PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 :		(11) Numéro de publication internationale:
C12N 15/82, 15/55, 15/11, 15/53, A01H 5/00, 1/02	A1	WO 94/18334
		(43) Date de publication internationale: 18 août 1994 (18.08.94)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00162

(22) Date de dépôt international: 15 février 1994 (15.02.94)

(30) Données relatives à la priorité:
93/01650 15 février 1993 (15.02.93) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)*: ARAYA, Alejandro [CL/FR]; Résidence Bois d'Arcy, Appartement 112, Bâtiment A1, Rue des Anciens-Combattants-d'Afrique-du-Nord, F-33400 Talence (FR). MOURAS, Armand [FR/FR]; 33, avenue de Brivazac, F-33600 Pessac (FR).

(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

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

(54) Title: TRANSGENIC PLANTS INCLUDING A TRANSGENE CONSISTING OF A HYBRID NUCLEIC ACID SEQUENCE, COMPRISING AT LEAST ONE NON-EDITED MITOCHONDRIAL GENE FRAGMENT OF SUPERIOR PLANTS AND PROCESS FOR THEIR PRODUCTION

(54) Titre: PLANTES TRANSGENIQUES INCLUANT UN TRANSGENE CONSTITUE PAR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE HYBRIDE, COMPORTANT AU MOINS UN FRAGMENT DE GENE MITOCHONDRIAL NON EDITE DE VEGETAUX SUPERIEURS ET LEUR PROCEDE DE PRODUCTION

(57) Abstract

Hybrid nucleic acid sequences including at least the coding region of an unedited mitochondrial gene of superior plants and controlling the male fertility of plants containing said sequences, transgenic plants having such sequences and methods of production of transgenic male-sterile plants and method of restoring male-fertile plants. The nuclei of the transgenic plants contain a hybrid sequence capable of being expressed (transgene), comprising at least one coding region of an unedited mitochondrial gene of superior plants and a sequence capable of transferring the protein expressed by said coding region, to the mitochondrion, said hybrid sequence being capable of modifying the male fertility of plants having incorporated said transgene, while leaving the other phenotype characteristics of said plants unaltered.

(57) Abrégé

Séquences d'acide nucléique hybrides, comportant au moins la région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux supérieurs et permettant le contrôle de la fertilité mâle des plantes contenant lesdites séquences, plantes transgéniques possédant de telles séquences, ainsi que méthode de production de plantes transgéniques mâle-stériles et méthode de restauration de plantes mâle-fertiles. Ces plantes transgéniques possèdent dans leurs noyaux, une séquence hybride exprimable (transgène), comprenant au moins une région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux supérieurs et une séquence susceptible de transférer la protéine exprimée par ladite région codante, vers la mitochondrie, laquelle séquence hybride est apte à modifier la fertilité mâle des plantes ayant incorporé ledit transgène, tout en ne modifiant pas les autres caractéristiques phénotypiques desdites plantes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

AT	Autriche	**GB**	Royaume-Uni	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GE**	Géorgie	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GN**	Guinée	**NE**	Niger
BE	Belgique	**GR**	Grèce	**NL**	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	**HU**	Hongrie	**NO**	Norvège
BG	Bulgarie	**IE**	Irlande	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	**IT**	Italie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**JP**	Japon	**PT**	Portugal
BY	Bélarus	**KE**	Kenya	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**KG**	Kirghizistan	**RU**	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CG	Congo			**SE**	Suède
CH	Suisse	**KR**	République de Corée	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovaquie
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	République tchèque	**LV**	Lettonie	**TJ**	Tadjikistan
DE	Allemagne	**MC**	Monaco	**TT**	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	**MD**	République de Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Espagne	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	**ML**	Mali	**UZ**	Ouzbékistan
FR	France	**MN**	Mongolie	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

PLANTES TRANSGENIQUES INCLUANT UN TRANSGENE CONSTITUE PAR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE HYBRIDE, COMPORTANT AU MOINS UN FRAGMENT DE GENE MITOCHONDRIAL NON EDITE DE VEGETAUX SUPERIEURS ET LEUR PROCEDE DE PRODUCTION.

La présente invention est relative à des séquences d'acide nucléique hybrides, comportant au moins la région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux supérieurs et permettant le contrôle de la fertilité mâle des plantes contenant lesdites séquences, aux plantes transgéniques possédant de telles séquences, ainsi qu'à une méthode de production de plantes transgéniques mâle-stériles et à une méthode de restauration de plantes mâle-fertiles.

Le contrôle de la fertilité mâle chez les plantes est un des problèmes clés pour l'obtention d'hybrides, et plus particulièrement de lignées mâle-stériles qui présentent un intérêt sur le plan agronomique, notamment pour le contrôle et l'amélioration des semences. En effet, la production de semences hybrides à grande échelle, à caractéristiques contrôlées, est une véritable gageure parce que beaucoup de cultures présentent à la fois les organes reproducteurs mâle et femelle (étamines et pistils). Ceci entraîne un taux important d'autopollinisation et rend difficile le contrôle des croisements entre lignées, pour l'obtention des hybrides recherchés.

Pour permettre l'obtention de croisements non consanguins qui permettent de produire des semences hybrides, présentant des propriétés intéressantes, les Inventeurs ont mis au point de nouvelles plantes transgéniques mâle-stériles, aptes à être restaurées et qui facilitent le développement de cultures hybrides.

La stérilité mâle cytoplasmique (SMC) se caractérise par un avortement du pollen après la méiose.

Dans les systèmes alloplasmiques, la SMC est due à une incompatibilité noyau-cytoplasme, qui peut se produire à plusieurs niveaux : réplication de l'ADN,

transcription des gènes, maturation des transcrits, traduction ou assemblage des complexes multiprotéiques.

Des observations réalisées chez le maïs et le pétunia (Dewey R.E. et al., Cell, 1986, 44, 439 ; Young E.G. et al., Cell, 1987, 50, 41), émerge l'hypothèse que la SMC est due à une déficience de la machinerie bioénergétique mitochondriale. En effet, la SMC se manifeste par une réduction du taux d'ATP et de NADP. Au niveau cellulaire, cette déficience est corrélée avec une dégénérescence des cellules du tapis de l'anthère, tout en n'ayant pas d'effet sur le développement de la plante.

Un certain nombre de méthodes ont été proposées, dans l'Art antérieur, pour obtenir des plantes mâle-stériles.

On peut citer notamment les rétrocroisements, qui conduisent à la substitution du génome nucléaire d'une espèce par un autre génome et ce, dans l'environnement cytoplasmique de la première espèce (alloplasmie) ; cette substitution peut également apparaître spontanément dans les cultures en champ. La SMC peut également être obtenue par fusion de protoplastes (Lonsdale D.M., Genetic Engineering, 1987, 6, 47).

Dans toutes ces situations, les résultats ne sont pas fiables, ni reproductibles ; de plus, dans tous les cas, les manipulations sont longues, fastidieuses et souvent difficiles à contrôler.

Des plantes mâle-stériles ont également été obtenues par transgénose, à l'aide d'un gène codant pour une RNAse, sous le contrôle d'un promoteur anthère-spécifique (Mariani C. et al., Nature, 1990, 347, 737). Ce transgène, lorsqu'il s'exprime, a un effet toxique sur la cellule dans la mesure où les ARNs endogènes sont dégradés, provoquant ainsi la mort cellulaire.

Un autre système, introduisant également une nouvelle fonction artificielle et destructrice, a été décrit par Worrall D. et al., (The Plant Cell, 1992, 4,

759-771) (système callase) et présente les mêmes inconvénients que le système RNAse.

D'autres méthodologies ont également proposées pour obtenir des plantes mâle-stérile ; on peut notamment citer les techniques qui tirent profit de la perturbation de certaines voies métaboliques (Van de Meer I.M. et al., The Plant Cell, 1992, 4, 253-262) (expression d'un gène anti-sens chalcone-synthase) ou les techniques qui font appel à l'hybridation somatique asymétrique (Melchers G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 6832-6836) pour mettre en présence, comme dans les lignées mâle-stériles alloplasmiques, le cytoplasme d'un individu donneur et le noyau d'un partenaire receveur. Ces deux derniers procédés présentent l'inconvénient majeur d'être très aléatoires quant à l'objectif visé, à savoir l'obtention de plantes mâle-stériles, permettant le contrôle de la reproduction de ces plantes.

La Demanderesse s'est, en conséquence, donné pour but de résoudre le problème de l'obtention contrôlée, fiable et reproductible de plantes transgéniques mâle-stériles, pouvant être utilisées dans des programmes agronomiques d'amélioration de semences.

La présente invention a pour objet des plantes transgéniques, possédant dans leurs noyaux, une séquence hybride exprimable (transgène), comprenant au moins une région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux supérieurs et une séquence susceptible de transférer la protéine exprimée par ladite région codante, vers la mitochondrie, lesquelles plantes sont caractérisées en ce que :

- les régions codantes des gènes mitochondriaux non édités sont choisis parmi les gènes codant pour une protéine du complexe ATP synthase choisis parmi le fragment de gène de l'ATP9 de blé, de formule I suivante :

ATG TTA GAA GGT GCT AAA TCA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA

ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT ATT GGA AAC GTC CTC
AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA TTG GCT
AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC
GAA GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC
TCA TTC GTT TTC CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGA

ou le gène de l'ATP6, ou parmi les gènes codant pour une protéine de la chaîne respiratoire choisis parmi les gène des sous-unités 1 à 7 de la NAD déshydrogénase, le gène de l'apocytochrome b et les gènes des sous-unités I, II ou III de la cytochrome-oxydase et

- la séquence susceptible de transférer ladite protéine exprimée vers la mitochondrie est sélectionnée dans le groupe constitué par les fragments codant pour la tryptophanyl ARNt synthétase de levure (SCHMITZ, U.K. et al., 1989, The Plant Cell, 1, 783-791), la sous-unité β de l'ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia* (BOUTRY et al., 1987, Nature, 328:340-342), et le translocateur ATP/ADP de maïs (BATHGATE et al., 1989, Eur. J. Biochem., 183:303-310) ou un fragment EcorI/KpnI de 303 paires de bases incluant les codons 1 à 62 de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase de levure (MAARSE et al., 1984, EMBO J., 3, 2831-2837),

laquelle séquence hybride est apte à modifier la fertilité mâle des plantes ayant incorporé ledit transgène, tout en ne modifiant pas les autres caractéristiques phénotypiques desdites plantes.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites plantes transgéniques, ladite séquence d'acide nucléique hybride comprend la région codante de formule I du gène codant pour la forme non éditée de l'ATP9 de blé, à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 1).

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites plantes transgéniques, ladite séquence d'acide

nucléique hybride comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de l'ATP6 de blé, de formule II suivante :

ATG GAT AAT TTT ATC CAG AAT CTG CCT GGT GCC TAC CCG GAA
ACC CCA TTG GAT CAA TTT GCC ATT ATC CCA ATA ATT GAT CTT
CAT GTG GGC AAC TTT TAT TTA TCA TTT ACA AAT GAA GTC TTG
TAT ATG CTG CTC ACT GTC GTT TTG GTC GTT TTT CTT TTT TTT
GTT GTT ACG AAA AAG GGA GGT GGA AAG TCA GTG CCA AAT GCA
TGG CAA TCC TTG GTC GAG CTT ATT TAT GAT TTC GTG CTG AAC
CTG GTA AAC GAA CAA ATA GGT GGT CTT TCC GGA AAT GTG AAA
CAA AAG TTT TTC CCT CGC ATC TCG GTC ACT TTT ACT TTT TCG
TTA TTT CGT AAT CCC CAG GGT ATG ATA CCC TTT AGC TTC ACA
GTG ACA AGT CAT TTT CTC ATT ACT TTG GCT CTT TCA TTT TCC
ATT TTT ATA GGC ATT ACG ATC GTT GGA TTT CAA AGA CAT GGG
CTT CAT TTT TTT AGC TTC TTA TTA CCT GCG GGA GTC CCA CTG
CCG TTA GCA CCT TTC TTA GTA CTC CTT GAG CTA ATC TCT TAT
TGT TTT CGT GCA TTA AGC TTA GGA ATA CGT TTA TTT GCT AAT
ATG ATG GCC GGT CAT AGT TTA GTA AAG ATT TTA AGT GGG TTT
GCT TGG ACT ATG CTA TTT CTG AAT AAT ATT TTC TAT TTC ATA
GGA GAT CTT GGT CCC TTA TTT ATA GTT CTA GCA TTA ACC GGT
CTG GAA TTA GGT GTA GCT ATA TCA CAA GCT CAT GTT TCT ACG
ATC TCA ATT TGT ATT TAC TTG AAT GAT GCT ACA AAT CTC CAT
CAA AAT GAG TCA TTT CAT AAT TGA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 3).

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites plantes transgéniques, ladite séquence d'acide nucléique hybride comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de cox II de formule III suivante :

ATG ATT CTT CGT TCA TTA TCA TGT CGA TTC TTC ACA ATC GCT
CTT TGT GAT GCT GCG GAA CCA TGG CAA TTA GGA TCT CAA GAC
GCA GCA ACA CCT ATG ATG CAA GGA ATC ATT GAC TTA CAT CAC
GAT ATC TTT TTC TTC CTC ATT CTT ATT TTG GTT TTC GTA TCA

CGG ATG TTG GTT CGC GCT TTA TGG CAT TTC AAC GAG CAA ACT
AAT CCA ATC CCA CAA AGG ATT GTT CAT GGA ACT ACT ATG GAA
ATT ATT CGG ACC ATA TTT CCA AGT GTC ATT CTT TTG TTC ATT
GCT ATA CCA TCG TTT GCT CTG TTA TAC TCA ATG GAC GGG GTA
TTA GTA GAT CCA GCC ATT ACT ATC AAA GCT ATT GGA CAT CAA
TGG TAT CGG ACT TAT GAG TAT TCG GAC TAT AAC AGT TCC GAT
GAA CAG TCA CTC ACT TTT GAC AGT TAT ACG ATT CCA GAA GAT
GAT CCA GAA TTG GGT CAA TCA CGT TTA TTA GAA GTT GAC AAT
AGA GTG GTT GTA CCA GCC AAA ACT CAT CTA CGT ATG ATT GTA
ACA CCC GCT GAT GTA CCT CAT AGT TGG GCT GTA CCT TCC TCA
GGT GTC AAA TGT GAT GCT GTA CCT GGT CGT TCA AAT CTT ACC
TTC ATC TCG GTA CAA CGA GAA GGA GTT TAC TAT GGT CAG TGC
AGT GAG ATT CGT GGA ACT AAT CAT GCC TTT ACG CCT ATC GTC
GTA GAA GCA GTG ACT TTG AAA GAT TAT GCG GAT TGG GTA TCC
AAT CAA TTA ATC CTC CAA ACC AAC TAA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 5).

Les plantes ayant incorporé le transgène conforme à l'invention (plantes transgéniques) sont, de manière générale, sélectionnées parmi les plantes présentant un intérêt agronomique, médical ou industriel. De manière plus précise, toute plante transformable et régénérable peut constituer la matière première pour l'obtention d'une plante transgénique conforme à l'invention.

Au sens de la présente invention, on entend par transformable, toute plante ayant la possibilité d'intégrer un gène au niveau nucléaire, de façon stable et transmissible, à sa descendance directe.

Egalement au sens de la présente invention, on entend par régénérable, toute plante ayant l'aptitude de produire des plantes néoformées (néoformation ou micro-propagation).

De manière non limitative, les plantes suivantes peuvent faire l'objet d'une transformation

conforme à l'invention :

tabac, colza, tournesol, soja, tomate, pomme de terre, melon, carotte, piment, endive, trèfle, lupin, haricot, pois, maïs, blé, seigle, avoine, orge, riz, millet, agrumes, coton.

