

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 11.05.98.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.11.99 Bulletin 99/45.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR et INSTI-
TUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE
LYON — FR.

⑦② Inventeur(s) : DELOBEL BERNARD, GRENIER
ANNIE, GUEGUEN JACQUES, FERRASSON ERIC et
MBAILAO MBAIGUINAM.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE DERIVE D'UNE ALBUMINE PA1B DE LEGUMINEUSE COMME
INSECTICIDE.

⑤⑦ L'Invention est relative à l'utilisation d'un polypeptide
dérivé d'une albumine PA1b de légumineuse comme insecti-
cide, en particulier pour la protection des graines de cé-
réales contre les insectes ravageurs.



UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE DERIVE D'UNE ALBUMINE PA1b
DE LEGUMINEUSE COMME INSECTICIDE

La présente invention concerne des protéines insecticides et leur utilisation pour la protection des
5 plantes, et en particulier des céréales, de leurs graines et des produits dérivés de celles-ci contre les insectes ravageurs.

Des insectes ravageurs des graines de céréales se rencontrent dans différentes familles, en particulier
10 parmi les Coléoptères, des Lépidoptères et des Homoptères. Chez les Coléoptères, on citera en particulier les charançons des grains (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*), ainsi que *Tenebrio* spp., *Rhyzopertha dominica*, *Trogoderma* spp.,
15 *Tribolium confusum*. Chez les Lépidoptères, on citera en particulier *Sitotroga cerealella* et *Ephestia kuehniella*.

Les ravageurs de graines de céréales sont parmi les principaux ennemis des récoltes qu'ils attaquent au champ (au moins dans les régions chaudes),
20 et surtout dans les silos de conservation ; ils peuvent également attaquer les produits transformés dérivés de céréales (par exemple farines, semoules, etc.) Ces insectes causent des dégâts très importants et sont chaque année à l'origine de la destruction d'une partie
25 importante (pouvant avoisiner 25%) de la récolte mondiale de céréales récoltées chaque année.

Pour lutter contre ces insectes, différentes méthodes ont été préconisées. L'utilisation d'insecticides (LINDANE®, puis MALATHION® et bromure
30 d'éthylène) est actuellement remise en question, du fait des problèmes posés par la présence de résidus de ces produits dans l'alimentation. En outre, des résistances à ces produits sont apparues chez de nombreux insectes cibles, ce qui rend leur utilisation de moins en moins
35 efficace. Pour remplacer ces insecticides ou limiter leur usage, différentes méthodes ont été proposées [pour

revue, cf par exemple F.H ARTHUR, J. Stored Prod. Res., 32, pp. 293-302, (1996)]. Les plus développées actuellement sont des méthodes physiques, telles que le refroidissement des silos, la conservation sous CO₂ ou sous azote ; ces méthodes sont toutefois onéreuses, et leur mise en œuvre, qui nécessite une haute technicité, est délicate ; elles ne sont donc pas applicables partout.

Un autre type d'approche, qui fait l'objet de nombreuses recherches, consiste à produire des plantes transgéniques exprimant un ou plusieurs gène(s) leur conférant une résistance contre l'attaque des insectes. Cependant, cette approche nécessite que l'on dispose de gènes appropriés, qui doivent en outre être acceptables à la fois pour l'environnement et par les consommateurs.

La plupart des insectes présentent une spécificité alimentaire plus ou moins stricte ; c'est ainsi que les graines de céréales sont attaquées par les charançons des grains (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*), qui n'attaquent pas les graines de légumineuses ; par contre, d'autres ravageurs, tels que les bruches, attaquent les légumineuses, mais pas les céréales.

Des travaux précédents de l'équipe des Inventeurs [DELOBEL et GRENIER, J. Stored Prod. Res., 29, pp. 7-14, (1993)], ont montré que les trois espèces de *Sitophilus* mentionnées ci-dessus pouvaient se développer sur des châtaignes ou des glands, mais qu'en revanche elles mouraient rapidement sur pois cassés, cette mortalité étant consécutive à la consommation des pois par ces charançons.

Les Inventeurs ont entrepris de rechercher la substance toxique responsable de cette mortalité. Il est par ailleurs connu que les légumineuses renferment plusieurs substances entomotoxiques, et qu'il existe chez diverses espèces d'insectes pour lesquelles les

légumineuses sont toxiques, des sous-populations naturelles plus ou moins résistantes à la toxicité des légumineuses.

Par exemple, dans le cas des charançons des grains, un test effectué par l'équipe des Inventeurs sur 90 souches d'origines géographiques différentes, a montré que 4 souches appartenant à l'espèce *Sitophilus oryzae* comportaient des individus capables de survivre sur pois cassés au stade adulte ; en revanche, aucune souche possédant cette faculté n'a été mise en évidence chez les espèces *Sitophilus zeamais*, ou *Sitophilus granarius* ; l'étude du déterminisme génétique de cette résistance a montré que ce caractère est monogénique, récessif et autosomal [GRENIER et al., Heredity, 79, pp. 15-23, (1997)].

Les Inventeurs ont sélectionné une souche de *S. oryzae* homozygote pour ce gène de résistance, et ont utilisé cette souche pour rechercher la substance toxique vis-à-vis de laquelle se manifestait le mécanisme de résistance codé par ce gène.

Les Inventeurs ont ainsi constaté que cette toxicité était associée aux isoformes d'une protéine, de séquence similaire à celle de l'albumine de pois PA1b décrite par HIGGINS et al., [J. Biol. Chem., 261(24), pp. 11124-11130, (1986)], et présentant une forte similitude (65% d'identité) avec la leginsuline de soja [WATANABE et al., Eur. J. Biochem., 15, pp. 224:1-167-72, (1994)]. Aucune propriété entomotoxique n'avait jusqu'à présent été associée à la protéine PA1b, à la leginsuline ou à d'autres protéines homologues.

L'alignement de la séquence de l'une des isoformes de la protéine purifiée par les Inventeurs, avec celles de la protéine PA1b de pois, publiée par HIGGINS et al. et de la leginsuline de soja publiée par WATANABE et al., est représentée sur la Figure 7. Ces 3

séquences comportent en particulier 6 résidus cystéines occupant des positions conservées.

La présente invention a pour objet l'utilisation en tant qu'insecticide, d'un polypeptide
5 comprenant une séquence répondant à la formule générale (I) suivante :



dans laquelle C représente un résidu cystéine, X_1 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10
10 acides aminés, X_2 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 5 acides aminés, X_3 représente une séquence de 4 à 10 acides aminés, X_4 représente une séquence de 3 à 10 acides aminés, X_5 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 4 acides aminés, X_6
15 représente une séquence de 7 à 15 acides aminés, X_7 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10 acides aminés.

