



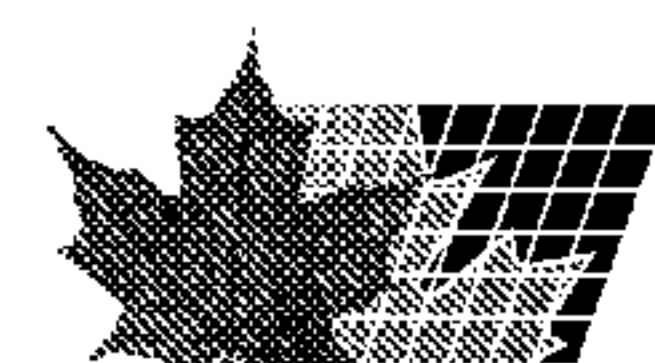
(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2001/06/22  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/01/17  
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2013/03/19  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/01/10  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2001/001979  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/004647  
(30) Priorité/Priority: 2000/07/11 (FR00/09032)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/82* (2006.01),  
*A01H 5/00* (2006.01), *A01N 63/02* (2006.01),  
*A01N 65/00* (2009.01), *C07K 14/415* (2006.01),  
*C12N 15/29* (2006.01)  
(72) Inventeurs/Inventors:  
LEMOINE, REMI RENE PAUL, FR;  
NOIRAUD, NATHALIE ELIANE JACQUELINE, FR  
(73) Propriétaire/Owner:  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE, FR  
(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : SEQUENCES D'ADN CODANT POUR UN TRANSPORTEUR DE POLYOLS ET LEUR UTILISATION,  
NOTAMMENT POUR LA PREPARATION DE PLANTES TRANSGENIQUES  
(54) Title: DNA SEQUENCES CODING FOR A POLYOL CARRIER AND USE THEREOF, IN PARTICULAR FOR  
PREPARING TRANSGENIC PLANTS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour un transporteur de polyols, chez les plantes et les champignons, tels que des polyols ayant une chaîne principale contenant 5 à 8 atomes de carbone, notamment 5 à 7 atomes de carbone, en particulier 6 atomes de carbone, lesquels polyols étant avantageusement choisis parmi le mannitol, le sorbitol, le dulcitol, le galactitol, l'inositol, le myo-inositol, le ribitol et le xylitol, et étant notamment le mannitol, pour la préparation de plantes transgéniques.





(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  
17 janvier 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/04647 A1**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :**C12N 15/82**, 15/29,

C07K 14/415, A01N 65/00, A01H 5/00

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal** etc.;  
Grosset-Fournier & Demachy Sarl, 20, rue de Maubeuge,  
F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/01979

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, 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.

(22) Date de dépôt international : 22 juin 2001 (22.06.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/09032

11 juillet 2000 (11.07.2000)

FR

(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, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **LEMOINE,**  
**Rémi, René, Paul** [FR/FR]; 11, boulevard sous Blassac,  
F-86000 Poitiers (FR). **NOIRAUD, Nathalie, Eliane,**  
**Jacqueline** [FR/FR]; Rue du Lavoir, F-79210 Saint Hilaire  
la Palud (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

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.

(54) Title: DNA SEQUENCES CODING FOR A POLYOL CARRIER AND USE THEREOF, IN PARTICULAR FOR PREPARING TRANSGENIC PLANTS

(54) Titre : SEQUENCES D'ADN CODANT POUR UN TRANSPORTEUR DE POLYOLS ET LEUR UTILISATION, NOTAMMENT POUR LA PREPARATION DE PLANTES TRANSGENIQUES

(57) Abstract: The invention concerns the use of a DNA sequence coding for a polyol carrier, in plants and fungi, such as polyols having a main chain containing 5 to 8 carbon atoms, in particular 5 to 7 carbon atoms, more preferably 6 carbon atoms, said polyols being advantageously selected among mannitol, sorbitol, dulcitol, galactitol, inositol, myo-inositol, ribitol and xylitol, and being preferably mannitol, for preparing transgenic plants.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour un transporteur de polyols, chez les plantes et les champignons, tels que des polyols ayant une chaîne principale contenant 5 à 8 atomes de carbone, notamment 5 à 7 atomes de carbone, en particulier 6 atomes de carbone, lesquels polyols étant avantageusement choisis parmi le mannitol, le sorbitol, le dulcitol, le galactitol, l'inositol, le myo-inositol, le ribitol et le xylitol, et étant notamment le mannitol, pour la préparation de plantes transgéniques.



WO 02/04647 A1



## SEQUENCES D'ADN CODANT POUR UN TRANSPORTEUR DE POLYOLS ET LEUR UTILISATION, NOTAMMENT POUR LA PREPARATION DE PLANTES TRANSGENIQUES

L'invention concerne des séquences d'ADN codant pour un transporteur de polyols et leur utilisation, notamment pour la préparation de plantes transgéniques.

Les plantes sont capables de synthétiser, par l'intermédiaire de la photosynthèse, des composés primaires comme les glucides en utilisant l'énergie lumineuse. Seuls certains organes de la plante, principalement les feuilles adultes, sont aptes à fabriquer et à exporter les glucides vers les organes de réserve, comme les tubercules, les graines et les fruits, utilisés dans l'alimentation humaine et animale.

Chez la plupart des plantes, le principal glucide transporté est le saccharose, mais chez de très nombreux végétaux, d'autres composés sont également transportés comme les polyols dont le mannitol est un exemple.

Les polyols sont, comme le saccharose, des produits primaires de la photosynthèse. On a d'ailleurs estimé qu'environ 30% de la production globale de carbone primaire était utilisé pour la synthèse des polyols.

Les polyols, cycliques ou non, sont très répandus chez les plantes ; ce sont des composés de faible poids moléculaire, très solubles et non réducteurs. Les trois polyols non cycliques (alditols) les plus répandus chez les Angiospermes sont le galactitol, le sorbitol et le mannitol. Le sorbitol est le produit photosynthétique principal chez plusieurs espèces de Rosacées telles que la pomme, la poire, la pêche et la prune.

Le mannitol, le plus répandu des alditols, est présent chez plus de 100 espèces de végétaux supérieurs, en particulier chez les Rubiacées (café), les Oléacées (troène, frêne, olive) et les Apiacées (céleri, carotte, persil) (Lewis, 1984). Il est produit dans les cellules de mésophylle (cellules contenant la chlorophylle). Pour circuler, il doit rentrer dans les tubes criblés (nervures). Cependant, il n'y a pas de continuité entre les cellules mésophylles et les tubes criblés : on a donc besoin d'un transporteur de mannitol. Ainsi, le mannitol sort des cellules mésophylles et utilise le transporteur pour pénétrer dans les tubes criblés.

Les composés synthétisés dans les feuilles adultes sont transportés vers les organes de réserve et traversent un certain nombre de membranes à l'aide des protéines spécialisées que sont les transporteurs. Ces transporteurs jouent un rôle considérable dans la plante car ils sont indispensables à sa croissance.



L'existence d'un transporteur de mannitol chez une plante telle que le céleri a été démontrée par différentes expériences biochimiques (Salmon et al., 1995). Cette publication a démontré qu'il existait un transporteur de mannitol chez le céleri et que l'expression de ce transporteur était très importante dans les tissus du phloème. Cependant, rien n'est dit quant à l'identification du transporteur de mannitol.

Si de nombreux transporteurs de sucres, comme le saccharose et les hexoses ont été clonés au cours des dernières années, aucun de ceux-ci n'est capable de transporter de polyol.

A l'heure actuelle, aucun transporteur de polyol linéaire n'a été identifié chez un organisme vivant. Chez les bactéries, un système multienzymatique capable de transporter et de phosphoryler à la fois le mannitol a été décrit (Boer et al., 1994). Toutefois, de tels systèmes n'ont jamais été décrits chez les organismes supérieurs.

L'invention a pour objet des transporteurs de polyols chez les plantes et les champignons, et leurs séquences d'ADN.

L'invention a également pour objet l'utilisation des séquences d'ADN de transporteur de polyol pour l'obtention de plantes transgéniques.

L'invention a également pour objet l'utilisation de séquences d'ADN de transporteur de polyol, notamment dans le cadre de l'obtention de plantes résistantes aux pathogènes ou de plantes résistantes au stress salin.

L'invention a également pour objet l'utilisation de séquences d'ADN de transporteur de polyol dans le cadre d'une méthode de criblage de plantes génétiquement modifiées.

L'invention concerne l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour un transporteur de polyols linéaires, chez les plantes et les champignons,

tels que des polyols ayant une chaîne principale contenant 5 à 8 atomes de carbone, notamment 5 à 7 atomes de carbone, en particulier 6 atomes de carbone, lesquels polyols étant avantageusement choisis parmi le mannitol, le sorbitol, le dulcitol, le galactitol, l'inositol, le ribitol et le xylitol, et étant notamment le mannitol,

pour la préparation de plantes transgéniques.

Dans l'expression "plantes et champignons", on englobe les algues, les mousses (Bryophytes), les fougères (Ptéridophytes), les plantes supérieures (Gymnospermes et Angiospermes) et les champignons.



On rappelle que, par définition, un polyol est un "polyalcool" contenant autant de fonctions alcool que d'atomes de carbone. On précise également que les termes polyol, polyalcool et sucre alcool sont équivalents.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation, pour la préparation de plantes transgéniques, d'une séquence d'ADN choisie parmi l'une des séquences suivantes : SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10.

SEQ ID NO : 1 est une nouvelle séquence d'acide nucléique identifiée chez le céleri (*Apium graveolens* L.), codant pour un transporteur de mannitol.

SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6, SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10 sont des séquences d'acides nucléiques codant pour des protéines de fonction jusqu'à ce jour inconnue.

SEQ ID NO : 3 (Beet 1) et SEQ ID NO : 4 (Beet 2) proviennent de la Betterave (*Beta vulgaris*).

SEQ ID NO : 5 (Pst 1), SEQ ID NO : 6 (Pst 2), SEQ ID NO : 7 (Pst 3), SEQ ID NO : 8 (Pst 4) et SEQ ID NO : 9 (Pst 5) proviennent d'*Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO : 10 (Bs) provient de *Bacillus subtilis*.

L'invention concerne également une nouvelle protéine, caractérisée par le fait qu'elle comprend ou est constituée par :

- la séquence SEQ ID NO : 2,
- ou toute séquence dérivée de SEQ ID NO : 2, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ayant la propriété de transporter, chez les plantes et les champignons, des polyols linéaires,

tels que des polyols ayant une chaîne principale contenant 5 à 8 atomes de carbone, notamment 5 à 7 atomes de carbone, en particulier 6 atomes de carbone, lesquels polyols étant avantageusement choisis parmi le mannitol, le sorbitol, le dulcitol, le galactitol, l'inositol, le ribitol et le xylitol, et étant notamment le mannitol,

- toute séquence homologue de SEQ ID NO : 2, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50% avec la séquence SEQ ID NO : 2 et possédant la propriété de transporter, chez les plantes et les champignons, des polyols tels que définis ci-dessus,



– ou tout fragment d'une des séquences définies ci-dessus, sous réserve qu'il possède la propriété de transporter, chez les plantes et les champignons, des polyols tels que définis ci-dessus, notamment tout fragment étant constitué d'au moins environ 10 acides aminés contigus dans la séquence SEQ ID NO : 2.

La propriété de transport de polyols présentée par un transporteur de polyols peut être vérifiée par l'un ou l'autre des tests suivants :

- l'utilisation de levure *S.cerevisiae* ou
- l'utilisation de membrane plasmique purifiée de vésicules du phloème.

L'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Noiraud et al., 2000) comprend la transformation des levures avec la séquence nucléotidique à tester, lesquelles levures sont capables de croître sur ledit polyol. Pour vérifier que le polyol est transporté dans ces levures, on peut utiliser du polyol marqué radioactivement. Pour chaque expérience, un contrôle est mis au point avec une souche de levure incapable de pousser sur le polyol, et qui ne transporte pas ledit polyol.

Le test ayant recours à une membrane plasmique purifiée de vésicules du phloème est celui décrit par Salmon et al. (1995).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la protéine de l'invention, telle que définie ci-dessus, est caractérisée en ce qu'elle est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2.

L'invention concerne également les fragments de protéine telle que définie ci-dessus, choisis parmi les séquences suivantes :

- Ala Cys Ala Leu Leu Ala Ser Met Asn Ser Ile Leu Leu Gly Tyr Asp Thr Gly Val Leu Ser Gly Ala Ser Ile (SEQ ID NO : 11) délimitée de l'acide aminé en position (26) à l'acide aminé en position (50) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Gln Ile Glu Ile Ile Ile Gly Ile Ile Asn Ile Tyr Ser Leu Leu Gly Ser Ala Ile Ala Gly (SEQ ID NO : 12) délimitée de l'acide aminé en position (62) à l'acide aminé en position (82) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Tyr Thr Met Val Leu Ala Gly Ile Ile Phe Phe Leu Gly Ala Ile Phe Met Gly Leu Ala (SEQ ID NO : 13) délimitée de l'acide aminé en position (92) à l'acide aminé en position (111) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Phe Leu Met Phe Gly Arg Phe Val Ala Gly Ile Gly Val Gly Tyr Ala Met Met Ile Ala Pro Val Tyr Thr Ala (SEQ ID NO : 14) délimitée de l'acide aminé en position (116) à l'acide aminé en position (140) de la séquence SEQ ID NO : 2,



- Phe Leu Thr Ser Phe Pro Glu Val Phe Ile Asn Ser Gly Val Leu Leu Gly Tyr Val Ser Asn Phe Ala Phe Ala (SEQ ID NO : 15) délimitée de l'acide aminé en position (150) à l'acide aminé en position (174) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Ile Met Leu Gly Ile Gly Ala Phe Pro Ser Val Ala Leu Ala Ile Ile Val Leu Tyr Met (SEQ ID NO : 16) délimitée de l'acide aminé en position (184) à l'acide aminé en position (203) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Ala Ala Ile Thr Gly Ile Gly Ile His Phe Phe Gln Gln Ala Cys Gly Ile Asp Ala Val Val Leu (SEQ ID NO : 17) délimitée de l'acide aminé en position (281) à l'acide aminé en position (302) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Leu Leu Ala Thr Ile Ala Val Gly Val Cys Lys Thr Val Phe Ile Leu Ile Ser Thr Phe (SEQ ID NO : 18) délimitée de l'acide aminé en position (320) à l'acide aminé en position (339) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Leu Met Leu Thr Ser Met Gly Gly Met Val Ile Ala Leu Phe Val Leu Ala Gly Ser Leu Thr Val (SEQ ID NO : 19) délimitée de l'acide aminé en position (349) à l'acide aminé en position (370) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Gly Gly Leu Ala Ile Phe Thr Val Tyr Ala Phe Val Ser Ile Phe Ser Ser Gly Met Gly Pro Ile Ala Trp Val Tyr (SEQ ID NO : 20) délimitée de l'acide aminé en position (382) à l'acide aminé en position (407) de la séquence SEQ ID NO : 2,
- Cys Ser Ile Gly Val Ala Val Asn Arg Gly Met Ser Gly Ile Ile Gly Met Thr Phe Ile Ser (SEQ ID NO : 21) délimitée de l'acide aminé en position (421) à l'acide aminé en position (441) de la séquence SEQ ID NO : 2, et
- Ala Phe Leu Leu Phe Ala Val Val Ala Ser Ile Gly Trp Val Phe Met Tyr Thr Met Phe (SEQ ID NO : 22) délimitée de l'acide aminé en position (451) à l'acide aminé en position (470) de la séquence SEQ ID NO : 2,

L'invention concerne également une séquence nucléotidique codant pour une protéine telle que définie ci-dessus.