Les plantes, à partir desquelles sont obtenus les gènes mitochondriaux non édités, sont sélectionnées de manière à ce que les changements de nucléotides (processus appelé editing) entre la séquence non éditée et la séquence éditée soient importants : au moins 8 codons modifiés, et de préférence au moins 10 codons modifiés.

De manière préférée, les gènes mitochondriaux non édités sont obtenus, de manière non limitative, à partir du blé, du tabac, du pétunia ou de la pomme de terre.

Des pré-séquences de levures sont, en particulier, fonctionnelles pour l'importation de protéines vers la mitochondrie, chez les plantes.

Conformément à l'invention, la plante à partir de laquelle est obtenu ledit gène mitochondrial non édité et la plante ayant incorporé le transgène peuvent être identiques ou différentes.

De manière surprenante, les plantes transformées par une telle séquence présentent, chez au moins 50 % d'entre elles, un phénotype mâle-stérile, tout en ne présentant pas d'autres perturbations, en ce qui concerne le développement de la plante.

Egalement de manière surprenante, de telles plantes transgéniques permettent de contrôler, de manière fiable et reproductible, le processus naturel de la SMC, notamment en évitant l'auto-pollinisation, sans introduire dans ces dernières de fonctions nouvelles, artificielles et destructrices, comme cela est le cas notamment dans les systèmes décrits par Mariani et al. (système RNAse) ou par WORRALL D. et al. (système callase).

La présente invention a également pour objet une séquence d'acide nucléique hybride, comprenant au moins la région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux supérieurs, à laquelle est associée une séquence susceptible de transférer la protéine exprimée par ladite région codante, vers la mitochondrie, caractérisée en ce que :

- les régions codantes des gènes mitochondriaux non édités sont choisis parmi les gènes codant pour une protéine du complexe ATP synthase choisis parmi le fragment de gène de l'ATP9 de blé, de formule I suivante :

ATG TTA GAA GGT GCT AAA TCA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA
ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT ATT GGA AAC GTC CTC
AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA TTG GCT
AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC
GAA GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC
TCA TTC GTT TTC CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGA

ou le gène de l'ATP6, ou parmi les gènes codant pour une protéine de la chaîne respiratoire, choisis parmi les gènes des sous-unités 1 à 7 de la NAD déshydrogénase, de l'apocytochrome b et des sous-unités I, II ou III de la cytochrome-oxydase, et

- la séquence nucléique susceptible de transférer ladite protéine exprimée vers la mitochondrie est sélectionnée dans le groupe constitué par des fragments codant pour la tryptophanyl ARNt synthétase de levure, la sous-unité β de l'ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia*, le translocateur ATP/ADP de maïs et un fragment EcorI/KpnI de 303 paires de bases incluant les codons 1 à 62 de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase de levure,

laquelle séquence hybride est apte à modifier la fertilité mâle des plantes l'ayant incorporée.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite séquence d'acide nucléique hybride, elle comprend la région codante de formule I du gène codant pour la

forme non éditée de l'ATP9 de blé, à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 1).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite séquence d'acide nucléique hybride, elle comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de l'ATP6 de blé, de formule II ci-dessus, à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 3).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite séquence d'acide nucléique hybride, elle comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de cox II de formule III ci-dessus, à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 5).

La présente invention a également pour objet, un plasmide, caractérisé en ce qu'il inclut une séquence d'acide nucléique hybride conforme à l'invention, associée à un promoteur choisi parmi les promoteurs s'exprimant constitutivement et les promoteurs s'exprimant au niveau des anthères et à un terminateur convenable.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit plasmide, il comprend le promoteur 35S et le terminateur du gène VI du CaMV.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit plasmide, il comprend en outre au moins un gène marqueur, notamment, et ce de manière non limitative, un gène de résistance à un antibiotique et de préférence, le gène de résistance à l'hygromycine.

Conformément à l'invention, les plantes transgéniques, telles que définies ci-dessus, sont susceptibles d'être obtenues à l'aide d'un procédé de produc-

tion de plantes transgéniques qui comprend, pour la transformation du végétal supérieur sélectionné, l'introduction d'au moins une copie de la séquence nucléique hybride telle que définie ci-dessus, dans une plante réceptrice, à l'aide d'un plasmide contenant ladite séquence, tel que défini ci-dessus.

Une telle transformation peut avantageusement être obtenue par l'une des méthodes suivantes : transformation de protoplastes, agrotransformation, microinjection, biolistique.

La présente invention a également pour objet un procédé d'inhibition de la production de pollen, chez les végétaux supérieurs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) insertion d'une séquence d'acide nucléique hybride, telle que définie ci-dessus, chez les végétaux sélectionnés, par tout moyen approprié ;

(b) régénération et culture des végétaux transgéniques obtenus en (a) ; et

(c) mesure de la production et de la viabilité du pollen (test de germination, notamment).

Egalement de manière surprenante, on peut restaurer la fonction mâle desdites plantes transgéniques mâle-stériles, conformes à l'invention, en croisant lesdites plantes transgéniques mâle-stériles avec des plantes transgéniques comprenant dans leurs noyaux une séquence d'acide nucléique hybride dite anti-sens, c'est-à-dire incluant au moins la même région codante de gène mitochondrial non édité de végétaux que celle incluse dans lesdites plantes transgéniques mâle-stérile, dans le sens inverse.

La présente invention a également pour objet un procédé de restauration de plantes mâle-fertiles, à partir de plantes transgéniques mâle-stériles, conformes à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(1) transformation du végétal supérieur sélectionné par l'introduction d'au moins une copie de la séquence nucléique hybride telle que définie ci-dessus, dans une plante réceptrice, à l'aide d'un plasmide contenant ladite séquence, pour l'obtention de plantes transgéniques mâle-stériles (PTMS) ;

(2) transformation du même végétal supérieur qu'en (1), par l'introduction d'au moins une copie d'une séquence nucléique hybride anti-sens, incluant au moins la même région codante de gène mitochondrial non édité de végétaux que celle incluse dans lesdites plantes transgéniques mâle-stérile obtenues en (1), dans une plante réceptrice, à l'aide d'un plasmide contenant ladite séquence, pour l'obtention de plantes transgéniques mâle-fertiles (PTMF) ;

(3) croisement des plantes transgéniques mâle-stériles obtenues en (1) et des plantes mâle-fertiles obtenues en (2), pour l'obtention d'hybrides vigoureux, restaurés dans leur fertilité mâle et présentant des caractéristiques présélectionnées.

La présente invention a également pour objet des plasmides incluant une séquence hybride anti-sens, telle que définie ci-dessus, associée à un promoteur choisi parmi les promoteurs constitutifs et les promoteurs spécifiques des anthères et également associée à un terminateur convenable.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Construction d'un gène chimérique conforme à l'invention cox IV-ATP9 (SEQ ID n° 1).

Les séquences codant pour l'ATP9 sont obtenues à partir d'un ADNc correspondant aux formes éditées et non éditées d'ARNm mitochondrial de blé.

L'ATP9 est fusionné à un fragment EcoRI/KpnI de 303 paires de base à partir d'un plasmide dénommé 19.4 (MAARSE et al., EMBO J., 1984, 3, 2831-2837), incluant les codons 1 à 62 de la sous-unité IV (*cox* IV) de la cytochrome oxydase de levure.

Le fragment résultant, obtenu après digestion par l'enzyme HincII est ligaturé au niveau du site de restriction SmaI du plasmide pDH51 (PIETRZAK et al., 1986, Nucleic Acids Res., 14:5857-5868). Le gène de résistance à l'hygromycine est inséré au niveau du site HindIII du plasmide pDH51, du plasmide pEA903 (forme éditée de l'ATP9, figure 1) et du plasmide pEA904 (forme non éditée de l'ATP9, figure 2) donnant naissance respectivement aux plasmides pH1 (figure 3), pH5 (figure 4) et pH2 (figure 5). Le plasmide pH4 (figure 6) est constitué du plasmide pEA904 dans lequel la partie codante cox IV/ATP9 est placée en orientation inverse par comparaison avec le plasmide pH2.

Les séquences cox IV-ATP9 non-édité et cox IV-ATP9 édité sont représentées aux figures 12 et 13.

Tous ces gènes sont sous le contrôle du promoteur CaMV 35S et du terminateur de gène VI de CaMV.

Les séquences conformes à l'invention peuvent spécifiquement être amplifiées à l'aide des amorces oligonucléotidiques suivantes :

(a) 5'-CACTACGTCAATCTATAAG-3', s'étendant du codon 3 au codon 9 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase de levure et

(b) 5'-TATGCTCAACACATGAGCG-3', localisée au niveau du terminateur du gène VI du CaMV (45 paires de base en amont du signal de polyadénylation).

L'ARNm d'ATP9 chez le blé subit des changements de nucléotides C→U (processus appelé *editing*), au niveau de 8 codons. Ces modifications ont pour conséquence le changement de 5 aminoacides dans la protéine correspondante (protéine éditée) et la perte, par rapport à la séquence déduite du gène, de 6 résidus dans la région C-terminale, perte provoquée par la création d'un codon stop.

La protéine non éditée est plus hydrophile avec 6 résidus supplémentaires au niveau C-terminal ; de plus, cette forme non éditée d'ATP9 sélectionnée, constitue un modèle de protéine modifiée particulièrement avantageux car il constitue un élément du canal à proton de l'ATP synthase et, en conséquence, il est indispensable à la fonction de ce complexe ; ce fragment est également avantageux en raison de la taille réduite de la séquence codante, qui facilite la manipulation et le fait que l'ATP9 peut avoir une localisation nucléaire ou mitochondriale.

EXEMPLE 2 : Production de plantes transgéniques mâle-stériles.

Aussi bien la construction plasmidique conforme à l'invention (voir exemple 1, plasmide pH2) que les constructions contrôles (plasmide pH1) et les constructions correspondant à la forme éditée de l'ATP9 plasmide pH5) sont utilisées pour la transformation de protoplastes d'une lignée de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana, dénommée SR1.

* Transformation des protoplastes :

Les protoplastes utilisés pour la transformation sont isolés à partir des feuilles de plantes de *Nicotiana tabacum* SR1, cultivés en condition axénique et âgées d'un mois. Les jeunes feuilles sont prélevées, débarrassées de la nervure centrale et coupées en fines lamelles. Les fragments sont ensuite incubés à l'obscurité à 26°C, pendant une nuit, dans une solution enzyma-

tique constituée du milieu K3 (NAGY et MALIGA, 1976) additionnée de cellulase Onozuka R10 (1,2 %), de macérozyme Onozuka R10 (0,4 %) et de driselase Fluka (0,1 %) (pH 5,6). Avant la récolte, la solution enzymatique est diluée avec une solution de saccharose 0,6 M, MES 0,1 % (p/v) (pH 5,6) dans les proportions respectives 2v/1v.

Les protoplastes sont séparés des tissus non digérés par filtration à travers un tamis de 100 µm. La suspension est recouverte d'une solution W5 (MENCZEL et al., Theor. Appl. Genetics, 1981, 59:191-195) en prenant soin de ne pas mélanger les phases liquides. Après centrifugation à 600 rpm pendant 10 min, les protoplastes sont rassemblés sous forme d'une bande à l'interface entre la solution W5 et la solution enzymatique. Ils sont recueillis soigneusement et lavés deux fois avec la solution W5 pour éliminer les traces d'enzymes. Les protoplastes sont placés dans une chambre froide à 4-6°C pendant 1-2 heures. Après une nouvelle centrifugation à 750 rpm pendant 5 min, ils sont remis en suspension dans une solution mannitol/magnésium (Mannitol Merck 0,5 M ; $MgCl_2$, $6H_2O$ Prolabo 1,5 mM, MES Sigma 0,1 %, pH 5,6) et leur concentration est ajustée à $1,6 \times 10^6$ protoplastes/ml. Les protoplastes sont soumis à un choc thermique à 45°C pendant 5 minutes.

Après retour à la température ambiante, 300 µl de suspension de protoplastes (5×10^5 protoplastes) sont répartis dans un tube conique de 12 ml. Ensuite, 20 µg de plasmide pH2 (ou de plasmide pH4), selon la plante transgénique que l'on souhaite obtenir, 300 µl d'une solution de PEG 4000 [(PEG 4000 Merck ; 40 % (p/v), mannitol Merck, 0,4 M ; $Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$ Merck ; pH 8 (solution stérilisée par filtration à 0,45 µm)] et 60 µg d'ADN de thymus de veau comme ADN entraîneur, sont ajoutés dans la suspension de protoplastes. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 25-30 minutes, et agité doucement de temps en temps. La suspension de transformation

est ensuite diluée progressivement en ajoutant petit à petit 10 ml de W5 sur une période de 10 minutes. Les protoplastes sont récupérés par centrifugation et repris dans 1 ml de milieu K3.

* Culture des protoplastes et régénération de plantes :

les protoplastes sont cultivés à raison de $5x10^4$ protoplastes/ml, dans 3 ml d'un mélange de milieux K3 et H (KAO et MICHAYLUK, 1975) en proportion 1:1 (v/v), solidifié avec de l'agarose (0,8 %). Les colonies résultantes sont successivement cultivées, en présence de l'agent de sélection hygromycine à 20 mg/l, dans le milieu A50m (milieu A contenant 50 g/l mannitol) (CABOCHE, 1980) pendant le premier mois, puis sur le milieu A30m (le milieu A contenant 30 g/l mannitol) durant le deuxième mois, et enfin sur le milieu A-m (milieu A sans mannitol), milieu contenant 40 mg/ml d'hygromycine, durant le troisième mois. Pour la régénération, les cals sont transférés sur le milieu AR. Le milieu AR est le milieu A contenant seulement 20 g/l saccharose comme source d'hydrate de carbone et 0,25 mg/l BAP comme hormone de croissance. Les plantules issues de cals sont cultivées sur le milieu T (NITCH et NITCH, 1969). Le milieu MSoo est utilisé pour l'entretien des plantes.

EXEMPLE 3 : Analyse phénotypique des plantes transgéniques obtenues.

Les tailles des plantes âgées de 14 semaines, obtenues conformément à l'exemple 2 sont précisées dans le Tableau I ci-après :

TABLEAU I

Fertilité de la plante[1]							
Lignées	nbre de plantes testées	F (%)	F/S (%)	S (%)	Croissance (cm)	nbre de noeuds	graines[2] (mg)
SR1	1	100	0	0	87,0	24	109 ± 36
H1	3	100	0	0	120 ± 6	19 ± 1	108 ± 14
H2	16	50 - -	- 19 -	- - 31	- 103 ± 26 -	- 19 ± 2 -	100 ± 32 25 ± 17 0
H5	9	100	0	0	92 ± 23	23 ± 5	94 ± 28

[1] F = fertile, F/S = semi-fertile, S = mâle-stérile

[2] valeur moyenne de production de graine par capsule après auto-pollinisation.

. lignée H1 = plantes transgéniques obtenues avec le plasmide pH1,

. lignée H2 = plantes transgéniques obtenues avec le plasmide pH2,

. lignée H5 = plantes transgéniques obtenues avec le plasmide pH5.

. lignée contrôle SR1 (plante non transformée).

La taille des plantes n'est pas significativement différente de celle des lignées SR1 non transformées. Le nombre de noeuds moyen est similaire dans les trois lignées transgéniques différentes (19 à 24 noeuds par plante).

Apparemment, il n'y a pas de modification dans le fonctionnement des méristèmes végétatifs dans la différenciation des noeuds et des feuilles des plantes transgéniques.

La floraison dans les lignées H1, H2 et H5 est induite 7 à 14 semaines après la transplantation. Les fleurs des plantes transgéniques sont similaires dans leurs formes et dans leurs couleurs à celles des fleurs

SR1 (pétales roses-rouges et anthères dans chaque fleur). Les plantes mâles-stériles ont des anthères blanches, contenant quelques grains de pollen ou aucun (figures 7A1 et 7B), tandis que les plantes fertiles ont des anthères blanc-jaunes avec des grains de pollen normaux (figures 7A2 et 7C). Il n'y a aucune différence dans la forme et dans la couleur du pistil entre les plantes mâles-stériles et mâles-fertiles.