De préférence, X_1 représente un dipeptide, X_2 représente un tripeptide, X_3 représente un heptapeptide, X_4
20 représente un tétrapeptide, X_5 représente un acide aminé, X_6 représente un nonapeptide, et X_7 représente un pentapeptide.

Avantageusement :

- X_1 répond à la séquence y_1y_2 dans laquelle y_1 et y_2
25 représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien y_1 représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, et y_2 représente l'acide glutamique ou l'acide aspartique ; et/ou
- 30 - X_2 répond à la séquence $y_3y_4y_5$ dans laquelle y_3 représente la glutamine ou l'asparagine, et y_4 et y_5 représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ;
35 et/ou

- X_3 répond à la séquence $y_6y_7y_8y_9y_{10}y_{11}y_{12}$ dans laquelle y_6 représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y_7 , y_{11} , et y_{12} représentent chacun la proline, y_8 représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, y_9 représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique, y_{10} représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ; et/ou
- 10 - X_4 répond à la séquence $y_{13}y_{14}y_{15}y_{16}$, dans laquelle y_{13} , y_{14} , y_{15} , y_{16} ,¹ représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien y_{14} représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y_{13} et
- 15 y_{15} représentent chacun un acide aminé basique, et y_{16} représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique ; et/ou
- X_5 représente un acide aminé basique ; et/ou
- X_6 répond à la séquence $y_{17}y_{18}y_{19}y_{20}y_{21}y_{22}y_{23}y_{24}y_{25}$, dans
- 20 laquelle y_{17} , y_{19} , y_{21} , et y_{23} représentent chacun un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine, y_{18} représente la proline, y_{20} et y_{24} représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y_{22}
- 25 représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, et y_{25} représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine ; et/ou
- 30 - X_7 répond à la séquence $y_{26}y_{27}y_{28}y_{29}y_{30}$ dans laquelle y_{26} représente un acide aminé basique, ou un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine, y_{27} représente l'asparagine ou la glutamine ou un acide aminé basique, y_{28} représente la proline, et y_{29}
- 35 et y_{30} représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, le polypeptide utilisé comme insecticide présente au moins 40%, de préférence au moins 60% d'homologie avec une quelconque des isoformes d'une albumine PA1b.

Au sens de la présente invention, on entend par : « albumine PA1b » non seulement toute isoforme de la protéine PA1b de pois, mais également toute protéine de la même famille présente chez d'autres plantes, notamment des légumineuses, ou des Méliacées, telles que *Khaya senegalensis*.

Des polypeptides utilisables conformément à l'invention, peuvent être des polypeptides naturels, par exemple les leginsulines de légumineuses, telle que la leginsuline de soja décrite par WATANABE et al. ; il peut s'agir également de polypeptides artificiels dont la séquence est dérivée de celle d'une PA1b par l'addition, la délétion, ou la substitution d'un petit nombre d'acides aminés. On peut par exemple utiliser des polypeptides comprenant une séquence répondant à la formule générale (I), ou une portion de celle-ci correspondant à la région impliquée dans l'activité insecticide. Ce peptide actif peut éventuellement être fusionné à son extrémité N-terminale et/ou à son extrémité C-terminale avec une autre séquence peptidique.

Ces polypeptides peuvent être obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, par exemple par synthèse peptidique, ou par génie génétique, en exprimant, dans une cellule-hôte appropriée une séquence codant pour le polypeptide souhaité. Ils peuvent également, dans le cas des polypeptides naturels, tels que la PA1b et la leginsuline, être purifiés à partir de graines de plantes telles que des légumineuses ou des Méliacées.

Conformément à l'invention, les polypeptides comprenant une séquence de formule générale (I) peuvent

être utilisés en tant que seul principe actif d'un insecticide, ou bien associés à un ou plusieurs autres principes actifs. Ils peuvent être utilisés en particulier, pour lutter contre les insectes ravageurs des graines de céréales, et également contre des insectes phytophages, tels que les lépidoptères *Mamestra brassicae* ou *Ostrinia nubilalis* ou les coléoptères *Chrysomélidae* comme *Phaedon cochleariae* ou *Curculionidae* comme *Anthonomus grandis* ou contre des Insectes phloemophages tels que les pucerons.

En outre, les Inventeurs ont constaté que la protéine PA1b conservait son activité insecticide pendant plusieurs années dans les graines sèches, et que cette activité n'était pas affectée par un chauffage à 100°C.

D'autre part, cette protéine n'est pas toxique pour l'homme ou les animaux supérieurs ; elle est présente dans les légumineuses qui font partie de leur alimentation habituelles.

Les polypeptides de séquence générale (I), sont particulièrement bien adaptés pour la protection, en particulier pendant le stockage, des graines, des farines, ou des produits transformés qui en sont dérivés.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, la concentration du polypeptide de séquence (I) au niveau du produit à protéger (plante, graines, ou produits dérivés) est généralement de 10µM à 100mM/kg, et avantageusement de 50µM à 10mM/kg.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, on traite le produit à protéger avec une préparation comprenant ledit polypeptide. Celui-ci peut par exemple être sous forme d'une préparation purifiée ou d'une fraction enrichie, qui peuvent notamment être obtenues à partir de graines de plantes produisant naturellement ledit polypeptide, ou bien à partir de cultures de cellules exprimant un gène codant pour ce polypeptide.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, on produit une plante transgénique, transformée par au moins un gène codant pour ledit polypeptide, et exprimant ce dernier dans au moins un de ses tissus ou organes.

La présente invention englobe également les plantes transgéniques produites de la sorte ; avantageusement, lesdites plantes sont des céréales.

Ces plantes peuvent être obtenues par les techniques habituelles de transgénèse végétale, qui sont connues en elles-mêmes.

Il est ainsi possible d'obtenir dans une plante une expression ubiquitaire et/ou une expression ou une surexpression dans certains tissus ou organes (par exemple dans les graines) d'un polypeptide de séquence (I), et de ce fait de protéger la plante, le tissu ou l'organe concerné, contre les attaques d'insectes pour lesquels ce polypeptide est toxique. En particulier, l'expression d'un polypeptide de séquence (I) dans les graines permet de protéger celles-ci, même après la récolte, ainsi que les farines et les produits transformés obtenus à partir de ces graines.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre qui se réfère à des exemples non-limitatifs, décrivant la purification et illustrant les propriétés insecticides d'une albumine PA1b de légumineuse.

EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE LA TOXICITE DE DIFERENTES FARINES DE LEGUMINEUSES POUR DES CHARANCONS DES CEREALES

La toxicité de farines de différentes légumineuses a été testée sur des charançons (*Sitophilus oryzae*). Les expérimentations ont été effectuées en parallèle sur des animaux de type sauvage (souche sensible S), et sur des mutants survivant à l'alimentation sur pois (souche résistante R).

Les charançons (*Sitophilus oryzae*) sont élevés en enceinte régulée à 27,5°C et 70% d'humidité relative. De jeunes adultes âgés d'une semaine sont prélevés dans ces élevages de masse pour les tests. Pour chaque test, 5 des lots de 30 insectes sont mis en expérimentation, et la mortalité journalière est notée.

Des boulettes de farine sont pétries avec de l'eau, mises à sécher 24 h, et utilisées pour l'alimentation des charançons. La farine grise de blé 10 utilisée est complétée avec différentes proportions de farine de légumineuse, tamisée à 0,2 mm d'ouverture de maille.

Les courbes dose-réponse de mortalité des charançons ont été obtenues en utilisant différentes 15 doses de chaque farine à tester. Les résultats sont traités par le programme « Toxicologie » [FEBVAY et RAHBÉ, « Toxicologie », un programme pour l'analyse des courbes de mortalité par la méthode des probits sur MacIntosh, Cahiers Techn. INRA, 27, pp. 77-78 (1991)]. Ce 20 programme utilise la transformation en Probits des mortalités cumulées et détermine l'équation de la courbe de régression et la concentration létale 50%. Ces valeurs sont déterminées après 4 et 7 jours d'exposition.

En outre, pour chaque concentration de farine 25 de pois, les temps létaux 50% (TL50) pour la souche sensible S ont également été calculés. La courbe d'étalonnage ainsi établie permettra de déterminer dans la suite des expérimentations, pour chaque farine ou fraction de farine testée, la concentration équivalente 30 en farine de pois(en % de pois dans le blé). Cette courbe est représentée sur la Figure 1.

Toxicité de la farine de pois :

La Figure 2 représente la mortalité cumulée pour des adultes de la souche sensible S de *Sitophilus* 35 *oryzae*, sur pois (◇), et sur blé (□), en fonction du temps d'alimentation en jours. Ces résultats montrent que

les charançons des céréales sont rapidement tués sur pois : en 8 jours, entre 90 et 100% des adultes sont morts.

La Figure 3 représente la mortalité à 6 jours de *Sitophilus oryzae* pour des boulettes à différentes concentrations de farine de poids ; la souche résistante (R) et la souche sensible (S) sont comparées. La courbe dose/réponse ainsi établie montre que, pour la souche sensible (S) on observe, dès 10% de farine de poids, 70% de mortalité en 6 jours (et 100% en 14 jours). Dans le même temps, la souche résistante (R) n'est pas affectée.

Toxicité de farines d'autres légumineuses :

Parmi les graines de légumineuses utilisées en alimentation humaine, 10 ont été testées pour leur action sur les charançons sensibles et résistants.

Des boulettes contenant 80% de farine de légumineuse et 20% de farine de blé ont été utilisées. La Figure 4 illustre la mortalité cumulée des charançons *Sitophilus oryzae*, souche résistante R (▨) ou souche sensible S (■), mesurée après 5 (4 A), 7 (4 B), 14 (4 C) et 20 jours (4 D) d'alimentation sur niébé (*Vigna unguiculata*) variété blanche (1) et rouge (2), pois de terre (3 : *Vigna subterranea*), lentille (4 : *Lens esculenta*), haricot (5 : *Phaseolus vulgaris*), haricot mungo (6 : *Vigna radiata*), adzuki (7 : *Vigna angularis*), fève (8 : *Vicia faba*), pois chiche (9 : *Cicer arietinum*), et lupin (10 : *Lupinus albus*).

Les résultats montrent qu'à 7 jours toutes les légumineuses sont toxiques pour la souche sensible, même si *Vigna subterranea* et *Cicer arietinum* n'ont pas encore tué tous les insectes qui y vivent ; par contre, la souche résistante ne présente pas ou très peu de mortalité. On peut donc en conclure qu'un même mécanisme à l'origine de la toxicité, est présent chez toutes ces légumineuses ; ce mécanisme apparaît en particulier comme

prédominant chez *Vigna subterranea*, *Vigna radiata* et *Cicer arietinum*.

Toutefois, l'examen des mortalités à 14 et 20 jours sur certaines légumineuses, fait apparaître pour la
5 souche résistante une mortalité plus ou moins grande, qu'il faut donc imputer à d'autres mécanismes ; c'est en particulier le cas sur *Phaseolus vulgaris* et sur *Vigna angularis*.

10 EXEMPLE 2 - PURIFICATION ET IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE RESPONSABLE DE LA TOXICITE CHEZ LE POIS

Préparation d'une fraction protéique enrichie en albumines (SRA1).

La fraction enrichie en albumine est préparée à l'échelle pilote selon le protocole développé par
15 CREVIEU et al. [Nahrung, 40(5), pp. 237-244, (1996)].

La farine de pois (10 kg) est mélangée sous agitation avec 140 litres de tampon acétate (pH 4,9), le mélange est centrifugé à 7500 t/min, le surnageant est soumis à une ultrafiltration sur membrane M5, à une
20 température qui ne dépasse pas 25°C. Le rétentat est soumis à une diafiltration sur la même membrane, le nouveau rétentat est centrifugé à 6000 t/min pendant 20 min et le surnageant lyophilisé. La poudre obtenue (SRA1) qui représente en moyenne 1% de la masse mise en
25 oeuvre au départ, est utilisée pour les purifications ultérieures.

A chaque étape de la purification, la toxicité des différentes fractions est déterminée selon le protocole décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

30 Chromatographie d'échange d'anions

10 g de SRA1 sont mis en suspension dans 100 ml d'une solution de méthanol à 60% et agités 1 heure à 4°C. Après centrifugation (30 min, 9000 g, 4°C) le surnageant est récupéré puis le méthanol présent est
35 éliminé à l'évaporateur rotatif. Le volume est alors

réajusté à 100 ml par de l'eau et un tampon Tris-HCl 1M (pH 8,8) de manière à obtenir une concentration finale de 50 mM en Tris-HCl. Les protéines solubles sont fractionnées par chromatographie d'échange d'anions sur
5 une colonne (120 x 50 mm) de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW. Les protéines adsorbées sont éluées par une concentration de 50% de tampon B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8 ; NaCl 500 mM) dans le tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8). Le débit d'élution est de 20 ml/min et les fractions collectées
10 ont un volume de 80 ml. Les protéines sont détectées par absorption à 280 nm.