Une séquence d'ADN avantageuse de l'invention comprend ou est constituée par :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1,
- ou toute séquence nucléotidique dérivée, par dégénérescence du code génétique, de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine représentée par SEQ ID NO : 2,



- ou toute séquence nucléotidique dérivée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine dérivée de SEQ ID NO : 2, telle que définie ci-dessus,
- ou toute séquence nucléotidique homologue de SEQ ID NO : 1, ayant de préférence une homologie d'au moins environ 35% avec la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour une protéine homologue de SEQ ID NO : 2, telle que définie ci-dessus,
- ou tout fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 30 nucléotides contigus dans ladite séquence,
- ou toute séquence nucléotidique complémentaire des séquences ou fragments susmentionnés,
- ou toute séquence nucléotidique susceptible d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence complémentaire d'une des séquences ou d'un des fragments susmentionnés.

Par conditions stringentes d'hybridation on entend :

- température d'hybridation : 65°C,
- milieu d'hybridation : tampon phosphate de sodium 250 mM, pH 7,2 ; 6,6% (p/v) de SDS ; 1 mM EDTA ; 1% (p/v) d'albumine sérine de bœuf,
- température de lavage : 65°C,
- milieux de rinçage successifs :
  - 2× SSC (1,75% NaCl ; 0,88% citrate de sodium), SDS 0,1%
  - 1× SSC (0,875% NaCl ; 0,44% citrate de sodium), SDS 0,1%
  - 0,5× SSC (0,44% NaCl ; 0,22% citrate de sodium), SDS 0,1%.

L'invention concerne également les fragments de séquences nucléotidiques telle que définies ci-dessus, choisis parmi les séquences suivantes :

- GCT TGT GCT CTT TTA GCT TCC ATG AAT TCC ATC TTA CTC GGC TAT GAC ACC GGA GTG TTG AGT GGA GCA TCA ATA (SEQ ID NO : 23) délimitée du nucléotide en position (92) au nucléotide en position (166) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- CAA ATC GAA ATA ATC ATC GGA ATC ATC AAC ATC TAC TCT CTT CTT GGT TCG GCC ATA GCC GGA (SEQ ID NO : 24) délimitée du nucléotide en position (200) au nucléotide en position (262) de la séquence SEQ ID NO : 1,



- TAC ACC ATG GTA CTA GCT GGT ATC ATA TTT TTT CTA GGA GCC ATT TTC ATG GGG CTT GCT (SEQ ID NO : 25) délimitée du nucléotide en position (290) au nucléotide en position (349) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- TTT CTC ATG TTT GGT CGC TTT GTT GCT GGA ATT GGT GTC GGT TAT GCC ATG ATG ATC GCT CCC GTC TAC ACT GCC (SEQ ID NO : 26) délimitée du nucléotide en position (362) au nucléotide en position (436) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- TTC CTC ACT TCT TTT CCT GAG GTT TTC ATT AAT TCT GGT GTG TTG CTC GGG TAT GTA TCC AAC TTT GCA TTT GCC (SEQ ID NO : 27) délimitée du nucléotide en position (464) au nucléotide en position (538) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- ATT ATG CTG GGA ATT GGA GCA TTT CCT TCA GTT GCC TTG GCC ATA ATT GTG TTA TAT ATG (SEQ ID NO : 28) délimitée du nucléotide en position (566) au nucléotide en position (625) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- GCT GCA ATT ACG GGT ATT GGT ATT CAT TTC TTC CAA CAG GCT TGT GGT ATT GAT GCT GTT GTT TTA (SEQ ID NO : 29) délimitée du nucléotide en position (857) au nucléotide en position (922) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- CTC CTT GCG ACA ATT GCT GTT GGA GTC TGC AAA ACA GTC TTT ATT CTG ATA TCA ACG TTT (SEQ ID NO : 30) délimitée du nucléotide en position (974) au nucléotide en position (1033) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- CTG ATG CTA ACA AGT ATG GGG GGT ATG GTT ATT GCT CTA TTT GTA CTG GCA GGC TCA TTG ACG GTT (SEQ ID NO : 31) délimitée du nucléotide en position (1061) au nucléotide en position (1126) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- GGT GGT TTG GCA ATA TTT ACA GTG TAT GCT TTT GTG TCG ATA TTT TCA AGT GGC ATG GGT CCA ATT GCT TGG GTC TAT (SEQ ID NO : 32) délimitée du nucléotide en position (1160) au nucléotide en position (1237) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- TGT AGT ATC GGA GTG GCA GTT AAC CGT GGC ATG AGT GGC ATA ATT GGA ATG ACA TTT ATA TCG (SEQ ID NO : 33) délimitée du nucléotide en position (1277) au nucléotide en position (1339) de la séquence SEQ ID NO : 1,
- GCA TTC CTT TTA TTT GCT GTG GTT GCA TCT ATC GGA TGG GTC TTT ATG TAC ACA ATG TTC (SEQ ID NO : 34) délimitée du nucléotide en position (1367) au nucléotide en position (1426) de la séquence SEQ ID NO : 1,



La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 23 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 11.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 24 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 12.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 25 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 13.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 26 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 14.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 27 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 15.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 28 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 16.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 29 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 17.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 30 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 18.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 31 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 19.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 32 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 20.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 33 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 21.

La séquence d'acide nucléique SEQ ID NO : 34 code pour le fragment de protéine SEQ ID NO : 22.

L'invention concerne également un vecteur recombinant, notamment plasmide, cosmide, phage ou ADN de virus, contenant une séquence nucléotidique telle que mentionnée ci-dessus.

L'invention concerne également un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, contenant les éléments nécessaires à l'expression dans une cellule hôte des polypeptides codés par les acides nucléiques tels que définis ci-dessus, insérés dans ledit vecteur.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le vecteur recombinant défini ci-dessus contient notamment un promoteur reconnu par l'ARN polymérase de la cellule hôte, en particulier un promoteur inductible et éventuellement une séquence de transcription, de terminaison, et éventuellement une séquence signal et/ou d'ancrage.



Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le vecteur recombinant, tel que défini ci-dessus, contient les éléments qui permettent l'expression d'une séquence nucléotidique, telle que définie ci-dessus, en tant que protéine mature ou protéine de fusion.

L'invention concerne également une cellule hôte, choisie notamment parmi les bactéries, les virus, les levures, les champignons, les plantes ou les cellules de mammifères, ladite cellule hôte étant transformée, notamment à l'aide d'un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la cellule hôte, telle que définie ci-dessus, contient les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne également le produit de l'expression d'un acide nucléique exprimé par une cellule hôte transformée telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne également un anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé de manière spécifique contre une protéine de l'invention.

On ne se limite pas aux anticorps polyclonaux ; l'invention concerne également tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé selon les méthodes classiques à partir, d'une part, de cellules de rate d'animaux, en particulier de souris ou de rat, les cellules de l'animal étant immunisées contre la protéine de l'invention, et d'autre part de cellules d'une lignée cellulaire de myélome, ledit hybridome étant susceptible d'être choisi selon la capacité de la lignée cellulaire à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine utilisée au préalable pour l'immunisation des animaux.

L'invention concerne également une sonde nucléotidique capable d'hybrider avec l'une quelconque des séquences nucléiques de l'invention.

L'invention concerne également les oligonucléotides antisens ou ARN messenger antisens dérivés des séquences nucléotidiques tels que définis ci-dessus.

Par modification de l'expression du transporteur de mannitol, en utilisant des oligonucléotides antisens, on peut alors déterminer si une diminution de l'expression du transporteur de mannitol a pour conséquence une diminution de la tolérance au stress salin.

L'invention concerne également les cellules de plantes contenant dans leur génome une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.



L'invention concerne également les plantes transgéniques, parties de plantes, semences de plantes ou matériel de propagation de plantes contenant des cellules telles que définies ci-dessus.

L'invention concerne en particulier les plantes transgéniques qui, à l'état natif, ne contiennent pas ou n'expriment pas le gène du transporteur de mannitol, dans le génome desquelles est introduit ladite séquence nucléotidique.

L'invention concerne en particulier les plantes transgéniques qui, à l'état natif, contiennent ou expriment le gène du transporteur de mannitol, dans le génome desquelles est introduit ladite séquence nucléotidique.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une protéine recombinante telle que définie ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

- la culture dans un milieu approprié d'une cellule hôte qui a été auparavant transformée par un vecteur approprié contenant un acide nucléique de l'invention, et
- la récupération de la protéine produite par la susdite cellule hôte transformée à partir du susdit milieu de culture ou à partir de la cellule hôte.

Par exemple, un procédé de préparation d'un céleri transgénique tel que défini ci-dessus, comprend les étapes suivantes :

- l'inoculation des tissus de Céleri,
- la coculture des segments de Céleri et des bactéries *A.tumefaciens*,
- l'élimination des bactéries *A.tumefaciens*,
- la régénération des plants de Céleri transformés (Nadel et al., 1989).

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être introduites dans des plasmides et être combinées avec des éléments de régulation pour l'expression dans des cellules eucaryotes. Ces éléments de régulation sont d'une part des promoteurs de transcription et d'autre part des terminateurs de transcription. Avec les séquences nucléotidiques de l'invention contenues dans les plasmides, on peut transformer les cellules eucaryotes dans l'intention d'exprimer un ARNm traduisible qui rend possible la synthèse d'un transporteur de polyol dans les cellules ou dans l'intention d'exprimer un ARNm non traduisible, qui empêche la synthèse d'un transporteur de polyol endogène dans les cellules.

Les procédés de modification génétique des dicotylédones et monocotylédones sont déjà connus (Gasser et al., 1989). Pour l'expression dans les plantes, les séquences nucléotidiques de l'invention doivent être couplées avec des éléments de régulation de la transcription. De tels éléments, appelés promoteurs, sont déjà connus (EP 375091).



De plus, il faut fournir les régions codantes avec les signaux de terminaison de la transcription avec lesquels ils peuvent être correctement transcrits. De tels éléments sont également décrits (Gielen et al., 1989). La région d'initiation de la transcription peut être native et/ou homologue de même qu'étrangère et/ou hétérologue à la plante hôte. Si on le souhaite, les régions de terminaison sont interchangeables entre elles. La séquence d'ADN des régions d'initiation et de terminaison de la transcription peut être préparée synthétiquement ou obtenue naturellement, ou obtenue à partir d'un mélange de constituants d'ADN naturel ou synthétique. Pour introduire des gènes étrangers dans des plantes supérieures, un grand nombre de vecteurs de clonage sont disponibles qui incluent un signal de répllication pour *E.coli* et un marqueur qui permet une sélection des cellules transformées.

Pour l'introduction des séquences nucléotidiques de l'invention dans un hôte cellulaire de plante, en plus de la transformation utilisant *Agrobacteria*, il existe beaucoup d'autres techniques. Ces techniques incluent la fusion de protoplastes, la microinjection d'ADN et l'électroporation, ainsi que des méthodes balistiques et l'infection de virus. A partir du matériel de plante transformé, les plantes entières peuvent être régénérées dans un milieu adapté, contenant des antibiotiques ou des biocides pour la sélection. Les plantes résultantes peuvent ensuite être testées pour la présence de l'ADN introduit. Il n'y a pas d'exigence particulière pour les plasmides en ce qui concerne l'injection et l'électroporation. On peut utiliser de simples plasmides tels que les dérivés pUC. La présence d'un gène marqueur est nécessaire pour la régénération de plantes entières à partir de telles cellules transformées. Les cellules transformées se développent dans les plantes de manière usuelle (McCormick et al., 1986). Ces plantes peuvent se développer normalement et être croisées avec des plantes qui possèdent les mêmes gènes transformés ou des gènes différents. Les hybrides résultants ont les propriétés phénotypiques correspondantes.

Les séquences d'ADN de l'invention peuvent également être introduites dans des plasmides et être combinées avec des éléments de régulation pour une expression dans des cellules procaryotes.

Les séquences d'ADN de l'invention peuvent également être introduites dans des plasmides qui permettent une mutagenèse ou une modification de séquence au moyen d'une recombinaison des séquences d'ADN dans les systèmes procaryotes ou eucaryotes.



Les plantes transgéniques de l'invention sont notamment caractérisées par une augmentation de la capacité à transporter un polyol de l'invention et à l'accumuler dans les organes à partir desquels il est extrait. Elles peuvent être utilisées pour orienter les flux dudit polyol à l'aide dudit transporteur vers les organes qui accumulent peu de sel, facilitant ainsi l'extraction.

L'invention concerne également un procédé de criblage de plantes génétiquement modifiées avec au moins une séquence nucléotidique d'intérêt qui comprend les étapes suivantes :

- la transformation de cellules végétales avec un vecteur contenant une séquence d'insertion, ladite séquence d'insertion comprenant la séquence nucléotidique d'intérêt et une séquence nucléotidique codant pour un transporteur de polyol tel que défini ci-dessus,
- la mise en culture des cellules ainsi transformées sur un milieu contenant ledit polyol comme unique source de carbone, pour l'obtention de plantes ou de fragments de plantes transgéniques contenant ladite séquence d'insertion.

Ce procédé concerne les plantes ne synthétisant pas de polyol ou les plantes qui le synthétisent.

Il s'agit, plus particulièrement, de transformer des fragments ou des cellules de plantes avec une séquence nucléotidique codant pour un transporteur de polyol, notamment de mannitol. Le criblage s'opère ensuite sur un milieu contenant ledit polyol comme seule source de carbone. Les plantes exprimant le transporteur de polyol ont ainsi un avantage de croissance sur les plantes non transformées. A ce stade, on peut supposer que toute plante est capable d'utiliser ledit polyol comme source de carbone. Toutefois, il peut s'avérer nécessaire de faire une co-transformation avec un gène codant une protéine capable de dégrader ledit polyol. L'utilisation d'un promoteur actif uniquement dans les phases initiales de régénération ou inductible par un composé simple permet de restreindre l'expression du transporteur de polyol aux phases de sélection.

Il s'agit donc d'un système de sélection simple basé sur un gène de plante qui n'est plus nécessaire une fois la sélection terminée et sur l'utilisation d'un produit naturel comme agent de sélection. Ce système évite d'avoir recours à l'utilisation de produits susceptibles d'être toxiques, tels que des antibiotiques.

L'invention concerne également un procédé d'obtention de plantes transgéniques résistantes aux pathogènes, qui comprend les étapes suivantes :



- la transformation de cellules végétales avec une séquence nucléotidique codant pour un transporteur de polyol tel que défini ci-dessus,
- la mise en culture des cellules ainsi transformées pour l'obtention de plantes ou de fragments de plantes transgéniques.

Ce procédé concerne la transformation de plantes ne synthétisant pas de polyol ou de plantes qui le synthétisent, avec une séquence nucléotidique d'un transporteur de polyol, notamment de mannitol, placé soit sous le contrôle d'un promoteur ubiquiste (type CaMV 35S) soit sous le contrôle d'un promoteur inductible en réponse à l'attaque du pathogène. L'intérêt réside en ce que la plante, en transportant vers ses propres cellules davantage de polyol, émis par le pathogène, supprime un des moyens de défense mis en place par le pathogène pour lutter contre l'oxygène activé libéré par la plante en réponse à cette attaque.

