

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 906 818**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **06 08693**

⑤① Int Cl⁸ : C 12 N 15/09 (2006.01), C 12 P 21/00, A 01 H 5/00,
C 12 N 15/82

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 04.10.06.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 11.04.08 Bulletin 08/15.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *PLANT ADVANCED TECHNOLO-
GIES PAT SAS Société par actions simplifiée* — FR.

⑦② Inventeur(s) : BITEAU FLORE, BOURGAUD FRE-
DERIC et GONTIER ERIC.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ PROCÉDE DE PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES A L'AIDE DE PLANTES CARNIVORES.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé de pro-
duction d'au moins une protéine, comprenant la culture
d'une plante carnivore ou insectivore, caractérisé en ce que
ladite plante a été génétiquement modifiée pour exprimer la
ou les dite(s) protéine(s).

FR 2 906 818 - A1



5 La présente invention concerne un procédé de production d'au moins une protéine, comprenant la culture d'une plante carnivore ou insectivore, caractérisée en ce que ladite plante a été génétiquement modifiée pour exprimer la ou les dite(s) protéine(s).

10 Les protéines représentent aujourd'hui une catégorie de molécules très utilisée, aussi bien dans le champ thérapeutique que diagnostique ou comme réactif de laboratoire notamment. De nombreux efforts sont donc réalisés pour améliorer les procédés de production de protéines recombinantes existant ou développer de nouveaux systèmes de production plus performants.

15 Les systèmes usuels de production de protéines recombinantes impliquent différents types d'organismes vivants pouvant être modifiés génétiquement afin de produire des protéines dites "recombinantes" : les micro-organismes (bactéries, levures, champignons), les cellules de mammifères en culture, les cellules d'insectes en culture, les animaux transgéniques, ou les plantes transgéniques.

20 Le système des plantes transgéniques présente des avantages. Notamment, il conduit à une grande sécurité biologique, puisque aucun agent pathogène connu ne peut infecter à la fois des plantes et des animaux. De plus, la production peut se faire à grande échelle par la culture de ces plantes transgéniques. Elle peut aussi se faire à des coûts plus faibles que dans d'autres systèmes industriels de production. L'utilisation de
25 plantes transgéniques permet également la production de protéines ayant subi un ou plusieurs processus de maturation post-traductionnelle. Enfin, le niveau actuel des biotechnologies végétales permet de cibler de façon spécifique les tissus dans lesquels s'accumulera la protéine d'intérêt, tels que les feuilles ou les graines, facilement accessibles.

30 Ainsi, l'expression de la protéine recombinante est généralement dirigée vers les feuilles et les graines. Le feuillage offre beaucoup de possibilités de synthèse (1). Ainsi, le tabac génétiquement transformé est utilisé par exemple pour la production

d'hémoglobine humaine. Cependant, le feuillage contient parfois des substances gênantes, difficiles à éliminer (polyphénols présents dans les feuilles de tabac). De plus, les protéines recombinantes doivent être extraites de ces feuilles rapidement car celles-ci sont rapidement périssables.

5 Les graines sont aussi parfois utilisées comme tissu de stockage, du fait de la stabilité plus grande du milieu d'accumulation des protéines, à faible teneur en eau. Ainsi, le maïs transgénique est utilisé par exemple pour la production de lipase gastrique. Les limitations de la graine proviennent principalement d'une capacité plus réduite de synthèse, et de l'obligation d'attendre la floraison avec un risque accru de
10 dispersion du transgène par pollinisation croisée.

Dans les deux cas, le principal inconvénient de ces systèmes de production de protéines recombinantes dans le feuillage ou les graines de plantes transgéniques est lié à la nécessité d'étapes lourdes d'extraction-purification de la protéine recombinante à partir du tissu végétal, qu'il s'agisse de feuilles ou de graines. En effet, la protéine
15 recombinante est insérée dans la matrice du tissu végétal, ce qui rend son extraction et sa purification difficile à mettre en œuvre, alors même que cette étape doit être réalisée le plus rapidement possible du fait de la protéolyse rapide qui survient dès l'homogénéisation (2). Cette dernière étape limite donc les avantages des systèmes actuels de production de protéines recombinantes par des plantes transgéniques. Il existe
20 par conséquent un besoin réel de systèmes de production qui conservent les avantages des systèmes de production actuels utilisant des plantes transgéniques tout en limitant fortement leurs inconvénients, notamment en simplifiant considérablement l'extraction-purification de la protéine recombinante.

25 Les plantes carnivores sont des végétaux capables de capturer des proies et d'en assimiler tout ou partie afin de subvenir partiellement à leurs besoins en azote. Outre leur capacité à fixer le dioxyde de carbone de l'air pour leurs besoins photosynthétiques et à absorber de l'eau et des sels minéraux par leurs racines, ces plantes, qui vivent souvent dans des milieux pauvres en éléments nutritifs, ont développé au niveau de
30 leurs feuilles des pièges de forme et de fonctionnement variés pour capturer des proies leur apportant un supplément azoté. Malgré leurs formes et leurs modes de fonctionnement variés, les pièges des plantes carnivores ont en commun de contenir des

sucs comprenant des enzymes digestives permettant une digestion plus ou moins poussée des proies et leur assimilation.

Il existe donc chez les plantes carnivores un système d'expression et de transport d'enzymes digestives dans les pièges, où ces enzymes, présentes dans un liquide, plus
5 ou moins visqueux et collant, sont directement accessibles et faciles à purifier. De plus, la collecte des sucs digestifs des pièges peut être réalisée sans détruire la plante, qui peut donc continuer à produire. Chez certains genres, et sous réserve de quelques précautions, la collecte des sucs digestifs peut donc être réalisée dans des conditions stériles, y compris quand la plante est cultivée dans un environnement non stérile. Enfin,
10 l'excrétion des sucs digestifs au niveau des pièges peut être induite par un stimulus chimique, et éventuellement mécanique, dû à la présence d'un insecte piégé. Le stimulus chimique peut être remplacé par l'application d'une solution contenant de l'azote organique, du phosphate, du chlorure de sodium, de la gélatine, de l'acide salicylique, ou de la chitine (3; 4), permettant ainsi potentiellement d'augmenter
15 facilement la production des protéines purifiées à partir des sucs digestifs.

De ce fait, différents documents décrivent la purification de protéines de plantes carnivores. La demande EP0019808 (5) décrit l'utilisation de sucs digestifs de plantes carnivores dans le traitement du cancer. De même, la demande WO9942115 (6) décrit l'utilisation de sucs digestifs de plantes carnivores afin d'inhiber des protéines kinases
20 impliquées dans certaines pathologies. Et la demande de brevet WO02057408 (7) décrit l'utilisation de chitinases, protéines retrouvées à l'état naturel dans les sucs foliaires de plantes carnivores du genre *Nepenthes*, pour des utilisations pharmaceutiques (anti-fongiques) ou agronomiques (anti-maladies cryptogamiques). Dans chacun de ces documents toutefois, les protéines produites et purifiées sont des protéines natives,
25 endogènes, de la plante carnivore. Les plantes carnivores n'étant pas génétiquement modifiées, aucune protéine recombinante n'est produite. A aucun moment ces brevets n'évoquent la possibilité de produire d'autres protéines à partir de plantes carnivores que celles déjà présentes à l'état naturel chez ces végétaux.

Par ailleurs, un article de Hirsikorpi et al. décrit la transformation de *Drosera rotundifolia* par le vecteur *Agrobacterium* avec un gène de luciférase (8). Toutefois, il
30 n'est présenté à aucun moment de résultat montrant une éventuelle sortie de la protéine luciférase dans les sucs se trouvant à la surface des feuilles des plantes.

Or, seules certaines protéines sont transportées vers les sucs digestifs des plantes carnivores. Le processus d'excrétion des protéines par les plantes carnivores a fait l'objet de quelques descriptions anatomiques (9). Sans pour autant que l'on en ait la preuve formelle, il semble bien que la production de sucs foliaires soit due à une production accrue de vésicules golgiennes provenant du réticulum endoplasmique (RE),
5 comme c'est déjà le cas pour d'autres plantes (10). Pour autant, la seule présence d'une protéine à l'intérieur du RE n'apporte aucune garantie qu'elle sera excrétée par la plante.

