marqueurs répartis sur ce chromosome, une plante pour laquelle l'intégrité du chromosome receveur d'intérêt est conservée (aucun événement de recombinaison). Sachant que les chromosomes font une longueur moyenne de 200cM, la probabilité d'avoir une plante sans événement de recombinaison est

$P=(0,99)^{200}\sim0,14$. Le nombre N de plantes à tester avec une probabilité de 95% de l'obtenir est N= (log0,05) / (log(1-0,14)) ~20.

La plante ainsi sélectionnée sera backcrossée avec le parent d'intérêt jusqu'à la reconversion totale (100%) en génome d'intérêt sur l'ensemble du génome.

Backcross	Sélection de l'intégrité génome élite sur le chromosome porteur du transgène, (10 marqueurs)		Caractérisation de l'ensemble génome pour le génotype d'intérêt	
	Nb plantes testées	Plante avec chromosome élite	Nb marqueurs	% génome d'intérêt
BC1	**20**	1		75
BC2	100			87,5
BC3	100		25	≈ 100
BC4	100		7	≈ 100

Nb total tests : (20x10)+(100x25)+(100x7)=**3400 tests** pour sélectionner **1 plante isogénique vraie** au site du transgène et **fixée à ≈ 100% en génome d'intérêt dès BC3.**

Selon les schémas, on recherchera une réduction du nombre de backcross (rapidité de production) ou une réduction du nombre de plantes à utiliser pour les rétrocroisements, en plus de l'isogénie obtenue de fait selon le procédé de l'invention.

Exemple 5 : Production d'hybrides commerciaux

Selon les techniques connues de l'homme de métier et ses connaissances en matière de floraison pour chaque lignée élite parentale (Gallais A. et al., 1983), il est possible de croiser lesdites lignées isotransgéniques obtenues à l'exemple 4, en vue d'obtenir des hybrides commerciaux.

Exemple 6 : Détermination du génome d'insertion du transgène

13 évènements ont été obtenus après transformation d'embryons hybrides selon le protocole décrit précédemment à l'exemple 2. Ces événements ont ensuite été analysés par Southern, pour déterminer le nombre de copies du transgène intégré, comme décrit précédemment à l'exemple 3 (a). 3 de ces évènements se sont avérés être monocopie.

Le transformant 152-2E, choisi pour la récupération des bordures génomiques décrite ci-dessous, a été obtenu après transformation avec le plasmide superbinaire recombinant pRec 290 issu de pBIOS 290, dérivé de pBIOS 273 par l'intégration au site Xho1 d'une cassette « Pro HMWG-PhytI-Nos 3' – Pro HMWG-PhytII-Nos 3' ». Ladite cassette est obtenue selon les techniques de clonage classiques, à partir de la séquence Pro HMWG de blé (Roberts et al The Plant Cell, 1 :569-578, 1989), des séquences

nucléotidiques PhytI (N° d'accès EMBL, GenBank : AJ223470) et PhytII (N° d'accès EMBL, GenBank : AJ223471), et de la séquence Nos3' (Depicker et al., Mol. Gen. Genet. 235 (2-3) : 389-396, 1992) et des enzymes de restriction appropriées.

La récupération des bordures génomiques a été réalisée du côté bordure droite (RB) par la technique de PCR ancrée en utilisant le kit Genome Walker (Clontech laboratories inc.,Palo Alto, California). Comme décrit à l'exemple 3 (b), l'identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré comprend les étapes suivantes :

Le couple d'oligonucléotides GSPRB3/AP1 a permis de réaliser la première PCR sur de l'ADN du transformant 152-1E digéré à EcoRV. Le produit de cette amplification a ensuite été soumis à une deuxième PCR avec le couple d'oligonucléotides GSPRB9/AP2.

Les caractéristiques des oligonucléotides GSPRB3 et GSPRB9 sont décrites dans le tableau de l'exemple 3 et correspondent aux séquences ID N0 18 et ID N0 24 en annexe.

Les oligonucléotides AP1 et AP2 sont ceux fournis dans le kit Genome Walker et les conditions de PCR sont celles préconisées par le fabricant Clontech. Le fragment bordure de 380 pb obtenu à cette dernière étape a été cloné dans le vecteur pGEMT (Promega corporation, Madison, Wisconsin), pour être amplifié et utilisé comme sonde.