On peut, pour augmenter l'efficacité du procédé, coupler l'expression du transporteur de polyol avec une enzyme dégradant ledit polyol.

L'invention concerne un procédé d'obtention de plantes transgéniques résistantes au stress salin, qui comprend les étapes suivantes :

- la transformation de cellules végétales avec une séquence nucléotidique codant pour un transporteur de polyol tel que défini ci-dessus,
- la mise en culture des cellules ainsi transformées pour l'obtention de plantes ou de fragments de plantes transgéniques.

Ce procédé concerne la transformation de plantes ne synthétisant pas de polyol ou de plantes qui le synthétisent avec une séquence nucléotidique codant pour un transporteur de polyol placé sous contrôle d'un promoteur spécifique du phloème (ou du promoteur du transporteur de polyol). Si la plante synthétise ledit polyol, l'augmentation du transport dudit polyol pourrait conduire à une tolérance accrue au stress salin. Dans le cas contraire, il convient également d'introduire des gènes permettant la synthèse dudit polyol, mais en limitant cette synthèse aux feuilles afin d'éviter des effets néfastes sur la croissance de la plante.

## **DESCRIPTION DES FIGURES**

La Figure 1 représente le test de croissance de la levure MaDH4 exprimant la séquence protéique AgMaT1. L'ADNc de AgMaT1, sous contrôle du promoteur ADH1, a été introduit dans les cellules de la souche MaDH4, et la croissance des cellules



transformées sur mannitol a été étudiée. Les cellules transformées ont été cultivées sur du milieu SC (synthétique complet) liquide sans tryptophane contenant soit du glucose 2% (SC-glu) soit du mannitol 2% (SC-mann).

MaDH4-YEP112A1XE : MaDH4 contenant le plasmide vide ;

MaDH4-AgMaT1 : MaDH4 contenant le plasmide avec l'acide nucléique de AgMaT1.

Les carrés blancs correspondent à des levures MaDH4 transformées avec le plasmide vide YEP112A1XE (défini ci-après) et cultivées sur du milieu SC-glucose.

Les carrés noirs correspondent à des levures MaDH4 transformées avec le plasmide vide YEP112A1XE (défini ci-après) et cultivées sur du milieu SC-mannitol.

Les cercles blancs correspondent à des levures MaDH4 transformées avec AgMaT1/YEP112A1XE (plasmide YEP112A1XE contenant l'acide nucléique de AgMaT1) et cultivées sur du milieu SC-glucose.

Les cercles noirs correspondent à des levures MaDH4 transformées avec AgMaT1/YEP112A1XE (plasmide YEP112A1XE contenant l'acide nucléique de AgMaT1) et cultivées sur du milieu SC-mannitol.

Les courbes représentent l'évolution en fonction du temps de l'absorbance (à 600 nm) des cultures de levure. Cette augmentation de l'absorbance correspond en fait à une augmentation du nombre de levures dans le milieu de culture et est représentative de la vitesse de croissance des levures. Ainsi les levures transformées avec les plasmides YEP112A1XE et AgMaT1/YEP112A1XE poussent sur du glucose mais seules les levures transformées avec le plasmide AgMaT1/YEP112A1XE sont capables de pousser sur du mannitol. Il s'agit donc d'une preuve que AgMaT1 code un transporteur de mannitol.

La Figure 2 représente l'absorption de mannitol dans des cellules de *S. cerevisiae*. La concentration externe en mannitol  $^3\text{H}$  est de 500  $\mu\text{M}$  et le pH de 4,5. Les carrés représentent l'absorption dans des cellules transformées avec l'acide nucléique de AgMaT1 tandis que les cercles représentent l'absorption dans des cellules témoins transformées avec le plasmide YEP112A1XE vide. Seules les cellules transformées avec le plasmide AgMaT1/YEP112A1XE sont capables d'absorber le mannitol  $^3\text{H}$  placé dans le milieu externe.



## MATERIEL ET METHODES

### Matériel végétal

Des plants de Céleri (*Apium graveolens* L. variété dulce, cultivar Vert d'Elne) ont été cultivés en serres selon les conditions décrites par Davis et al. (1988). Les faisceaux phloémiens ont été isolés à partir de pétioles adultes selon la technique décrite par Daie (1987).

### Souches bactériennes et de levures

Les souches suivantes ont été utilisées dans cette étude : *Escherichia coli* souches DH5 $\alpha$  (*supE44*,  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80, *lacZM15*), *hsdR17*, *recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) (souches commercialisées par Clontech). XL1Blue™ MRF' (Stratagene) et SOLR™ (Stratagene) ont été cultivées selon les techniques standard (Sambrook et al., 1989). La souche de *Saccharomyces cerevisiae* MaDH4 (*ura3*, *trp1*, *LEU2*, *gap1-1*, *put4-1*, *uga4-1*), dont la préparation est indiquée ci-après, exprime le gène de la mannitol déshydrogénase de levure et a été utilisée pour la caractérisation fonctionnelle de l'ADNc de *AgMaT1*. La souche 2a a été obtenue par croisement entre les souches  $\Delta\alpha$  (MAT $\alpha$ , *ura3*, *trp1*, *leu2*) (Marcireau et al., 1992) et  $\Sigma$ 22574d (MAT $\alpha$ , *ura3-1*, *gap1-1*, *put4-1*, *uga4-1*) (Jauniaux et al., 1987).

### Vecteur d'expression dans les levures

On a utilisé le plasmide YIP 128A1, décrit dans Riesmeier et al. (1992). Le gène de la mannitol déshydrogénase de levure (*YEL070*) a été amplifié par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en utilisant les oligonucléotides MDHPST5 (5'- GACTCGA-GATGACAAAATCAGACGAAACAAC-3') et MDHBGL3 (5'- GAAGATCTTCACACCTTGGTCTAAAATTTCC-3') sur l'ADN génomique de la souche de *Saccharomyces*  $\Delta\alpha$ . Le produit de la PCR a été cloné dans le vecteur pBluescript SK digéré préalablement par *Pst*I et *Bam*HI. Après séquençage pour confirmer la séquence du gène amplifié, le produit de PCR a été digéré par *Pst*I et *Xba*I et cloné dans les sites



Pst1/Xba1 de YIP128A1. La construction a été intégrée dans le génome de *S. cerevisiae* par le site EcoV dans le gène *leu2* pour obtenir la souche MaDH4.

#### 5'RACE-PCR (Amplification rapide des extrémités d'ADNc par PCR),

Des ARN totaux de feuilles de céleri ont été isolés selon la méthode de Kay et al. (1987). Le premier brin d'ADNc a été inversement transcrit à partir de l'ARN total avec l'amorce dégénérée (5'-CCNACNCC(G/A)AANGGNA(G/A)NA(G/A)-3) dérivée de la séquence LLGFGVG en utilisant la transcriptase inverse SuperScript™ II (Stratagène). Après dégradation de la matrice ARN par la RNaseH (Eurogentec), une amorce d'accrochage (dC)<sub>16</sub> a été créée à l'extrémité 3' de l'ADNc simple brin par une déoxynucleotidyl transférase (GibcoBRL). Une amplification PCR a été réalisée en utilisant les amorces (dG)<sub>16</sub> et LLGFGVG dans les conditions suivantes : 2 min à 95°C puis 30 cycles comprenant une dénaturation de 2 min à 95°C, une fixation de 2 min à 55°C et une élongation de 2 min à 72°C. Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose puis clonés dans le plasmide pGEM-T Easy™ (Promega).

#### Construction et criblage d'une banque d'ADNc de phloème de céleri

Les ARN totaux des faisceaux de phloème ont été isolés selon la méthode décrite par Kay et al. (1987). Les ARN polyA+ ont été purifiés avec le système PolyATtract mRNA isolation (Promega). Une banque unidirectionnelle EcoR1/XhoI a été construite dans le phage Uni-ZapXR™ (Stratagene).

Les phages recombinants (900 000) ont été criblés avec, comme sonde, le produit de 5'RACE-PCR marqué radioactivement, en accord avec le protocole du fabricant (Stratagene). Les filtres en nylon Hybond™-N™ (Amersham) ont été hybridés pendant une nuit à 42°C selon les conditions standard (Stratagene). Les filtres ont ensuite été rincés pendant 15 min à 42°C dans du SSC 2x (SSC 1x = 0,15 M NaCl ; 0,015 M citrate de sodium) avec du SDS à 0,1%, puis 15 min dans le même milieu mais à 50°C et 30 min à 50°C dans du SSC 1x et du SDS à 0,1%. L'excision *in vivo* a été réalisée sur les 24 clones qui avaient donné un signal positif lors des 3 tours successifs de criblage. Les ADNc identifiés ont été partiellement séquencés. Les comparaisons de séquence ont été réalisées sur le site du National Center for Biotechnology Information. Les régions



transmembranaires ont été prédites avec le programme Tmpred (Hofmann et Stoffel, 1993).

#### Expression d'AgMaT1 dans *Saccharomyces cerevisiae*

L'ADNc de AgMaT1 a été ligué dans les sites PstI-XhoI du vecteur de levure YEP112A1XE (Riesmeier et al., 1992). Ce vecteur permet l'expression des ADNc sous le contrôle du promoteur de levure ADH1. Les cellules de levures MaDH4 ont été rendues compétentes et transformées selon le protocole décrit par Dohmen et al. (1991).

#### Détermination de la vitesse de croissance

Les cultures de levures ont poussé sur du milieu SC comprenant soit du glucose à 2%, soit du mannitol à 2%. Des fractions aliquotes ont été prélevées régulièrement dans les cultures et leur absorbance a été mesurée à 600 nm.

#### Détermination de l'activité mannitol déshydrogénase

Les cellules ont été cultivées jusqu'en phase de croissance logarithmique, rincées dans de l'eau distillée et remises en suspension à 80% (poids/volume) dans du tampon d'extraction (phosphate de potassium 50 mM pH 7,5, DTT 1 mM et Triton X100 à 0,5%). Les cellules ont été cassées par vortex avec des billes de verre. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation et l'extrait brut utilisé pour le dosage enzymatique. L'activité mannitol deshydrogénase a été mesurée à 30°C selon Quain et Boulton (1987).

#### Mesure de transport de mannitol radiomarqué

Les cellules ont été cultivées jusqu'en début de phase logarithmique (correspondant à une absorbance de 0,6 à 600 nm), lavées dans de l'eau distillée et resuspendues à 1% (poids/volume) dans du milieu SC tamponné à pH 4,5 avec du MES 25 mM. Une fraction aliquote de 100 µl de la suspension cellulaire a été incubée pendant 60, 120, 180 et 300 s dans 100 µl d'une solution contenant du [<sup>3</sup>H]-mannitol 500 µM. La réaction a été arrêtée par addition de 8 ml d'eau à 4°C et par filtration sur



des filtres en fibres de verre (Sartorius). La radioactivité incorporée dans les cellules de levure a été déterminée par comptage en scintillation liquide (Packard). Pour les expériences avec des inhibiteurs ou des compétiteurs, le produit a été ajouté 30s avant le mannitol radioactif.

#### Etude de l'expression d'AgMaT1 par RT-PCR (transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérase)

Des ARN totaux de phloème de céleri ont été isolés selon la méthode de Kay et al. (1987). Le premier brin d'ADNc a été inversement transcrit à partir de l'ARN total avec l'amorce oligo dT en utilisant la transcriptase inverse SuperScript™ II (Stratagène). Après dégradation de l'ARN matrice par la RNaseH (Eurogentec), une amplification PCR a été effectuée en utilisant les amorces 5' (ATTCTGGTGTGTTGCTCG) et 3' (CAATGAACAGTATGATGTG) qui permettent l'amplification d'un fragment de 661 nucléotides. Les conditions de PCR sont les suivantes : 2 minutes à 95°C puis 30 cycles comprenant une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une fixation d'une minute à 47°C et une élongation de 45 secondes à 72°C. Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose et l'intensité du signal obtenu quantifié à l'aide du logiciel Photoshop 5.0 (Adobe systems Inc.). Le facteur d'élongation eIF4A(10) (Mandel et al., 1995) a été utilisé comme gène de contrôle dont l'expression est invariable.

## **RESULTATS**

### Clonage moléculaire de AgMaT1

Un certain nombre de protéines qui transportent des sucres ou des métabolites font preuve de similitudes dans leurs séquences. Il a été suggéré que ces protéines de transport ont évolué à partir de la duplication d'une protéine ancestrale avec 6 régions transmembranaires (Maiden et al., 1987). Plusieurs régions d'acides aminés conservés ont été identifiées telles que les séquences d'acides aminés aux extrémités des 6<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> domaines transmembranaires, respectivement PESPR et PETKG (Griffith et al., 1992). Une comparaison entre les différents transporteurs de glucose (MST1, STP1, STP4, HUP1, HUP3, GLUT1), le transporteur de D-xylose de *L.brevis*, le transporteur



d'arabinose d'*E.coli* (ARAE), le transporteur de galactose d'*E.coli* (GALP) et les transporteurs de myo-inositol de levure (gènes ITR1 et ITR2) indique une région conservée LLGFGVG. On a choisi cette séquence comme matrice pour concevoir l'amorce dégénérée 5'RACE pour la PCR.

Le premier brin d'ADNc a été transcrit inversement à partir de l'ARN entier des feuilles de céleri mature, amorcé avec une amorce dégénérée LLGFGVG. Après amplification, on a observé une bande de 1 kb sur le gel d'agarose. On a cloné tous les fragments de cette réaction de PCR dans un vecteur pGEM-T Easy (Promega), et on a obtenu plusieurs clones.

Pour obtenir un clone entier, on a construit une bibliothèque d'ADNc provenant de faisceaux de phloème isolés à partir de pétioles de céleri mature et on a criblé cette bibliothèque avec le clone 5'RACE-PCR. Après avoir criblé 900 000 transformants, on a identifié 24 clones positifs. Des transformants positifs avec des inserts d'approximativement 1,8-2,0 kb ont été choisis et partiellement séquencés. L'un de ces clones, nommé *AgMaT1*, a été choisi pour une analyse détaillée. Il contient 1778 pb avec un cadre ouvert de lecture qui code pour une protéine contenant 513 acides aminés avec une masse moléculaire estimée à 56 kDa. L'analyse hydropathique de la séquence déduite d'acides aminés indique que *AgMaT1* contient 12 domaines transmembranaires et une région centrale hydrophile longue de 77 résidus acides aminés. La séquence d'acides aminés de *AgMaT1* a été comparée avec celles des bases de données et on a trouvé que cette séquence était apparentée aux transporteurs de sucres dans de nombreux organismes. Le pourcentage d'identité des acides aminés est approximativement égal à 50%. Cependant, on a trouvé un plus grand pourcentage d'identité (65%) avec deux éventuels transporteurs de sucre de *Beta vulgaris* (Beet 1 et Beet 2). Un résidu d'asparagine, qui est une partie d'une séquence consensus de N-glycosylation (Asn372), est situé sur le côté externe et devrait ainsi être glycosylé. De plus, les séquences consensus, qui sont les caractéristiques communes du sous-groupe des transporteurs de sucre de la MFS, sont présentes dans *AgMaT1*. Nous avons trouvé les séquences de PESPRXL et PETQGRXXE respectivement aux extrémités des 6<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> domaines transmembranaires, ou le motif (R/K)XGR(R/K) entre le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> et également les 8<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> hélices transmembranaires (Griffith et al., 1992).