D'une manière générale, les publications récentes décrivent parfois des résultats
10 inattendus en matière de localisation de protéines. Aucun élément ne permet donc de garantir qu'une protéine, sans aucun signal d'adressage ou même possédant un signal d'adressage vers le RE, pourra être excrétée en quantité suffisante pour être détectée dans les sucs digestifs des pièges de plantes carnivores. De ce fait, seules des protéines déjà naturellement présentes dans les sucs digestifs des pièges de plantes carnivores ont
15 été purifiées à ce jour. Aucun document ne décrit ou suggère la possibilité de générer une plante carnivore génétiquement modifiée excrétant au niveau des pièges une protéine recombinante.

De plus, les sucs digestifs sécrétés au niveau des pièges des plantes carnivores comprennent des enzymes digestives, telles que des protéases, peroxydases,
20 ribonucléases, lipases, amylases, estérases, phosphatases acide, chitinases, glycosylases. Or cette capacité naturelle à sécréter des enzymes digestives, et notamment des protéases, au niveau des pièges constitue a priori un obstacle à la production de protéines recombinantes par sécrétion au niveau des pièges du fait du risque de dégradation induit par la présence de ces protéases.

Pourtant, les inventeurs ont trouvé de façon surprenante qu'il est possible de
25 générer des plantes carnivores génétiquement modifiées exprimant une protéine exogène recombinante, dont une quantité non négligeable est détectable au niveau des sucs digestifs dans les pièges. En outre, les tests réalisés par les inventeurs sur plusieurs protéines recombinantes distinctes montrent qu'il est possible d'isoler des protéines
30 fonctionnelles qui ne sont donc pas dégradées de façon significative par les enzymes digestives. Ainsi, les inventeurs ont montré que, contrairement aux prévisions, il est possible, en modifiant génétiquement une plante carnivore pour qu'elle exprime une

protéine exogène recombinante, de détecter en quantité suffisante cette protéine recombinante dans les sucs digestifs des plantes, et de purifier cette protéine sous une forme fonctionnelle, malgré l'existence des enzymes digestives. Les problèmes du transport de la protéine recombinante dans les pièges et de la dégradation par les enzymes digestives étant surmontés, ce système de production permet de combiner de nombreux avantages liés à la collecte de la protéine recombinante à partir des sucs digestifs des pièges :

- 10 - la plante n'est pas détruite ni même significativement amoindrie par la collecte et peut donc être conservée en culture pour d'autres collectes ultérieures ;
- les pièges sont naturellement des organes facilement accessibles, permettant ainsi une collecte aisée des sucs digestifs ;
- 15 - chez certaines plantes carnivores, notamment celles possédant des pièges à urnes ou à outres, les sucs digestifs sont produits et excrétés en une certaine quantité dans des pièges fermés au milieu extérieur, le piège n'étant ouvert au milieu extérieur qu'une fois prêt pour la digestion de proies. Même si la plante est cultivée dans un environnement non stérile, durant la période de préparation du piège, les sucs digestifs sont excrétés en conditions naturellement stériles.
- 20 Sous réserve de réaliser la collecte de sucs digestifs avant l'ouverture du piège et de quelques précautions, la collecte des protéines recombinantes peut donc être réalisée dans certains modes de réalisation dans des conditions stériles ;
- 25 - le fait que la protéine recombinante à purifier soit présente dans un milieu liquide extérieur à la plante, et non dans un tissu végétal solide (tel qu'une feuille ou une graine), simplifie énormément l'étape de purification de la protéine recombinante ;
- enfin, ce système peut être induit dans la mesure où l'excrétion des sucs digestifs peut être augmentée par des signaux mécaniques et/ou
- 30 chimiques mimant la présence d'une proie.

L'invention concerne donc un procédé de production d'au moins une protéine, comprenant la culture d'une plante carnivore, caractérisé en ce que ladite plante a été génétiquement modifiée pour exprimer la ou les dite(s) protéine(s).

5 Par « plante carnivore », on entend tout végétal capable de capturer et digérer des proies animales, tout type de proie du règne animal étant englobé dans cette définition, grâce à un système d'expression et de transport d'enzymes digestives dans les pièges. Le plus souvent, les proies animales sont des insectes (on parle alors plus
10 précisément de plantes insectivores), mais de petits rongeurs ou batraciens, ou encore de petits animaux aquatiques dans le cas des plantes carnivores aquatiques peuvent également être pris dans les pièges de certaines plantes carnivores. Le terme « plante carnivore » utilisé ici inclut donc tous les types de plantes carnivores possédant un système d'expression et de transport d'enzymes digestives dans les pièges, et en particulier les plantes insectivores, mais sans s'y limiter. En revanche, seules les plantes
15 carnivores possédant un système d'expression et de transport d'enzymes digestives dans les pièges sont incluses au sens de l'invention. Notamment, certains genres de végétaux chez lesquels l'absence de sécrétion d'enzymes digestive est compensée par la présence de microorganismes extérieurs à la plante sécrétant des enzymes digestives, bien que habituellement considérés comme faisant partie des plantes carnivores, ne sont pas
20 considérées comme des plantes carnivores au sens de la présente invention. Ainsi, les genres *Brochinia*, *Catopsis berteroniana*, *Ibicella lutea*, *Heliamphora*, et *Darlingtonia* ne sont pas considérés comme des plantes carnivores au sens de l'invention.

25 Comme indiqué précédemment, l'intérêt des plantes carnivores est l'existence de protéines excrétées au niveau des sucs digestifs des pièges, protéines qui sont directement accessibles, faciles à purifier puisque non insérées dans un tissu végétal, et au moins dans certains cas et pendant un certain temps, stockées sous une forme stérile par la plante.

Pour tirer profit de ces avantages, il est nécessaire que la protéine recombinante
30 exprimée par la plante soit également excrétée au niveau des pièges de la plante. Ainsi, avantageusement, dans un procédé selon l'invention, la ou les dite(s) protéine(s) est

traduite dans les cellules de plante et excrétée par le système natif d'excrétion des protéines naturelles de ladite plante.

Par plante « génétiquement modifiée », on entend une plante chez laquelle un
5 gène ou un fragment de gène a été inséré. Cela inclut donc les plantes ayant été
transformées avec un vecteur d'expression du gène ou fragment de gène d'intérêt,
permettant l'expression de ce gène ou ce fragment de gène chez cette plante. Le gène
d'intérêt, qui est inséré en totalité ou en partie chez la plante, peut être aussi bien un
gène exogène, non exprimé naturellement par la plante, qu'un gène endogène déjà
10 exprimé naturellement par la plante et dont on souhaiterait augmenter l'expression.

En particulier, dans un mode de réalisation avantageux d'un procédé selon
l'invention, la plante carnivore qui est cultivée a été génétiquement modifiée par
transformation par *Agrobacterium*, par biolistique, par électroporation, par
microinjection ou par l'utilisation de vecteurs viraux.

15 La transformation de plantes par *Agrobacterium* est une technique bien connue
de l'homme du métier. Brièvement, *Agrobacterium tumefaciens*, un microorganisme
pathogène chez la plante, est connu depuis le début du 20^{ème} siècle. Par nature, *A.*
tumefaciens a la capacité exceptionnelle de transférer un segment d'ADN particulier
(ADN-T) de son plasmide inducteur de tumeur (Ti) vers le noyau de cellules de plantes
20 infectées où il est ensuite intégré de façon stable dans le génome hôte et transcrit,
provoquant la maladie de la galle du collet. Le fragment d'ADN-T est flanqué de
répétitions directes de 25 paires de bases (pb) agissant en tant que signal d'élément cis-
régulateur pour l'appareil de transfert. Il a été démontré qu'en réalité, tout ADN
étranger placé entre ces bordures d'ADN-T peut être transféré aux cellules végétales. Il
25 est donc possible de générer des souches d'*Agrobacterium* dans lesquelles les gènes
provoquant la maladie ont été remplacés par un ADN sélectionné de manière spécifique,
permettant ainsi d'intégrer l'ADN sélectionné de manière spécifique de façon stable
dans le génome de la plante.