Le chromatogramme est représenté sur la Figure 5. La concentration en tampon B est indiquée par la ligne discontinue. Les fractions de 80 ml correspondant aux
15 pics sont réunies en deux fractions principales, DEAE NA et DEAE 1, indiquées sur le chromatogramme par les lignes horizontales. La fraction non adsorbée (DEAE NA) contient toute la toxicité.

Cette fraction est dialysée 72 heures contre
20 de l'eau puis lyophilisée. On obtient ainsi environ 450 mg de la fraction DEAE NA.

Chromatographie HPLC phase inverse semi-préparative.

La fraction DEAE NA obtenue après chromatographie échangeuse d'anions est fractionnée par
25 chromatographie HPLC phase inverse (RP-HPLC) sur une colonne HYPERSIL (250 x 10,5 mm) remplie de NUCLEOSIL 5 µm 300 Å greffé par une chaîne aliphatique en C18. Pour chaque chromatographie 15 mg de protéines sont déposées sur la colonne. Le débit d'élution est de 3 ml/min et les
30 protéines sont détectées par absorption à 220 nm. Les protéines sont éluées par un gradient de tampon B (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'acétonitrile) dans le mélange A (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'eau) selon la séquence suivante : t=0 min, 40% de B ; t=5 min,
35 40% de B ; t=17 min, 48% de B ; t=18 min, 80% de B ; et t=23 min, 80% de B.

Le chromatogramme est illustré par la Figure 6. Le gradient d'acétonitrile est représenté par la ligne discontinue. La toxicité est localisée uniquement au niveau des pics F1 et PT ; les fractions correspondant à ces pics qui ont été collectées, sont représentées sur le chromatogramme par des traits horizontaux,.

Trente chromatographies successives correspondant à une quantité injectée de 450 mg de DEAE NA ont été effectuées. Les fractions ont été réunies puis lyophilisées après évaporation de l'acétonitrile et de l'acide trifluoroacétique au SPEED VAC. 4 mg de la fraction PT et 5 mg de F1 ont ainsi été obtenues. Ces fractions ont ensuite été analysées par chromatographie HPLC phase inverse (RP-HPLC).

15 Chromatographie HPLC phase inverse

Le contrôle de la pureté des protéines des fractions F1 et PT est effectué par chromatographie HPLC phase inverse sur une colonne INTERCHROM (250 x 4,6 mm) remplie de NUCLEOSIL 5 μ m 100 Å greffé par une chaîne aliphatique en C18. Le débit d'élution est de 1 ml/min et les protéines sont détectées par absorption à 220 nm.

Les protéines sont éluées en 45 minutes par un gradient linéaire de 0 à 50% de mélange B (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'acétonitrile) dans le mélange A (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'eau).

Cette analyse montre que la fraction PT ne contient que la protéine toxique PT. La fraction F1 est plus complexe et contient deux polypeptides majeurs.

30 Caractérisation des protéines présentes dans les fractions PT et F1

Les déterminations de masses ont été réalisées par spectrométrie de masse à électrospray (ES-MS). Les masses moyennes calculées à partir de 2 estimations, sont de 3741,1 Da dans le cas de PT, et de 3736 et 3941 Da pour les polypeptides de la fraction FT.

Le nombre de cystéines libres et impliquées dans les ponts disulfures, a été déterminé par alkylation de la protéine par l'iodoacétamide, avant et après réduction, et comparaison des temps de rétention en
5 RP-HPLC et des masses en ES-MS, des protéines alkylées avec la protéine native.

La protéine non-réduite alkylée présente un temps de rétention et une masse identiques à celle de la protéine native. En revanche, la protéine réduite puis
10 alkylée présente un temps de rétention nettement différent de celui observé pour la protéine native (30 min au lieu de 42 min), et une masse de 4089,9 Da.

Il apparaît donc que cette protéine contient 6 cystéines, qui sont toutes impliquées dans 3 ponts
15 disulfures.

Séquence complète de la protéine PT

La séquence complète de la protéine PT a été établie. La masse calculée à partir des 37 résidus de la protéine est 3741,4 Da, ce qui est identique, à l'erreur
20 de mesure près, à celle déterminée par spectrométrie de masse (3741,1 Da) pour la protéine native. La valeur calculée pour la protéine alkylée par l'iodoacétamide (4090 Da) est également équivalente à celle obtenue expérimentalement (4089,9 Da). Ces résultats démontrent
25 l'absence de modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations...) de la protéine.

La séquence de la protéine PT présente une très forte homologie avec celle de l'albumine de pois PA1b [HIGGINS et al, J. Biol. Chem, 261(24), pp. 11124-
30 11130, (1986)]. Les deux séquences ne diffèrent que par le remplacement du résidu valine en position 29 dans la protéine PT par une isoleucine dans la PA1b. Une forte similitude (65% d'identité) est également observée entre la protéine PT et la leginsuline de soja [WATANABE et
35 al., Eur. J. Biochem., 15, pp. 224:1-167-72, (1994)]. En particulier, les 6 résidus cystéine, qui jouent un rôle

essentiel dans la structure des protéines, occupent des positions conservées.

La comparaison de ces 3 séquences est illustrée par la figure 7.

5 Ces résultats permettent de conclure que la protéine responsable de la résistance du pois aux charançons des céréales est similaire à la protéine PA1b décrite par HIGGINS. Cette protéine est synthétisée sous la forme d'une préproprotéine de 130 résidus (PA1) qui
10 subit une maturation post-traductionnelle libérant la protéine PA1b ainsi qu'une protéine de 53 résidus nommée PA1a [HIGGINS et al., J. Biol. Chem., 261(24), pp. 11124-11130, (1986)].

15 Le séquençage des 10 premiers résidus N-terminaux de chacun des polypeptides toxiques de la fraction F1 a également été réalisé. Les séquences obtenues sont identiques à celle de l'extrémité N-terminale de la protéine PT. Comme, d'autre part, les masses de ces polypeptides déterminées par ES-MS sont
20 très proches de celle de la PT, il apparaît que ces polypeptides représentent des isoformes de la PT.

EXEMPLE 3 - ACTIVITE ET STABILITE DES PROTEINES ENTOMOTOXIQUES EXTRAITES DU POIS

Activité :

25 L'activité entomotoxique des polypeptides de la fraction PT ou de la fraction F1 a été déterminée comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus ; à la concentration de 1% dans la farine de blé (3mM), ces polypeptides ont pour le charançon une toxicité équivalente à celle de la
30 farine de pois pure. Une concentration de 60 µM est suffisante pour empêcher toute infestation par les charançons.