Remarque :

La principale difficulté rencontrée au cours du clonage a été l'absence totale de caractérisation d'un tel transporteur chez aucun organisme vivant. En effet le seul transporteur de mannitol est une mannitol-phospho-transférase de bactérie (Boer et al., 1994) qui effectue à la fois le transport et la phosphorylation du mannitol. Ce système combiné est présent chez les bactéries pour de nombreux substrats mais il n'existe pas chez les organismes Eucaryotes. Toutefois, selon une première stratégie, un premier criblage de la banque d'ADNc a été effectué avec la partie du gène de la mannitol-phospho-transférase correspondant au domaine transmembranaire. Ce criblage n'a pas permis d'obtenir de résultat, ce qui se justifie a posteriori par l'absence d'homologie significative entre AgMaT1 et la mannitol-phospho-transférase.

Une seconde stratégie, qui s'est révélée inopérante, s'est inspirée de celle utilisée pour identifier le transporteur d'oligosaccharides chez les végétaux (brevet EP 0 647 273). Il s'agissait de compléter des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* avec une banque d'ADNc dans un vecteur d'expression. Les levures sont en effet capables d'utiliser le mannitol comme source de carbone, mais elles nécessitent une période d'induction assez longue sur mannitol. Comme il a déjà été précisé, aucun transporteur de mannitol n'a été identifié chez la levure. Le raisonnement était que si une levure exprimait un transporteur de mannitol végétal, cela lui conférerait un avantage de croissance et que donc, elle pousserait plus vite sur un milieu contenant du mannitol. On a procédé ainsi mais aucun des ADNc obtenus ne présentait aucunes des caractéristiques de protéines membranaires et ressemblaient en fait à des facteurs de transcription. Le système de sélection permettait en fait d'identifier des ADNc qui intervenaient sur l'expression des gènes de la levure et non pas des transporteurs.

Devant les difficultés rencontrées, les Inventeurs ont formulé une hypothèse a priori peu probable selon laquelle le transporteur de mannitol ferait partie de la super famille des transporteurs de glucides décrite par Marger et Saier (1993). Pour ce faire, on a utilisé une espèce, le céleri, chez laquelle l'existence d'un transporteur de mannitol avait été démontrée (Salmon et al., 1995) et à construire une banque d'ADNc à partir du tissu (le phloème) dans lequel le transporteur est le plus exprimé. La seconde étape a été la sélection des ADNc obtenus sur leur capacité à conférer à des levures la possibilité de transporter du mannitol. Dans ces expériences le témoin était la souche de levure



transformée avec le plasmide d'expression vide. C'est ainsi que la fonction de transporteur de mannitol de l'ADNc de AgMaT1 a été démontrée.

Lors de cette expérience, on a identifié d'autres séquences : on a en tout obtenu 24 clones. Parmi tous ces clones, on en a séquencé deux qui présentaient des profils d'hydropathie de transporteurs. Le premier, M22 (AgMaT1), conférait à des levures la capacité de transporter du mannitol alors que le second, M7, ne la conférait pas.

#### Construction d'une souche de levure susceptible de métaboliser le mannitol intracellulaire

Des études initiales ont été réalisées afin de caractériser la capacité d'une levure à absorber et à métaboliser le mannitol (Quain et Boulton, 1987). Sur les 40 souches polyploïdes de *S. cerevisiae* criblées, la moitié d'entre elles ont fait preuve d'une bonne croissance sur du mannitol 5% après une adaptation à long terme (Quain et Boulton, 1987). Par conséquent, on a décidé de tester différentes souches de levures pour leur capacité à transporter et à métaboliser le mannitol et on a retenu 2 souches. Cela a d'abord été effectué en analysant les caractéristiques de croissance sur un milieu contenant du mannitol comme unique source de carbone.  $\Sigma 22574d$ , en général déficiente en transporteur général d'acides aminés et en transporteur de proline, est incapable de croître sur un milieu contenant du mannitol comme unique source de carbone. Au contraire,  $\Delta\alpha$  était capable de croître sur du mannitol après une adaptation à long terme. Après adaptation, la souche pouvait être maintenue avec succès sur un milieu solide contenant du mannitol 5%. Mais le maintien de la souche adaptée  $\Delta\alpha$  sur un milieu solide contenant seulement du glucose a conduit à la perte totale de la croissance adaptée. Une telle adaptation de la croissance sur du mannitol est probablement due à l'induction des enzymes clés de dégradation ou des perméases de transport. En accord avec les observations précédentes, on a pu détecter une D-mannitol déshydrogénase dépendante de  $NAD^+$  chez les levures  $\Delta\alpha$  (Tableau 1).



TABLEAU 1 : Activité de mannitol déshydrogénase dans différentes souches de levures.

Les souches se sont développées dans un milieu liquide contenant soit de glucose 2% soit du mannitol 2%. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SD des trois expériences indépendantes. ND, non détecté.

| Souche          | Activité ( $\mu\text{mol}$ de mannitol oxydé.(mg de protéine) <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |                   |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|                 | glucose                                                                                          | mannitol          |
| $\Delta\alpha$  | 0,011 $\pm$ 0,003                                                                                | 0,240 $\pm$ 0,007 |
| $\Sigma 22574d$ | 0,006 $\pm$ 0,002                                                                                | ND                |
| 2a              | 0,001 $\pm$ 0,001                                                                                | ND                |
| MaDH4           | 0,410 $\pm$ 0,011                                                                                | ND                |

Pour obtenir une auxotrophie au tryptophane, on a croisé la souche  $\Delta\alpha$  (Trp<sup>-</sup>) avec la souche  $\Sigma 22574d$  (Trp<sup>+</sup>). On a choisi la levure 2a qui ne peut pas croître sur un milieu contenant du mannitol, avec une auxotrophie au tryptophane et à la leucine. Aucune activité de mannitol déshydrogénase n'a été détectée dans les cellules 2a (Tableau 1). Il a fallu introduire une activité d'hydrolyse du mannitol limitée à l'intérieur de la levure. On a cloné l'ADNc du gène de la mannitol déshydrogénase de la levure dans YIP128A1 sous le contrôle du promoteur *ADH1* et on l'a intégré de manière stable dans le gène *leu2* de 2a. Plusieurs transformants ont fait preuve d'une activité mannitol déshydrogénase. La souche avec l'activité la plus importante, nommée MaDH4, a été utilisée pour des analyses ultérieures (Tableau 1).

#### Expression hétérologue de la protéine AgMaT1

Pour une caractérisation ultérieure de la fonction de la protéine AgMaT1, il a été nécessaire d'exprimer le transporteur de manière fonctionnelle dans un système hétérologue comme des cellules de levure. L'ADNc de *AgMaT1* a été souscloné dans les sites PstI/XhoI du vecteur navette YEP 112A1XE qui a une boîte promoteur/terminateur du gène de l'alcool déshydrogénase *ADH1* de *S. cerevisiae* (Riesmeier et al., 1992). Les cellules de MaDH4 compétentes ont été transformées avec cette construction et YEP 112A1XE a été utilisé comme témoin.



Toutes les constructions ont d'abord été testées pour leur capacité à croître sur du mannitol comme unique source de carbone. Comme indiqué dans la Figure 1, la souche MaDH4, transformée avec le plasmide vide YEP 112A1XE n'est pas capable de croître sur le mannitol. Les cellules exprimant *AgMaT1* pouvaient très bien croître sur ce polyol. Afin de tester directement la capacité des cellules transformées à transporter le mannitol, les cellules de levure ont été incubées dans un milieu contenant du [ $^3$ H]-mannitol pendant quelques secondes à plusieurs minutes, les cellules ont été lavées et la radioactivité absorbée a été mesurée par comptage en scintillation électrique. La Figure 2 indique que le transport du mannitol dans les cellules témoins de *S. cerevisiae* est négligeable. Cependant, les souches de levure MaDH4, exprimant *AgMaT1*, transportent le [ $^3$ H]-mannitol à des vitesses élevées lorsqu'elles croissent sur un milieu contenant du mannitol. On a obtenu le même résultat avec des cellules de levure transformées croissant sur du glycérol (donnée non indiquée).

D'autres polyols comme le dulcitol, le sorbitol, le xylitol, le myo-inositol semblent être capables d'inhiber de moitié l'absorption du mannitol. La forme oside du mannitol, le mannose, semble être reconnue par *AgMaT1*.

#### Variation de l'expression d'AgMaT1 lors d'un stress salin

L'expression d'AgMaT1 a été suivie dans des plantes ayant été soumises à un stress salin pendant 4 semaines (arrosage quotidien avec 300 mM de NaCl, Noiraud et al., 2000). Le phloème de ces plantes ainsi que des plantes témoins correspondantes (arrosées avec de l'eau ne contenant pas de NaCl) a été prélevé pour extraire des ARN qui ont été utilisés pour effectuer des réactions de RT-PCR. Si l'on prend l'expression d'AgMaT1 dans le phloème de plantes témoins comme base 100, l'expression d'AgMaT1 dans le phloème de plantes traitées au NaCl est de 500%, ce qui représente une stimulation très importante et est en accord avec un rôle d'AgMaT1 dans la tolérance au stress salin chez le céleri.



## PROTOCOLE DE TRANSFORMATION DE PETIOLES OU DE FEUILLES DE CELERI BRANCHE

Des plants de Céleri branche (environ 10 cm de hauteur) régénérés à partir de cellules embryogènes sont utilisés comme matériel végétal pour la transformation.

### Inoculation des tissus de Céleri

Des bactéries *Agrobacterium tumefaciens* sont cultivées pendant 24 h à 28°C sous agitation dans du milieu LB (Liquid Broth : tryptone 1%, extrait autolytique de levure 0,5%, NaCl 0,5%)) avec l'antibiotique approprié.

Les pétioles des plants de Céleri sont fragmentés en section de 0,5 cm environ. Pour chaque fragment, une section longitudinale est faite. Les segments de Céleri sont incubés dans du milieu MS (Murashige & Skoog) 1 X (concentration normale, c'est-à-dire pas de dilution) liquide contenant 1/25<sup>ème</sup> de la culture de bactéries *Agrobacterium tumefaciens* pendant 60 min à température ambiante.

### Composition du milieu MS

| Macro-éléments                  |          |
|---------------------------------|----------|
| CaCl <sub>2</sub>               | 2,99 mM  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,25 mM  |
| KNO <sub>3</sub>                | 18,79 mM |
| MgSO <sub>4</sub>               | 1,50 mM  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 20,61 mM |

| Vitamines         |          |
|-------------------|----------|
| Glycine           | 26,64 mM |
| Myo-inositol      | 0,56 mM  |
| Acide nicotinique | 4,06 µM  |
| Pyridoxine-HCl    | 2,43 µM  |
| Thiamine-HCl      | 0,30 µM  |

| Micro-éléments                                        |          |
|-------------------------------------------------------|----------|
| CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O                | 0,11 µM  |
| CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O                | 0,10 µM  |
| FeNaEDTA                                              | 0,10 µM  |
| H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>                        | 0,10 µM  |
| KI                                                    | 5,00 µM  |
| MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O                  | 0,10 mM  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O | 1,03 µM  |
| ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O                | 29,91 µM |



L'excès de bactéries est ensuite enlevé des segments de Céleri en les déposant sur du papier absorbant pendant 2-3 min.

#### Coculture des segments de Céleri et des bactéries *A. tumefaciens*

La face cambiale des segments de Céleri est déposée en contact du milieu de régénération RM gélosé. Durant 48 h, les boîtes de Pétri sont placées dans une chambre climatisée à 25°C et soumises à des cycles lumière/obscurité 16 h/ 8 h.

#### Elimination des bactéries *A. tumefaciens*

Après 48 h de coculture, les segments de Céleri sont prélevés des boîtes de milieu RM et transférés dans du MS 1 X liquide supplémenté avec de la céfotaxime à une concentration finale de 250 µg/mL. Après une incubation de 60 min, les segments de Céleri sont séchés sur du papier absorbant pendant 2-3 min.

#### Régénération de plants de Céleri transformés

La face cambiale des segments de Céleri est déposée en contact du milieu d'initiation de la callogenèse CIM gélosé. Les boîtes de Pétri CIM sont placées dans une chambre climatisée à 25°C et soumises à des cycles lumière/obscurité 16 h/8 h jusqu'au développement de cals (2-3 semaines). Les segments de Céleri sont alors transférés sur un milieu d'induction de l'organogenèse OIM gélosé (2-3 semaines). Après l'apparition des bourgeons, ceux-ci sont prélevés et placés sur le milieu d'enracinement EM gélosé. Quelques semaines (3-4 semaines) sont nécessaires pour le développement de jeunes pousses de Céleri.



Composition des milieux

## Milieu de régénération RM

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| MS                                     | 1 X        |
| Mannitol                               | 3,0 %      |
| Saccharose                             | 1,5 %      |
| Hydrolysate de caséine                 | 100,0 mg/L |
| 6-Benzylaminopurine (BAP)              | 1,0 mg/L   |
| Acide $\alpha$ -naphtylacétique (NAA)  | 0,1 mg/L   |
| Acide gibbérellique (GA <sub>3</sub> ) | 0,1 mg/L   |
| Agar                                   | 0,8 %      |

## Milieu d'initiation de la callogenèse (CIM)

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| MS                                     | 1 X        |
| Mannitol                               | 3,0 %      |
| Saccharose                             | 1,5 %      |
| Hydrolysate de caséine                 | 100,0 mg/L |
| 6-Benzylaminopurine (BAP)              | 1,0 mg/L   |
| Acide $\alpha$ -naphtylacétique (NAA)  | 0,1 mg/L   |
| Acide gibbérellique (GA <sub>3</sub> ) | 0,1 mg/L   |
| Kanamycine                             | 125,0 mg/L |
| Céfotaxime                             | 200,0 mg/L |
| Agar                                   | 0,8 %      |

## Milieu d'induction de l'organogénèse (OIM)

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| MS                                     | 1 X        |
| Mannitol                               | 3,0 %      |
| Saccharose                             | 1,5 %      |
| Hydrolysate de caséine                 | 100,0 mg/L |
| 6-Benzylaminopurine (BAP)              | 1,0 mg/L   |
| Acide gibbérellique (GA <sub>3</sub> ) | 0,1 mg/L   |
| Kanamycine                             | 75,0 mg/L  |
| Céfotaxime                             | 200,0 mg/L |
| Agar                                   | 0,8 %      |



## Milieu d'enracinement (EM)

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| MS                                    | 1 X        |
| Mannitol                              | 3,0 %      |
| Saccharose                            | 1,5 %      |
| Hydrolysate de caséine                | 100,0 mg/L |
| Acide $\alpha$ -indolylacétique (IAA) | 0,1 mg/L   |
| Kanamycine                            | 75,0 mg/L  |
| Céfotaxime                            | 200,0 mg/L |
| Agar                                  | 0,8 %      |