La transformation de plantes par biolistique, encore appelé bombardement au
30 moyen de microprojectiles ou microparticules, est une technique utilisée pour libérer
l'ADN directement dans le génome hôte également bien connue de l'homme du métier.
En résumé, un plasmide ou de l'ADN linéarisé contenant le(s) gène(s) concerné(s) est

fixé à des particules de tungstène ou d'or (billes micro-porteuses) qui sont libérées dans les cellules de l'hôte à haute vitesse de manière à pénétrer le noyau des cellules végétales. Dans le noyau, l'ADN peut se séparer de la bille micro-porteuse et s'intégrer dans le génome hôte. Le bombardement au moyen de microprojectiles ou biolistique
5 peut être utilisé pour transformer le tissu de la plupart des espèces végétales.

La technique d'électroporation des protoplastes, bien connue de l'homme du métier et qui fait appel à des impulsions électriques, peut également être utilisée pour transformer une plante. Brièvement, elle consiste à soumettre un mélange de protoplastes et d'ADN à une série de chocs électriques de courte durée et de tension
10 élevée. Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique par polarisation des phospholipides qui la constituent et induit alors la formation de pores au travers desquels les molécules d'ADN peuvent transiter. Si le choc électrique n'a pas été trop violent, le phénomène est réversible et la membrane reprend ensuite son état initial, laissant le protoplaste parfaitement viable.

15 La technique de microinjection consiste à injecter directement, au moyen de micropipettes ou microsiringues manipulées sous microscope, l'ADN sélectionné dans le noyau de protoplastes.

Des vecteurs viraux peuvent également être utilisés pour la transformation. Cette technique, bien connue de l'homme du métier, consiste à utiliser un virus de plante à
20 ADN double brin, dans le génome duquel les gènes pathogènes ont été inactivés et le gène d'intérêt a été inséré. La plante est alors transformée par infection avec le virus modifié.

Avantageusement, la transformation a été réalisée par *Agrobacterium tumefaciens*, par biolistique, ou par électroporation, techniques les plus couramment
25 utilisées.

Par « protéine », on entend tout type de polymère comprenant un squelette constitué d'acides aminés. Ainsi, on inclut par ce terme non seulement des protéines entières, mais aussi des peptides ou polypeptides correspondant à des sous-unités ou des
30 fragments de protéines entières, ainsi que tout peptide ou polypeptide d'intérêt, y compris s'il ne correspond pas à un fragment d'une protéine connue, qu'il s'agisse d'un variant d'un tel fragment (possédant des mutations par rapport au fragment de

référence) ou d'un peptide ou polypeptide créé de toutes pièces. En particulier, au sens de l'invention, une protéine peut comprendre des acides aminés modifiés n'existant pas à l'état naturel. De même, les liaisons peptidiques peuvent avoir été modifiées. En outre, on inclut également dans le terme protéine au sens de l'invention la présence facultative
5 de modifications post-traductionnelles de type glycosylation, phosphorylation, ou méthylation.

De plus, ladite protéine produite grâce à un procédé selon l'invention peut présenter un intérêt dans tout type de domaine des activités humaines. Notamment, ladite protéine peut être choisie parmi un médicament de médecine vétérinaire ou
10 humaine, un agent cosmétique, un agent phytopharmaceutique, un agent de diagnostic, un agent nutraceutique ou un réactif de laboratoire

Par protéine « médicament », on entend toute protéine faisant l'objet d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de maladies humaines ou vétérinaires. De telles protéines médicament comprennent notamment des hormones
15 protéiques (hormones sexuelles, hormone de croissance...), des enzymes, des anticorps (en particulier des anticorps monoclonaux), etc...

Par protéine « agent cosmétique », on entend toute protéine permettant de nettoyer, entretenir et embellir les parties externes du corps humain, notamment la peau ou les cheveux. Des exemples de protéines agents cosmétiques incluent le collagène, la
20 toxine botulique, ou les protéines de venin de serpent utilisées dans des soins de la peau.

Par protéine « agent phytopharmaceutique », on entend toute protéine permettant de protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, ce qui inclut notamment les pesticides ; exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, par exemple en augmentant ou diminuant leur
25 croissance; ou assurer la conservation des produits végétaux.

Par protéine « agent de diagnostic », on entend toute protéine impliquée dans un test *in vitro* ou *in vivo* permettant de déterminer la présence ou l'absence chez un sujet d'une maladie particulière. Notamment, de telles protéines agent de diagnostic comprennent notamment :

- 30 - des anticorps dirigés contre une protéine dont la présence dans un échantillon indique la présence d'une maladie, comme par exemple des anticorps dirigés contre des antigènes de microorganismes pathogènes

ou des antigènes tumoraux, permettant ainsi la détection des microorganismes ou d'un cancer ;

- des protéines exprimées spécifiquement en cas de maladie, comme par exemple des protéines de microorganismes pathogènes, permettant ainsi la détection chez un sujet de la présence d'anticorps dirigés contre ces protéines et donc le diagnostic de la maladie.

5 Par protéine « réactif de laboratoire », on entend toute protéine utilisée dans un laboratoire d'analyses médicales ou de recherche, tel que notamment un anticorps, une enzyme, un antigène, une hormone, une cytokine, une chemokine, un récepteur cellulaire, etc...

10 Par « protéine nutraceutique », on entend toute protéine utilisée pour ses allégations santé, afin d'entretenir le capital santé du consommateur, telle que notamment des protéines ayant une activité sur la régénération ou la prolifération cellulaire, sur le système nerveux central, sur le système cardiovasculaire, les allergies, et la prévention de maladies métaboliques (obésité, diabète).

20 La culture de la plante carnivore utilisée dans un procédé selon l'invention est réalisée de façon classique, en tenant compte des particularités du type de plante carnivore choisi. Les méthodes de cultures des différents types de plantes carnivores sont bien connues de l'homme du métier. D'une manière générale, beaucoup de plantes carnivores poussent sur des sols très riches en matière organique (ex : tourbières), ou même sous forme de lianes poussant sur des arbres porteurs (cas des Nepenthes). Certaines sont aquatiques comme les utriculaires. Des protocoles généraux de culture des plantes carnivores sont décrits dans le livre de Juniper et al (11), qui peuvent ensuite être adaptés facilement par l'homme du métier à chaque plante particulière.

25 Un des avantages évoqués précédemment lié au fait d'utiliser le système natif d'excrétion des protéines de la plante carnivore réside dans le fait que ce système est inductible par des signaux mécaniques et/ou chimiques mimant la présence d'une proie. Ainsi, dans un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, la plante est soumise à des stimuli chimiques, et éventuellement mécaniques, mimant la capture d'une proie et induisant une activation du système de production et d'excrétion des

protéines par ladite plante au niveau des pièges. De tels stimuli chimiques incluent notamment l'application d'une solution contenant de l'azote organique, du phosphate, du chlorure de sodium, de la gélatine, de l'acide salicylique, ou de la chitine (1,2). Toutefois, la plante peut également être cultivée en absence de tout stimulus chimique
5 et/ou mécanique mimant la capture d'une proie et induisant une activation du système de production et d'excrétion des protéines par ladite plante au niveau des pièges.

Comme indiqué précédemment, un des problèmes potentiellement lié à l'excrétion de la protéine recombinante d'intérêt dans les sucs digestifs des pièges est lié
10 à la présence dans ces sucs d'enzymes digestives, et notamment de protéases. Outre le fait que les inventeurs ont montré que la présence de ces enzymes digestives n'est en réalité pas un obstacle à la purification de protéines fonctionnelles, il est de plus possible, pour diminuer encore les risques liés à ces enzymes, de prévoir dans le procédé selon l'invention l'inhibition de la synthèse d'une ou plusieurs enzymes
15 digestives, et en particulier d'une ou plusieurs protéases, par ladite plante carnivore. Ainsi, selon un mode de réalisation d'un procédé selon l'invention, ledit procédé comprend en outre l'inhibition de la synthèse d'une ou plusieurs enzymes digestives par ladite plante carnivore. Avantagusement, au moins une de la ou des dite(s) enzyme(s) digestive(s) dont la synthèse est inhibée est une protéase. En effet, ce sont les enzymes
20 les plus susceptibles de détériorer la protéine recombinante excrétée au niveau des pièges. Toutefois, d'autres protéines susceptibles de dégrader la protéine recombinante peuvent également être ciblées. Par exemple, dans le cas d'une protéine glycosylée, il est possible de cibler, seule ou en même temps que des protéases, une ou plusieurs glycosylases. D'autres enzymes susceptibles de dégrader d'autres types de
25 modifications post-traductionnelles peuvent également être ciblées.