L'identification du génome receveur décrit à l'exemple 3 (c), à partir du fragment bordure récupéré, consiste à hybrider ce fragment sonde sur un transfert de gel d'électrophorèse contenant l'ADN du transformant 152-2E digéré avec EcoRV ainsi que l'ADN des 2 lignées parentales de l'hybride (A188 et L2) et celui de 6 autres transformants.

Le résultat de l'hybridation est représenté sur la figure 3 : sur cette autoradiographie, on visualise de l'ADN correspondant à 7 transformants différents, sachant qu'il y a de 1 à 3 plantes par transformant.

L'hybridation avec la sonde bordure met en évidence 1 bande spécifique au génotype A188 (1.7Kb) et 1 spécifique de la lignée élite L2 (2.5 Kb). On retrouve ces 2 bandes chez tous les transformants (prouvant bien qu'ils sont issus de l'hybride) sauf pour l'événement t152-1E, qui lui présente une bande plus basse à 0.8 Kb environ. On en déduit que le transgène s'est inséré dans le fragment attendu EcoRV de 1.7 Kb du génome de la lignée A188.

Cette expérience confirme donc la possibilité d'identifier, selon le protocole décrit, le génome d'insertion de l'ADN-T dans le cas de transformant produit par la technique de transformation d'hybride, génome A188 dans ce cas précis.

Selon le même protocole, il est également possible d'obtenir des transformants pour lesquels l'insertion de l'ADN-T s'effectue dans le génome élite, avec une probabilité de 1 transformant sur 2 en moyenne.

Dans le cas où le génome du parent élite est identifié comme le génome receveur de l'insertion de l'ADN-T, des rétrocroisements peuvent être réalisés avec le parent d'intérêt et testés en sélection jusqu'à l'obtention de lignées isotransgéniques, comme décrit précédemment à l'exemple 4.

BIBLIOGRAPHIE

An et al, Plant Physiol., 81 : 86-91, 1986.

Armstrong, C.L. et al., Maize Genet. Coop. News Letter 59:92-93, 1985.

Armstrong C.L. et al., Theor Appl Genet 84 :755-762, 1992.

Battraw et al., Plant Mol. Biol., 15 :527, 1990.

Bechtold N. et al., Comptes rendus Académie des Sciences Paris Serie 3, 316 : 1194-1199, 1993.

Burr B. et al., Genetic Engineering : principles and methods. Setlow A, Hollaender (eds.) Plenum press NY 5 : 45-59, 1983.

Cao et al., Plant Cell Reports : 11 : 586-591, 1992.

Callis et al., Genes Dev., 1 :1183, 1987.

Carrington J.C. et Freed D.D, Journal of Virology, 64(4) : 1590-1597, 1990.

Chupeau et al., Biotechnology, 7(5) : 503-508, 1989.

Christensen et al., Transgenic Res., 5 : 213, 1996.

Datla R. et al., Biotechnology Ann. Rev., 3 :269-296, 1997.

Dean C. et al., Plant Journal, 2, 69-81, 1992.

Depigny-This et al., Plant. Mol. Biol 20 : 467-479, 1992.

Devic et al., Plant Physiol and Biochem., 35(4) : 331-33, 1997.

Does Mp et al., Plant. Mol. Biol., 17(1) : 151-3, 1991.

Fromm M. et al., Biotechnology, 8 : 833-839, 1990.

Gallais A. et al., Agromaïs, 20, 40, 1983.

Gaubier et al., Mol. Gen. Genet., 238 :409-418, 1993.

Hiei et al., The plant Journal 6 : 271-282, 1994.

Hospital et al., Genetics, 132 : 1199-1210, 1992.

Hoekema et al, Nature, 303, 179-180, 1983.

Ishida et al., Nature Biotechnology, 14 :745-750, 1996.

Jouanin et al., Plant. Sci., 53 : 53-63, 1987.

Kamoun S. et al., Mol Plant Microbe Interact, 6(5) :573-81, Sept-Oct 1993.

Kay et al., Science 236 : 1299-1302, 1987.

Komari T. et al., The Plant Journal, 10(1) : 165-174, 1996.