## REFERENCES

- Lewis DH (1984) Physiology and metabolism of alditols. *In* DH Lewis eds, Storage carbohydrates in vascular plants, Cambridge University Press, Cambridge, pp 157-179,
- Boer et al. (1994) *Journal of Biological Chemistry*, **269** : 17863-17871,
- Daie J (1987) Sucrose uptake in isolated phloem of celery is a single saturable transport system. *Planta* **171** : 474-482,
- Davis et al. (1988) Biosynthesis of sucrose and mannitol as a function of leaf age in celery (*Apium graveolens* L.). *Plant Physiol.* **86** : 129-133,
- Dohmen et al. (1991) An efficient transformation procedure enabling long term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7** : 691-692,
- Gasser et al. (1989) *Science*, **244** : 1293-1299,
- Gielen et al. (1989) *EMBO J*, **8** : 23-29,
- Griffith et al. (1992) Membrane transport proteins : implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4** : 684-695,
- Hofmann K et Stoffel W (1993) Tmbase – A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **347** : 166,
- Jauniaux et al. (1987) Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the *PUT4* gene and study of *PUT4* RNA levels in the wild-type and the mutant strains. *Eur. J. Biochem.* **164** : 601-606,
- Kay et al. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Sci.* **236** : 1299-1302,
- Maiden et al. (1987) Mammalian and bacterial sugar porters are homologous. *Nature* **325** : 641-643,
- Mandel et al. (1995) *Plant Mol. Biol.*, **29** : 995-1004,
- Marcireau et al. (1992) Construction and growth properties of a yeast strain defective in sterol 14-reductase. *Curr Genet*, **22** : 267-272,
- Marger MD, Saier JMH (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18** : 13-20,
- McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports*, **5** : 81-84,
- Nadel et al. (1989) *Plant Cell and Organ Culture*, **18** : 181-189,



- Noiraud et al. (2000) The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiology*, **122** : 1447-1455,
- Quain DE, Boulton CA (1987) Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Bacteriol.* **133** : 1675-1684,
- Riesmeier et al. (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11** : 4705-4713,
- Salmon et al. (1995) Study of sucrose and mannitol transport in plasma-membrane vesicles from phloem and non-phloem tissues of celery (*Apium graveolens* L.) petioles. *Planta* **197** : 76-83,
- Sambrook et al. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CNRS

<120> SEQUENCES D'ADN CODANT POUR UN TRANSPORTEUR DE POLYOLS  
ET LEUR UTILISATION, NOTAMMENT POUR LA PREPARATION DE  
PLANTES TRANSGENIQUES

&lt;130&gt; IFB00 CNR APIU

&lt;140&gt; FR0009032

&lt;141&gt; 2000-07-11

&lt;160&gt; 34

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1766

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Apium graveolens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (17)..(1555)

&lt;400&gt; 1

```

ggcaccgagga gcttct atg att acc ggc gaa gtt tcc gtc gat tca tat gat 52
          Met Ile Thr Gly Glu Val Ser Val Asp Ser Tyr Asp
              1              5              10

act aac aag cct aaa cct aaa agg aat aag tat gct ttt gct tgt gct 100
Thr Asn Lys Pro Lys Pro Lys Arg Asn Lys Tyr Ala Phe Ala Cys Ala
          15              20              25

ctt tta gct tcc atg aat tcc atc tta ctc ggc tat gac acc gga gtg 148
Leu Leu Ala Ser Met Asn Ser Ile Leu Leu Gly Tyr Asp Thr Gly Val
          30              35              40

ttg agt gga gca tca ata tac ata aag gaa gat ctc cat ttc tcc gac 196
Leu Ser Gly Ala Ser Ile Tyr Ile Lys Glu Asp Leu His Phe Ser Asp
          45              50              55              60

gtt caa atc gaa ata atc atc gga atc atc aac atc tac tct ctt ctt 244
Val Gln Ile Glu Ile Ile Ile Gly Ile Ile Asn Ile Tyr Ser Leu Leu
              65              70              75

ggt tcg gcc ata gcc gga agg acc tcg gac tgg ata ggc aga cgt tac 292
Gly Ser Ala Ile Ala Gly Arg Thr Ser Asp Trp Ile Gly Arg Arg Tyr
              80              85              90

acc atg gta cta gct ggt atc ata ttt ttt cta gga gcc att ttc atg 340
Thr Met Val Leu Ala Gly Ile Ile Phe Phe Leu Gly Ala Ile Phe Met
          95              100              105

ggg ctt gct aca aac ttt gcc ttt ctc atg ttt ggt cgc ttt gtt gct 388
Gly Leu Ala Thr Asn Phe Ala Phe Leu Met Phe Gly Arg Phe Val Ala
          110              115              120

```



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| gga att ggt gtc ggt tat gcc atg atg atc gct ccc gtc tac act gcc | 436  |
| Gly Ile Gly Val Gly Tyr Ala Met Met Ile Ala Pro Val Tyr Thr Ala |      |
| 125 130 135 140                                                 |      |
| gag gtt gct ccg tcg tct tcc cgt ggt ttc ctc act tct ttt cct gag | 484  |
| Glu Val Ala Pro Ser Ser Ser Arg Gly Phe Leu Thr Ser Phe Pro Glu |      |
| 145 150 155                                                     |      |
| gtt ttc att aat tct ggt gtg ttg ctc ggg tat gta tcc aac ttt gca | 532  |
| Val Phe Ile Asn Ser Gly Val Leu Leu Gly Tyr Val Ser Asn Phe Ala |      |
| 160 165 170                                                     |      |
| ttt gcc aag tgc cca ctt tgg tta ggc tgg aga att atg ctg gga att | 580  |
| Phe Ala Lys Cys Pro Leu Trp Leu Gly Trp Arg Ile Met Leu Gly Ile |      |
| 175 180 185                                                     |      |
| gga gca ttt cct tca gtt gcc ttg gcc ata att gtg tta tat atg cca | 628  |
| Gly Ala Phe Pro Ser Val Ala Leu Ala Ile Ile Val Leu Tyr Met Pro |      |
| 190 195 200                                                     |      |
| gag tcc cca cgt tgg ctc gtt atg cag ggt cga ctt ggt gaa gcg agg | 676  |
| Glu Ser Pro Arg Trp Leu Val Met Gln Gly Arg Leu Gly Glu Ala Arg |      |
| 205 210 215 220                                                 |      |
| act gta ctt gag aaa act tct act tcc aaa gaa gaa gct cac caa aga | 724  |
| Thr Val Leu Glu Lys Thr Ser Thr Ser Lys Glu Glu Ala His Gln Arg |      |
| 225 230 235                                                     |      |
| ctg tct gat att aag gaa gct gct ggg att gat aaa gat tgt aat gac | 772  |
| Leu Ser Asp Ile Lys Glu Ala Ala Gly Ile Asp Lys Asp Cys Asn Asp |      |
| 240 245 250                                                     |      |
| gat gtt gtt caa gtt cca aaa cgt acc aaa gac gaa gca gtg tgg aaa | 820  |
| Asp Val Val Gln Val Pro Lys Arg Thr Lys Asp Glu Ala Val Trp Lys |      |
| 255 260 265                                                     |      |
| gaa ttg att ctt cac cct aca aaa cct gtt cgc cac gct gca att acg | 868  |
| Glu Leu Ile Leu His Pro Thr Lys Pro Val Arg His Ala Ala Ile Thr |      |
| 270 275 280                                                     |      |
| ggt att ggt att cat ttc ttc caa cag gct tgt ggt att gat gct gtt | 916  |
| Gly Ile Gly Ile His Phe Phe Gln Gln Ala Cys Gly Ile Asp Ala Val |      |
| 285 290 295 300                                                 |      |
| gtt tta tac agc cct cga att ttt gaa aaa gct ggt atc aaa agt aat | 964  |
| Val Leu Tyr Ser Pro Arg Ile Phe Glu Lys Ala Gly Ile Lys Ser Asn |      |
| 305 310 315                                                     |      |
| agt aaa aag ctc ctt gcg aca att gct gtt gga gtc tgc aaa aca gtc | 1012 |
| Ser Lys Lys Leu Leu Ala Thr Ile Ala Val Gly Val Cys Lys Thr Val |      |
| 320 325 330                                                     |      |
| ttt att ctg ata tca acg ttt cag ctg gac aaa att gga cga cgc ccc | 1060 |
| Phe Ile Leu Ile Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys Ile Gly Arg Arg Pro |      |
| 335 340 345                                                     |      |
| ctg atg cta aca agt atg ggg ggt atg gtt att gct cta ttt gta ctg | 1108 |
| Leu Met Leu Thr Ser Met Gly Gly Met Val Ile Ala Leu Phe Val Leu |      |
| 350 355 360                                                     |      |



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

gca ggc tca ttg acg gtt att aac aaa tca cat cat act ggt cat tgg 1156  
 Ala Gly Ser Leu Thr Val Ile Asn Lys Ser His His Thr Gly His Trp  
 365 370 375 380

gct ggt ggt ttg gca ata ttt aca gtg tat gct ttt gtg tcg ata ttt 1204  
 Ala Gly Gly Leu Ala Ile Phe Thr Val Tyr Ala Phe Val Ser Ile Phe  
 385 390 395

tca agt ggc atg ggt cca att gct tgg gtc tat agc tcc gag gtg ttc 1252  
 Ser Ser Gly Met Gly Pro Ile Ala Trp Val Tyr Ser Ser Glu Val Phe  
 400 405 410

cct ttg agg cta aga gct caa ggt tgt agt atc gga gtg gca gtt aac 1300  
 Pro Leu Arg Leu Arg Ala Gln Gly Cys Ser Ile Gly Val Ala Val Asn  
 415 420 425

cgt ggc atg agt ggc ata att gga atg aca ttt ata tcg atg tac aaa 1348  
 Arg Gly Met Ser Gly Ile Ile Gly Met Thr Phe Ile Ser Met Tyr Lys  
 430 435 440

gcc atg act att ggt ggt gca ttc ctt tta ttt gct gtg gtt gca tct 1396  
 Ala Met Thr Ile Gly Gly Ala Phe Leu Leu Phe Ala Val Val Ala Ser  
 445 450 455 460

atc gga tgg gtc ttt atg tac aca atg ttc ccc gag aca caa ggt aga 1444  
 Ile Gly Trp Val Phe Met Tyr Thr Met Phe Pro Glu Thr Gln Gly Arg  
 465 470 475

aat ctc gaa gaa att gag tta ttg ttt ggc agc tac ttt ggc tgg agg 1492  
 Asn Leu Glu Glu Ile Glu Leu Leu Phe Gly Ser Tyr Phe Gly Trp Arg  
 480 485 490

aag aca ttg aag gat ttg aag gca aaa gaa gct gct gaa gca aag agt 1540  
 Lys Thr Leu Lys Asp Leu Lys Ala Lys Glu Ala Ala Glu Ala Lys Ser  
 495 500 505

cgc gag agt gaa gtt tagcagtcag atgaatttag gggtcaaaga tggttatatta 1595  
 Arg Glu Ser Glu Val  
 510

gctctgtgta gagggtagtt ttagagaagc ccttagtatg tggttgagta tgtgtgatta 1655

ttaaccatca cccgataatt tagaataagg gtgtcaaaga acaattaccc atttcttatg 1715

tggtaatcta ttgaaaagaa tttgcccaat ggtaaaaaaa aaaaaaaa a 1766

<210> 2

<211> 513

<212> PRT

<213> *Apium graveolens*

<400> 2

Met Ile Thr Gly Glu Val Ser Val Asp Ser Tyr Asp Thr Asn Lys Pro  
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Arg Asn Lys Tyr Ala Phe Ala Cys Ala Leu Leu Ala Ser  
 20 25 30

Met Asn Ser Ile Leu Leu Gly Tyr Asp Thr Gly Val Leu Ser Gly Ala  
 35 40 45



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

Ser Ile Tyr Ile Lys Glu Asp Leu His Phe Ser Asp Val Gln Ile Glu  
 50 55 60  
 Ile Ile Ile Gly Ile Ile Asn Ile Tyr Ser Leu Leu Gly Ser Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Arg Thr Ser Asp Trp Ile Gly Arg Arg Tyr Thr Met Val Leu  
 85 90 95  
 Ala Gly Ile Ile Phe Phe Leu Gly Ala Ile Phe Met Gly Leu Ala Thr  
 100 105 110  
 Asn Phe Ala Phe Leu Met Phe Gly Arg Phe Val Ala Gly Ile Gly Val  
 115 120 125  
 Gly Tyr Ala Met Met Ile Ala Pro Val Tyr Thr Ala Glu Val Ala Pro  
 130 135 140  
 Ser Ser Ser Arg Gly Phe Leu Thr Ser Phe Pro Glu Val Phe Ile Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Val Leu Leu Gly Tyr Val Ser Asn Phe Ala Phe Ala Lys Cys  
 165 170 175  
 Pro Leu Trp Leu Gly Trp Arg Ile Met Leu Gly Ile Gly Ala Phe Pro  
 180 185 190  
 Ser Val Ala Leu Ala Ile Ile Val Leu Tyr Met Pro Glu Ser Pro Arg  
 195 200 205  
 Trp Leu Val Met Gln Gly Arg Leu Gly Glu Ala Arg Thr Val Leu Glu  
 210 215 220  
 Lys Thr Ser Thr Ser Lys Glu Glu Ala His Gln Arg Leu Ser Asp Ile  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Ala Ala Gly Ile Asp Lys Asp Cys Asn Asp Asp Val Val Gln  
 245 250 255  
 Val Pro Lys Arg Thr Lys Asp Glu Ala Val Trp Lys Glu Leu Ile Leu  
 260 265 270  
 His Pro Thr Lys Pro Val Arg His Ala Ala Ile Thr Gly Ile Gly Ile  
 275 280 285  
 His Phe Phe Gln Gln Ala Cys Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Tyr Ser  
 290 295 300  
 Pro Arg Ile Phe Glu Lys Ala Gly Ile Lys Ser Asn Ser Lys Lys Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Thr Ile Ala Val Gly Val Cys Lys Thr Val Phe Ile Leu Ile  
 325 330 335  
 Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys Ile Gly Arg Arg Pro Leu Met Leu Thr  
 340 345 350  
 Ser Met Gly Gly Met Val Ile Ala Leu Phe Val Leu Ala Gly Ser Leu  
 355 360 365



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

Thr Val Ile Asn Lys Ser His His Thr Gly His Trp Ala Gly Gly Leu  
370 375 380

Ala Ile Phe Thr Val Tyr Ala Phe Val Ser Ile Phe Ser Ser Gly Met  
385 390 395 400

Gly Pro Ile Ala Trp Val Tyr Ser Ser Glu Val Phe Pro Leu Arg Leu  
405 410 415

Arg Ala Gln Gly Cys Ser Ile Gly Val Ala Val Asn Arg Gly Met Ser  
420 425 430

Gly Ile Ile Gly Met Thr Phe Ile Ser Met Tyr Lys Ala Met Thr Ile  
435 440 445

Gly Gly Ala Phe Leu Leu Phe Ala Val Val Ala Ser Ile Gly Trp Val  
450 455 460

Phe Met Tyr Thr Met Phe Pro Glu Thr Gln Gly Arg Asn Leu Glu Glu  
465 470 475 480