Une telle inhibition peut être partielle ou totale et peut être induite de différentes manières.

Premièrement, elle peut être induite en utilisant des techniques génétiques permettant une telle inhibition.

30 Notamment, il est possible de cibler directement les gènes dont on souhaite inhiber l'expression, notamment par la suppression du génome de la plante du ou des

gènes d'enzyme digestive ou par l'extinction de la transcription de ces gènes appelée « gene silencing ».

La suppression du génome de la plante, encore appelée « knock-out » ou « KO », du ou des gènes d'enzyme(s) digestive(s) ciblé(s) est réalisée par les techniques
5 maintenant bien connues de l'homme du métier.

L'extinction de la transcription du ou des gènes d'enzyme(s) digestive(s) ciblé(s) par « silencing » constitue un ensemble de techniques bien décrites chez les végétaux.

Ainsi la technique de Virus Induced Gene silencing (VIGS) nécessite le clonage d'une courte séquence du gène de plante ciblé dans un virus végétal. Dans les quelques
10 semaines qui suivent l'infection virale qui contient le fragment de gène en question, le mécanisme naturel de défense de la plante conduit à la dégradation spécifique des ARNm correspondant au gène endogène de la plante qui est ciblé. Cette technique permet d'obtenir rapidement, en 3 à 4 semaines après l'infection virale, la mise sous silence du gène ciblé, à partir d'une plante normale, sans processus de régénération de
15 transformants in vitro, en utilisant le principe de contamination systémique du virus dans la plante. (12).

La technique de co-suppression peut également conduire à l'extinction spécifique de l'expression de gènes ciblés. Cette extinction s'obtient en re-insérant un gène cible, sous contrôle d'un promoteur constitutif ou inductible ou tissu-spécifique,
20 dans une plante donnée. Le transfert de gène peut utiliser une technique quelconque de transformation génétique (infection par agrobacterium, par vecteur viral, par microinjection, par biolistique...). Pour une partie des plantes génétiquement transformées, on observe la disparition du caractère ou de la fonction codée par le gène cible (13).

25 L'inactivation post-transcriptionnelle de gènes peut aussi s'obtenir par toute technique de transformation génétique des végétaux (infection par agrobacterium, par vecteur viral, par microinjection, par biolistique...) en insérant dans la plante cible un fragment du gène dont on cherche à éteindre la transcription, suivant le principe des ARN interférents (RNAi (14)).

30 L'inhibition par voie génétique du ou des gènes d'enzyme(s) digestive(s) ciblé(s) peut également être réalisée indirectement par l'expression ectopique chez la plante carnivore d'au moins un gène d'inhibiteur de protéase, c'est-à-dire d'au moins un

gène dont l'expression conduit à la diminution partielle ou totale de l'expression d'au moins une protéase. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, la plante carnivore qui est utilisée est également transformée pour exprimer au moins un gène d'inhibiteur de protéase, la transformation pouvant être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par toute technique décrite précédemment. Tout type de gène d'inhibiteur de protéase peut être utilisé. En particulier, la plupart des protéases possèdent une activité enzymatique optimale à pH acide. Par exemple, les deux protéases connues chez les plantes du genre *Nepenthes* (une endopeptidase et la Nepenthesin) sont des enzymes ayant une activité optimale à pH acide (15). De ce fait, il peut être utile d'utiliser un gène connu pour inhiber l'expression de protéases acides. Notamment, le gène de levure IPA3_YEAST (Swissprot accession number P01094), qui code pour l'inhibiteur de la saccharopepsine, est connu pour coder pour un inhibiteur de protéase acide proche de celles des plantes du genre *Nepenthes*.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier d'un procédé selon l'invention dans lequel on inhibe l'expression d'au moins une protéase, l'inhibition de la synthèse d'une ou plusieurs protéases par ladite plante carnivore est réalisée par des techniques génétiques choisies parmi la suppression du génome de la plante d'au moins un gène de protéase, l'extinction de la transcription d'au moins un gène de protéase par « silencing », ou et l'expression ectopique d'au moins un gène d'inhibiteur de protéase.

Alternativement, l'inhibition de la synthèse d'une ou plusieurs enzymes digestives par la plante carnivore peut être induite en utilisant des techniques non génétiques. En particulier, l'inhibition peut également être induite en ajoutant directement dans le liquide digestif des pièges une solution inhibitrice de la ou des enzyme(s) digestive(s) ciblées, ou encore en contrôlant les conditions de pH et/ou de température du liquide digestif, de façon à limiter l'activité de la ou des enzyme(s) digestive(s) ciblées. En effet, des inhibiteurs de la plupart des enzymes sont connus dans l'art, et la plupart des enzymes possèdent des conditions optimales de pH et/ou de température en dehors desquelles leur activité est limitée. En plaçant les sucs digestifs en présence d'inhibiteurs et/ou en dehors des conditions optimales d'activité enzymatique de l'enzyme ciblée, il est donc possible de limiter son activité.

En effet, les pièges étant facilement accessibles, il est possible d'ajouter dans le liquide digestif des pièges une solution d'inhibiteurs de la ou des enzyme(s) digestive(s)

ciblées, soit par injection de la solution dans les urnes ou autres des plantes à pièges à urnes (par exemple les *Nepenthes*) ou à outre (par exemple les Utriculaires), soit par pulvérisation de la solution sur la glu des plantes à pièges à glu (par exemple les plantes du genre *Drosera*).

5 En ce qui concerne plus particulièrement les protéases, différents types d'inhibiteurs de protéases peuvent être utilisés. Notamment, il a été montré que les activités des protéases de *Nepenthes* étaient inhibées par un inhibiteur de protéases acides d'animaux et de champignons : le DDE (Dichlorodiphényldichloroéthylène, (16)). Deux autres inhibiteurs de protéases acides, le DAN (Diazoacetyl-DL-norceuline
10 méthyl ester) et la Pepstatine (3S, 4S-4-amino-3-hydroxy-6-méthyl-heptanoïc acide) isolée de *Streptomyces testaceus* et d'autres actinomycètes qui forment un complexe avec des protéases à acides aspartiques, inhibent complètement l'activité digestive des urnes de *Nepenthes* (15, 17).

D'autres inhibiteurs de protéases et même des mélanges de plusieurs protéases
15 ayant des cibles de protéines différentes sont commercialisés. Ces mélanges permettent d'inhiber un panel de protéases différentes (par exemple, cystéine protéase, sérine protéase, et métaloprotéases, on y retrouve également la pepstatine), assurant une meilleure protection pour la préservation de notre protéine d'intérêt.

Un ou plusieurs de ces inhibiteurs peuvent donc être ajoutés sous forme de
20 solution injectée ou pulvérisée au niveau des pièges.

Il est également possible de limiter l'activité des protéases au niveau des pièges en contrôlant la température et/ou le pH des liquides digestifs. En effet, il a notamment été montré que l'activité digestive des protéases extraites du liquide digestif d'urnes de
25 *Nepenthes* augmentait avec la température, pour atteindre un optimum autour de 50°C/60°C (15). Il est donc possible de limiter leur activité en maintenant les plantes à une température plus faible à partir du moment où les urnes sont en développement. Avantagusement, pour limiter l'activité protéasique, la température devrait être comprise entre 5 et 25°C, de préférence entre 5 et 20°C, entre 5 et 15°C, voire entre 5 et 10°C.

30 En outre, il a été montré que l'activité protéasique du liquide digestif des plantes carnivores est optimale à pH bas (15), l'acidification du liquide augmentant l'activité digestive. Il semble que la digestion serait due principalement aux enzymes sécrétées

par les glandes quand l'ascidie est jeune et le pH bas. Mais, avec le vieillissement, le pH augmente et les microorganismes deviennent responsables de la plus grande part de la digestion. Chez *Nepenthes villosa*, par exemple, le liquide digestif reste actif pendant environ 4 à 5 mois, pendant lesquels le pH est maintenu autour de 2. Passé ce délai, le pH monte rapidement à 6. Il est donc possible de tirer profit de ce fait en contrôlant le pH du liquide digestif, notamment par l'ajout d'une solution basique par injection dans les urnes ou dans les outres ou pulvérisation sur les pièges à glu, ce qui permettrait de limiter l'activité des protéases. L'activité protéasique étant optimale autour de pH 2-3, le pH devrait de préférence être maintenu au-dessus de 4 ; au-dessus de 4,5 ;
5
10
15
avantageusement au-dessus de 5 ; au-dessus de 5,5 ; plus avantageusement au-dessus de 6 ; au-dessus de 6,5 ; voire au-dessus de 7 ; ou au-dessus de 7,5 . De préférence, le pH ne devrait pas être trop basique non plus et donc rester en dessous de 9, avantageusement en dessous de 8,5, voire en dessous de 8. Ainsi, de préférence, pour contrôler l'activité des protéases, le pH devrait être compris entre 4 et 9, avantageusement entre 5 et 8,5, avantageusement entre 6 et 8, voire entre 7 et 8.