EXEMPLE 4 : Analyse de la fertilité des plantes transgéniques.

Les transformants H1 et H5 produisent des plantes fertiles, alors que les transformants H2 présentent des caractéristiques de fertilité, de semi-fertilité ou de stérilité définies sur la base de la germination du pollen ou par la réaction au diacétate de fluorescéine.

Dans les plantes transgéniques fertiles, la viabilité du pollen est comprise entre 31 et 75 %, proche des valeurs trouvées dans la lignée de contrôle SR1 ; dans les plantes semi-fertiles, la viabilité du pollen est d'environ 10 à 20 % ; dans les plantes mâles-stériles, la viabilité est généralement inférieure à 2 %.

La fertilité des plantes est également déterminée par la production de graines après auto-pollinisation ou rétrocroisement. Les résultats sont également illustrés au Tableau I ci-dessus.

Les lignées H1 et H5 ont une production moyenne de graines de 100 mg/capsule comparable à celle des lignées contrôles SR1 (110 mg/capsule). Les lignées H2 qui correspondent à des plantes stériles ne produisent aucune graine, les plantes semi-fertiles produisent entre 12 et 50 mg/capsule, les plantes fertiles produisent en moyenne 100 mg/capsule. Ces valeurs sont bien corrélées avec la viabilité pollinique.

La caractéristique de fertilité femelle, pour les plantes stériles et semi-fertiles, est déterminée par rétrocroisement avec les lignées SR1 comme parent mâle.

Toutes les plantes mâles-stériles sont femelles fertiles et produisent une quantité normale de graines viables (63 à 92 mg/capsule), avec une valeur de viabilité des graines supérieure à 77 %. Ainsi le caractère stérile ou semi-fertile dans 50 % des lignées H2 est dû à l'absence ou à la production très faible de pollen viable.

La transmission des transgènes est analysée à travers la ségrégation génétique du gène de l'hygromycine phosphotransférase *(hpt)* chez les descendants (entre 200 et 500 descendants analysés). Après auto-fécondation (plantes fertiles et/ou semi-fertiles), la résistance à l'hygromycine est transmise dans la majorité des cas comme un caractère mendélien (mono ou di-génique).

Après rétrocroisement avec le parent SR1 (plante stérile), 4 des 5 plantes mâles-stériles héritent du caractère de résistance à l'hygromycine comme un caractère mendélien digénique, ceci exprimant 2 *loci* actifs.

Ces analyses montrent que les plantes stériles sont uniquement affectées dans la production de pollen, puisqu'elles sont femelles fertiles et produisent une quantité de graines par fruit (100 à 150 mg), comparable, voir supérieure à celle des témoins.

EXEMPLE 5 : Analyse moléculaire des transformants.

Pour mettre en évidence la présence et la transcription du transgène ATP9, l'analyse des produits de transcription est effectuée par hybridation de type Southern et Northern. L'ADN total est isolé à partir des lignées H2 (stériles, semi-fertiles et fertiles) et des lignées H5. Par ailleurs, le gène chimérique est analysé par amplification PCR.

* Méthodes utilisées :

- L'ADN total est isolé à partir de 10 g de tissus de feuilles essentiellement comme décrit dans SAGHAL-MAROOF M.A. et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 81, 8014-8018. 1 µg d'ADN est amplifié dans un volume final de 100 µl, en utilisant 0,5 unité de Taq polymérase, 0,18 mM dNTPs et 100 pmol de chacune des amorces. Les amorces utilisées sont celles précisées à l'exemple 1. L'utilisation de ces amorces exclut l'amplification de l'ATP9 endogène (voir figure 8C).

L'étape de dénaturation est réalisée à 95°C pendant 1 min, l'étape d'hybridation est réalisée pendant 2 min à 52°C et l'étape de polymérisation est réalisée pendant 1 min à 72°C.

25 cycles sont réalisés, les échantillons sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5 % et transférés sur une membrane Hybond-N^+ (Amersham), comme décrit dans SAGHAL-MAROOF M.A. al. (référence citée). Les filtres sont pré-hybridés à 42°C dans de la formamide déionisée à 50 %, 5 x SSC, 8 x Denhardt et SDS à 0,5 %. Les filtres sont hybridés avec la séquence codante de 300 paires de base de l'ATP9, fragment EcoRI/HindIII marqué au ^{32}P.

Une bande (correspondant à un produit comprenant 700 paires de bases) est observée dans la plupart des lignées H2 et H5 comme prévu. La figure 8A montre les résultats obtenus avec l'ADN H2.2 et H2.16, issu de plantes mâles-stériles (pistes 1 et 2) et avec des plantes fertiles (ADN H5.6 et H5.15, pistes 3 et 4). L'ADN issu des plantes non transformées SR1 ne donne aucun signal (piste 5).

- L'ARN total des lignées SR1, H2 et H5 est extrait, à partir des feuilles, comme suit : 5 g de feuilles sont cryobroyés ; puis on procède à une première extraction à partir de la poudre congelée, avec 5 ml d'un mélange phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1 ; v:v:v) et 5 ml de TNES+DTT (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS et 2 mM dithiothréitol) ; on procède ensuite à une deuxième extraction, à partir de la phase aqueuse, deux fois avec un volume égal de chloro-

forme et d'alcool isoamylique (24:1 ; v:v) et l'ARN est précipité avec un volume égal de chlorure de lithium 4 M à 0°C pendant une nuit.

Les ARNs sont dissous dans une eau traitée au DEPC. La concentration d'ARN est mesurée par la densité optique (DO) à 260 nm. Les ARNs poly(A)$^+$ sont purifiés par chromatographie d'affinité oligo(dT)-cellulose. 20 µg d'ARN total et 1 µg d'ARN poly(A)$^+$ sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 %, tampon formaldéhyde/formamide, puis transférés sur des membranes de nylon Hybond-N$^+$. Les hybridations avec la sonde ATP9 sont réalisées comme décrit ci-dessus.

Une bande de 0,48 kb est obtenue avec les lignées contrôle SR1 (figure 8B, piste 1). Cette bande est présente dans toute les lignées et correspond à l'ARNm endogène mitochondrial.

Un transcrit additionnel, correspondant à une bande de 0,98 kb est présente seulement chez les plantes transformées. Comme illustré à la figure 8B, ces molécules peuvent être séparées de l'ARNm endogène par chromatographie oligo(dT)-cellulose, confirmant son origine cytoplasmique.

La figure 8B, (pistes 3 et 4), montre les résultats obtenus avec les plantes mâles-stériles H2.2 et H2.16 et avec les plantes fertiles H5.6 et H5.15, (pistes 5 et 6). Le transcrit de 0,98 kb est absent des contrôles non transformés (piste 2).

- En parallèle, par la technique de la PCR de l'ADNc, il est possible d'obtenir des transcrits provenant du transgène grâce aux séquences ajoutées au cours de la manipulation *in vitro* telles que les régions de la pré-séquence provenant de la levure (*cox* IV) et la région de terminaison du CaMV. De plus, seul le transcrit de 0,98 kb hybride avec une sonde provenant de la séquence *cox* IV fusionnée à l'ATP9.

EXEMPLE 6 : Analyse de la production de la protéine chimère.

Pour comprendre si les transgènes affectent l'expression du gène mitochondrial ATP9 endogène, l'ARN total des plantes transformées H2 et H5 ainsi que des plantes contrôles ont été hybridés avec une sonde mitochondriale spécifique.

Comme le montre la figure 9, aucune différence substantielle n'est observée lorsque le transgène est édité ou non édité et le marquage est similaire à celui du contrôle.

La production de la protéine transgénique est analysée par immunoblotting des extraits mitochondriaux et cytosoliques. Des anticorps dirigés contre les fragments 21 à 54 de la partie pré-séquence de *cox* IV de levure, faisant partie du transgène, sont obtenus chez le lapin.

On procède comme suit : un fragment XbaI/KpnI contenant les codons 21 à 54 de *cox* IV de levure est isolé à partir du plasmide 19.4 précité.

Ce fragment est ligaturé au plasmide pGEX-A (figure 10) en phase avec la séquence codante de la glutathion S-transférase, sous le contrôle du promoteur de la β-galactosidase.

La protéine de fusion est induite après transformation de cellules d'*E. coli* DH5α par l'IPTG. Ces cellules produisent environ 80 mg de protéines/litre de culture.

La protéine fusionnée est purifiée à partir d'un extrait d'*E. coli* par chromatographie d'affinité sur une colonne de glutathion-agarose. La protéine éluée par du glutathion est obtenue avec un taux de pureté de l'ordre de 95 %. La protéine de fusion est utilisée comme antigène pour produire des anticorps anti-*cox* IV chez le lapin.

Les feuilles de plantes de serre sont uti-

lisées pour le fractionnement cellulaire. 100 µg de protéines cytosoliques et mitochondriales sont fractionnés par urée/SDS-PAGE. L'immunoréaction est réalisée en utilisant un anti-sérum anti-*cox* IV dilué au 1/500ème selon la méthode de DARLEY-USMAR et al. [1987, Mitochondria, *a practical approach*, eds DARLEY-USMAR, (IRL Press Ltd.) pp. 113-152)]. Les protéines des plantes transgéniques portant le phénotype mâle-stérile sont révélées par des anticorps IgG anti-lapin conjugués à de la peroxydase.

Aucun signal n'est observé, ni avec la fraction mitochondriale (figure 11B, piste 1), ni avec la fraction cytosolique de la lignée SR1 non transformée.

La fraction mitochondriale des plantes mâles-stériles H2.2 et fertiles H5.15 (figure 11B, pistes 2 et 4 respectivement) montre une bande de 12 kDa correspondant à la taille attendue pour la protéine (voir figure 11A, qui précise la structure du précurseur de 15 kDa et de la protéine importée de 12 kDa).

Les protéines cytosoliques de ces lignées (figure 11B, pistes 3 et 5) montrent 2 bandes, l'une à 15 kDa, la taille attendue pour le polypeptide précurseur chimérique, et l'autre à 14 kDa. La nature de ce dernier polypeptide reste à déterminer ; il s'agit probablement d'un produit de dégradation du précurseur de 15 kDa.

La protéine associée avec la fraction mitochondriale de la lignée H5.15 (figure 11, piste 4) migre à peu près au même endroit que la protéine mitochondriale H2.2, mais légèrement en aval. Cette différence est due au fait que les gènes chimériques diffèrent au niveau de la position du codon stop. En effet, comme déjà précisé ci-dessus, la protéine éditée présente 6 résidus en moins que la protéine non éditée due à la génération d'un codon stop lors de l'editing de l'ARN.

EXEMPLE 7 : Etude de la respiration des mitochondries des plantes transgéniques.

L'effet du transgène au niveau subcellulaire

doit se traduire par un dysfonctionnement de la fonction respiratoire de la mitochondrie. L'analyse de la respiration des parties non chlorophylliennes des plantes transgéniques a été réalisée.

La détermination des vitesses de respiration des organes non chlorophylliens (racines), en présence ou en absence de découplants est effectuée par analyse de la consommation d'oxygène à l'aide d'une électrode de Clark. Des études plus fines ont été conduites sur des mitochondries purifiées par centrifugation différentielle et en gradient de Ficoll. L'effet de découplants sur la respiration et les rapports ADP/O ont été déterminés sur des mitochondries issues de lignées mâles-stériles et comparé aux plantes contrôles transformées ou sauvages.

Ces différentes mesures montrent que la fonction mitochondriale est réduite dans les plantes mâle-stériles par rapport au témoin non transformé ou transformé avec le plasmide pH5. Cette situation est proche de celle rencontrée chez les plantes mâle-stérile naturelles.

Il ressort de ce qui précède que l'expression dans des plantes transgéniques de tabac d'une séquence d'ADN codant pour de l'ATP9 mitochondrial non édité de blé n'a pas d'effet sur la plupart des caractères phénotypiques des plantes transformées, à l'exception de l'apparition de la stérilité mâle.

En effet, la taille, la vitesse de croissance, le nombre de noeuds, la forme et la taille des feuilles et des fleurs sont similaires chez les plantes transgéniques et chez les plantes contrôles. Toutefois, des effets significatifs sont observés au niveau des organes de la reproduction mâle lorsque la séquence d'ATP9 de blé, sous sa forme non éditée, est exprimée dans les plantes de tabac.

En fait, les expérimentations de transformations réalisées avec le plasmide pH2 conduit à la produc-

tion de beaucoup de plantes (50 %) modifiées dans leur fertilité. Approximativement 19 % sont semi-fertiles et 31 % sont entièrement stériles.

Toutes les lignées semi-fertiles et stériles H2 expriment le transgène sous la forme d'ARNm polyadénylé. Les lignées H2 fertiles ne présentent pas le transcrit de 0,98 kb, même lorsque le transgène est détecté après amplification par PCR, ceci indiquant que dans ce dernier cas le transgène est inactif.

Des résultats montrent également, de manière inattendue, que le phénotype mâle-stérile est corrélé uniquement avec la présence de séquence non éditée d'ATP9 tandis que les transformants obtenus avec la forme éditée d'ATP9 sont tous fertiles.

Dans tous les cas, les plantes stériles sont seulement mâles-stériles et peuvent être pollinisées avec un pollen étranger, ceci reflètant une fertilité femelle normale.

EXEMPLE 8 : Production des plantes transgéniques présentant une séquence hybride conforme à l'invention anti-sens.

On procède comme dans l'exemple 2, la transformation de protoplastes étant toutefois réalisée à l'aide des plasmides pH4.

En croisant ces plantes mâle-fertiles avec les plantes transgéniques mâle-stériles, conformes à l'invention, on obtient des hybrides mâle-fertiles non consanguins.

EXEMPLE 9 : Construction d'un gène chimérique conforme à l'invention cox IV-ATP6 (SEQ ID n° 3).

Les séquence codant pour l'ATP6 sont obtenues à partir d'un ADNc correspondant aux formes éditées et non éditées d'ARNm mitochondrial de blé.

Le fragment d'ATP6 non édité sélectionné présente la séquence de formule II définie ci-dessus et est fusionné à la séquence de transfert cox IV de levure

telle que définie ci-dessus.

Le fragment résultant est similaire à celui obtenu à l'exemple 1.

L'ARNm d'ATP6 chez le blé subit des changements de nucléotides (*editing*), au niveau de 12 codons. Les modifications ont pour conséquence le changement de 11 aminoacides et la perte, par rapport à la séquence déduite du gène, de 7 résidus, dans la région C-terminale, perte provoquée par la création d'un codon stop.

EXEMPLE 10 : Construction d'un gène chimérique conforme à l'invention cox IV-cox II (SEQ ID n° 5).

Les séquence codant pour cox II sont obtenues à partir d'un ADNc correspondant aux formes éditées et non éditées d'ARNm mitochondrial de blé.

Le fragment du gène cox II non édité présente la séquence de formule III définie ci-dessus et est fusionné à la séquence de transfert cox IV de levure telle que définie ci-dessus.

Le fragment résultant est similaire à celui obtenu à l'exemple 1.