Ile Glu Leu Leu Phe Gly Ser Tyr Phe Gly Trp Arg Lys Thr Leu Lys  
485 490 495

Asp Leu Lys Ala Lys Glu Ala Ala Glu Ala Lys Ser Arg Glu Ser Glu  
500 505 510

Val

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2056

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Beta vulgaris

&lt;400&gt; 3

```

atcaatccaa aaaaatcaaa aggaaacaaa ttcccatctt tccttacttt ctctctcttt 60
ttctctctct tattggtgag aaataagtga gccatgagtg aaggaactaa taaagccatg 120
tcagacccac caccaacaac tgcaagcaaa gtaatagcag attttgatcc tttaaagaag 180
cctcctaaga gaaacaagtt tgcttttgct tgtgctactt tggcttctat gacttctggt 240
ttacttggtt atgacattgg agtaatgagt ggtgcaataa tctacctcaa agaagactgg 300
cacattagtg acacacaaat aggagtctta gtcggaatct taaacatcta ctgcctcttc 360
ggctctttcg cagctggctg aacttccgat tggatcggac gacgttacac catcgtatta 420
gctggtgcaa tcttcttcgt tggcgcacta ctcatgggtt tcgccacaaa ctadgcattt 480
ctcatggtag gccgttttgt aacaggaata ggtgttggtt atgcacttat gatcgcacct 540
gtttacactg cagaggtttc tctgcttct tcaagaggat ttcttacctc ttttcctgag 600
gttttcatca atgcaggaat tttgcttgga tatatatcta accttgcat tccaagcctc 660
ccaactcatt tgagctggag gtttatgctc ggaatcgggg cgattccgag catatttttg 720
gctattggag tgcttgctat gctgagtca ccgcggtggc ttgttatgca gggaaggctt 780
ggagatgcta agaaggtgct taatcgcata tctgactcgc ctgaggaggc tcaacttagg 840
ctcagtgaga ttaagcagac agcaggaatc ccagctgagt gtgatgaaga catctataag 900
gttgaaaaaa caaagataaa atcagggaat gcagtttgga aagagctctt cttcaaccct 960
actcccgcag tgaggcgtgc agtgattgca ggtatcggaa ttactttttt ccagcaagct 1020
tccggcatcg acgccgtggt tttatacagt ccaaggatct ttcagagtgc tggaatcaca 1080
aatgcacgta aacagttact tgcaacagta gctgtaggag ttgttaagac acttttcata 1140
ttagttgcta catttcaatt agacaagtat ggtagaaggc ctttactatt aacaagtgtt 1200
ggtggtatga tcatagccat cttaacctta gccatgtctt taactgttat tgatcactct 1260
catcacaaga ttacatgggc tatagccttg tgtataacca tgggtttgtgc tgtcgttgcg 1320
tcgttttcga ttggttttagg accaattaca tgggtatata gttcagagggt tttcccctta 1380

```



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

```

aggTTaaggg ctcaaggtac tagcatgggt gtggctgtta atagagttgt aagtgggtgtt 1440
atttcaatat ttttcttgcc tttgtcacat aagattacaa caggTggTgc cttctttttg 1500
ttcgaggga ttgctattat tgcttggttc ttcttcttga cgtttcttcc tgagactaga 1560
gggcgtacac ttgagaatat gcatgagttg tttgaagatt ttagatggag ggagtcattt 1620
ccaggcaaca agtcaaataa tgatgagaat agcacaagaa aacaaagtaa tggtaatgac 1680
aagagtcaag tacaattggg agaaactact actagtagtg tacaagtata gttatgtacg 1740
gatgttatgt catgtatagc tgttcgactt ttaatgacga taattaatct caaatcgaac 1800
aagtttctaa gatgtgtgtg tataagatgt gcgtgatgta cgtacttggt atacacatgt 1860
tgttcttaga atgtgacct ctttattttt gcaaatacat tgtagcaaat taaagtaatc 1920
taattatagg ataccaaatg gttcaaaaaa caatgtcttt tgtgtgattt tgtatgatgc 1980
ttcatcattt gtcagtttac cttttttttg gtaatgaaga caaaataaat tcatgagttt 2040
agctttaaaa aaaagr
2056

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1925

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Beta vulgaris

&lt;400&gt; 4

```

ctctttttct ctctcttatt ggtgagaaat aagtgagcca tgagtgaagg aactaataaa 60
gccatgtcag acccaccacc aacaactgca agcaaagtaa tagcagattt tgatccttta 120
aagaagcctc ctaagagaaa caagtttgct tttgcttggt ctactttggc ttctatgact 180
tctgtttttac ttggttatga cattggagta atgagtgggt caataatcta cctcaaagaa 240
gactggcaca ttagtgacac acaaatagga gttctagtcg gaatcttaaa catctactgc 300
ctcttcggct ctttcgcagc tggtagaaca tccgattgga tcggacgacg ttacactatc 360
gtgttagctg gtgcaatctt cttcgttggc gcactactca tgggtttcgc cacaactac 420
gcattttctta tggtaggccc ttttgtaaca ggaatagggt ttggttatgc acttatgatc 480
gcacctgttt aactgcaga ggtttctcct gcttcttcaa gaggatttct tacctctttt 540
cctgaggttt tcatcaatgc aggaattttg cttggatata tatctaactc cgcattttca 600
agcctcccaa ctcatTTgag ctggaggttt atgctcgga tcggggcgat tccgagcata 660
tttttggtta ttggagtgt tgctatgcct gagtcaccga ggtggcttgt tatgcaggga 720
aggcttgag atgctaagaa ggtgcttaat cgaatatctg actcgctga ggaggctcaa 780
cttaggctca gtgagattaa gcagacagca ggaatcccag ctgagtgtga tgaagacata 840
tataagggtg aaaaaacaaa gataaaatca gggaatgcag tttggaaaga gctcttcttc 900
aaccctactc ccgcagtgag gcgtgcagtg attgcaggta tcggaattca ctttttccag 960
caagcttccg gcacgcagc cgtggtttta tacagtcaa ggatctttca gagtgcaggga 1020
atcacaatg cacgtaaaca gttacttgca acagttagct taggagttgt taagacactt 1080
ttcatattag ttgctacatt tcaattagac aagtatggta gaaggccttt actattaaca 1140
agtgttggtg gtatgatcat agccatctta accttagcca tgtctttaac tgttattgat 1200
cactctcatc acaagattac atgggctata gccttggtga taaccatggt ttgtgctgtc 1260
gttgcgctgt tttcgattgg tttaggacca attacatggg tatatagttc agaggttttc 1320
cccttgaggt taagggtca aggtactagc atgggtgtgg ctgttaatag agttgtaagt 1380
gggtgtatTT caatatTTtt cttgcctttg tcacataaga ttacaacagg tgggtgccttc 1440
tttttggtcg gagggattgc tattattgct tggttcttct tcttgacgtt tcttcctgag 1500
actagagggc gtacacttga gaatatgcat gagttgtttg aagatttttag atggaggggag 1560
tcattttccag gcaacaagtc aaataatgat gagaatagta caagaaaaca aagcaatggt 1620
aatgacaaga gtcaagtaca attgggagaa actactacta gtactactgt tacaatgac 1680
aatcactgag aaacaattgt tagtgtacaa gtatagttat gtaoggatgt tatgtcatgt 1740
atagctgttc gacttttaat gataattaat cttaaagtcga acaagcttct aagatgtgtg 1800
tgtataacat ggcgatgt acgcgcttgt tatacacatg ttgttcttag aatgtgatcc 1860
tctttatttt cgcaaataca ttgtagcaaa ttaaagtaat ctaattatag gataccaaat 1920
ggaaa
1925

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1715

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 5



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

|             |             |             |             |             |            |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| tcattgtcca  | tccacaactt  | cattgtcttt  | gctcatagaa  | ttattcttct  | tgtttgcggt | 60   |
| gtagctccc   | aagagagtct  | ccatctcctc  | tagaggtata  | ccacgtgtct  | ccgggaggaa | 120  |
| agtgaagaag  | aagacccatg  | cggcggcagc  | aactccggcg  | aatagaagga  | acgcaccgcc | 180  |
| gatggtgaga  | cctttagaaa  | gagataggaa  | tgtcattcca  | ataataccac  | tcattagtct | 240  |
| attcaacatc  | actcctaaac  | ttgccccttg  | agctcttagc  | ctcacaggga  | atatctctga | 300  |
| gcagtagacc  | cacgtcacgg  | ggcctgcacc  | tattgagaat  | gttgccacaa  | aagtcatcac | 360  |
| cgtcgtaacg  | gcgagcccta  | tagcccactt  | gagtgtttgc  | ccgggggttc  | tgttgatcac | 420  |
| cgtgagacta  | gttccaagtg  | cgggtcaagga | aagaaacatt  | ccgcccatac  | tcgtaagcaa | 480  |
| caaggcacga  | cgtccgaacc  | gatccaccac  | acaagtccct  | accacgatga  | agagagtctt | 540  |
| gacaactccg  | acagcgaccg  | tagccaagag  | ctgggtcattc | ttggacttca  | gtccagcctt | 600  |
| tgagaagatt  | gtcggagagt  | aaagcacaac  | cgcatacaatt | ccagaggcctt | gctgggcgaa | 660  |
| atgaatacca  | aggcatgcta  | tgaggatgtg  | tcgaacggac  | gggggttggtc | gaacgagaag | 720  |
| gtccttccac  | acgccttttc  | cagcgtctct  | tttattcgga  | acgactataa  | catcgtctgt | 780  |
| catatcatcg  | gggattccaa  | ctgcgcgttt  | gatgtcatcg  | agcctagaga  | tagcttcttc | 840  |
| tttggtgttg  | gaggttttgt  | caaggacttt  | aaaagcatcc  | ccgagacgac  | cctgaaggac | 900  |
| gagccaccga  | ggagactccg  | gcattgccaa  | cactccaatg  | gctaggaaca  | ccgagggaac | 960  |
| cgtccttaca  | cctaacatga  | acctccatcc  | gaggtgctcg  | ggaagccttg  | agaagaagta | 1020 |
| attggatacg  | tatcccaaaa  | gtataccaat  | attgataaaa  | atctgcatac  | aaaaatcaca | 1080 |
| ttatcatcat  | caacctccgt  | tatcattttcc | aatcatacat  | aaaaaaaaaa  | aaacttttga | 1140 |
| tcagttgaac  | ctcagggaaa  | gaggttaagga | agcctcggga  | agaggcggga  | gcgacttcag | 1200 |
| cgggtgtaaac | aggcgcaatc  | atcatagcat  | aaccaacacc  | gataccggct  | acaaaacggc | 1260 |
| caaccattat  | gaaagggtag  | tttgtggcaa  | agcccattag  | tagggctccg  | caaaagaaga | 1320 |
| aggctcctgc  | caacactatt  | gtatatcgtc  | ttccgagcca  | atcagaagtt  | ctaccagctg | 1380 |
| cgccggaacc  | gaccagagag  | tagatgttta  | gaattcccat  | aagaatctca  | agttgtacat | 1440 |
| cagacagttt  | caaatcgtct  | tttatgaaaa  | ttgaagctcc  | actcatcact  | ccaatgtctg | 1500 |
| taacatcccc  | aaacatgtaa  | gaatgattat  | ctaaatcgta  | aaaccaaac   | aatctgaat  | 1560 |
| tgattgttaa  | tttaaaaaga  | agacgaaccg  | taaccaagga  | tgatagaagt  | catggaggct | 1620 |
| aagattgcac  | aagcaaaagc  | atatcggtct  | ctattcccc   | tcggtggctc  | tgactccgca | 1680 |
| atcacaacac  | cttggttcaac | tcccaggagaa | ttcat       |             |            | 1715 |

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1722

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 6

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atgagttcct  | caggagaaga  | acgagggtgtt | gttggttgccg | agtcagagcc  | gccaagaggg  | 60   |
| aatagaagcc  | gatttgcttt  | tgcttggtgca | atcttagcct  | ccatgacttc  | tatcatcctt  | 120  |
| ggttatgggt  | ggtcttctaa  | tcattctcta  | acgatcaaat  | ttcagatttg  | gtttggttta  | 180  |
| acggtttaga  | taatcatcct  | cacattttat  | ggatgttgca  | gatattggag  | tgatgagtgg  | 240  |
| agctgcaatt  | ttcataaaaag | acgatttgaa  | gctgtcggac  | gtacaacttg  | agattcttat  | 300  |
| gggaattcta  | aatatctatt  | ctctgatcgg  | ttcaggagca  | gctggaagaa  | cttccgattg  | 360  |
| gatcggaaga  | cgatatacca  | tagtggtggc  | aggattcttc  | ttcttttggtg | gagccctact  | 420  |
| aatgggtttt  | gccactaact  | atcctttcat  | tatggtcggc  | cgttttgtag  | ccggtatcgg  | 480  |
| tgtcgggttac | gctatgatga  | ttgcgcctgt  | ttataccacg  | gaagtcgctc  | cagcctcttc  | 540  |
| tcgaggcttc  | cttagctctt  | tccctgaggt  | tcaatagatc  | caaattttac  | tagttttatat | 600  |
| gatataaaaa  | aaaagaaaat  | taggtttata  | ttaatgtgat  | atgattttat  | atgcatgcag  | 660  |
| atattttatca | acattgggtat | actattggga  | tacgtatcca  | attacttctt  | cgccaagctt  | 720  |
| ccagagcaca  | ttggatggag  | gttcatgtta  | ggtattggag  | ctgtgccctc  | agtgtttcta  | 780  |
| gccattggag  | tgttggcaat  | gcccgagtct  | ccacgggtggc | tcgtcatgca  | gggtcgtcta  | 840  |
| ggggacgctt  | ttaaagtcct  | tgacaaaacc  | tcaaacacca  | aagaagaagc  | catctcaagg  | 900  |
| ctcaatgaca  | tcaaacgcgc  | agttggaatc  | cccgatgata  | tgacagacga  | tgttatagtc  | 960  |
| gttccgaata  | aaaagagcgc  | tggaaaaggc  | gtgtggaagg  | accttctcgt  | tcgaccaacc  | 1020 |
| ccgtccgttc  | gacacatcct  | catagcatgc  | cttggtatcc  | atttctccca  | gcaagcctcc  | 1080 |
| ggaattgatg  | ctgtcgtgct  | ttactctccg  | accatcttct  | caagggtcgg  | actgaagtcc  | 1140 |
| aagaatgacc  | agctcttggtc | tacggtcgct  | gtcggagtgtg | tcaagactct  | cttcatcgta  | 1200 |
| gtaggaactt  | gtttggtgga  | ccggtttgga  | cgtcgtgcct  | tgttgcttac  | gagtatgggt  | 1260 |
| ggaatgtttt  | tttcttgac   | cgcccttgga  | actagtctca  | cgggtgatcga | caggaaaccc  | 1320 |
| gggcaaacac  | tcaagtgggc  | tatagggtctc | gccgttacga  | cgggtgatgac | ttttgtcgca  | 1380 |
| acattctcat  | taggtgcagg  | ccccgtgacg  | tgggtctacg  | cctcagagat  | attccccgtg  | 1440 |



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

```

aggctaagag cgcaaggagc aagtttggga gtgatgttga atagactaat gagtggtatt 1500
ataggaatga cattcctatc tctttctaag ggtctcacca tcggtggtgc attccttctc 1560
ttcgccggag ttgcggttgc cgcgtgggtc ttcttcttca ctttcctccc ggagacacgt 1620
ggtgtgcctt tagaagaaat agagagtctc ttcgggagct acagcgcaa caaaaagaac 1680
aatgttatga gcaaaggga acaagtagtt gatgaacaat ga 1722

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1804

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 7