Une autre amélioration possible du procédé selon l'invention consiste à favoriser l'excrétion de la protéine recombinante dans les pièges soit par la présence dans la protéine d'un peptide signal permettant son transport dans le réticulum endoplasmique (RE) soit en favorisant le transport du RE vers le Golgi, puis du golgi vers la membrane plasmique et les pièges par la voie transmembranaire, en sur-exprimant dans la plante un gène de la famille des SNARE protéines.
20

En ce qui concerne le peptide signal, comme indiqué précédemment, bien que la présence d'un tel peptide ne soit pas nécessairement suffisante pour permettre une exportation vers les sucs digestifs des pièges, il semble que la voie d'excrétion des enzymes digestives présentes dans les pièges passe par le RE, et la présence d'un peptide signal vers le RE endoplasmique peut donc favoriser un meilleur transport vers les pièges de la protéine recombinante. Ainsi, dans un mode de réalisation du procédé selon l'invention, la protéine d'intérêt à produire comprend un peptide signal permettant son transport dans le réticulum endoplasmique. Un tel peptide signal peut être soit
25
30

présent naturellement dans la protéine, soit fusionné à une protéine ne possédant pas de peptide signal.

L'adressage des protéines dans le compartiment endomembranaire du RE est déterminé par deux mécanismes alternatifs :

5 1/ la présence d'un peptide signal sur la partie N-terminale de la protéine, cette protéine pouvant être soluble ou liée ultérieurement à une membrane. Ce peptide signal comprenant en général un motif hydrophobe assure l'entrée de la protéine à l'intérieur de RE. Consécutivement à l'entrée dans le RE, la protéine peut être prise en charge par des chaperonnes qui auront pour fonction d'assurer une conformation spatiale optimale
10 de la protéine.

 2/ la traduction de l'ARNm en protéine peut se faire (en totalité ou en partie) à proximité du RE, avec l'aide de ribosomes liés aux membranes. Ainsi pour certaines protéines, il existe une séquence signal hydrophobe de quelques dizaines d'acides
15 aminés dans la partie N-terminale. Lors du processus de traduction, une protéine cytoplasmique SRP (signal recognition protein) se lie à la surface du ribosome, ce qui stoppe le processus de traduction. La particule SRP fixée sur le ribosome, vient s'attacher sur un récepteur à la surface des membranes du réticulum. La séquence signal hydrophobe de la protéine traverse alors la membrane du RE. La traduction reprend et la
20 protéine est ensuite libérée à l'intérieur du lumen (19).

Ainsi, pour une protéine d'intérêt donné, il est possible de favoriser son adressage vers le RE en ajoutant à la séquence primaire un peptide signal en position N-terminale présentant des propriétés hydrophobes. Un exemple de motif N terminal hydrophobe peut être trouvé dans la famille des cytochromes P450 eucaryotes, qui sont
25 des enzymes localisées au niveau des membranes du RE (CYP2C5, CYP73A1).

En ce qui concerne l'adressage depuis le RE vers le Golgi, puis du Golgi vers l'extérieur des pièges, il semble que des motifs peptidiques attachés aux vésicules ou aux membranes, connus sous la dénomination de SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein receptors) soient impliqués dans les
30 processus d'exocytose chez les végétaux, par le biais de mécanismes de fusions membranaires précédées d'interactions moléculaires de type SNARE-SNARE (18). Notamment, de tels motifs peptidiques de type SNARE ciblant le transport de vésicules

chargées en protéines, depuis le RE vers le Golgi, ont été décrits dans des protéines chez *Arabidopsis* (18) : il s'agit des domaines SNARE des peptides Syntaxin-41, Syntaxin-42, Syntaxin-43 (AtSYP41 à 43, numéros d'accension Genbank respectivement : O65359, Q9SWH4, et Q9SUJ1). D'autres peptides de type SNARE sont également connus chez *Arabidopsis*. Ils sont présents à la surface de vésicules golgiennes et déterminent le transport depuis le Golgi vers la membrane plasmique (exocytose) ; ils correspondent aux Syntaxin-121 à 125 (AtSYP121 à 125, numéros d'accension Genbank : Q9ZSD4, Q9SVC2, Q9ZQZ8, O64791, et Q9SXB0). Les différents domaines SNARE sont résumés dans le Tableau 1 ci-dessous.

10

Tableau 1. Domaines SNARE connus chez *Arabidopsis*

Gène	Numéro d'accension Genbank	Région correspondant au domaine SNARE (aa)
Syntaxin-41	O65359 (GI:28380151)	237-293
Syntaxin-42	Q9SWH4 (GI:28380167)	232-289
Syntaxin-43	Q9SUJ1 (GI:38503420)	246-302
Syntaxin-121	Q9ZSD4 (GI:28380149)	217-276
Syntaxin-122	Q9SVC2 (GI:28380140)	216-275
Syntaxin-123	Q9ZQZ8 (GI:28380148)	209-268
Syntaxin-124	O64791 (GI:28380117)	206-265
Syntaxin-125	Q9SXB0 (GI:28380142)	201-260

Ainsi une plante carnivore génétiquement transformée sur-exprimant au moins une de ces deux familles de protéines SNARE, ou une protéine possédant un ou plusieurs domaines SNARE ou dérivés, devrait conduire à une excrétion majorée de ses protéines présentes au niveau du RE. Dans un mode de réalisation du procédé selon l'invention, la plante carnivore cultivée est en outre génétiquement modifiée pour exprimer au moins un gène comprenant au moins un domaine de type SNARE, conduisant ainsi à une excrétion majorée de la ou des protéines d'intérêt vers les pièges.

Par « domaine de type SNARE », on entend tout motif peptidique possédant au moins 80%, au moins 85%, au moins 90%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98%, au moins 99 %, voire 100% d'identité avec au moins un des domaines

SNARE définis dans le Tableau 1. En particulier, les gènes comportant un domaine SNARE décrits dans le Tableau 1 peuvent être surexprimés dans la plante carnivore utilisée.

5 Le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre avec tout type de plante carnivore. Les plantes carnivores peuvent être classées en différentes catégories en fonction de leur type de piège, et les modalités pratiques du procédé selon l'invention peuvent donc varier en fonction du type de piège. Différents modes de réalisation particuliers avantageux correspondant à des types de pièges distincts sont décrits ci-
10 dessous. Cependant, d'autres modes de réalisation peuvent être facilement développés par l'homme du métier, et le procédé selon l'invention ne saurait donc se limiter aux modes de réalisations particuliers avantageux décrits ci-dessous.

Une première catégorie de plantes carnivores utilisables dans un mode de
15 réalisation avantageux du procédé selon l'invention est celle des plantes carnivores possédant des pièges à glu.

Par « pièges à glu », on entend des pièges constitués de feuilles adhésives. Ces feuilles sécrètent de petites gouttelettes appelées glu ou mucilage sur lesquelles les proies se collent. Ces pièges peuvent être passifs (les feuilles sécrétant les gouttelettes
20 de mucilage sont immobiles) ou semi-actifs (les feuilles sécrétant les gouttelettes de mucilage s'enroulent afin d'améliorer la surface de contact, permettant ainsi une meilleure digestion). Plusieurs genres de plantes carnivores possèdent des pièges à glu. Ainsi, dans le procédé selon l'invention utilisant une plante carnivore possédant des
25 pièges à glu, celle-ci est notamment choisie parmi les genres *Drosera*, *Pinguicula*, *Byblis*, *Drosophyllum*, et *Triphyophyllum*. Avantageusement, ladite plante carnivore possédant des pièges à glu est du genre *Drosera*.