L'ARNm chez le blé subit des changements de nucléotides (*editing*), au niveau de 16 codons. Les modifications ont pour conséquence le changement de 16 aminoacides par rapport à la séquence déduite du gène cox II.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:
(A) NOM: Centre National de la Recherche Scientifique C.N.R.S.
(B) RUE: 3 rue Michel-Ange
(C) VILLE: Paris
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75016

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PLANTES TRANSGENIQUES INCLUANT UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE HYBRIDE, COMPORTANT UN FRAGMENT DE GENE MITOCHONDRIAL NON EDITE DE VEGETAUX SUPERIEURS ET LEUR PROCEDE D'OBTENTION.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 568 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 99..527

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```
GTCAACGTAT TCTTCTCCCT GAAGAAACAG TATACTAACA ATACTCACCC ATTTCGATTT      60

TGATGTTGCC ATACAAATAG ATAACAAGCA CAAGCACA ATG CTT TCA CTA CGT          113
                                              Met Leu Ser Leu Arg
                                                1               5

CAA TCT ATA AGA TTT TTC AAG CCA GCC ACA AGA ACT TTG TGT AGC TCT        161
Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg Thr Leu Cys Ser Ser
            10                  15                  20
```

```
AGA TAT CTG CTT CAG CAA AAA CCC GTG GTG AAA ACT GCC CAA AAC TTA      209
Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys Thr Ala Gln Asn Leu
            25                  30                  35

GCA GAA GTT AAT GGT CCA GAA ACT TTG ATT GGT CCT GGT GCT AAA GAG      257
Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly Pro Gly Ala Lys Glu
        40                  45                  50

GGT ACC CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAG ATG TTA GAA GGT GCT AAA TCA      305
Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Leu Glu Gly Ala Lys Ser
    55                  60                  65

ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT      353
Ile Gly Ala Gly Ala Ala Thr Ile Ala Leu Ala Gly Ala Ala Val Gly
70                  75                  80                  85

ATT GGA AAC GTC CTC AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA      401
Ile Gly Asn Val Leu Ser Ser Leu Ile His Ser Val Ala Arg Asn Pro
                90                  95                  100

TCA TTG GCT AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC      449
Ser Leu Ala Lys Gln Ser Phe Gly Tyr Ala Ile Leu Gly Phe Ala Leu
            105                 110                 115

ACC GAA GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC TCA      497
Thr Glu Ala Ile Ala Leu Phe Ala Pro Met Met Ala Phe Leu Ile Ser
        120                 125                 130

TTC GTT TTC CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGAGATCAAA AAAGAAATGT            544
Phe Val Phe Arg Ser His Lys Lys Ser
    135                 140

GTGAATGTAG TTACAGATGT CGAC                                          568
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 142 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```
Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg
 1               5                  10                  15

Thr Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys
            20                  25                  30
```

```
Thr Ala Gln Asn Leu Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly
        35                  40                  45

Pro Gly Ala Lys Glu Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Leu
    50                  55                  60

Glu Gly Ala Lys Ser Ile Gly Ala Gly Ala Ala Thr Ile Ala Leu Ala
65                  70                  75                  80

Gly Ala Ala Val Gly Ile Gly Asn Val Leu Ser Ser Leu Ile His Ser
                85                  90                  95

Val Ala Arg Asn Pro Ser Leu Ala Lys Gln Ser Phe Gly Tyr Ala Ile
            100                 105                 110

Leu Gly Phe Ala Leu Thr Glu Ala Ile Ala Leu Phe Ala Pro Met Met
        115                 120                 125

Ala Phe Leu Ile Ser Phe Val Phe Arg Ser His Lys Lys Ser
    130                 135                 140
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 1106 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 99..1106

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

```
GTCAACGTAT TCTTCTCCCT GAAGAAACAG TATACTAACA ATACTCACCC ATTTCGATTT      60

TGATGTTGCC ATACAAATAG ATAACAAGCA CAAGCACA ATG CTT TCA CTA CGT         113
                                          Met Leu Ser Leu Arg
                                            1               5

CAA TCT ATA AGA TTT TTC AAG CCA GCC ACA AGA ACT TTG TGT AGC TCT       161
Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg Thr Leu Cys Ser Ser
                10                  15                  20

AGA TAT CTG CTT CAG CAA AAA CCC GTG GTG AAA ACT GCC CAA AAC TTA       209
Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys Thr Ala Gln Asn Leu
            25                  30                  35
```

```
GCA GAA GTT AAT GGT CCA GAA ACT TTG ATT GGT CCT GGT GCT AAA GAG       257
Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly Pro Gly Ala Lys Glu
         40                  45                  50

GGT ACC CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAG ATG GAT AAT TTT ATC CAG AAT       305
Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Asp Asn Phe Ile Gln Asn
     55                  60                  65

CTG CCT GGT GCC TAC CCG GAA ACC CCA TTG GAT CAA TTT GCC ATT ATC       353
Leu Pro Gly Ala Tyr Pro Glu Thr Pro Leu Asp Gln Phe Ala Ile Ile
 70                  75                  80                  85

CCA ATA ATT GAT CTT CAT GTG GGC AAC TTT TAT TTA TCA TTT ACA AAT       401
Pro Ile Ile Asp Leu His Val Gly Asn Phe Tyr Leu Ser Phe Thr Asn
                 90                  95                 100

GAA GTC TTG TAT ATG CTG CTC ACT GTC GTT TTG GTC GTT TTT CTT TTT       449
Glu Val Leu Tyr Met Leu Leu Thr Val Val Leu Val Val Phe Leu Phe
            105                 110                 115

TTT GTT GTT ACG AAA AAG GGA GGT GGA AAG TCA GTG CCA AAT GCA TGG       497
Phe Val Val Thr Lys Lys Gly Gly Gly Lys Ser Val Pro Asn Ala Trp
        120                 125                 130

CAA TCC TTG GTC GAG CTT ATT TAT GAT TTC GTG CTG AAC CTG GTA AAC       545
Gln Ser Leu Val Glu Leu Ile Tyr Asp Phe Val Leu Asn Leu Val Asn
    135                 140                 145

GAA CAA ATA GGT GGT CTT TCC GGA AAT GTG AAA CAA AAG TTT TTC CCT       593
Glu Gln Ile Gly Gly Leu Ser Gly Asn Val Lys Gln Lys Phe Phe Pro
150                 155                 160                 165

CGC ATC TCG GTC ACT TTT ACT TTT TCG TTA TTT CGT AAT CCC CAG GGT       641
Arg Ile Ser Val Thr Phe Thr Phe Ser Leu Phe Arg Asn Pro Gln Gly
                170                 175                 180

ATG ATA CCC TTT AGC TTC ACA GTG ACA AGT CAT TTT CTC ATT ACT TTG       689
Met Ile Pro Phe Ser Phe Thr Val Thr Ser His Phe Leu Ile Thr Leu
            185                 190                 195

GCT CTT TCA TTT TCC ATT TTT ATA GGC ATT ACG ATC GTT GGA TTT CAA       737
Ala Leu Ser Phe Ser Ile Phe Ile Gly Ile Thr Ile Val Gly Phe Gln
        200                 205                 210

AGA CAT GGG CTT CAT TTT TTT AGC TTC TTA TTA CCT GCG GGA GTC CCA       785
Arg His Gly Leu His Phe Phe Ser Phe Leu Leu Pro Ala Gly Val Pro
    215                 220                 225

CTG CCG TTA GCA CCT TTC TTA GTA CTC CTT GAG CTA ATC TCT TAT TGT       833
Leu Pro Leu Ala Pro Phe Leu Val Leu Leu Glu Leu Ile Ser Tyr Cys
230                 235                 240                 245
```

```
TTT CGT GCA TTA AGC TTA GGA ATA CGT TTA TTT GCT AAT ATG ATG GCC        881
Phe Arg Ala Leu Ser Leu Gly Ile Arg Leu Phe Ala Asn Met Met Ala
                250                 255                 260

GGT CAT AGT TTA GTA AAG ATT TTA AGT GGG TTT GCT TGG ACT ATG CTA        929
Gly His Ser Leu Val Lys Ile Leu Ser Gly Phe Ala Trp Thr Met Leu
            265                 270                 275

TTT CTG AAT AAT ATT TTC TAT TTC ATA GGA GAT CTT GGT CCC TTA TTT        977
Phe Leu Asn Asn Ile Phe Tyr Phe Ile Gly Asp Leu Gly Pro Leu Phe
        280                 285                 290

ATA GTT CTA GCA TTA ACC GGT CTG GAA TTA GGT GTA GCT ATA TCA CAA       1025
Ile Val Leu Ala Leu Thr Gly Leu Glu Leu Gly Val Ala Ile Ser Gln
    295                 300                 305

GCT CAT GTT TCT ACG ATC TCA ATT TGT ATT TAC TTG AAT GAT GCT ACA       1073
Ala His Val Ser Thr Ile Ser Ile Cys Ile Tyr Leu Asn Asp Ala Thr
310                 315                 320                 325

AAT CTC CAT CAA AAT GAG TCA TTT CAT AAT TGA                           1106
Asn Leu His Gln Asn Glu Ser Phe His Asn
                330                 335
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 335 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```
Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg
  1               5                  10                  15

Thr Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys
            20                  25                  30

Thr Ala Gln Asn Leu Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly
        35                  40                  45

Pro Gly Ala Lys Glu Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Asp
    50                  55                  60

Asn Phe Ile Gln Asn Leu Pro Gly Ala Tyr Pro Glu Thr Pro Leu Asp
65                  70                  75                  80

Gln Phe Ala Ile Ile Pro Ile Ile Asp Leu His Val Gly Asn Phe Tyr
                85                  90                  95
```

```
Leu Ser Phe Thr Asn Glu Val Leu Tyr Met Leu Leu Thr Val Val Leu
            100                 105                 110

Val Val Phe Leu Phe Phe Val Val Thr Lys Lys Gly Gly Gly Lys Ser
        115                 120                 125

Val Pro Asn Ala Trp Gln Ser Leu Val Glu Leu Ile Tyr Asp Phe Val
    130                 135                 140

Leu Asn Leu Val Asn Glu Gln Ile Gly Gly Leu Ser Gly Asn Val Lys
145                 150                 155                 160

Gln Lys Phe Phe Pro Arg Ile Ser Val Thr Phe Thr Phe Ser Leu Phe
                165                 170                 175

Arg Asn Pro Gln Gly Met Ile Pro Phe Ser Phe Thr Val Thr Ser His
            180                 185                 190

Phe Leu Ile Thr Leu Ala Leu Ser Phe Ser Ile Phe Ile Gly Ile Thr
        195                 200                 205

Ile Val Gly Phe Gln Arg His Gly Leu His Phe Phe Ser Phe Leu Leu
    210                 215                 220

Pro Ala Gly Val Pro Leu Pro Leu Ala Pro Phe Leu Val Leu Leu Glu
225                 230                 235                 240

Leu Ile Ser Tyr Cys Phe Arg Ala Leu Ser Leu Gly Ile Arg Leu Phe
                245                 250                 255

Ala Asn Met Met Ala Gly His Ser Leu Val Lys Ile Leu Ser Gly Phe
            260                 265                 270

Ala Trp Thr Met Leu Phe Leu Asn Asn Ile Phe Tyr Phe Ile Gly Asp
        275                 280                 285

Leu Gly Pro Leu Phe Ile Val Leu Ala Leu Thr Gly Leu Glu Leu Gly
    290                 295                 300

Val Ala Ile Ser Gln Ala His Val Ser Thr Ile Ser Ile Cys Ile Tyr
305                 310                 315                 320

Leu Asn Asp Ala Thr Asn Leu His Gln Asn Glu Ser Phe His Asn
                325                 330                 335
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 1067 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 99..1067

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

```
GTCAACGTAT TCTTCTCCCT GAAGAAACAG TATACTAACA ATACTCACCC ATTTCGATTT       60

TGATGTTGCC ATACAAATAG ATAACAAGCA CAAGCACA ATG CTT TCA CTA CGT           113
                                             Met Leu Ser Leu Arg
                                               1               5

CAA TCT ATA AGA TTT TTC AAG CCA GCC ACA AGA ACT TTG TGT AGC TCT         161
Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg Thr Leu Cys Ser Ser
                10                  15                  20

AGA TAT CTG CTT CAG CAA AAA CCC GTG GTG AAA ACT GCC CAA AAC TTA         209
Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys Thr Ala Gln Asn Leu
            25                  30                  35

GCA GAA GTT AAT GGT CCA GAA ACT TTG ATT GGT CCT GGT GCT AAA GAG         257
Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly Pro Gly Ala Lys Glu
        40                  45                  50

GGT ACC CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAG ATG ATT CTT CGT TCA TTA TCA         305
Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Ile Leu Arg Ser Leu Ser
    55                  60                  65

TGT CGA TTC TTC ACA ATC GCT CTT TGT GAT GCT GCG GAA CCA TGG CAA         353
Cys Arg Phe Phe Thr Ile Ala Leu Cys Asp Ala Ala Glu Pro Trp Gln
70                  75                  80                  85

TTA GGA TCT CAA GAC GCA GCA ACA CCT ATG ATG CAA GGA ATC ATT GAC         401
Leu Gly Ser Gln Asp Ala Ala Thr Pro Met Met Gln Gly Ile Ile Asp
                90                  95                  100

TTA CAT CAC GAT ATC TTT TTC TTC CTC ATT CTT ATT TTG GTT TTC GTA         449
Leu His His Asp Ile Phe Phe Phe Leu Ile Leu Ile Leu Val Phe Val
            105                 110                 115

TCA CGG ATG TTG GTT CGC GCT TTA TGG CAT TTC AAC GAG CAA ACT AAT         497
Ser Arg Met Leu Val Arg Ala Leu Trp His Phe Asn Glu Gln Thr Asn
        120                 125                 130

CCA ATC CCA CAA AGG ATT GTT CAT GGA ACT ACT ATG GAA ATT ATT CGG         545
Pro Ile Pro Gln Arg Ile Val His Gly Thr Thr Met Glu Ile Ile Arg
    135                 140                 145
```

```
ACC ATA TTT CCA AGT GTC ATT CTT TTG TTC ATT GCT ATA CCA TCG TTT      593
Thr Ile Phe Pro Ser Val Ile Leu Leu Phe Ile Ala Ile Pro Ser Phe
150                 155                 160                 165

GCT CTG TTA TAC TCA ATG GAC GGG GTA TTA GTA GAT CCA GCC ATT ACT      641
Ala Leu Leu Tyr Ser Met Asp Gly Val Leu Val Asp Pro Ala Ile Thr
                170                 175                 180

ATC AAA GCT ATT GGA CAT CAA TGG TAT CGG ACT TAT GAG TAT TCG GAC      689
Ile Lys Ala Ile Gly His Gln Trp Tyr Arg Thr Tyr Glu Tyr Ser Asp
            185                 190                 195

TAT AAC AGT TCC GAT GAA CAG TCA CTC ACT TTT GAC AGT TAT ACG ATT      737
Tyr Asn Ser Ser Asp Glu Gln Ser Leu Thr Phe Asp Ser Tyr Thr Ile
        200                 205                 210

CCA GAA GAT GAT CCA GAA TTG GGT CAA TCA CGT TTA TTA GAA GTT GAC      785
Pro Glu Asp Asp Pro Glu Leu Gly Gln Ser Arg Leu Leu Glu Val Asp
    215                 220                 225

AAT AGA GTG GTT GTA CCA GCC AAA ACT CAT CTA CGT ATG ATT GTA ACA      833
Asn Arg Val Val Val Pro Ala Lys Thr His Leu Arg Met Ile Val Thr
230                 235                 240                 245

CCC GCT GAT GTA CCT CAT AGT TGG GCT GTA CCT TCC TCA GGT GTC AAA      881
Pro Ala Asp Val Pro His Ser Trp Ala Val Pro Ser Ser Gly Val Lys
                250                 255                 260

TGT GAT GCT GTA CCT GGT CGT TCA AAT CTT ACC TTC ATC TCG GTA CAA      929
Cys Asp Ala Val Pro Gly Arg Ser Asn Leu Thr Phe Ile Ser Val Gln
            265                 270                 275

CGA GAA GGA GTT TAC TAT GGT CAG TGC AGT GAG ATT CGT GGA ACT AAT      977
Arg Glu Gly Val Tyr Tyr Gly Gln Cys Ser Glu Ile Arg Gly Thr Asn
        280                 285                 290