```

tagacttagg tgcaaaagga agctgtcata tcggtggaaa tgtttcaact aatgctggtg 60
gtttgegtct aatccgttat ggctcacttc atggaactgt attgggtaat gacttacagt 120
tttagttact ttcgatccat ctgaaaacat ttggatttca tgttctcatc atttttattt 180
tcttcatctc aggtctagaa gctgtcacag caaatggcaa cgtgcttgac atgcttggaa 240
ctttacgcaa agacaatact gggtagcact taaaacattt gtttattggt aggtattata 300
ttggcttgtg cttgtacaat gatttcaagt atcacttcat cagcaaaata gactaaatca 360
tcttgatttt ttctctttac tggtttccac aggtagttaa ggatcacttg gtattgtaac 420
taaagtttct attctcacac aaccaaatt gtcttctgta aatttagcct tcattgcttg 480
caaagattat ctgagctgcc aggtttaata caatttcttt tgtactcctg taattgaatt 540
ctatctacag aggagatagt gctgtaactg ttatctctca ttgtgtttcc tttgtttgca 600
gaaacttctt gttgaagcaa agagaaatct tggagagata ctctcggctt tcgagtttct 660
tgataacaat tccatggatt tggtaagctt ttaggaagtt actaatagga actgtttgca 720
ttcctgacac tttatcttgt gcacaaggct ttgattttgc taaacccttt ctgtttttta 780
ttcattcaac aggtactgaa ccacctagac ggtgtacgta atccagtttc ctcttcggag 840
aacttttata ttctgatcga gacaacaggg agtgatgaaa ctaatgacag gtattgagaa 900
ttttctggtc tttctgtgac tttcacaatt ttccagtacc atttaaatga attctaagta 960
tttcagatcc cttgagagag tttttgtctg attcaaaaac taatgcaggg agaagcttga 1020
agctttcctg ttgaagtcac tggaaaaagg tttagtttct gatggtgtaa tcgctcaaga 1080
cattaaccag gcatcctcat tttggcgcac acgagaggta aaacacttga gagttatttc 1140
ctctgaaaaa gcttgatggt acacgacgaa taaagtcata atcataacc tcgaggggat 1200
aacagaggcg ttacagaaag caggagctgt ttacaagtat gacttatcct taccggttga 1260
agaaatttac aatattgtta acgatcttcg agggagatta ggtaagatat atatcaatac 1320
attgtctcct aattacttga aaccgaaaga ttcaatgaaa actgcaacca aatatgcaat 1380
gcttcagggtg acttagcaaa tggttatggga tatggtcacc ttggagacgg aaatctacat 1440
ttaaacatct cagccgcgga atataacgat aaggtaaaat tctgatatcc atatgaaaca 1500
ttccaagatg ttcaagtgat cattcattca ctcttttctt gcagctttta ggtttgatag 1560
agccttatgt ctatgagtgg acatcaaagc accgtggaag catcagtgcg gaacatggat 1620
taggtgtaat gaaagctaata gaaatcttct acagcaaatc acccgaaact gtaagttaac 1680
aacaacaac gtatggaaac tatgtataga actatcgtgt cactctattc ttaccggaat 1740
ataatattat gcaggttgca ttaatggctt ccattaaaaa gttgctggac ccaaaggga 1800
ttct 1804

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1662

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 8

```

ttatgagaaa cccccaatag agatggtttt agtttgaatc tcaagtccgt cacgatcacc 60
acgaggaccc ccaccaccaa aaagcttctc catctcctcc aatggcaatc ctttcgtctc 120
cggcaacata aagaagaaga accaccatgc cgccaccgct attccggcga atacgaagaa 180
cacgccccct gtcgtgatcg ccttcgtcat cgacagaaaa ctcatgaga ccgtcgcgtt 240
catgatccta ttaaccgcaa cacctatact cgctccctga gccctaagtc tcaacgggaa 300
tatctcggag ctgtacaccc atgtgatagg tccaagccct atggagaaaa aagctacaaa 360
tgcatacgta gagacgatgc ttaaaactcaa tgcccacgct aaccgcccaa atcgctgaac 420
catcgtgaga ctaaccgcta aactgggtcaa tgccaagacc atcccacccg tactggtcaa 480
caggagcttt ctacgaccta cettgtcgag caagaaagtg gctattatta tgaaaaaggc 540

```



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

```

cttagttaaa cctacaccga ccgtggctag taagagcttg tcttttcgaaa caactccggc 600
tttcttgaaa attctcgggc tgtacaacac gacggcctca atccccgtcg catgctcgaa 660
aaagtgtatc ccaacggccg ctatcaagat caaacgcacc gcaggtcgcg gttttatcac 720
caactccctc caaacacttt taccgtgatt cttcttctta acgccgccac caacttcttt 780
tatctctgtc acatctactt ccgcagcggg taagatgtct ctgaaccggt cttcagcttc 840
ttcttccgta ttggatacca aaaccattat tttcttggct tcttctaacc taccttgcac 900
cacaagccac ctcggcgact cgggcattct tgtaatccca aaagccaata tcaaagacgg 960
gaacgctgog attccaagca tcaatctcca tccaagtttc aacgtcagtt tcccaaaaca 1020
gtaattcgag acatagccta gtaaaatccc aagactaata caaagctcag gtagagaagt 1080
gagaaagcct ctatgtgacg cagaggatat ctcggcagag taaaccggag ctatcatgag 1140
agcaaaccct acaccaactc cggcaatata tcgtccgacc atcaaaacag gatagtttgg 1200
gccgtaacct ataagaactg agcccactaa gaatatcacg gcggagagag ctatggtgta 1260
acgtcggcog atgacgtcag acgttttccc cgccgttagt gatccgacga gtgcacaaag 1320
attcaagatt ccggccaaaa cttcaatctg agtgtcgttt attttttagat catctcttat 1380
aaatatctga gctccgctca taactcccgt atctaaggac aacacaccat taaaaaaa 1440
aaaatatctg ttaatatata atcattaata taattccatt gaatatatct ttatatgata 1500
tatgtagaaa acttttgttt gatatgtaga gaatgttagt atgttaccat atccaaagat 1560
gatagaaatg atggaagcaa caatggcaca cccgaaagcg aacttgttca tatgaggggt 1620
tggatccgaa ccgggaaaat tatgaccatc agcatgaacc at 1662

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1690

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 9

```

tcaaaactcc tgttccttgc gcacaagacg ctcagcatct ccaagctcaa cttcaccgtc 60
ttttctttcc agcccaccct gaaacatcaa ctctatctgc tccagtgact tcccgttgt 120
ctcggggact agcacatata cgaagataac tgagagtgcg gacacgaggg agaaaacgaa 180
gaaggttcct ccaacagtga tggcacgtga cacagagagg aaggacatgg ccaccagacc 240
gctgcacacc ctgttcccaa ccgcccacag cgcagatgcc tgggctctta atcgtaatgg 300
aaagatctct gatgtcaaga ccagcaaac aggtcccatt cctatggaga agaaggcaac 360
gtttccacaa acaaagagaa gcgccaaggt tatcccaagc gttoettggc cgaggaatgt 420
gagcgtaaag cttagacaaa agagacacag agtcattcct attgtgctca cataaagcag 480
cggtttccgg ccaacactat caatcaggaa ggtggcaaat agtatgaaca ctgttttctg 540
gacaccaaca gcgacagttg cagcgagcag tttggtctcg tcttgatcc cagcctcttt 600
caggatctct ggactatagt agactgtggc gtcaattcct gtgatctgct ggaaacactg 660
gattccaaat ccaacaatca gcattttccg tacaacagga gatgggctaa gaagctcacg 720
ccacacgggc ctgtcctcgc tgccttctgt atgtgcagcc gccagttgta tctctgcaag 780
ccgctcttcc gcttcgtcat ctcgctcatt cgttttcatg agcacctctc gtgcaactgc 840
cactcggcct ttcattacca gccacctcgg cgactcaggg atcacacaca gcgcaaatcc 900
tatgaacacc gaaggaagaa tcccaactgc aagcatgac ctccagctga tatgcacgga 960
aagccccgag aaagcgtagt tcgaaacata gccagcaag atccctagat ttatgaagat 1020
ctcagggaac gaagtgaata atcctctagc tacggtgggg gatattctcg cgatgtagac 1080
aggagcgatc atgacaccaa gcccaatccc aatgccggct aaagttctcc ctatcatcaa 1140
aacctcgaaa gacggagcga cagccatcac ggcagacca gtctggaaga cgagagcagc 1200
caaggccatg gtccattttc taccgataga gtcagaggtt ctgccgccgg ctaagctgcc 1260
aaagagttag atgatgctaa ggctaccaat gagcacttcc gtctgcacct ccgttatttt 1320
gagatcctgc tgtatgaaca acaccgcacc gctcattacc ccaacatctg acaaatacca 1380
aaaacagagc acacatacct ttttgtaagt caacaaagta aagaagaaga agaagaatcc 1440
gattatataa gtaaaaccga ccgtagccga gaagaacatt gttcaaggat gcaaaaaagg 1500
cacaagccat aacgtatttt ctggttctac tgtttctagc ctctgcttca cgatgattct 1560
gcgattcctc cgcgtcggag tccattctct gatacttatt cttcttattt ccgacagaga 1620
ccgccgaaa acccgagcca ccgccattac caacctccgg aagattcttc atcatctccc 1680
tccgccgagg 1690

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1518

&lt;212&gt; ADN



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

<213> *Bacillus subtilis*

&lt;400&gt; 10

```

aagggagtca tctttatgaa aaagcagtca aatatatggc tttatttttt cggagctctt 60
ggaggcgcggt tatatggcta tgataccgga gtgatttccg gagctatttt atttatgaaa 120
aaggagttag gcttaaaccgc gtttacagaa ggtcttggtg tcagctcctt gctgggtggg 180
gcatatattgg gctcaggagc ggccggcgaag ctgactgacc gtttcggaag aaaaaaagca 240
attatggcag ccgcgctgct gttttgtata ggccggtctt gtgtggcact ggccccaat 300
acaggagtca tgggtgctgtt tcgcatcatt ttgggacttg cagtcggaac atcgacgaca 360
atcgtacccc tttattttatc tgaactggcg ccaaaacata aacgcggggc gctgtcatca 420
ctgaatcagc tgatgatcac ggtcggcatc cttctttctt acattgtcaa ttacatat 480
gccgatgccg aagcgtggcg ctggatgctt ggattggctg ctgtgccgtc attgctcttg 540
cttattggca ttttgtttat gccggagagc ccgcgctggc tgttcacgaa tggcgaagaa 600
agcaaagcga agaaaattct tgaaaaattg cgtggcaca aagatattga tcaggaaata 660
catgatataa aagaagcggg aaagcaggat gaaggcggtc tgaaggagct gttcgatcca 720
tgggtgcgcc cagcgcttat tgcaggtttg ggactcgctt ttttgagca atttatcgga 780
acgaatacga tcatctacta tgcgccaaag acctttacaa acgtcggatt cggaaactcc 840
gcttcgatatt taggcacggg cggaatcggc acagtcaatg ttctcatgac attagtagcg 900
attaaaatca tcgacaagat tggaagaaag ccgttactgc tattcgggaa tgcgggcatg 960
gtgatcagct tgatcgttct cgcttttagta aatctctttt tcaataacac tccggctgcc 1020
tcatggacga ccgtcatttg tttaggcgtg tttatcgttg tctttgcggt cagctgggga 1080
ccggttggtg ggggtgatgct tcctgaattg ttcccgcttc acgtcagagg aatcgggacc 1140
gggtgttcga ccttaatgtt gcacgttggg aactgattg tttcattaac ctatccaata 1200
ttaatggaag cgatcggaat cagttattta ttcttgattt atgccgcgat cggtatcatg 1260
gcgttcttat ttgtccgatt taaagtgaca gagacaaagg gaagaagcct tgaagaaatt 1320
gagcaggatt tacgggacaa aaacggacag ggaggagcgg ccggaaaaca gcagactgtc 1380
ggaacataaa aaagggtgcg cgatcatgcg cacccttttg attgcttact ttcccaccgt 1440
gccaaagtta atgattttta aagaaatatc gtacttaaaa tcagtctcag aaaatatattc 1500
atcccaatgc ccttttac 1518

```

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMat1 d'*Apium graveolens*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (75)

&lt;400&gt; 23

```

gct tgt gct ctt tta gct tcc atg aat tcc atc tta ctc ggc tat gac 48
Ala Cys Ala Leu Leu Ala Ser Met Asn Ser Ile Leu Leu Gly Tyr Asp
  1           5           10           15