Chez ces plantes carnivores possédant des pièges à glu, le mucilage est directement accessible à l'air libre, et la protéine d'intérêt peut être obtenue directement par récolte de la glu présente à l'air libre. La récolte de la glu des pièges peut alors être
30 réalisée par trempage, aspersion ou lavage de la plante carnivore possédant des pièges à glu qui est cultivée, par aspiration ou absorption sur tissu (notamment tout type de papier, par exemple du papier buvard) de la glu, ou par prélèvement direct de la glu de

la plante carnivore possédant des pièges à glu qui est cultivée. Notamment, dans un mode de réalisation avantageux, la plante carnivore possédant des pièges à glu est cultivée sur un système rigide permettant la manipulation d'un ensemble de plantes, leur retournement et le trempage de leurs parties aériennes dans une solution.

5 Alternativement, la plante carnivore possédant des pièges à glu peut être cultivée sur un plan incliné recouvert d'un matériau imperméable à l'eau, la glu des pièges étant récoltée par aspersion et/ou lavage des parties aériennes de la plante et la collecte de la solution obtenue au bas du plan incliné.

10 Une deuxième catégorie de plantes carnivores utilisables dans un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention est celle des plantes carnivores possédant des pièges à urnes, à cornets, ou à outres.

Par « pièges à urnes », on entend des pièges constitués de feuilles terminées par des urnes ou ascidies, surmontés d'une sorte de couvercle appelé opercule. Les proies, attirées par des glandes à nectar, pénètrent dans le piège et glissent sur les parois internes qui sont surmontées d'un bourrelet infranchissable ; elles finissent par se noyer comme dans le cas précédent. Les plantes carnivores possédant des pièges à urnes incluent notamment les genres *Nepenthes* et *Cephalotus*.

15

Par « pièges à cornets », on entend des pièges constitués de feuilles transformées en cornets tubulaires. Les insectes attirés par des glandes à nectar pénètrent par l'ouverture qui est située près du sommet du piège. La paroi interne de ce dernier est visqueuse ou garnie de poils dirigés vers le bas, et interdisant toute remontée. Les proies se noient dans le liquide contenu dans le piège. Les plantes carnivores possédant des pièges à cornets incluent notamment le genre *Sarracenia*.

20

Par « pièges à outres », on entend des pièges constitués de petites poches ou utricules plus ou moins transparentes disposées le long des racines, présentant à une extrémité un orifice entouré de poils ramifiés dont certains commandent le déclenchement du piège lorsqu'une proie (souvent microscopique) les effleure. L'utricule s'enfle alors très brutalement (1/500s) aspirant à la fois l'eau et la proie. Puis l'utricule reprend lentement sa forme initiale en 1/2 h tandis que la proie n'a plus aucune chance de s'échapper. De tels pièges se retrouvent principalement chez les espèces du

25

30

genre *Utricularia*. Ainsi, avantageusement, la plante carnivore possédant des pièges à autres utilisée dans le procédé selon l'invention est du genre *Utricularia*.

Avantageusement, la plante carnivore utilisée possède des pièges à urnes et est choisie parmi les genres *Nepenthes* ou *Cephalotus*.

5 Dans ce cas, ainsi que dans le cas de plantes à pièges à cornets, les sucres digestifs dans laquelle la protéine d'intérêt est excrétée forment un liquide au fond des urnes ou cornets, liquide qui peut être récolté facilement. Ainsi, lorsque la plante carnivore utilisée dans le procédé selon l'invention possède des pièges à urnes ou à cornets, la protéine d'intérêt est avantageusement obtenue par récolte des fluides excrétés se
10 trouvant à l'intérieur des urnes.

L'intérêt des pièges à urnes, c'est-à-dire possédant un opercule, est que l'opercule n'est ouvert par la plante qu'à un certain stade de développement du piège. Avant ce stade, l'opercule est fermé, les sucres digestifs étant excrétés dans le piège étant ainsi en conditions stériles. Ainsi, l'utilisation de telles plantes peut permettre, sous
15 réserve de récolter les sucres digestifs avant l'ouverture de l'opercule et de réaliser la récolte dans des conditions stériles, de collecter la protéine recombinante produite par la plante carnivore et excrétée au niveau des pièges sous forme stérile. Ainsi, avantageusement, la plante carnivore utilisée dans le procédé selon l'invention possède des pièges à urnes, et est avantageusement choisie parmi les genres *Népenthes* et
20 *Cephalotus*. Dans ce cas, les fluides se trouvant à l'intérieur des urnes sont alors avantageusement récoltés avant l'ouverture naturelle des urnes de la plante. En particulier, lesdits fluides se trouvant à l'intérieur des urnes peuvent notamment être récoltés par sacrifice des urnes ou par un dispositif permettant la ponction desdits fluides à l'intérieur des urnes en conditions stériles.

25 Qu'il s'agisse de pièges à urnes ou à cornets, les protéases natives produites par la plante s'accumulent petit à petit au fond des urnes ou des cornets. Afin de limiter les risques de dégradation de la protéine d'intérêt par les enzymes digestives, les fluides se trouvant à l'intérieur des urnes sont avantageusement récoltés à un stade de développement de la plante où les protéases natives produites par la plante ne se sont
30 pas encore accumulées de manière massive dans lesdits fluides. Une simple mise au point à la portée de l'homme du métier permet de déterminer pour chaque type de plante

à quel stade la quantité de protéine d'intérêt est maximale tout en restant à un stade où la quantité de protéases natives produites par la plante est encore limitée.

Lorsque des plantes carnivores possédant des pièges à outres sont utilisées dans le procédé selon l'invention, la protéine est avantageusement obtenue par récolte des fluides excrétés se trouvant à l'intérieur des outres. En particulier, les fluides se trouvant à l'intérieur des outres peuvent être libérés par application d'un stress mécanique, comme par exemple le passage de peignes, brosses, ou de filaments, ou l'émission d'ultrasons ou encore d'autres ondes sonores, à la surface des outres.

DESCRIPTION DES DESSINS

10 **Figure 1.** Observation au microscope UV de plantes *Drosera rotundifolia* transformées GFP (**A** et **B**) ou de plantes témoins (**C**). Les flèches indiquent l'emplacement de zones de fluorescence (zones les plus claires) liées à l'expression de la GFP.

15 **Figure 2.** Observation de poils pédicellés présents sur les feuilles comportant des glandes sécrétrices d'enzymes digestives d'insectes de plantes *Drosera rotundifolia* témoins (plantes sauvages non transformées, **A**) ou de plantes transformées GFP (**B**). Les flèches indiquent l'emplacement de zones de fluorescence (zones les plus claires) liées à l'expression de la GFP.

20 **Figure 3.** Observations de mucilage de plantes *Drosera rotundifolia* transformées GFP (**A**) ou de plantes témoins (plantes sauvages non transformées, **B**) au microscope UV après absorption sur papier à cigarette. Les flèches indiquent l'emplacement de zones de fluorescence (zones les plus claires) liées à l'expression de la GFP.

25 **Figure 4.** Observations de feuilles de plantes *Drosera rotundifolia* transformées GUS (**A**) ou de plantes témoins (plantes sauvages non transformées, **B**) après révélation avec le substrat X-Gluc. Les plages gris foncé correspondent aux plages bleues indiquant que le substrat X-Gluc a été transformé par l'enzyme GUS, démontrant ainsi la présence de l'enzyme GUS dans ces zones.

30 **Figure 5.** Observations de feuilles et de poils de plantes *Drosera rotundifolia* transformées GUS (**A** et **B**) ou de plantes témoins (plantes sauvages non transformées, **C**) après révélation avec le substrat X-Gluc à la loupe binoculaire. Les plages gris foncé

correspondent aux plages bleues indiquant que le substrat X-Gluc a été transformé par l'enzyme GUS, démontrant ainsi la présence de l'enzyme GUS dans ces zones.

Figure 6. Observations de gouttelettes de glu après révélation avec le substrat X-Gluc après absorption de la glu sur papier Whatman. **A.** Comparaison de papiers enduits de gouttelettes de glu de *Drosera rotundifolia* transformées GUS (en haut), enduit de gouttelettes de glu de *Drosera rotundifolia* témoin (plante sauvage non transformée, au milieu), ou sans gouttelettes (en bas). **B.** Aggrandissement de **A** pour les papiers enduits de gouttelettes de glu de *Drosera rotundifolia* transformées GUS (en haut), enduit de gouttelettes de glu de *Drosera rotundifolia* témoin (plante sauvage non transformée, au milieu). **C.** Papiers enduits de gouttelettes de glu d'autres plantes *Drosera rotundifolia* transformées GUS. Les plages gris foncé correspondent aux plages bleues indiquant que le substrat X-Gluc a été transformé par l'enzyme GUS, démontrant ainsi la présence de l'enzyme GUS dans ces zones.