CAT GCC TTT ACG CCT ATC GTC GTA GAA GCA GTG ACT TTG AAA GAT TAT     1025
His Ala Phe Thr Pro Ile Val Val Glu Ala Val Thr Leu Lys Asp Tyr
    295                 300                 305

GCG GAT TGG GTA TCC AAT CAA TTA ATC CTC CAA ACC AAC TAA             1067
Ala Asp Trp Val Ser Asn Gln Leu Ile Leu Gln Thr Asn
310                 315                 320
```

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 322 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

```
Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg
 1               5                  10                  15

Thr Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys
            20                  25                  30

Thr Ala Gln Asn Leu Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly
        35                  40                  45

Pro Gly Ala Lys Glu Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Ile
    50                  55                  60

Leu Arg Ser Leu Ser Cys Arg Phe Phe Thr Ile Ala Leu Cys Asp Ala
65                  70                  75                  80

Ala Glu Pro Trp Gln Leu Gly Ser Gln Asp Ala Ala Thr Pro Met Met
                85                  90                  95

Gln Gly Ile Ile Asp Leu His His Asp Ile Phe Phe Phe Leu Ile Leu
            100                 105                 110

Ile Leu Val Phe Val Ser Arg Met Leu Val Arg Ala Leu Trp His Phe
        115                 120                 125

Asn Glu Gln Thr Asn Pro Ile Pro Gln Arg Ile Val His Gly Thr Thr
    130                 135                 140

Met Glu Ile Ile Arg Thr Ile Phe Pro Ser Val Ile Leu Leu Phe Ile
145                 150                 155                 160

Ala Ile Pro Ser Phe Ala Leu Leu Tyr Ser Met Asp Gly Val Leu Val
                165                 170                 175

Asp Pro Ala Ile Thr Ile Lys Ala Ile Gly His Gln Trp Tyr Arg Thr
            180                 185                 190

Tyr Glu Tyr Ser Asp Tyr Asn Ser Ser Asp Glu Gln Ser Leu Thr Phe
        195                 200                 205

Asp Ser Tyr Thr Ile Pro Glu Asp Asp Pro Glu Leu Gly Gln Ser Arg
    210                 215                 220

Leu Leu Glu Val Asp Asn Arg Val Val Val Pro Ala Lys Thr His Leu
225                 230                 235                 240

Arg Met Ile Val Thr Pro Ala Asp Val Pro His Ser Trp Ala Val Pro
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Val Lys Cys Asp Ala Val Pro Gly Arg Ser Asn Leu Thr
            260                 265                 270
```

```
Phe Ile Ser Val Gln Arg Glu Gly Val Tyr Tyr Gly Gln Cys Ser Glu
        275                 280                 285

Ile Arg Gly Thr Asn His Ala Phe Thr Pro Ile Val Val Glu Ala Val
    290                 295                 300

Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Asp Trp Val Ser Asn Gln Leu Ile Leu Gln
305                 310                 315                 320