Korit A.A et al., Eur. J. Biochem., 195, 329-334, 1991.

Maas et al., Plant Mol. Biol., 16 :199, 1991.

McElroy et al., Plant Cell, 2 : 163-171, 1990.

Morris et al., Virology, 187 :633, 1992.

Murigneux et al., Theor. Appl. Genet. 87 : 278-287, 1993.

Neuhaus G. et al., Theoretical and Applied Genetics, 75(1) : 30-36, 1987.

Ohta et al., Plant Cell Physiol, 31 :805, 1990.

Panabieres F. et al., Mol Plant Microbe Interact, 8(6) : 996-1003, Nov-Dec 1995.

Ragot et al., Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires, Les Colloques, n° 72,

Ed Reina et al., N.A.R, 18 :6426, 1990

Robert et al., Plant Cell, 1 : 569-578, 1989.

Saiki Rk. et al., Science 29 : 487-491, 1988.

Sambrook et al., Molecular Cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory

Press, New York, 1989.

Schocher et al., Biotechnology, 4 : 1093-1096, 1986

Shen et al., Plant. Mol. Biol., 26 : 1085-1101, 1994.

Snowden et al., Plant Mol. Biol., 31 :689, 1996.

Southern, Journal of molecular Biology, 98 : 503-517, 1975.

Vancanneyt et al., Mol Gen. Genet, 220 :245, 1990.

Watson et al., Adn recombinant, Ed. De Boeck université, 273-292.

Weising et al., Annual Rev. Genet, 22 : 241, 1988.

REVENDICATIONS

1- Procédé d'obtention de lignées isotransgéniques de plantes, comprenant les étapes suivantes de :

a) transformation des cellules végétales d'un hybride de plante constitué par le croisement de deux lignées parentales, une lignée d'intérêt et une lignée apte à la transformation, avec un vecteur porteur d'un ADN-T contenant un transgène;

b) sélection des transformants primaires hybrides ayant intégré ledit ADN-T uniquement, dans le génome de la lignée d'intérêt ;

c) rétrocroisements avec la lignée parentale d'intérêt desdits transformants primaires sélectionnés en b), et sélection des individus issus de ces rétrocroisements jusqu'à l'obtention de lignées isotransgéniques.

2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de sélection des transformants primaires hybrides consiste à identifier les séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré pour déterminer le génome parent receveur dudit ADN-T.

3- Procédé selon la revendication 2, dans lequel la détermination du génome parent receveur dudit ADN-T à partir desdites séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T se fait selon une technique de RFLP ou une méthode de séquençage.

4- Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel sont sélectionnés dès le premier rétrocroisement en c) les individus dont le chromosome receveur de l'ADN-T a conservé un génotype entièrement de type lignée d'intérêt et qui ont un ratio génome d'intérêt sur l'ensemble du génome d'au moins 75%.

5- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape ultérieure de croisement entre la lignée isotransgénique selon l'invention et une autre lignée d'intérêt, notamment une autre lignée isotransgénique contenant un autre transgène, pour l'obtention d'une lignée hybride.

6- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules végétales proviennent d'une espèce de grande culture choisie parmi le maïs, blé, colza, tournesol, pois, soja, orge ou d'une espèce potagère ou florale.

7- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'ADN-T comprend notamment une séquence nucléotidique codant pour une protéine conférant des propriétés agronomiques et/ou de résistance aux maladies.

8- Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les lignées isotransgéniques obtenues sont des lignées élites commerciales.

9- Utilisation du procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle permet l'introgression de plusieurs caractères transgéniques dans une plante sans addition de fragments liés au transgène pouvant faire l'objet d'un fardeau génétique.

10- Procédé permettant de cibler le génome parent receveur d'un ADN-T après transformation d'un hybride, comprenant l'identification des séquences génomiques adjacentes à l'ADN-T inséré.

11- Plantes ou parties de plantes, notamment semences transgéniques obtenues selon l'invention, à l'une ou l'autre des étapes décrites dans les revendications 1 ou 5.

12- Lignées isotransgéniques vraies obtenues à partir de transformants hybrides selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles sont fixées en génotype lignée d'intérêt pur sur l'ensemble du génome et ont intégré de façon stable l'ADN-T contenant le transgène.