Figure 7. Analyse par PCR de l'insertion du vecteur d'expression comprenant les gènes GUS et NPT II dans le génome des plantes transformées, par détection du gène NPT II. Mq : marqueurs de taille. 1 et 2 : plantes testées.

EXEMPLES

*EXEMPLE 1. Transformation de plantes *Drosera rotundifolia**

20 1.1 Matériels et méthodes

1.1.1. Transformation des plantes *Drosera rotundifolia* avec les gènes GFP ou GUS

La transformation des *Drosera* a été faite à partir des feuilles, après blessure de ces dernières et mise en co-culture avec *Agrobacterium tumefaciens* afin de réaliser l'étape du transfert de l'ADN-t vers les cellules végétales, comme l'ont décrit Hirsikorpi et al. Dans notre cas, la transformation des plantes a été faite avec deux constructions plasmidiques distinctes, avec des gènes marqueurs différents.

L'ADN-t comprenait le gène *NPT II* codant pour la Neomycin phosphotransférase II conférant la résistance à la kanamycine et :

-Soit le gène codant pour la protéine GFP, la Green Fluorescent Protein, issue d'une méduse (*Aequorea victoria*). Cette protéine possède la propriété de fluorescer dans le visible lorsqu'elle est excitée sous UV (395 nm).

- Soit le gène codant pour l'enzyme GUS, la β -Glucuronidase, qui en présence du substrat X-gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) conduit à l'apparition d'un produit de couleur bleue.

1.1.1 Observations de feuilles après révélation avec le substrat X-Gluc

La solution mère X-gluc est diluée dans du tampon X-Gluc (100mM Tris HCl, NaCl 50 mM, pH7) pour obtenir une concentration finale de 1mM, et est appliqué sur les parties végétales directement. Le tout est placé à 37°C à obscurité pendant 12h. Les feuilles sont ensuite mis à tremper dans un bain d'éthanol afin d'éliminer la chlorophylle, et de mieux voir la coloration bleue due à l'éventuelle présence de l'enzyme GUS.

1.2 Résultats

1.2.1 Plantes *Drosera rotundifolia* transformées GFP

1.2.1.1 *Observations de feuilles au microscope UV*

Des limbes de feuilles de plantes carnivores témoins et transformées GFP ont été observées au microscope UV. Certaines feuilles transformées GFP montrent des plages fluorescentes marquées (Figure 1A et 1B, voir flèches), alors que les feuilles des plantes témoins n'en présentent pas (Figure 1C) :

Ces observations au microscope montre que les plantes sont bien transformées GFP, et expriment la protéine dans le limbe de la feuille.

1.2.1.2 *Observations de poils et de mucilage au microscope UV*

La recherche de fluorescence a ensuite été axée sur l'observation de poils pédicellés présents sur les feuilles comportant des glandes sécrétrices d'enzymes digestives d'insectes, et sur l'observation de gouttelettes de glu ou mucilage produites par ces glandes.

Sur les plantes témoins, les poils observés ne présentent en général pas de fluorescence (Figure 2A). Malgré tout, certaines observations ont révélé la présence de

fluorescence sur des extrémités de poils témoins, mais celle-ci est beaucoup moins marquée que celle observée dans certains poils de plantes GFP où la protéine semble s'exprimer (Figure 2B, voir flèches).

5 1.2.1.3 *Observations de mucilage au microscope UV après absorption sur papier à cigarette*

Afin d'observer l'éventuelle présence de la protéine GFP dans les gouttelettes de glu, des petits carrés de papier à cigarette ont été découpés, pour balayer les feuilles de plantes témoins et GFP et absorber la glu sur le papier.

10 Le papier ayant absorbé des gouttelettes de mucilage de plantes GFP a été observé sous microscope UV : il présente des spots fluorescents (Figure 3A, voir flèches). Le papier témoin n'en présente aucun (Figure 3B). Cette observation montre que les gouttelettes de glu de plantes transformées GFP expriment et contiennent la protéine.

1.2.2 Plantes *Drosera rotundifolia* transformées GUS

15 1.2.2.1 *Observations de feuilles après révélation avec le substrat X-Gluc*

Afin de vérifier que les plantes sont bien transformées, une révélation avec le substrat X-gluc a été effectuée sur des feuilles de deux plantes supposées transformées et des feuilles témoins.

20 Les feuilles supposées Gus présentent des plages bleues marquées (Figure 4A, voir plages gris foncé) par rapport aux feuilles témoins (Figure 4B). On en déduit donc la présence de l'enzyme Gus et de son activité dans les plantes supposées transformées, étant donné l'apparition de ce produit bleu formé en présence du substrat. A noter que la feuille n'est pas colorée entièrement, certaines plages restent blanches. Les feuilles témoins présentent des zones bleues aux endroits de blessures/sections faites lors de la
25 séparation feuille/plante, mais le limbe ne présente pas de coloration. (Figure 4B).

1.2.2.2 *Observations de feuilles et de poils après révélation avec le substrat X-Gluc à la loupe binoculaire*

Ces feuilles témoins et GUS après révélation ont pu être observées à la loupe binoculaire afin de voir où se localise exactement la coloration bleue.

Les feuilles de plantes transformées GUS (Figure 5A et 5B) présentent une coloration sur la partie inférieure du poil uniquement (voir coloration gris foncé). L'extrémité du poil, lieu de formation de la glu, n'est pas colorée. Les poils des feuilles des plantes témoins ne présentent aucune coloration (Figure 5C).

5 1.2.2.3 *Observations de gouttelettes de glu après révélation avec le substrat X-Gluc après absorption de la glu sur papier Whatman*

Comme pour les plantes GFP, des gouttelettes de glu de plantes GUS et témoins ont été absorbées avec cette fois du papier Whatman (papier balayé sur les gouttelettes afin d'en absorber le plus possible). Ces morceaux de papier ont ensuite été mis à
10 incuber dans du tampon et du substrat X-Gluc 12h à 37°C.

Au bout d'1h d'incubation, la coloration est déjà présente. Des photos ont été prises après 12h d'incubation (Figure 6).

Le papier portant des gouttelettes de feuilles GUS (Figure 6A en haut, et Figure 6B à gauche) présente une coloration bleue (voir zones gris foncé) là où la glu a pu être absorbée. Le papier portant des gouttes de glu de feuilles témoins (Figure 6A au milieu, et Figure 6B à droite) ne présente aucune coloration, de même que le papier ne portant pas de gouttes de glu (Figure 6A en bas). L'enzyme GUS est donc exprimée et bien présente dans les gouttelettes de mucilage des feuilles de plantes transformées GUS, et non dans celles des plantes témoins.
15

20 Cette expérience a été reproduite sur 17 plantes transformées GUS, la transformation étant mise en évidence par la coloration bleue des feuilles après révélation avec le substrat X-Gluc. Sur ces 17 plantes transformées GUS, 14 présentent des gouttelettes contenant l'enzyme GUS (papier tacheté de bleu). Seules 3 plantes apparemment transformées ne semblent pas exprimer la protéine recherchée dans les
25 gouttelettes. Ces résultats indiquent donc, qu'au moins dans la majorité des cas, les plantes transformées GUS expriment l'enzyme GUS et que celle-ci est présente dans les gouttelettes de mucilage des pièges.

De plus, différentes intensités et quantités de bleu étaient visibles sur les papiers Whatman, suggérant que certaines plantes transformées expriment et sécrètent plus ou
30 moins l'enzyme GUS dans le mucilage des feuilles. Afin de confirmer ceci, des tests ont été réalisés sur les gouttelettes d'une seule feuille de plantes GUS : 5 feuilles de 5 plantes GUS déjà testées précédemment ont été prélevées, et les gouttelettes de chaque

feuille ont été absorbées séparément sur un papier Whatman. Les résultats obtenus à ce jour confirment le fait que les plantes transformées GUS expriment et sécrètent plus ou moins la protéine GUS dans les gouttelettes de mucilage.