Thr Asn
```

REVENDICATIONS

1°) Plantes transgéniques, possédant dans leurs noyaux, une séquence hybride exprimable (transgène), comprenant au moins une région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux supérieurs et une séquence susceptible de transférer la protéine exprimée par ladite région codante, vers la mitochondrie, lesquelles plantes sont caractérisées en ce que :

- les régions codantes des gènes mitochondriaux non édités sont choisis parmi les gènes codant pour une protéine du complexe ATP synthase choisis parmi le fragment de gène de l'ATP9 de blé, de formule I suivante :

ATG TTA GAA GGT GCT AAA TCA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT ATT GGA AAC GTC CTC AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA TTG GCT AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC GAA GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC TCA TTC GTT TTC CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGA

ou le gène de l'ATP6, ou parmi les gènes codant pour une protéine de la chaîne respiratoire choisis parmi les gène des sous-unités 1 à 7 de la NAD déshydrogénase, le gène de l'apocytochrome b et les gènes des sous-unités I, II ou III de la cytochrome-oxydase et

- la séquence susceptible de transférer ladite protéine exprimée vers la mitochondrie est sélectionnée dans le groupe constitué par les fragments codant pour la tryptophanyl ARNt synthétase de levure, la sous-unité β de l'ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia*, et le translocateur ATP/ADP de maïs ou un fragment EcorI/KpnI de 303 paires de bases incluant les codons 1 à 62 de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase de levure,

laquelle séquence hybride est apte à modifier la fertilité mâle des plantes ayant incorporé ledit transgène, tout en ne modifiant pas les autres caractéristiques phénotypiques desdites plantes.

2°) Plantes transgéniques selon la revendication 1, caractérisées en ce que ladite séquence d'acide nucléique hybride comprend la région du gène codant pour la forme non éditée de l'ATP9 de blé, de formule suivante :

ATG TTA GAA GGT GCT AAA TCA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA
ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT ATT GGA AAC GTC CTC
AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA TTG GCT
AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC
GAA GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC
TCA TTC GTT TTC CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 1).

3°) Plantes transgéniques selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisées en ce que ladite séquence d'acide nucléique hybride comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de l'ATP6 de blé, de formule suivante :

ATG GAT AAT TTT ATC CAG AAT CTG CCT GGT GCC TAC CCG GAA
ACC CCA TTG GAT CAA TTT GCC ATT ATC CCA ATA ATT GAT CTT
CAT GTG GGC AAC TTT TAT TTA TCA TTT ACA AAT GAA GTC TTG
TAT ATG CTG CTC ACT GTC GTT TTG GTC GTT TTT CTT TTT TTT
GTT GTT ACG AAA AAG GGA GGT GGA AAG TCA GTG CCA AAT GCA
TGG CAA TCC TTG GTC GAG CTT ATT TAT GAT TTC GTG CTG AAC
CTG GTA AAC GAA CAA ATA GGT GGT CTT TCC GGA AAT GTG AAA
CAA AAG TTT TTC CCT CGC ATC TCG GTC ACT TTT ACT TTT TCG
TTA TTT CGT AAT CCC CAG GGT ATG ATA CCC TTT AGC TTC ACA
GTG ACA AGT CAT TTT CTC ATT ACT TTG GCT CTT TCA TTT TCC
ATT TTT ATA GGC ATT ACG ATC GTT GGA TTT CAA AGA CAT GGG
CTT CAT TTT TTT AGC TTC TTA TTA CCT GCG GGA GTC CCA CTG
CCG TTA GCA CCT TTC TTA GTA CTC CTT GAG CTA ATC TCT TAT
TGT TTT CGT GCA TTA AGC TTA GGA ATA CGT TTA TTT GCT AAT
ATG ATG GCC GGT CAT AGT TTA GTA AAG ATT TTA AGT GGG TTT
GCT TGG ACT ATG CTA TTT CTG AAT AAT ATT TTC TAT TTC ATA

GGA GAT CTT GGT CCC TTA TTT ATA GTT CTA GCA TTA ACC GGT
CTG GAA TTA GGT GTA GCT ATA TCA CAA GCT CAT GTT TCT ACG
ATC TCA ATT TGT ATT TAC TTG AAT GAT GCT ACA AAT CTC CAT
CAA AAT GAG TCA TTT CAT AAT TGA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 3).

4°) Plantes transgéniques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que ladite séquence d'acide nucléique hybride comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de cox II de formule suivante :

ATG ATT CTT CGT TCA TTA TCA TGT CGA TTC TTC ACA ATC GCT
CTT TGT GAT GCT GCG GAA CCA TGG CAA TTA GGA TCT CAA GAC
GCA GCA ACA CCT ATG ATG CAA GGA ATC ATT GAC TTA CAT CAC
GAT ATC TTT TTC TTC CTC ATT CTT ATT TTG GTT TTC GTA TCA
CGG ATG TTG GTT CGC GCT TTA TGG CAT TTC AAC GAG CAA ACT
AAT CCA ATC CCA CAA AGG ATT GTT CAT GGA ACT ACT ATG GAA
ATT ATT CGG ACC ATA TTT CCA AGT GTC ATT CTT TTG TTC ATT
GCT ATA CCA TCG TTT GCT CTG TTA TAC TCA ATG GAC GGG GTA
TTA GTA GAT CCA GCC ATT ACT ATC AAA GCT ATT GGA CAT CAA
TGG TAT CGG ACT TAT GAG TAT TCG GAC TAT AAC AGT TCC GAT
GAA CAG TCA CTC ACT TTT GAC AGT TAT ACG ATT CCA GAA GAT
GAT CCA GAA TTG GGT CAA TCA CGT TTA TTA GAA GTT GAC AAT
AGA GTG GTT GTA CCA GCC AAA ACT CAT CTA CGT ATG ATT GTA
ACA CCC GCT GAT GTA CCT CAT AGT TGG GCT GTA CCT TCC TCA
GGT GTC AAA TGT GAT GCT GTA CCT GGT CGT TCA AAT CTT ACC
TTC ATC TCG GTA CAA CGA GAA GGA GTT TAC TAT GGT CAG TGC
AGT GAG ATT CGT GGA ACT AAT CAT GCC TTT ACG CCT ATC GTC
GTA GAA GCA GTG ACT TTG AAA GAT TAT GCG GAT TGG GTA TCC
AAT CAA TTA ATC CTC CAA ACC AAC TAA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 5).

5°) Plante transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la plante ayant incorporé ledit transgène est du tabac.

6°) Plante transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la plante ayant incorporé ledit transgène est notamment choisie parmi : le colza, le tournesol, le soja, la tomate, la pomme de terre, le melon, la carotte, le piment, l'endive, le trèfle, le lupin, le haricot, le pois, le maïs, le blé, le seigle, l'avoine, l'orge, le riz, le millet, les agrumes, le coton.

7°) Séquence d'acide nucléique hybride, comprenant au moins la région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux supérieurs, à laquelle est associée une séquence susceptible de transférer la protéine exprimée par ladite région codante, vers la mitochondrie, caractérisée en ce que :

- les régions codantes des gènes mitochondriaux non édités sont choisis parmi les gènes codant pour une protéine du complexe ATP synthase choisis parmi le fragment de gène de l'ATP9 de blé ,de formule I suivante :

ATG TTA GAA GGT GCT AAA TCA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT ATT GGA AAC GTC CTC AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA TTG GCT AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC GAA GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC TCA TTC GTT TTC CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGA

ou le gène de l'ATP6, ou parmi les gènes codant pour une protéine de la chaîne respiratoire, choisis parmi les gènes des sous-unités 1 à 7 de la NAD déshydrogénase, de l'apocytochrome b et des sous-unités I, II ou III de la cytochrome-oxydase, et

- la séquence nucléique susceptible de transférer ladite protéine exprimée vers la mitochondrie est sélectionnée dans le groupe constitué par des fragments

codant pour la tryptophanyl ARNt synthétase de levure, la sous-unité β de l'ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia*, le translocateur ATP/ADP de maïs et un fragment EcorI/KpnI de 303 paires de bases incluant les codons 1 à 62 de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase de levure,
laquelle séquence hybride est apte à modifier la fertilité mâle des plantes l'ayant incorporée.

8°) Séquence d'acide nucléique hybride selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend la région du gène codant pour la forme non éditée de l'ATP9 de blé, de formule suivante :

ATG TTA GAA GGT GCT AAA TCA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA
ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT ATT GGA AAC GTC CTC
AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA TTG GCT
AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC
GAA GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC
TCA TTC GTT TTC CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 1).

9°) Séquence d'acide nucléique hybride selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de l'ATP6 de blé, de formule suivante :