```

```

acc gga gtg ttg agt gga gca tca ata 75
Thr Gly Val Leu Ser Gly Ala Ser Ile
      20           25

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;400&gt; 11

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | Ala | Leu | Leu | Ala | Ser | Met | Asn | Ser | Ile | Leu | Leu | Gly | Tyr | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Gly | Val | Leu | Ser | Gly | Ala | Ser | Ile |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (63)

&lt;400&gt; 24

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| caa | atc | gaa | ata | atc | atc | gga | atc | atc | aac | atc | tac | tct | ctt | ctt | ggt | 48 |
| Gln | Ile | Glu | Ile | Ile | Ile | Gly | Ile | Ile | Asn | Ile | Tyr | Ser | Leu | Leu | Gly |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| tcg | gcc | ata | gcc | gga |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 63 |
| Ser | Ala | Ile | Ala | Gly |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 20  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;400&gt; 12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Glu | Ile | Ile | Ile | Gly | Ile | Ile | Asn | Ile | Tyr | Ser | Leu | Leu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ala | Ile | Ala | Gly |
|     |     |     | 20  |     |

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(60)

<400> 25  
 tac acc atg gta cta gct ggt atc ata ttt ttt cta gga gcc att ttc 48  
 Tyr Thr Met Val Leu Ala Gly Ile Ile Phe Phe Leu Gly Ala Ile Phe  
     1                    5                    10                    15  
 atg ggg ctt gct 60  
 Met Gly Leu Ala  
                     20

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle  
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment  
       de la séquence nucléotidique codant pour la  
       protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<400> 13  
 Tyr Thr Met Val Leu Ala Gly Ile Ile Phe Phe Leu Gly Ala Ile Phe  
     1                    5                    10                    15  
 Met Gly Leu Ala  
                     20

<210> 26  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment  
       de la séquence nucléotidique codant pour la  
       protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(75)

<400> 26  
 ttt ctc atg ttt ggt cgc ttt gtt gct gga att ggt gtc ggt tat gcc 48  
 Phe Leu Met Phe Gly Arg Phe Val Ala Gly Ile Gly Val Gly Tyr Ala  
     1                    5                    10                    15  
 atg atg atc gct ccc gtc tac act gcc 75  
 Met Met Ile Ala Pro Val Tyr Thr Ala  
                     20                    25

<210> 14  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle  
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;400&gt; 14

Phe Leu Met Phe Gly Arg Phe Val Ala Gly Ile Gly Val Gly Tyr Ala  
1 5 10 15

Met Met Ile Ala Pro Val Tyr Thr Ala  
20 25

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(75)

&lt;400&gt; 27

ttc ctc act tct ttt cct gag gtt ttc att aat tct ggt gtg ttg ctc 48  
Phe Leu Thr Ser Phe Pro Glu Val Phe Ile Asn Ser Gly Val Leu Leu  
1 5 10 15

ggg tat gta tcc aac ttt gca ttt gcc 75  
Gly Tyr Val Ser Asn Phe Ala Phe Ala  
20 25

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;400&gt; 15

Phe Leu Thr Ser Phe Pro Glu Val Phe Ile Asn Ser Gly Val Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Tyr Val Ser Asn Phe Ala Phe Ala  
20 25

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(60)

&lt;400&gt; 28

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| att | atg | ctg | gga | att | gga | gca | ttt | cct | tca | ggt | gcc | ttg | gcc | ata | att | 48 |
| Ile | Met | Leu | Gly | Ile | Gly | Ala | Phe | Pro | Ser | Val | Ala | Leu | Ala | Ile | Ile |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |    |

|     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| gtg | tta | tat | atg |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |
| Val | Leu | Tyr | Met |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 20  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;400&gt; 16

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Met | Leu | Gly | Ile | Gly | Ala | Phe | Pro | Ser | Val | Ala | Leu | Ala | Ile | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |

|     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Val | Leu | Tyr | Met |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 20  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 66

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(66)

&lt;400&gt; 29

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| gct | gca | att | acg | ggt | att | ggt | att | cat | ttc | ttc | caa | cag | gct | tgt | ggt | 48 |
| Ala | Ala | Ile | Thr | Gly | Ile | Gly | Ile | His | Phe | Phe | Gln | Gln | Ala | Cys | Gly |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| att | gat | gct | ggt | ggt | tta |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 66 |
| Ile | Asp | Ala | Val | Val | Leu |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 20  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<400> 17

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Ile | Thr | Gly | Ile | Gly | Ile | His | Phe | Phe | Gln | Gln | Ala | Cys | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Asp | Ala | Val | Val | Leu |
|     |     |     | 20  |     |     |

<210> 30

<211> 60

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(60)

<400> 30

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ctc | ctt | gcg | aca | att | gct | gtt | gga | gtc | tgc | aaa | aca | gtc | ttt | att | ctg | 48 |
| Leu | Leu | Ala | Thr | Ile | Ala | Val | Gly | Val | Cys | Lys | Thr | Val | Phe | Ile | Leu |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |    |

|     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| ata | tca | acg | ttt |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |
| Ile | Ser | Thr | Phe |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 20  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<400> 18

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Leu | Ala | Thr | Ile | Ala | Val | Gly | Val | Cys | Lys | Thr | Val | Phe | Ile | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Ser | Thr | Phe |
|     |     |     | 20  |

<210> 31

<211> 66

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: fragment



de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(66)

<400> 31

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ctg | atg | cta | aca | agt | atg | ggg | ggt | atg | gtt | att | gct | cta | ttt | gta | ctg | 48 |
| Leu | Met | Leu | Thr | Ser | Met | Gly | Gly | Met | Val | Ile | Ala | Leu | Phe | Val | Leu |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| gca | ggc | tca | ttg | acg | gtt | 66 |
| Ala | Gly | Ser | Leu | Thr | Val |    |
|     |     |     | 20  |     |     |    |

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<400> 19

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Met | Leu | Thr | Ser | Met | Gly | Gly | Met | Val | Ile | Ala | Leu | Phe | Val | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Gly | Ser | Leu | Thr | Val |
|     |     |     | 20  |     |     |

<210> 32

<211> 78

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(78)

<400> 32

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| ggt | ggt | ttg | gca | ata | ttt | aca | gtg | tat | gct | ttt | gtg | tcg | ata | ttt | tca | 48 |
| Gly | Gly | Leu | Ala | Ile | Phe | Thr | Val | Tyr | Ala | Phe | Val | Ser | Ile | Phe | Ser |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| agt | ggc | atg | ggt | cca | att | gct | tgg | gtc | tat | 78 |
| Ser | Gly | Met | Gly | Pro | Ile | Ala | Trp | Val | Tyr |    |
|     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |    |

<210> 20

<211> 26

<212> PRT



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;400&gt; 20

Gly Gly Leu Ala Ile Phe Thr Val Tyr Ala Phe Val Ser Ile Phe Ser  
1 5 10 15

Ser Gly Met Gly Pro Ile Ala Trp Val Tyr  
20 25

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(63)

&lt;400&gt; 33

tgt agt atc gga gtg gca gtt aac cgt ggc atg agt ggc ata att gga 48  
Cys Ser Ile Gly Val Ala Val Asn Arg Gly Met Ser Gly Ile Ile Gly  
1 5 10 15

atg aca ttt ata tcg 63  
Met Thr Phe Ile Ser  
20

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

&lt;400&gt; 21

Cys Ser Ile Gly Val Ala Val Asn Arg Gly Met Ser Gly Ile Ile Gly  
1 5 10 15

Met Thr Phe Ile Ser  
20

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;



WO 02/04647

PCT/FR01/01979

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (60)

<400> 34

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| gca | ttc | ctt | tta | ttt | gct | gtg | gtt | gca | tct | atc | gga | tgg | gtc | ttt | atg | 48 |
| Ala | Phe | Leu | Leu | Phe | Ala | Val | Val | Ala | Ser | Ile | Gly | Trp | Val | Phe | Met |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |    |

|     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| tac | aca | atg | ttc |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |
| Tyr | Thr | Met | Phe |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 20  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
de la séquence nucléotidique codant pour la  
protéine AgMaT1 d'Apium graveolens

<400> 22

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Phe | Leu | Leu | Phe | Ala | Val | Val | Ala | Ser | Ile | Gly | Trp | Val | Phe | Met |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Tyr | Thr | Met | Phe |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|     |     |     | 20  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |



**REVENDICATIONS**

1. Utilisation de la SEQ ID NO : 1 codant pour un transporteur de SEQ ID NO : 2 de mannitol, chez les plantes et les champignons, pour la préparation de plantes transgéniques.

2. Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2.

3. Polynucléotide qui comprend ou est constituée par :  
—un polynucleotide de séquence SEQ ID NO : 1 ;  
—un polynucléotide codant pour une protéine de séquence SEQ ID NO : 2, comprenant ou constitué d'une séquence homologue à la séquence SEQ ID NO : 1 par dégénérescence du code génétique ; ou  
—un polynucléotide complémentaire à la séquence SEQ ID NO : 1.

4. Vecteur recombinant, le vecteur étant un plasmide, un cosmide, un phage ou de l'ADN de virus, contenant un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3.

5. Vecteur recombinant selon la revendication 4, contenant les éléments nécessaires à l'expression dans une cellule hôte d'une protéine codée par un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3, insérés dans ledit vecteur.

6. Cellule hôte, ladite cellule étant une bactérie, un virus, une levure, un champignon, une plante ou une cellule de mammifère, et étant transformée, à l'aide d'un vecteur recombinant tel que défini dans la revendication 4 ou 5.

7. Polynucléotide antisens ou ARN antisens complémentaire à un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3.

8. Cellule de plante contenant dans son génome un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3.



**9.** Procédé d'obtention de plantes génétiquement modifiées avec au moins une séquence nucléotidique d'intérêt qui comprend les étapes suivantes :

- 5           – la transformation de cellules végétales avec un vecteur contenant une séquence d'insertion, ladite séquence d'insertion comprenant la séquence nucléotidique d'intérêt et un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3, et
- 10          – la mise en culture des cellules ainsi transformées sur un milieu contenant du mannitol comme unique source de carbone, pour l'obtention de plantes ou de fragments de plantes transgéniques contenant ladite séquence nucléotidique d'intérêt.

**10.** Procédé d'obtention de plantes transgéniques résistantes aux pathogènes, qui comprend les étapes suivantes :

- 15          – la transformation de cellules végétales avec un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3, ledit polynucléotide étant placé sous contrôle d'un promoteur ubiquiste inductible CaMV 35S ou d'un promoteur inductible en réponse à l'attaque dudit pathogène, et
- 20          – la mise en culture des cellules ainsi transformées pour l'obtention de plantes ou de fragments de plantes transgéniques.

**11.** Procédé d'obtention de plantes transgéniques résistantes au stress salin, qui comprend les étapes suivantes :

- 25          – la transformation de cellules végétales avec un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3, et
- la mise en culture des cellules ainsi transformées pour l'obtention de plantes ou de fragments de plantes transgéniques.



1 / 2

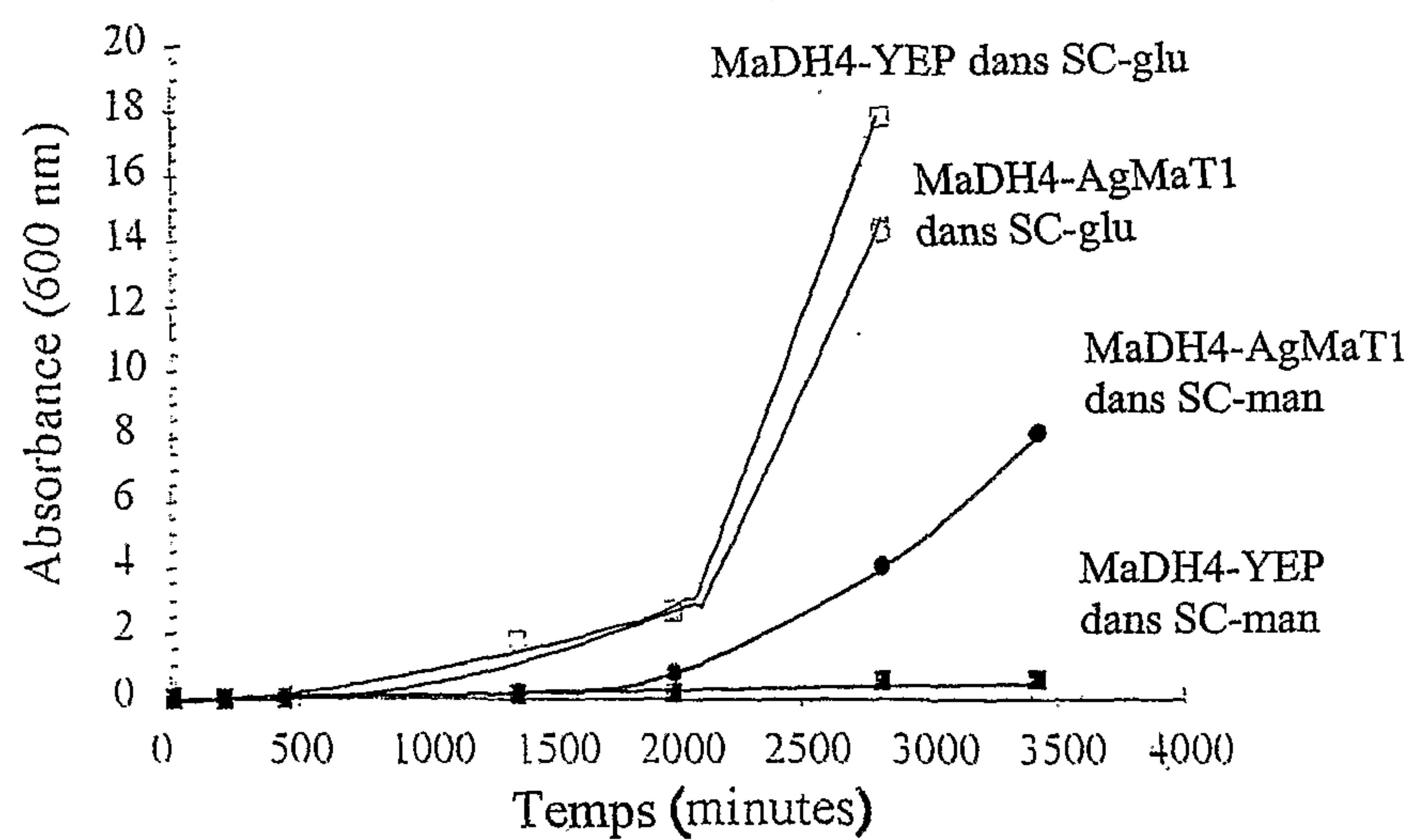


FIGURE 1



2 / 2

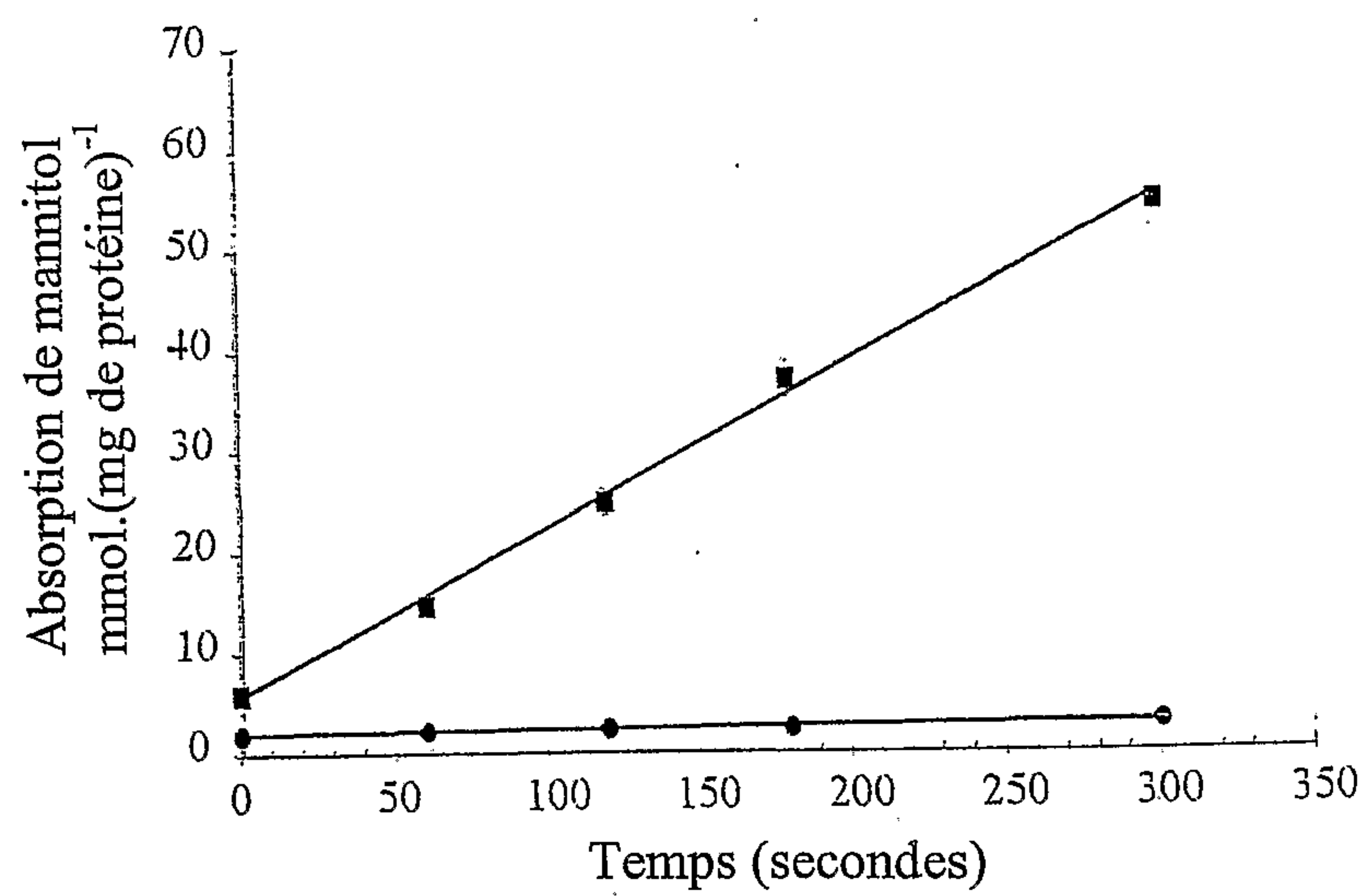


FIGURE 2