Stabilité :

35 Les polypeptides de la fraction PT ou de la fraction F1, extraits à partir de graines sèches stockées

pendant plusieurs années, conservent leur activité entomotoxique. En outre, cette activité n'est pas affectée par un chauffage à 100°C.

Toxicité pour différents insectes :

5 La toxicité de la protéine PT pour la teigne de la farine *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera), et pour le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera) a également été testée.

10 Les essais sur la teigne de la farine ont été effectués sur des larves de premier et deuxième stade d'*Ephestia kuehniella* alimentées sur des boulettes de farine de blé contenant différentes concentrations de la protéine PT (en mM par kg de farine de blé). Les résultats sont illustrés par la Figure 8.

15 (O = Survie à 0 jour ;
 ▲ = Survie à 4 jours ;
 □ = Survie à 10 jours).

Ces résultats montrent que cette protéine est très toxique, dès la concentration de 0,25mM/kg.

20 Le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera), a été nourri sur milieu artificiel contenant différentes concentrations de la protéine PT.

25 (□ = 3,3 µM ;
 ▲ = 17 µM ;
 ◆ = 46 µM ;
 ○ = 84 µM ;
 ■ = 100 µM).

30 Les résultats, qui sont illustrés par la Figure 9, montrent qu'une importante mortalité apparaît dès la concentration de 46 µmolaire, mortalité qui est totale à 100 µmolaire.

REVENDICATIONS

1) Utilisation comme insecticide d'un polypeptide comprenant une séquence répondant à la formule générale (I) suivante :

5 $X_1CX_2CX_3CX_4CX_5CX_6CX_7$ (I)

dans laquelle C représente un résidu cystéine, X_1 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10 acides aminés, X_2 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 5 acides aminés, X_3 représente une
10 séquence de 4 à 10 acides aminés, X_4 représente une séquence de 3 à 10 acides aminés, X_5 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 4 acides aminés, X_6 représente une séquence de 7 à 15 acides aminés, X_7 représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10
15 acides aminés.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que X_1 représente un dipeptide, X_2 représente un tripeptide, X_3 représente un heptapeptide, X_4 représente un tétrapeptide, X_5 représente un acide
20 aminé, X_6 représente un nonapeptide, et X_7 représente un pentapeptide.

3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que :

- X_1 répond à la séquence y_1y_2 dans laquelle y_1 et y_2
25 représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien y_1 représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, et y_2 représente l'acide glutamique ou l'acide aspartique ; et/ou

30 - X_2 répond à la séquence $y_3y_4y_5$ dans laquelle y_3 représente la glutamine ou l'asparagine, et y_4 et y_5 représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ;
35 et/ou

- X_3 répond à la séquence $y_6y_7y_8y_9y_{10}y_{11}y_{12}$ dans laquelle y_6 représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la

sérine, la glycine, et la thréonine, y_7 , y_{11} , et y_{12} représentent chacun la proline, y_8 représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, y_9 représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique, y_{10} représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ;
 5 et/ou

- X_4 répond à la séquence $y_{13}y_{14}y_{15}y_{16}$, dans laquelle y_{13} , y_{14} , y_{15} , y_{16} , représentent chacun un acide aminé choisi
 10 parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien y_{14} représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y_{13} et y_{15} représentent chacun un acide aminé basique, et y_{16} représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique ;
 15 et/ou

- X_5 représente un acide aminé basique ; et/ou
 - X_6 répond à la séquence $y_{17}y_{18}y_{19}y_{20}y_{21}y_{22}y_{23}y_{24}y_{25}$, dans laquelle y_{17} , y_{19} , y_{21} , et y_{23} représentent chacun un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine,
 20 et la méthionine, y_{18} représente la proline, y_{20} et y_{24} représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y_{22} représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine,
 25 le tryptophane, et la tyrosine, et y_{25} représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine ; et/ou

- X_7 répond à la séquence $y_{26}y_{27}y_{28}y_{29}y_{30}$ dans laquelle y_{26} représente un acide aminé basique, ou un acide aminé
 30 choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine, y_{27} représente l'asparagine ou la glutamine ou un acide aminé basique, y_{28} représente la proline, et y_{29} et y_{30} représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine.

35 4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le

polypeptide utilisé comme insecticide présente au moins 60% d'identité avec une quelconque des isoformes d'une albumine PA1b.

5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide est choisi dans le groupe constitué par les albumines PA1b et les leginsulines.

6) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé pour protéger des graines de céréales ou des produits dérivés de celles-ci, contre des insectes ravageurs.

7) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé pour protéger des plantes contre les insectes ravageurs des graines de céréales.

8) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé à une concentration de 10 μ M à 100mM.

9) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend le traitement du produit à protéger avec une préparation comprenant ledit polypeptide.

10) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend la production d'une plante transgénique, transformée par au moins un gène codant pour ledit polypeptide, et exprimant ce dernier dans au moins un de ses tissus ou organes.

11) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite plante transgénique est une céréale.

12) Plante transgénique telle que définie dans une quelconque des revendications 10 ou 11.