ATG GAT AAT TTT ATC CAG AAT CTG CCT GGT GCC TAC CCG GAA
ACC CCA TTG GAT CAA TTT GCC ATT ATC CCA ATA ATT GAT CTT
CAT GTG GGC AAC TTT TAT TTA TCA TTT ACA AAT GAA GTC TTG
TAT ATG CTG CTC ACT GTC GTT TTG GTC GTT TTT CTT TTT TTT
GTT GTT ACG AAA AAG GGA GGT GGA AAG TCA GTG CCA AAT GCA
TGG CAA TCC TTG GTC GAG CTT ATT TAT GAT TTC GTG CTG AAC
CTG GTA AAC GAA CAA ATA GGT GGT CTT TCC GGA AAT GTG AAA
CAA AAG TTT TTC CCT CGC ATC TCG GTC ACT TTT ACT TTT TCG
TTA TTT CGT AAT CCC CAG GGT ATG ATA CCC TTT AGC TTC ACA
GTG ACA AGT CAT TTT CTC ATT ACT TTG GCT CTT TCA TTT TCC
ATT TTT ATA GGC ATT ACG ATC GTT GGA TTT CAA AGA CAT GGG

CTT CAT TTT TTT AGC TTC TTA TTA CCT GCG GGA GTC CCA CTG
CCG TTA GCA CCT TTC TTA GTA CTC CTT GAG CTA ATC TCT TAT
TGT TTT CGT GCA TTA AGC TTA GGA ATA CGT TTA TTT GCT AAT
ATG ATG GCC GGT CAT AGT TTA GTA AAG ATT TTA AGT GGG TTT
GCT TGG ACT ATG CTA TTT CTG AAT AAT ATT TTC TAT TTC ATA
GGA GAT CTT GGT CCC TTA TTT ATA GTT CTA GCA TTA ACC GGT
CTG GAA TTA GGT GTA GCT ATA TCA CAA GCT CAT GTT TCT ACG
ATC TCA ATT TGT ATT TAC TTG AAT GAT GCT ACA AAT CTC CAT
CAA AAT GAG TCA TTT CAT AAT TGA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 3).

10°) Séquence d'acide nucléique hybride selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend le fragment de région codant pour la forme non éditée de cox II de formule suivante :

ATG ATT CTT CGT TCA TTA TCA TGT CGA TTC TTC ACA ATC GCT
CTT TGT GAT GCT GCG GAA CCA TGG CAA TTA GGA TCT CAA GAC
GCA GCA ACA CCT ATG ATG CAA GGA ATC ATT GAC TTA CAT CAC
GAT ATC TTT TTC TTC CTC ATT CTT ATT TTG GTT TTC GTA TCA
CGG ATG TTG GTT CGC GCT TTA TGG CAT TTC AAC GAG CAA ACT
AAT CCA ATC CCA CAA AGG ATT GTT CAT GGA ACT ACT ATG GAA
ATT ATT CGG ACC ATA TTT CCA AGT GTC ATT CTT TTG TTC ATT
GCT ATA CCA TCG TTT GCT CTG TTA TAC TCA ATG GAC GGG GTA
TTA GTA GAT CCA GCC ATT ACT ATC AAA GCT ATT GGA CAT CAA
TGG TAT CGG ACT TAT GAG TAT TCG GAC TAT AAC AGT TCC GAT
GAA CAG TCA CTC ACT TTT GAC AGT TAT ACG ATT CCA GAA GAT
GAT CCA GAA TTG GGT CAA TCA CGT TTA TTA GAA GTT GAC AAT
AGA GTG GTT GTA CCA GCC AAA ACT CAT CTA CGT ATG ATT GTA
ACA CCC GCT GAT GTA CCT CAT AGT TGG GCT GTA CCT TCC TCA
GGT GTC AAA TGT GAT GCT GTA CCT GGT CGT TCA AAT CTT ACC
TTC ATC TCG GTA CAA CGA GAA GGA GTT TAC TAT GGT CAG TGC
AGT GAG ATT CGT GGA ACT AAT CAT GCC TTT ACG CCT ATC GTC
GTA GAA GCA GTG ACT TTG AAA GAT TAT GCG GAT TGG GTA TCC
AAT CAA TTA ATC CTC CAA ACC AAC TAA,

à laquelle est associée en tant que séquence de transfert, les codons 1 à 62 de la pré-séquence de la sous-unité IV de la cytochrome-oxydase (cox IV) de levure (SEQ. ID n° 5).

11°) Plasmide, caractérisé en ce qu'il inclut une séquence d'acide nucléique hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, associée à un promoteur choisi parmi les promoteurs s'exprimant constitutivement et les promoteurs s'exprimant au niveau des anthères et à un terminateur convenable.

12°) Plasmide selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite séquence est sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur du gène VI du CaMV.

13°) Plasmide selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un gène marqueur.

14°) Procédé de production de plantes transgéniques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend, pour la transformation du végétal supérieur sélectionné, l'introduction d'au moins une copie de la séquence nucléique hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, dans une plante réceptrice, à l'aide d'un plasmide contenant ladite séquence, selon l'une quelconque des revendications 11 à 13.

15°) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ladite transformation est obtenue par l'une quelconque des méthodes suivantes : transformation de protoplastes, agrotransformation, microinjection, biolistique.

16°) Procédé d'inhibition de la production de pollen, chez les végétaux supérieurs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) insertion d'une séquence d'acide nucléique hybride, selon l'une quelconque de revendications 7 à 10, chez les végétaux sélectionnés, par tout moyen appro-

prié ;

(b) régénération et culture des végétaux transgéniques obtenus en (a) ; et

(c) mesure de la production et de la viabilité du pollen (test de germination, notamment).

17°) Procédé de restauration de plantes mâle-fertiles, à partir de plantes transgéniques mâle-stérile, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(1) transformation du végétal supérieur sélectionné par l'introduction d'au moins une copie de la séquence nucléique hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, dans une plante réceptrice, à l'aide d'un plasmide contenant ladite séquence, pour l'obtention de plantes transgéniques mâle-stériles (PTMS) ;

(2) transformation du même végétal supérieur qu'en (1), par l'introduction d'au moins une copie d'une séquence nucléique hybride anti-sens, incluant au moins la même région codante de gène mitochondrial non édité de végétaux que celle incluse dans lesdites plantes transgéniques mâle-stérile obtenues en (1), dans une plante réceptrice, à l'aide d'un plasmide contenant ladite séquence, pour l'obtention de plantes transgéniques mâle-fertiles (PTMF) ;

(3) croisement des plantes transgéniques mâle-stériles obtenues en (1) et des plantes mâle-fertiles obtenues en (2), pour l'obtention d'hybrides.

18°) Plantes transgéniques, caractérisées en ce qu'elles comprennent dans leurs noyaux une séquence d'acide nucléique hybride dite anti-sens, c'est-à-dire incluant au moins la même région codante de gène mitochondrial non édité de végétaux que celle incluse dans les plantes transgéniques mâle-stérile selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans le sens inverse, lesquelles plantes transgéniques sont aptes à restaurer les plantes transgéniques selon l'une quelconque des

revendications 1 à 6.

19°) Plasmide, caractérisé en ce qu'il inclut une région codante d'un gène mitochondrial non édité de végétaux anti-sens, associée à un promoteur choisi parmi les promoteurs s'exprimant constitutivement et les promoteurs s'exprimant au niveau des anthères et à un terminateur convenable.

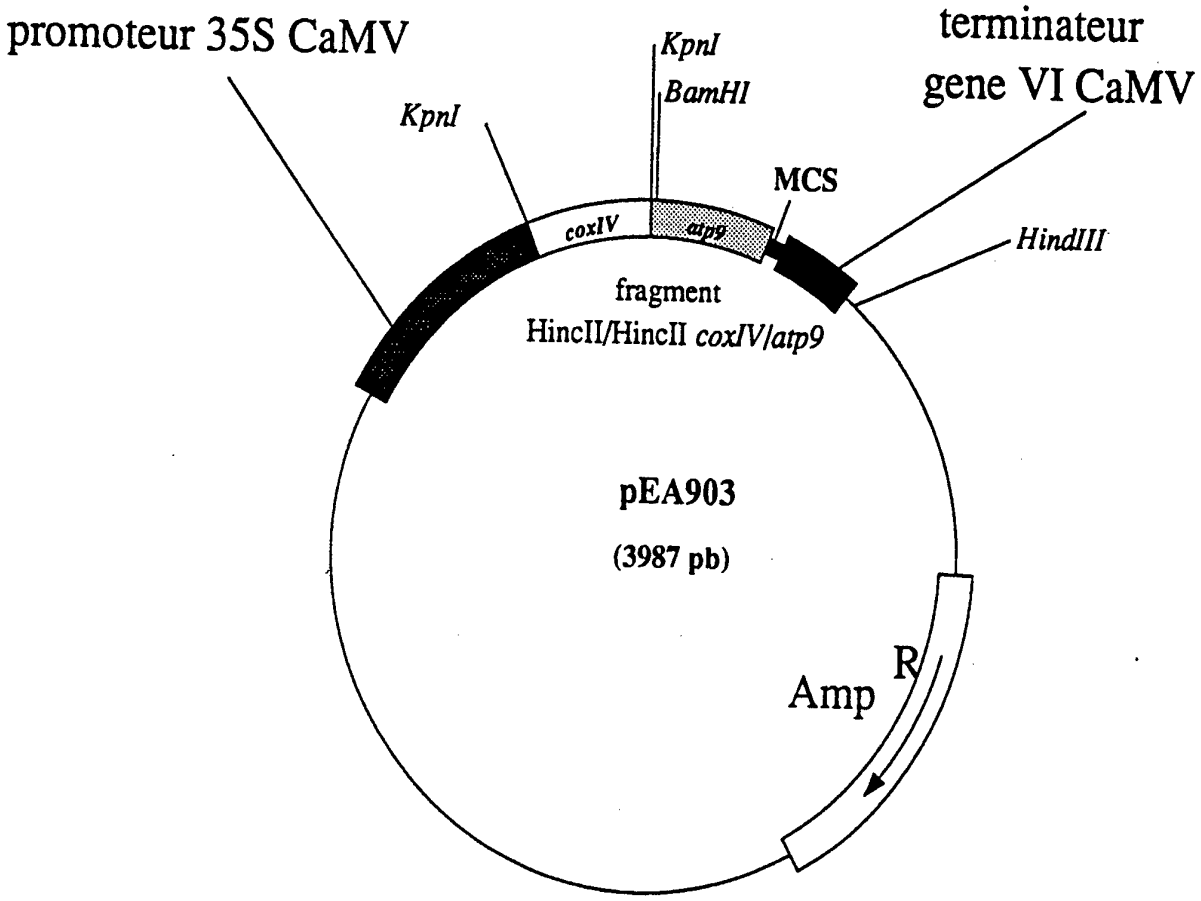

promoteur 35S CaMV
KpnI
KpnI
BamHI
terminateur
gene VI CaMV
MCS
coxIV
atp9
HindIII
fragment
HincII/HincII coxIV/atp9
pEA903
(3987 pb)
Amp R

FIGURE 1

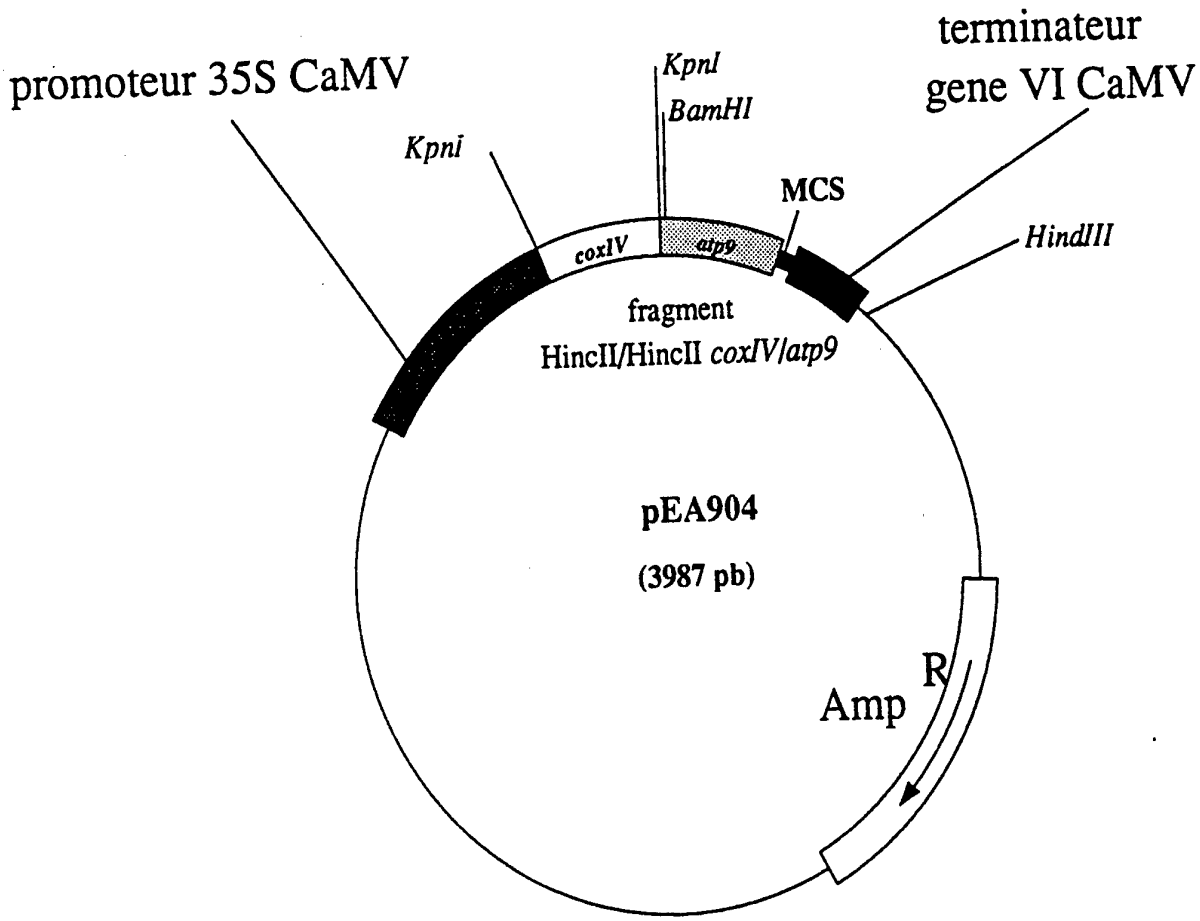

promoteur 35S CaMV
KpnI
BamHI
Kpni
terminateur
gene VI CaMV
MCS
HindIII
coxIV
atp9
fragment
HincII/HincII coxIV/atp9
pEA904
(3987 pb)
Amp R

FIGURE 2

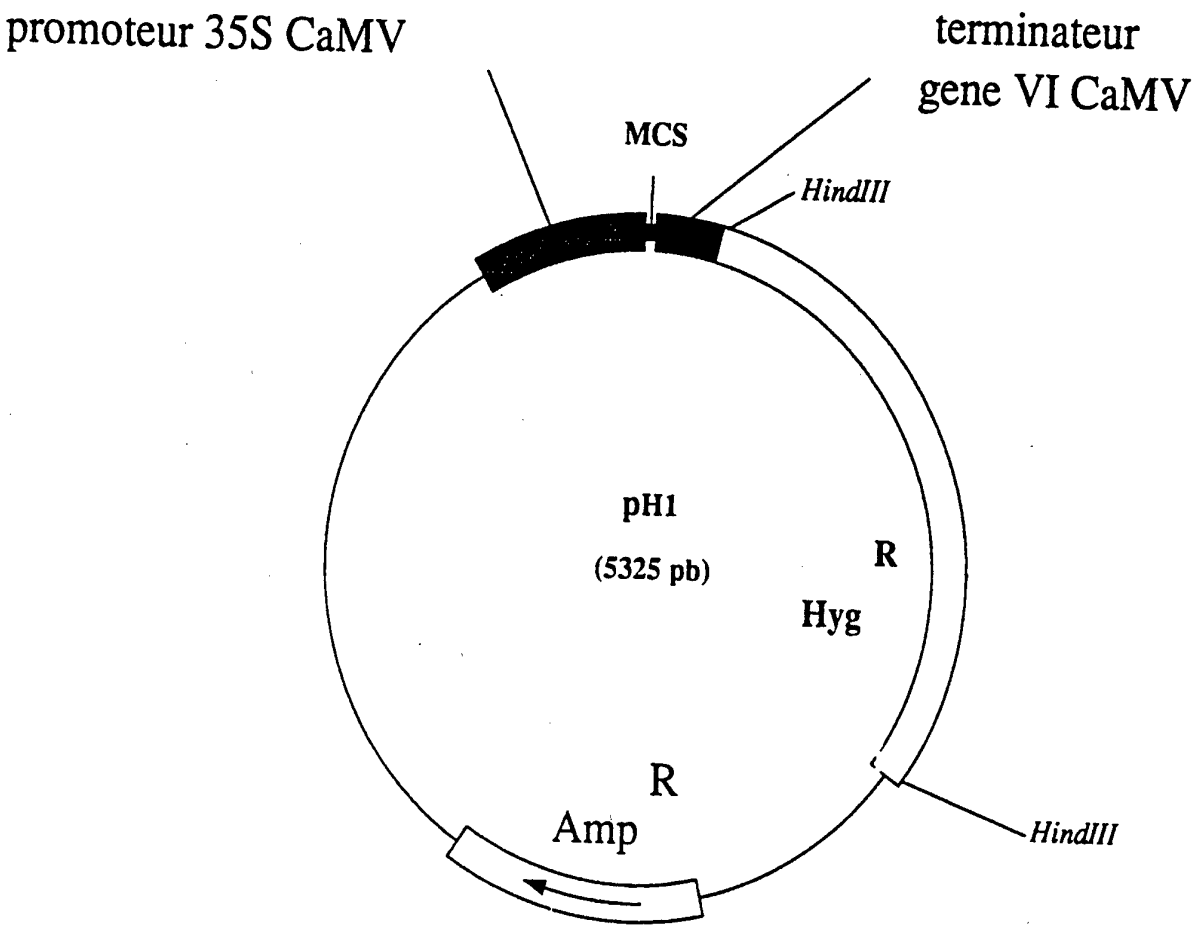

promoteur 35S CaMV
terminateur
gene VI CaMV
MCS
HindIII
pH1
(5325 pb)
R
Hyg
R
Amp
HindIII

FIGURE 3

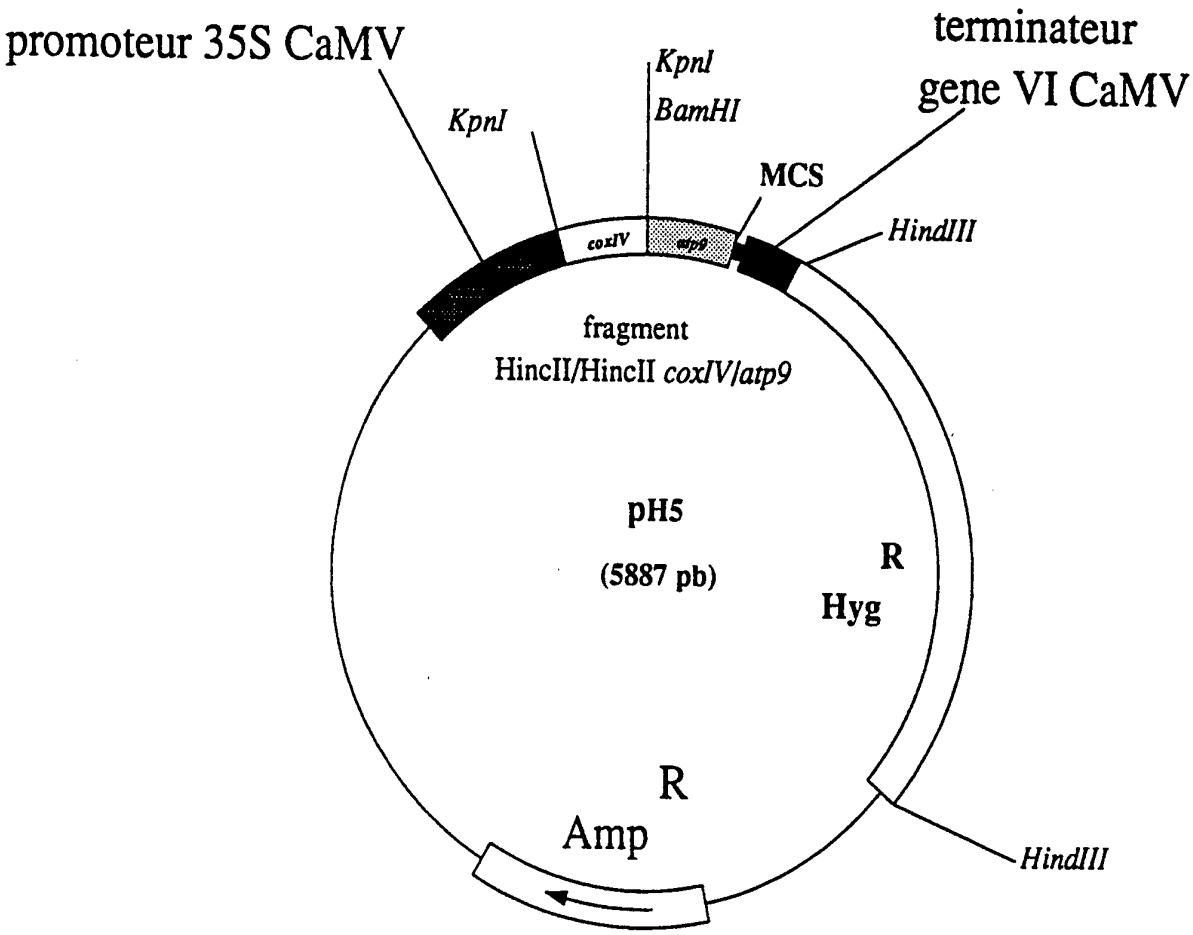

promoteur 35S CaMV
KpnI
KpnI
BamHI
MCS
terminateur
gene VI CaMV
HindIII
coxIV
atp9
fragment
HincII/HincII coxIV/atp9
pH5
(5887 pb)
R
Hyg
R
Amp
HindIII

FIGURE 4

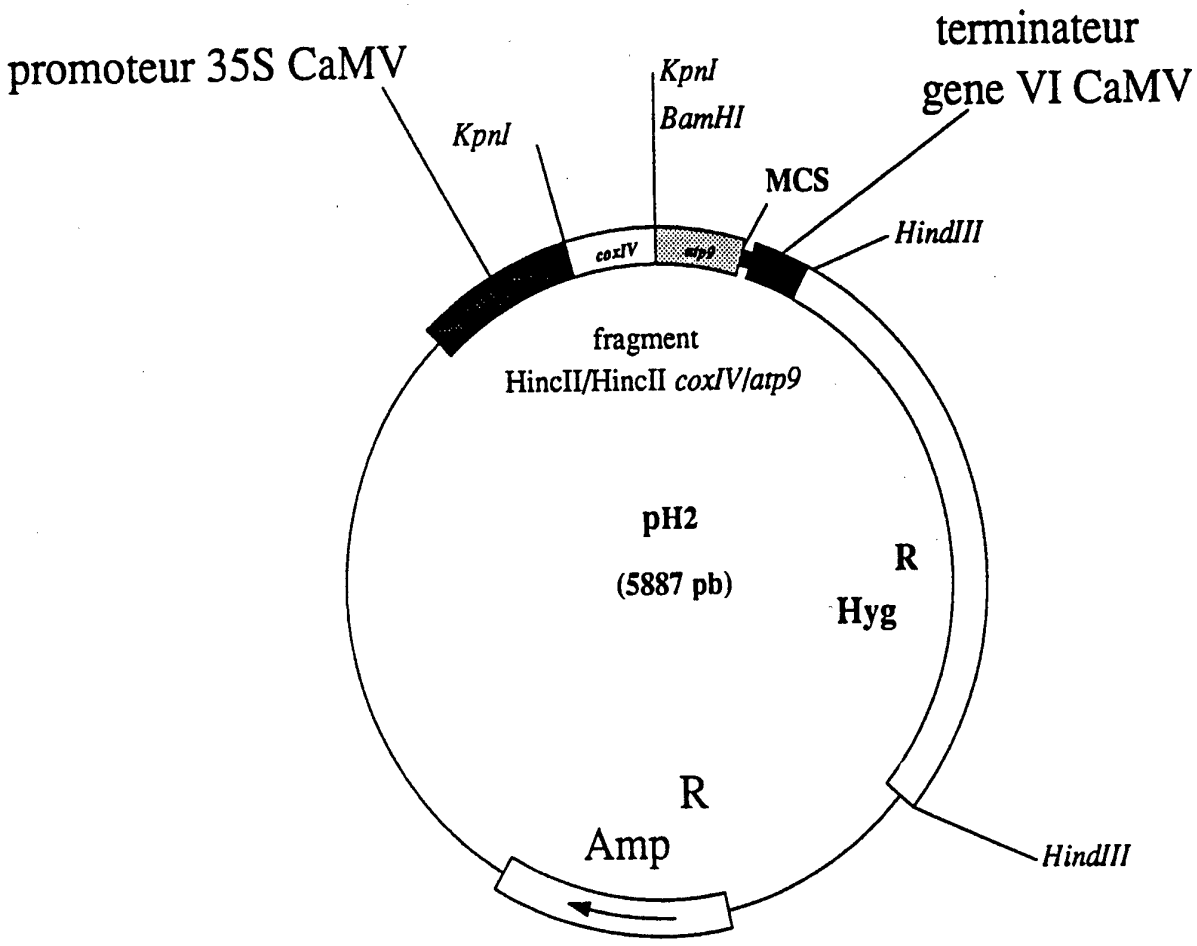

promoteur 35S CaMV
KpnI
KpnI
BamHI
MCS
terminateur
gene VI CaMV
HindIII
coxIV
atp9
fragment
HincII/HincII coxIV/atp9
pH2
(5887 pb)
R
Hyg
R
Amp
HindIII

FIGURE 5

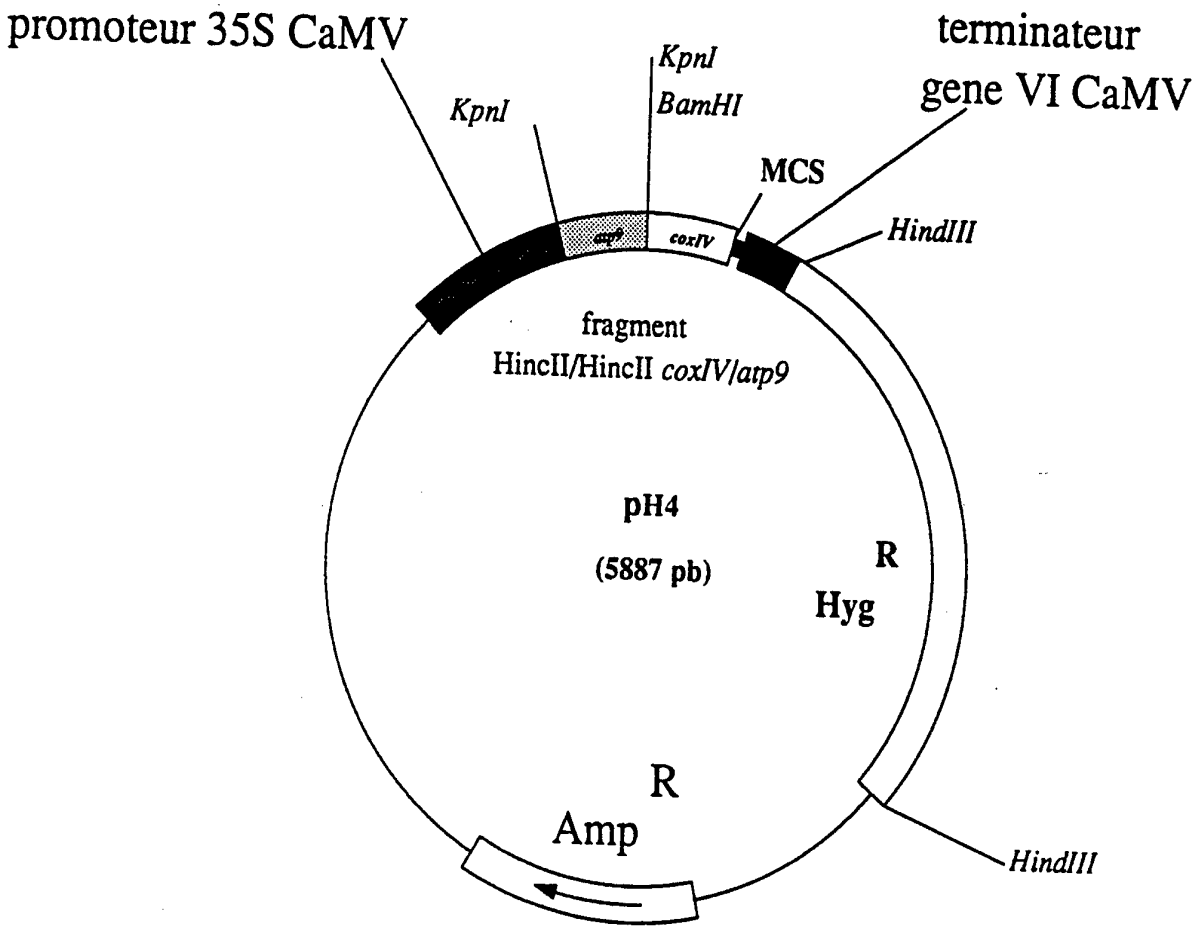
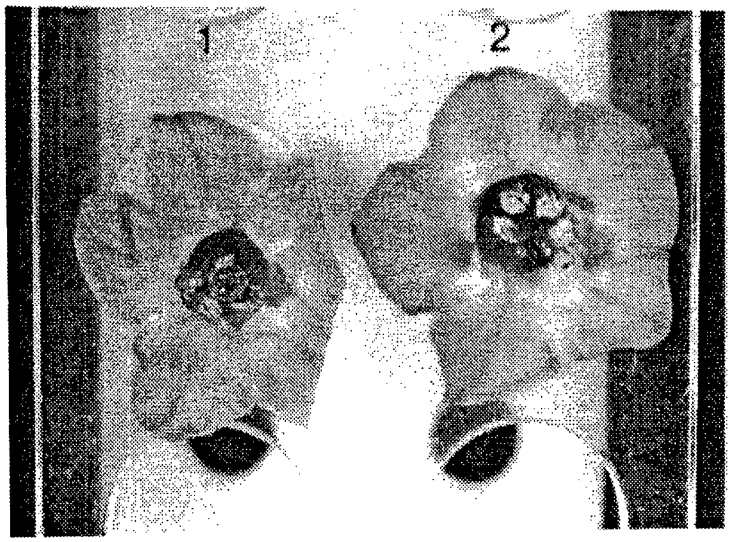
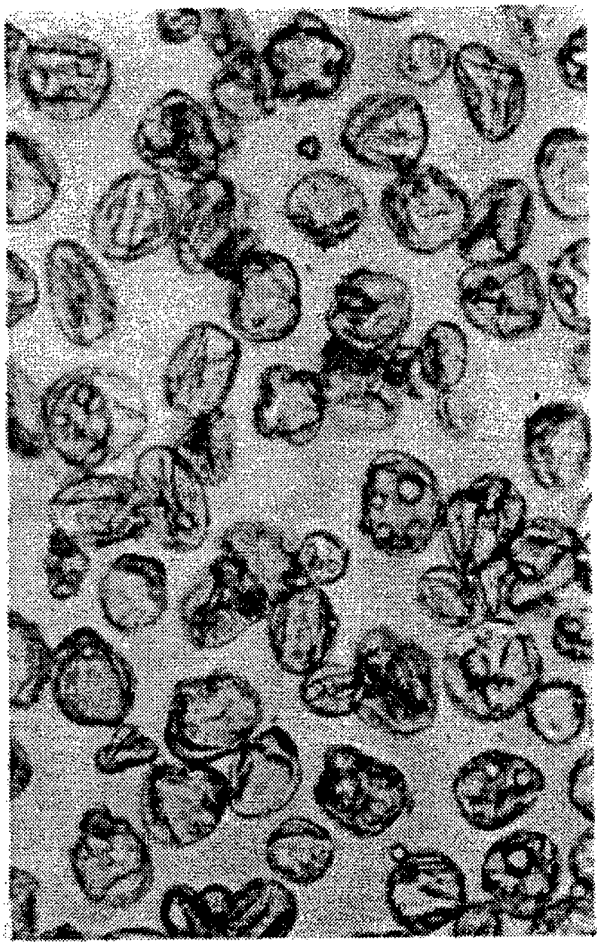

promoteur 35S CaMV
terminateur
gene VI CaMV
KpnI
KpnI
BamHI
MCS
HindIII
coxIV
fragment
HincII/HincII coxIV/atp9
pH4
(5887 pb)
R
Hyg
R
Amp
HindIII

FIGURE 6



B



C

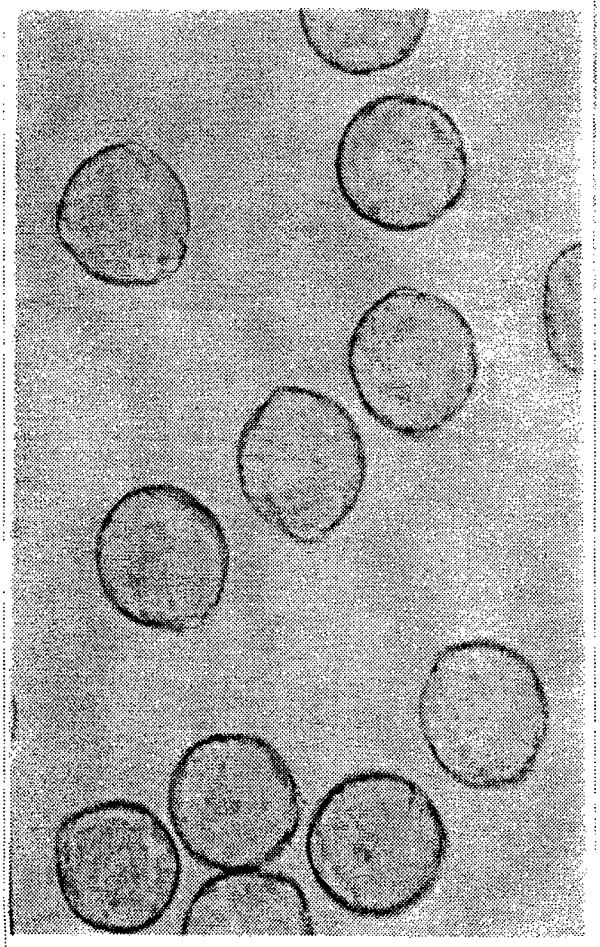
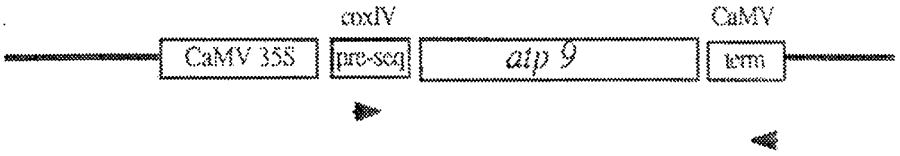
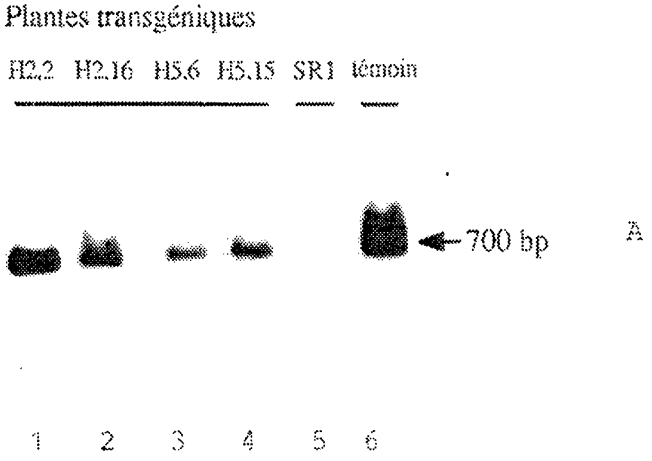


FIGURE 7



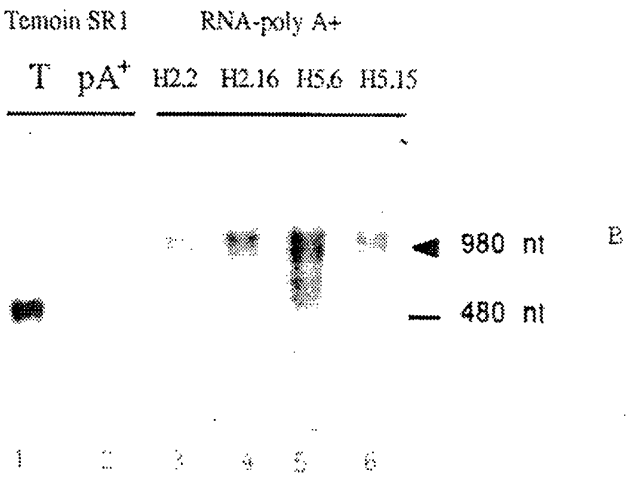
C

Analyse de transgènes par PCR



A

Analyse des transcrits poly A+ de plantes transgéniques par hybridation de Northern



B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 8

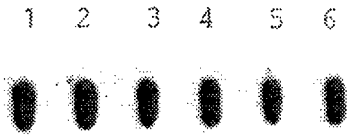


FIGURE 9

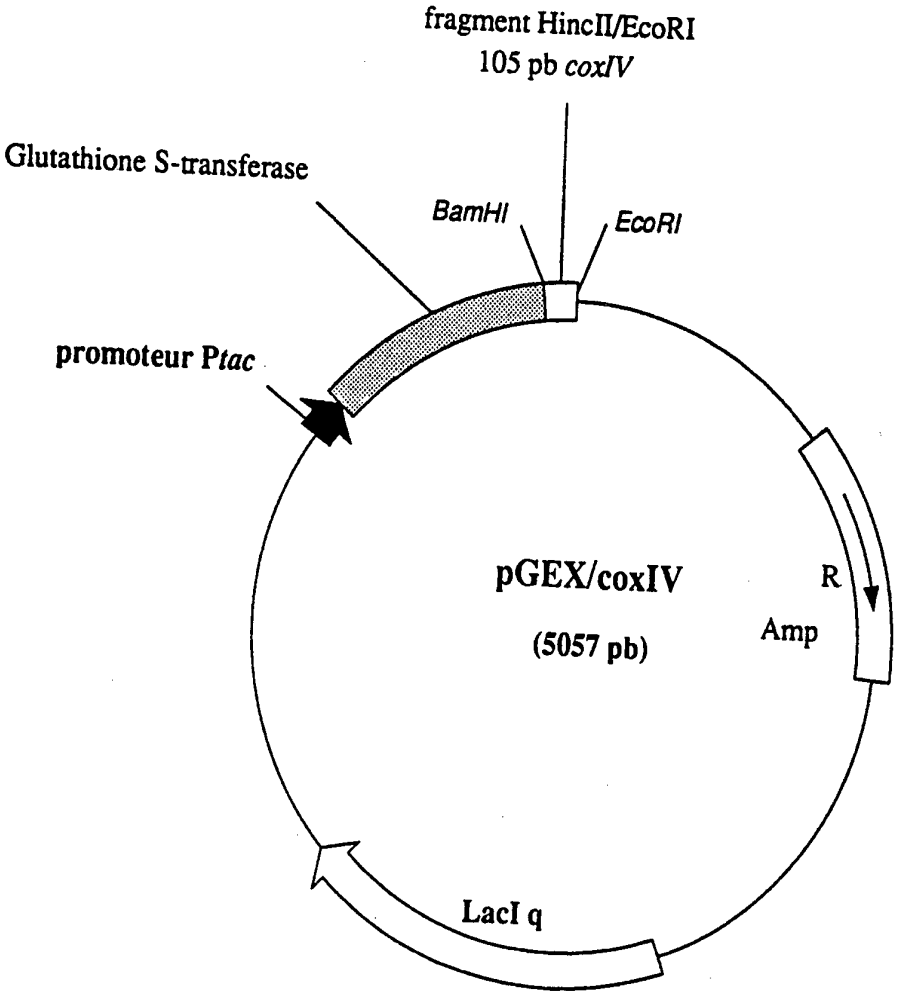
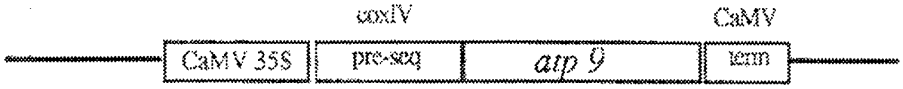
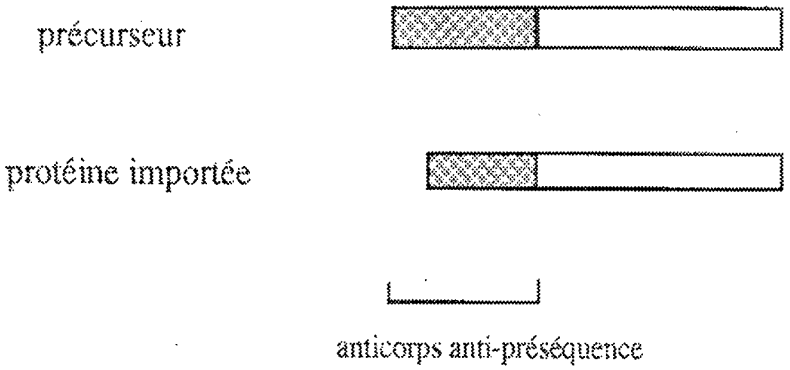

fragment HincII/EcoRI
105 pb coxIV
Glutathione S-transferase
BamHI
EcoRI
promoteur Ptac
pGEX/coxIV
(5057 pb)
R
Amp
LacI q

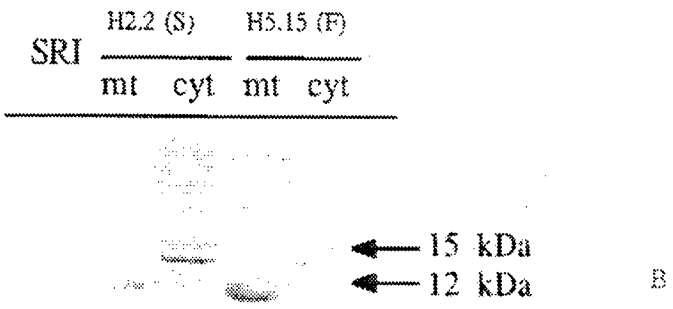
FIGURE 10

Localisation intracellulaire de proteines transgéniques par immunoblot





A



B

FIGURE 11