13- Hybrides commerciaux produits selon le procédé décrit à la revendication 5.

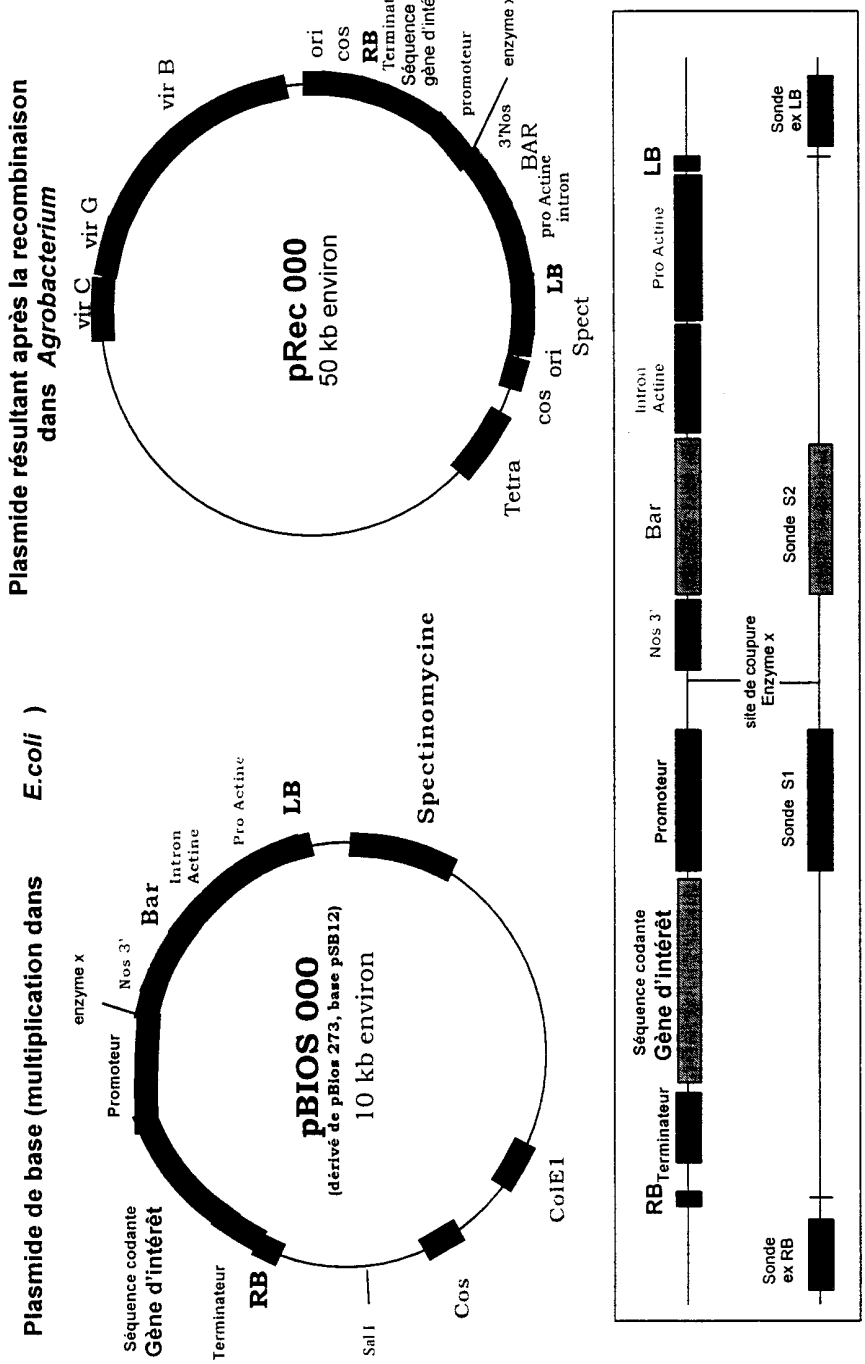

Plasmide de base (multiplication dans E.coli)
Plasmide résultant après la recombinaison dans Agrobacterium
pBIOS 000
(dérivé de pBios 273, base pSB12)
10 kb environ
pRec 000
50 kb environ
Spectinomycine
ColE1
Cos
Sal I
RB
Terminateur
Séquence codante
Gène d'intérêt
enzyme x
Nos 3'
Promoteur
Bar
Intron Actine
Pro Actine
LB
vir C
vir G
vir B
ori
cos
Séquence codante
gène d'intérêt
promoteur
3'Nos
BAR
pro Actine intron
Tetra
Spect
site de coupure Enzyme x
Sonde ex RB
Sonde S1
Sonde S2
Sonde ex LB