1/9

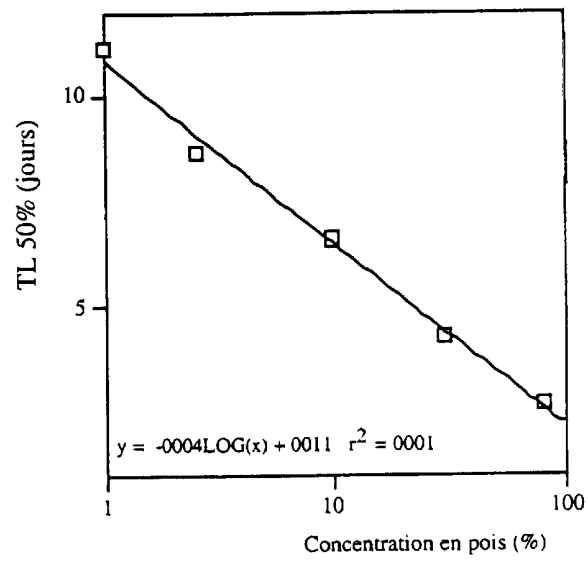


FIGURE 1

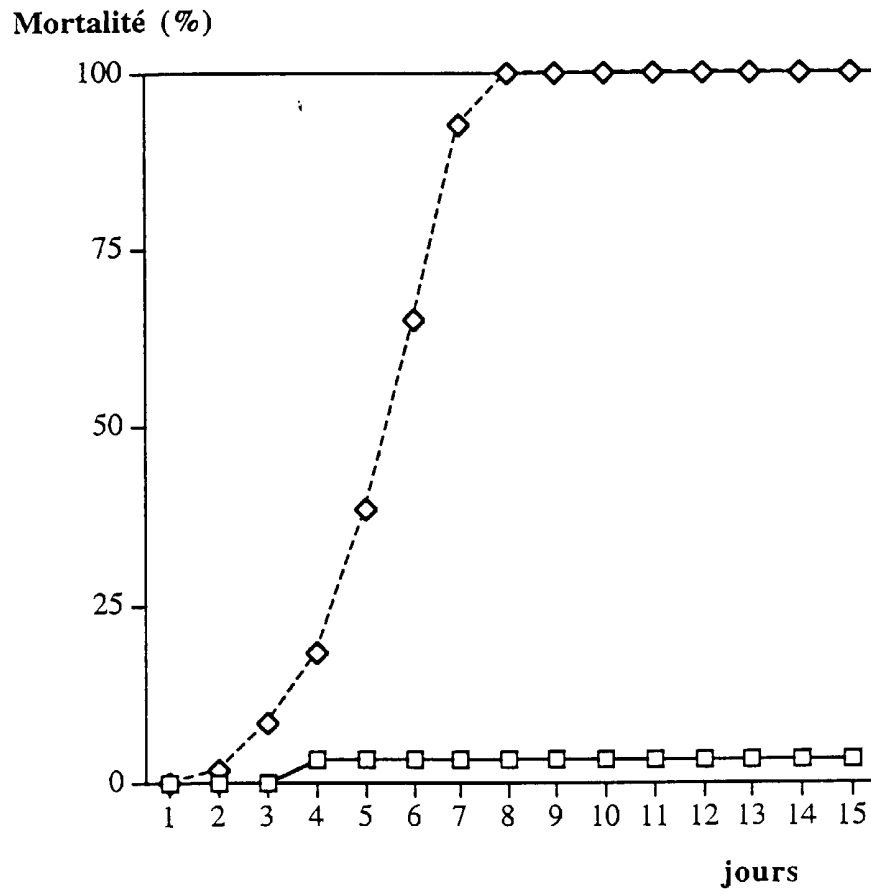


FIGURE 2

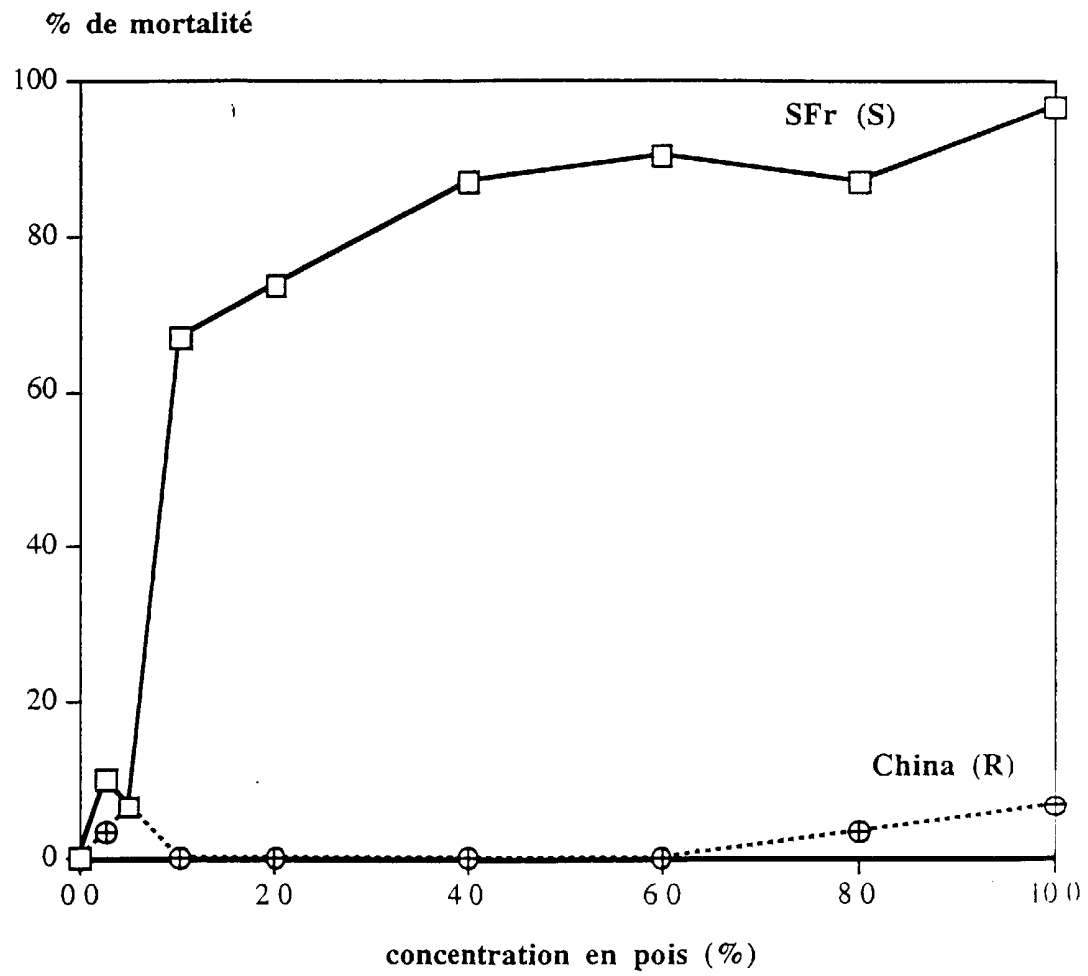


FIGURE 3

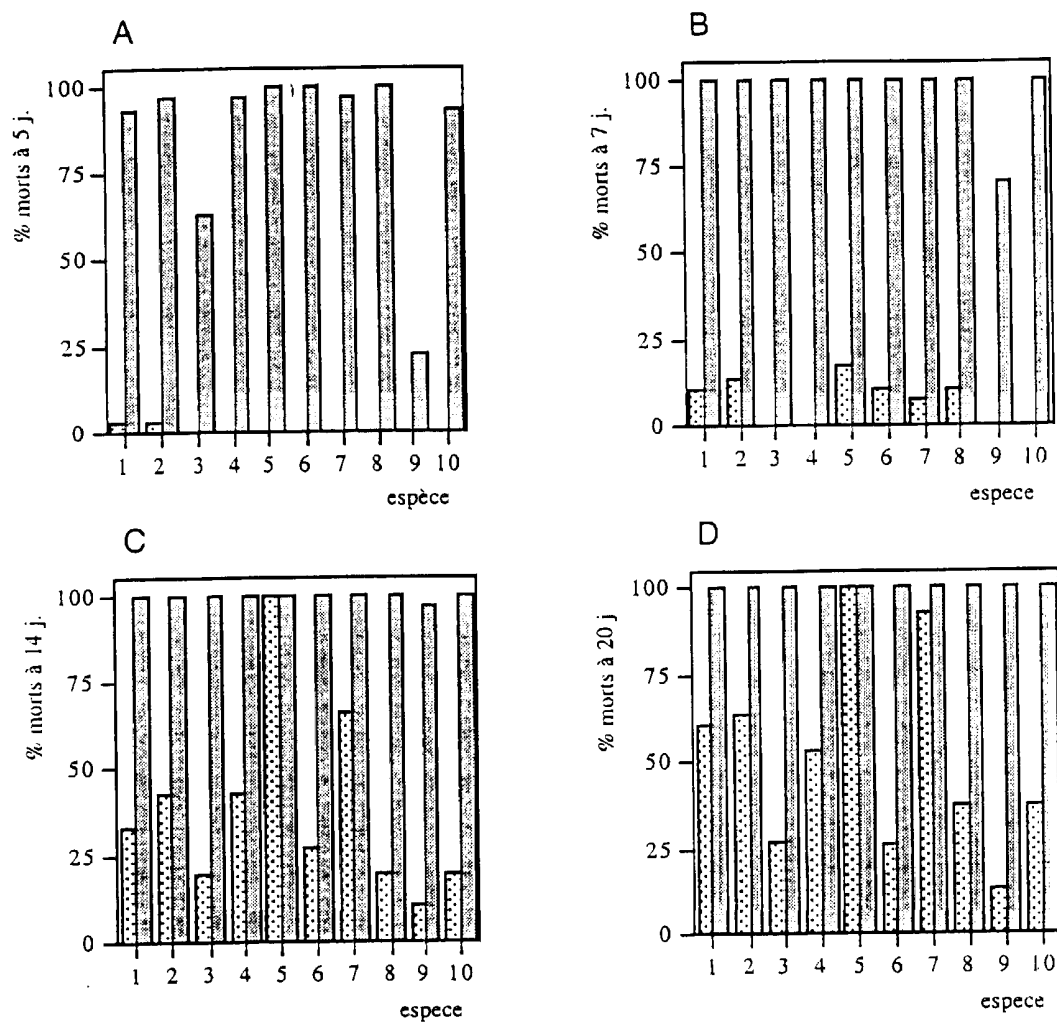


FIGURE 4

5/9

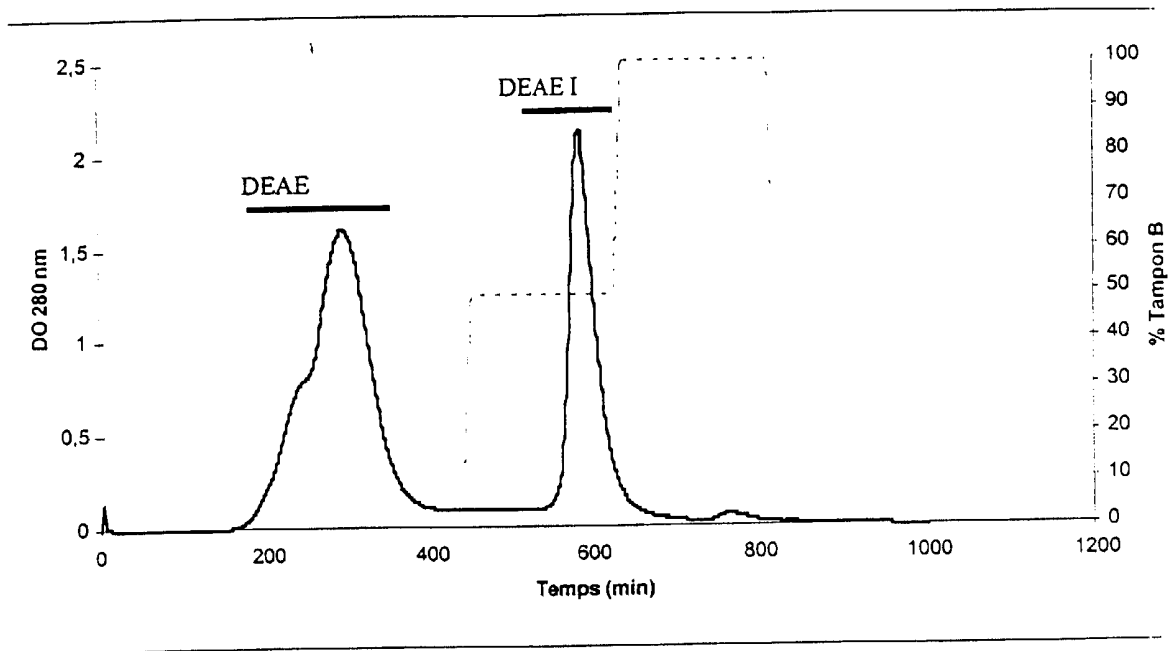


FIGURE 5

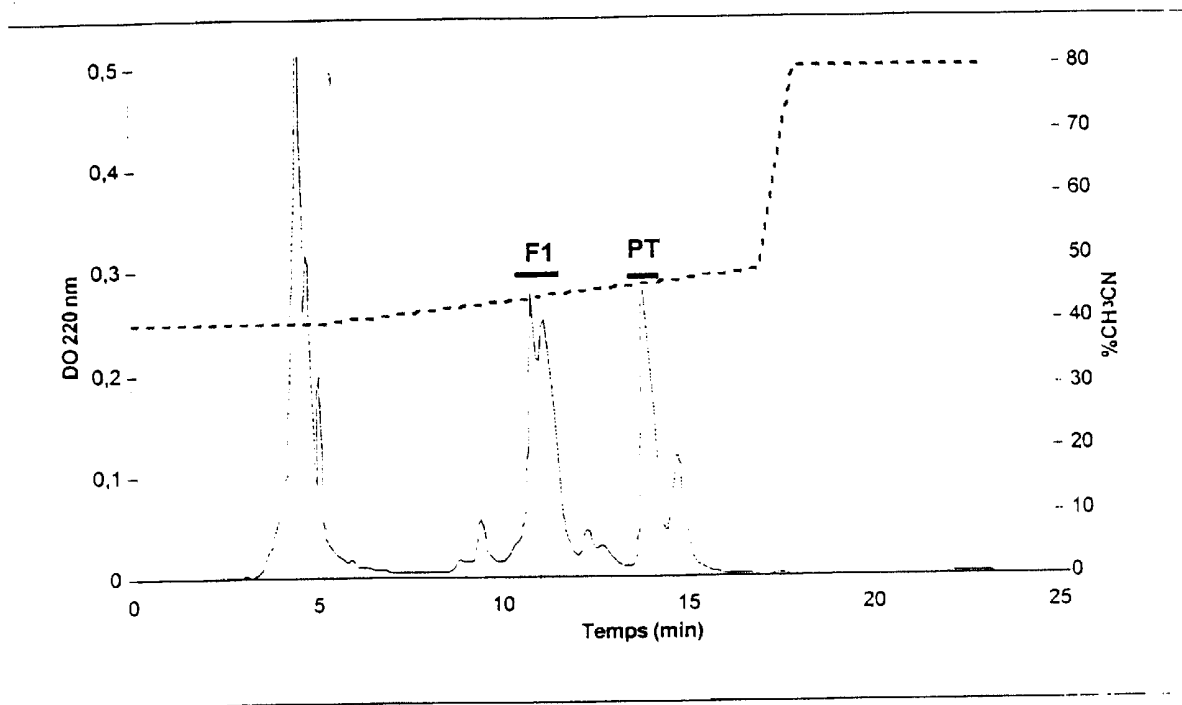


FIGURE 6

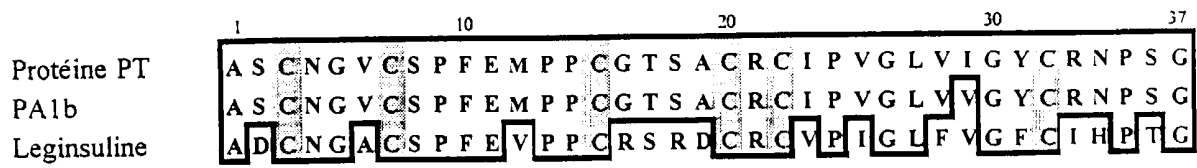


FIGURE 7

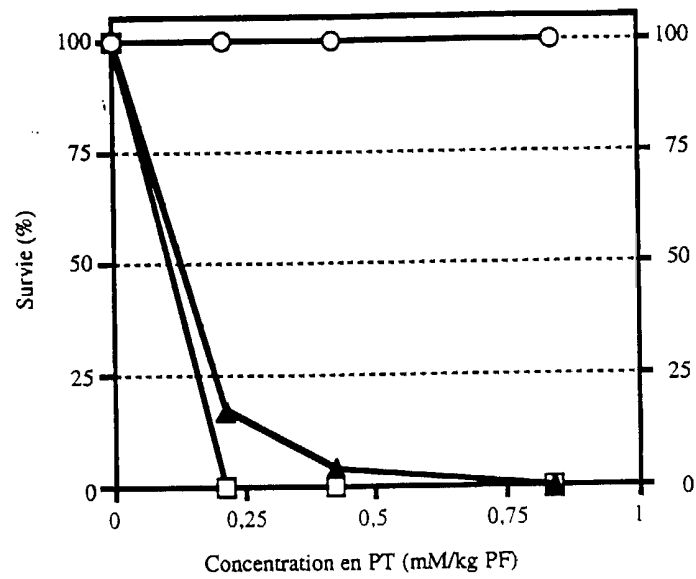


FIGURE 8

9/9

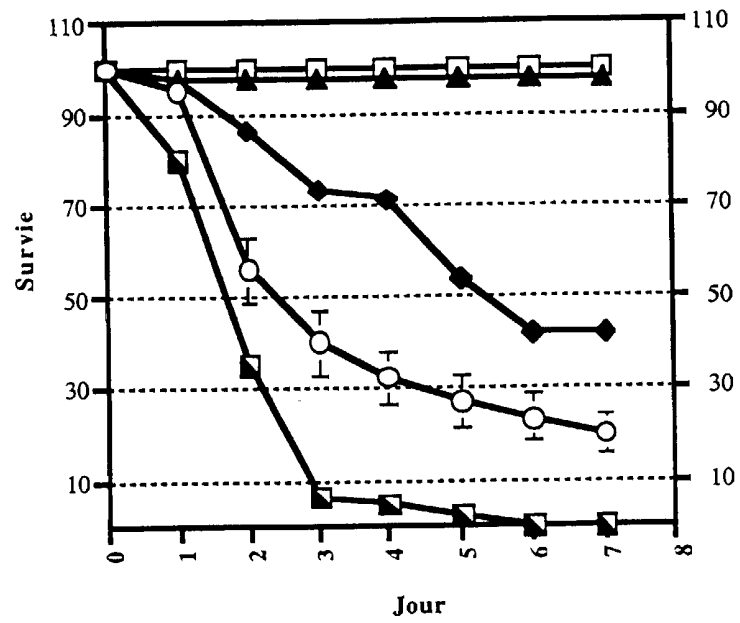


FIGURE 9

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 565045
FR 9805877

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	HIGGINS T J V ET AL: "Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), vol. 261, no. 24, 25 août 1986, pages 11124-11130, XP002091347 MD US	1-5
Y	* le document en entier, particulièrement page 11129 *	6-13