```
 1                                                  GTCAACGTATTCTTCTCCCTGAAGAAACAGT
32 ATACTAACAATACTCACCCATTTCGATTTTGATGTTGCCATACAAATAGATAACAAGCACAAGCACA

   Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg Thr 17
99 ATG CTT TCA CTA CGT CAA TCT ATA AGA TTT TTC AAG CCA GCC ACA AGA ACT

   Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys Thr Ala 34
151 TTG TGT AGC TCT AGA TAT CTG CTT CAG CAA AAA CCC GTG GTG AAA ACT GCC

   Gln Asn Leu Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly Pro Gly Ala 51
202 CAA AAC TTA GCA GAA GTT AAT GGT CCA GAA ACT TTG ATT GGT CCT GGT GCT

   Lys Glu Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Leu Glu Gly Ala Lys 68
253 AAA GAG GGT ACC CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAG ATG TTA GAA GGT GCT AAA

   Ser Ile Gly Ala Gly Ala Ala Thr Ile Ala Leu Ala Gly Ala Ala Val Gly 85
304 TCA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT

   Ile Gly Asn Val Leu Ser Ser Leu Ile His Ser Val Ala Arg Asn Pro Ser 102
355 ATT GGA AAC GTC CTC AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA

   Leu Ala Lys Gln Ser Phe Gly Tyr Ala Ile Leu Gly Phe Ala Leu Thr Glu 119
406 TTG GCT AAA CAA TCA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC GAA

   Ala Ile Ala Leu Phe Ala Pro Met Met Ala Phe Leu Ile Ser Phe Val Phe 136
457 GCT ATT GCA TTG TTT GCC CCA ATG ATG GCC TTT CTG ATC TCA TTC GTT TTC

   Arg Ser His Lys Lys Ser Stop    142
508 CGA TCG CAT AAA AAG TCA TGA GATCAAAAAAGAAATGTGTGAATGTAGTTACAGATGTCGAC
```

Préséquence COX IV-ATP9 (non-édité)

FIGURE 12

```
1                                                GTCAACGTATTCTTCTCCCTGAAGAAACAGT

32  ATACTAACAATACTCACCCATTTCGATTTTGATGTTGCCATACAAATAGATAACAAGCACAAGCACA

    Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg Thr 17
99  ATG CTT TCA CTA CGT CAA TCT ATA AGA TTT TTC AAG CCA GCC ACA AGA ACT

    Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu Leu Gln Gln Lys Pro Val Val Lys Thr Ala 34
151 TTG TGT AGC TCT AGA TAT CTG CTT CAG CAA AAA CCC GTG GTG AAA ACT GCC

    Gln Asn Leu Ala Glu Val Asn Gly Pro Glu Thr Leu Ile Gly Pro Gly Ala 51
202 CAA AAC TTA GCA GAA GTT AAT GGT CCA GAA ACT TTG ATT GGT CCT GGT GCT

    Lys Glu Gly Thr Arg Gly Ser Ser Arg Val Glu Met Leu Glu Gly Ala Lys 68
253 AAA GAG GGT ACC CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAG ATG TTA GAA GGT GCT AAA

    Leu Ile Gly Ala Gly Ala Ala Thr Ile Ala Leu Ala Gly Ala Ala Val Gly 85
304 TTA ATA GGT GCC GGA GCT GCT ACA ATT GCT TTA GCC GGA GCT GCT GTC GGT

    Ile Gly Asn Val Phe Ser Ser Leu Ile His Ser Val Ala Arg Asn Pro Ser 102
355 ATT GGA AAC GTT TTC AGT TCT TTG ATT CAT TCC GTG GCG CGA AAT CCA TCA

    Leu Ala Lys Gln Leu Phe Gly Tyr Ala Ile Leu Gly Phe Ala Leu Thr Glu 119
406 TTG GCT AAA CAA TTA TTT GGT TAT GCC ATT TTG GGC TTT GCT CTC ACC GAA

    Ala Ile Ala Leu Phe Ala Leu Met Met Ala Phe Leu Ile Leu Phe Val Phe 136
457 GCT ATT GCA TTG TTT GCC CTA ATG ATG GCC TTT TTG ATC TTA TTC GTT TTC Stop

508 TGA TCGCATAAAAAGTCATGAGATCAAAAAAGAAATGTGTGAATGTAGTTACAGATGTCGAC
```

Préséquence COX IV-ATP9 (édité)

FIGURE 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/FR 94/00162

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12N15/82 C12N15/55 C12N15/11 C12N15/53 A01H5/00
A01H1/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C12N A01H

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
O,X	COLLOQUES DE L'INRA NO.59. PLANT SCIENCES TODAY: FIRST GENERAL COLLOQUIUM ON PLANT SCIENCES; MEETING, LA COLLE SUR LOUP, FRANCE, OCTOBER 16-18, 1991 page 308 MOURAS, A., ET AL. 'Transgenic male-sterile plant production by transfection into nucleus of mutated mitochondrial gene'	1,2,5-8, 11-16
Y	see the whole document --- -/--	17-19

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

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 May 1994	24. 06. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Maddox, A

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

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 90 , March 1993 , WASHINGTON US pages 2370 - 2374 HERNOULD, M., ET AL. 'Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited atp9 mitochondrial gene from wheat' see the whole document	1,2,5-8, 11-16
Y	EP,A,0 412 911 (PGS) 13 February 1991 see page 6, line 18 - line 32; claim 14	17
Y	WO,A,90 08828 (PALADIN HYBRIDS) 9 August 1990 see page 39, line 25 - page 40, line 14	18,19
Y	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. vol. 14E , 1990 page 357 SCHMULLING, T., ET AL. 'Restorage of genetically engineered male sterility by antisense mRNA' see abstract R538	18,19
Y	EP,A,0 329 308 (PALADIN HYBRIDS) 23 August 1989 see example 10	18,19
A	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. vol. 13D , 1989 page 299 CONNETT, M.B., ET AL. 'Plant transformation as a test of the relationship between cytoplasmic male sterility, respiratory phenotype, and the PCF gene' see abstract	4

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/FR 94/00162

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0412911	13-02-91	AU-B-	625509	16-07-92
		AU-A-	6068890	11-03-91
		WO-A-	9102069	21-02-91
		JP-T-	3503004	11-07-91
WO-A-9008828	09-08-90	AU-A-	5037290	24-08-90
		EP-A-	0456706	21-11-91
		JP-T-	4504355	06-08-92
EP-A-0329308	23-08-89	AU-A-	2963289	03-08-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No
PCT/FR 94/00162

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12N15/82 C12N15/55 C12N15/11 C12N15/53 A01H5/00
A01H1/02

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C12N A01H

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
O,X	COLLOQUES DE L'INRA NO.59. PLANT SCIENCES TODAY: FIRST GENERAL COLLOQUIUM ON PLANT SCIENCES; MEETING, LA COLLE SUR LOUP, FRANCE, OCTOBER 16-18, 1991 page 308 MOURAS, A., ET AL. 'Transgenic male-sterile plant production by transfection into nucleus of mutated mitochondrial gene'	1,2,5-8, 11-16
Y	voir le document en entier	17-19

	-/--	

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

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

* Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
19 Mai 1994	24. 06. 94

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

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 90 , Mars 1993 , WASHINGTON US pages 2370 - 2374 HERNOULD, M., ET AL. 'Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited atp9 mitochondrial gene from wheat' voir le document en entier	1,2,5-8, 11-16
Y	EP,A,0 412 911 (PGS) 13 Février 1991 voir page 6, ligne 18 - ligne 32; revendication 14	17
Y	WO,A,90 08828 (PALADIN HYBRIDS) 9 Août 1990 voir page 39, ligne 25 - page 40, ligne 14	18,19
Y	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. vol. 14E , 1990 page 357 SCHMÜLLING, T., ET AL. 'Restorage of genetically engineered male sterility by antisense mRNA' see abstract R538	18,19
Y	EP,A,0 329 308 (PALADIN HYBRIDS) 23 Août 1989 voir exemple 10	18,19
A	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. vol. 13D , 1989 page 299 CONNETT, M.B., ET AL. 'Plant transformation as a test of the relationship between cytoplasmic male sterility, respiratory phenotype, and the PCF gene' voir abrégé	4

2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 94/00162

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0412911	13-02-91	AU-B-	625509	16-07-92
		AU-A-	6068890	11-03-91
		WO-A-	9102069	21-02-91
		JP-T-	3503004	11-07-91
WO-A-9008828	09-08-90	AU-A-	5037290	24-08-90
		EP-A-	0456706	21-11-91
		JP-T-	4504355	06-08-92
EP-A-0329308	23-08-89	AU-A-	2963289	03-08-89