Figure 1

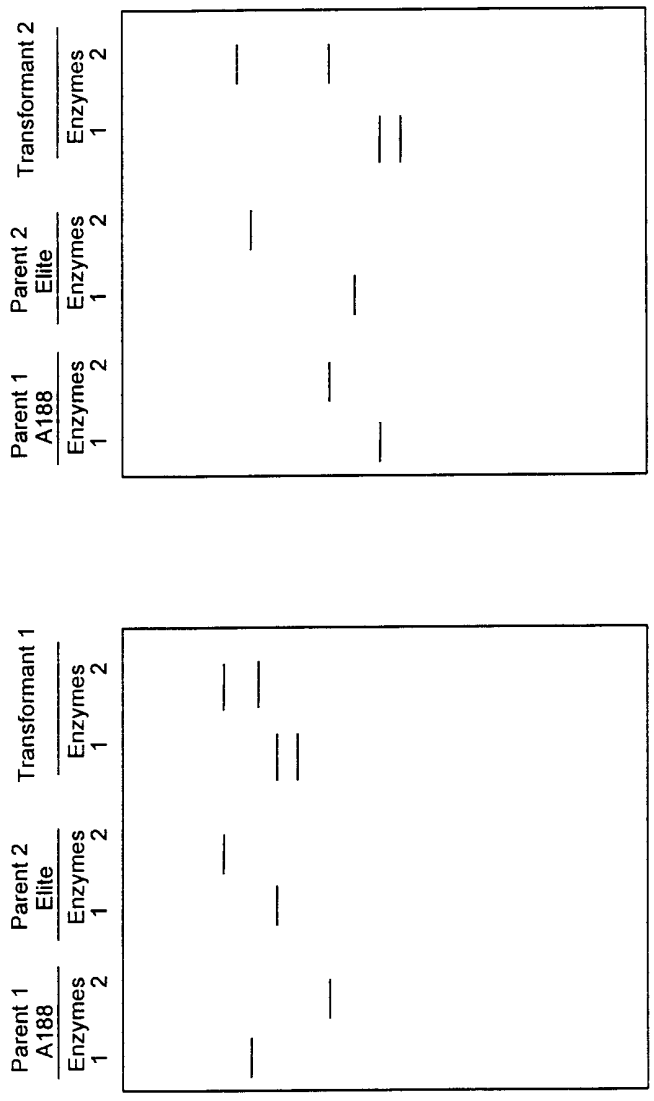


Figure 2 : Hybridation des blots avec sondes spécifiques des bordures génomiques de chacun des transformants.

LISTE DE SEQUENCES

<110> RHOBIO

<120> Procédé d'obtention de lignées isotransgéniques

<130>

<140>
<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 1
atcatcctgt gacggaactt tg 22

<210> 2
<211> 22
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 2
atcatcctgt gacggaactt tg 22

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 3
gctcggcaca aaatcaccac 20

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 4
catagttctc aagatcgaca gc 22

<210> 5
<211> 29
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 5
gcaggcatgc aagcttcagc tgctcgatc 29

<210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 6
ccgcaatgtg ttattaagtt gtctaagc 28

<210> 7
<211> 28
<212> ADN

<213> synthetic construct

<400> 7
caggcatgca agcttcagct gctcgatc 28

<210> 8
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 8
ctgcaggcat gcaagcttca gctgctc 27

<210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 9
tgcaggcatg caagcttcag ctgctcg 27

<210> 10
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 10
aggcatgcaa gcttcagctg ctcgatc 27

<210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 11
cagtacatta aaaacgtccg caatgtg 27

<210> 12
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 12
acgtccgcaa tgtgttatta agttgtc 27

<210> 13
<211> 26
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 13
tgcaggcatg caagcttcag ctgctc 26