D,X	WATANABE Y ET AL: "A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein" THE EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 224, no. 1, août 1994, pages 167-172, XP002091348 BERLIN DE * le document en entier *	1-5, 11, 13
X	EALING P M ET AL.: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco" TRANSGENIC RESEARCH, vol. 3, 1994, pages 344-354, XP002091349 US * abrégé *	1-5, 11, 13
Y	BAKER J E ET AL: "Multiplicity of albumins from wheat inhibitory to amylase from the rice weevil coleoptera curculionidae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, vol. 82, no. 6, 1989, pages 1548-1553, XP002091350 * abrégé *	6-13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N C07K A01N
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 février 1999		De Kok, A
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

N° d'enregistrement
national

FA 565045
FR 9805877

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 93 04586 A (ICI PLC) 18 mars 1993 * page 1 - page 8 *	6-13	
A	BUONOCORE V ET AL.: "Wheat protein inhibitors of alpha amylase" PHYTOCHEMISTRY, vol. 16, no. 7, 1977, pages 811-820, XP002091351 OXFORD GB * le document en entier *	6-13	
A	GATEHOUSE A M R ET AL: "IDENTIFYING PROTEINS WITH INSECTICIDAL ACTIVITY: USE OF ENCODING GENES TO PRODUCE INSECT-RESISTANT TRANSGENIC CROPS" PESTICIDE SCIENCE, vol. 52, no. 2, février 1998, pages 165-175, XP000751964 * le document en entier *	1-13	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche			Examineur
19 février 1999			De Kok, A
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)