<210> 14
<211> 26
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 14
ggcatgcaag cttcagctgc tcgatc 26

<210> 15
<211> 26
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 15
cgtccgcaat gtgttattaa gttgtc 26

<210> 16
<211> 29
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 16
atgatcagat tgtcgtttcc cgccttcag 29

<210> 17
<211> 29
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 17
gactccctta attctccgct catgatcag 29

<210> 18
<211> 29
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 18
gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacg 29

<210> 19
<211> 29
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 19
tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaac 29

<210> 20
<211> 28
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 20
tgatcagatt gtcgtttccc gccttcag 28

<210> 21
<211> 28
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 21
actcccttaa ttctccgctc atgatcag 28

<210> 22
<211> 28
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 22
cggttctgtc agttccaaac gtaaaacg 28

<210> 23
<211> 28
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 23

gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaac 28

<210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 24
gatcagattg tcgtttcccg ccttcag 27

<210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 25
ctcccttaat tctccgctca tgatcag 27

<210> 26
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 26
tcatcggcgg gggtcataac gtgactc 27

<210> 27
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 27
ggttctgtca gttccaaacg taaaacg 27

<210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 28
cggttctgtc agttccaaac gtaaaac 27

<210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 29
atcagattgt cgtttcccgc cttcag 26

<210> 30
<211> 26
<212> ADN
<213> synthetic construct

<400> 30
tcccttaatt ctccgctcat gatcag 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. onal Application No
PCT/FR 00/02130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/63 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00 A01H5/10

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 32326 A (PIONEER HI BRED INT) 30 July 1998 (1998-07-30) cited in the application abstract; examples 6,7 ---	1,6-8, 11-13
A	ISHIDA Y ET AL: "HIGH EFFICIENCY TRANSFORMATION OF MAIZE (ZEA MAYS L.) MEDIATED BTY AGROBACTERIUM TUMEFACIENS" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 14, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 745-750, XP002046364 ISSN: 0733-222X cited in the application abstract page 749, right-hand column -page 750, left-hand column --- -/--	1,6,7, 11,12

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

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 December 2000	15/12/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Ceder, O

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. ɔnal Application No
PCT/FR 00/02130

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHYI ET AL.: "Locations and stability of Agrobacterium mediated Ti plasmid insertions in the lycopersicon genome" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 204, 1986, pages 64-69, XP000920599 abstract	1,3,7, 11,12
A	UMBECK ET AL.: "Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants" CROP SCIENCE, vol. 29, 1989, pages 196-201, XP000920567 page 197, left-hand column	1,7,11, 12

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte .onal Application No
PCT/FR 00/02130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9832326 A	30-07-1998	US 5981840 A	09-11-1999
		AU 6036898 A	18-08-1998
		EP 0971578 A	19-01-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. e internationale No
PCT/FR 00/02130

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/63 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00 A01H5/10

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 98 32326 A (PIONEER HI BRED INT) 30 juillet 1998 (1998-07-30) cité dans la demande abrégé; exemples 6,7 ---	1,6-8, 11-13
A	ISHIDA Y ET AL: "HIGH EFFICIENCY TRANSFORMATION OF MAIZE (ZEA MAYS L.) MEDIATED BTY AGROBACTERIUM TUMEFACIENS" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 14, no. 6, 1 juin 1996 (1996-06-01), pages 745-750, XP002046364 ISSN: 0733-222X cité dans la demande abrégé page 749, colonne de droite -page 750, colonne de gauche --- -/--	1,6,7, 11,12

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

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

° Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
8 décembre 2000	15/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Ceder, O

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/02130

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHYI ET AL.: "Locations and stability of Agrobacterium mediated Ti plasmid insertions in the lycopersicon genome" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 204, 1986, pages 64-69, XP000920599 abrégé ---	1,3,7, 11,12
A	UMBECK ET AL.: "Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants" CROP SCIENCE, vol. 29, 1989, pages 196-201, XP000920567 page 197, colonne de gauche -----	1,7,11, 12

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. e Internationale No
PCT/FR 00/02130

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9832326 A	30-07-1998	US 5981840 A	09-11-1999
		AU 6036898 A	18-08-1998
		EP 0971578 A	19-01-2000