5 1.2.2.4 Analyse par PCR de l'insertion du vecteur d'expression dans le génome des plantes transformées

Les plantes sont transformées à l'aide de 2 gènes, qui se trouvent sur le même fragment d'ADN-t : le gène *GUS* et un gène de résistance à la Kanamycine (*NPT II*), qui permet de sélectionner les plantes en ajoutant l'antibiotique au milieu de culture. En effet, si la plante a intégré le gène de résistance à la Kanamycine, elle survit sur le milieu comportant de la Kanamycine, tandis que les plantes non transformées meurent, ce qui permet de sélectionner les plantes transformées.

Les deux gènes, *GUS* et *NPT II*, sont intégrés simultanément dans le génome de la plante. Ainsi, la présence dans le génome de la plante du gène *NPT II* indique la présence dans le génome de la plante du gène *GUS*, démontrant ainsi la transformation de la plante.

Pour des raisons de technique de PCR, la présence du gène *NPT II* dans le génome de la plante a été recherchée par amplification par PCR d'un fragment du gène *NPT II* chez 2 plantes chez lesquelles les tests enzymatiques ont déjà indiqué la présence du gène *GUS*.

Les résultats sont présentés sur la Figure 7, et montrent que le fragment du gène *NPT II* est bien amplifié par PCR chez ces 2 plantes, démontrant ainsi l'insertion dans le génome de la plante du vecteur d'expression comprenant les gènes *GUS* et *NPT II*.

1.3 Conclusion

Ainsi, les résultats présentés ci-dessus indiquent clairement qu'il est possible de générer une plante carnivore génétiquement modifiée dans laquelle le gène d'une protéine d'intérêt a été inséré, et de récolter facilement la protéine d'intérêt au niveau des sucs digestifs des pièges excrétés par la plante (ici, de la glu).

En outre, les tests réalisés sur les deux protéines d'intérêt utilisées (*GUS* et *GFP*) indiquent que les protéines obtenues sont fonctionnelles, malgré l'existence d'enzymes digestives.

REFERENCES

1. Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Mullaney, E.J., Ziegelhoffer, T., and Austin-Phillips, S. (2003). Fungal phyA gene expressed in potato leaves produces active and stable phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306(2),603-609.
5
2. Gao, Y., Suo, G.L., Han, J., He, Z.Q., Yao, W., Dai, J.W. (2006). Expression of Human BMP-2 Gene in Different Tissues of Tobacco Plants. *Acta Genetica Sinica* 33 (1), 56-62.
3. Gallie, D. R., and Chang, S. C. (1997). Signal transduction in the carnivorous plant *Sarracenia purpurea* - Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources. *Plant Physiology* 115, 1461-1471.
10
4. Matusikova, I., Salaj, J., Moravcikova, J., Mlynarova, L., Nap, J. P., and Libantova, J. (2005). Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia*L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey. *Planta* 222, 1020-1027.
15
5. EP0019808
6. WO 99/42115
7. WO 02/057408
8. Hirsikorpi M., Kämäräinen.T., Teeri. T., Hohtola.A. (2002). Agrobacterium-mediated transformation of round leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.). *Plant Science*, 162, 537-542.
20
9. Schweikert, R. J., Beaudoin, S. E., and Owen, T. P. (2006). Induced changes to the ultrastructure of the digestive glands from the carnivorous pitcher plant *Nepenthes alata*. In "Plant Biology 2006" (A. S. o. P. Biologists, ed.). unpublished, Boston, Massachusetts, USA.
25
10. Chikwamba, R. K., Scott, M. P., Mejia, L. B., Mason, H. S., and Wang, K. (2003). Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11127-11132.
- 30 11. Juniper, B.E., Robins, R.J., Joel, D. (1989) *The Carnivorous Plants*. Londres, Academic Press, 353p.

12. Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., and Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal* 39, 734-746.
13. Deblock, M. (1993). The Cell Biology of Plant Transformation - Current State,
5 Problems, Prospects and the Implications for the Plant-Breeding. *Euphytica* 71, 1-14.
14. Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6, 206-U1.
15. Frazier, C.K. (2000) The enduring Controversies Concerning the Process of
10 Protein Digestion in Nepenthes (Nepenthaceae). *International carnivorous plant Society* 29(2), 56-61
16. Lobareva LS, Rudenskaia GN, Stepanov VM.
17. Takahashi, K., Chang, W., Ko, J. (1974). Specific inhibition of acid proteases
15 from brain, kidney, skeletal muscle, and insectivorous plants by diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester and by pepstatin. *The Journal of Biochemistry* 76(4), 897-900.
18. Pratelli, R., Sutter, J.-U., and Blatt, M. R. (2004). A new catch in the SNARE. *Trends in Plant Science* 9, 187-195.
19. Nicchitta, C. V. (2002). A platform for compartmentalized protein synthesis:
20 protein translation and translocation in the ER. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 412-416.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production d'au moins une protéine, comprenant la culture d'une plante carnivore, caractérisé en ce que ladite plante a été génétiquement modifiée pour exprimer la ou les dite(s) protéine(s).
5
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la ou les dite(s) protéine(s) est traduite dans les cellules de la plante et excrétée par le système d'excrétion des protéines naturelles de ladite plante
10
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite plante a été génétiquement modifiée par transformation par Agrobactérium, par biolistique, par électroporation, par microinjection ou par l'utilisation de vecteurs viraux.
15
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite protéine est choisie parmi un médicament de médecine vétérinaire ou humaine, un agent cosmétique, un agent phytopharmaceutique, un agent de diagnostic, un agent nutraceutique ou un réactif de laboratoire.
20
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite plante est soumise à des stimuli chimiques, et éventuellement mécaniques, mimant la capture d'une proie et induisant une activation du système de production et d'excrétion des protéines par ladite plante au niveau des pièges.
25
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite plante est cultivée en absence de tout stimulus chimique et/ou mécanique mimant la capture d'une proie et induisant une activation du système de production et d'excrétion des protéines par ladite plante au niveau des pièges.
30

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'inhibition de la synthèse d'une ou plusieurs enzymes digestives par ladite plante carnivore.
- 5 8. Procédé selon l'une la revendication 7, caractérisé en ce que au moins une de la ou des dite(s) enzyme(s) digestive(s) dont la synthèse est inhibée est une protéase.
9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que l'inhibition de la synthèse d'une ou plusieurs enzyme(s) digestive(s) par ladite plante carnivore est
10 réalisée par des techniques génétiques choisies parmi la suppression du génome de la plante d'au moins un gène d'enzyme digestive, l'extinction de la transcription d'au moins un gène d'enzyme digestive par « silencing », ou et l'expression ectopique d'au moins un gène d'inhibiteur d'enzyme digestive.
- 15 10. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que l'inhibition de la synthèse d'une ou plusieurs enzyme(s) digestive(s) par ladite plante carnivore est réalisée en ajoutant directement dans le liquide digestif des pièges une solution inhibitrice de la ou des enzyme(s) digestive(s), ou en contrôlant les conditions de pH et/ou de température du liquide digestif.
20
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ladite protéine comprend un peptide signal permettant son transport dans le réticulum endoplasmique.
- 25 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ladite plante carnivore est en outre génétiquement modifiée pour exprimer au moins un gène comprenant au moins un domaine de type SNARE.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que
30 ladite plante carnivore possède des pièges à glu.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que ladite plante carnivore possédant des pièges à glu est choisie parmi les genres *Drosera*, *Pinguicula*, *Byblis*, *Drosophyllum*, et *Triphyophyllum*.
- 5 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que ladite protéine est obtenue par récolte de la glu des pièges par trempage, aspersion ou lavage de ladite plante, par aspiration ou absorption sur tissu de la glu de ladite plante, ou par prélèvement direct de la glu.
- 10 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que ladite plante est cultivée sur un système rigide permettant la manipulation d'un ensemble de plantes, leur retournement et le trempage de leurs parties aériennes dans une solution.
- 15 17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que ladite plante est cultivée sur un plan incliné recouvert d'un matériau imperméable à l'eau, la glu des pièges étant récoltée par aspersion et/ou lavage des parties aériennes de la plante et la collecte de la solution obtenue au bas du plan incliné.
- 20 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que ladite plante carnivore possède des pièges à urnes, à cornets ou à outres.
- 25 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que ladite protéine est obtenue par récolte des fluides excrétés se trouvant à l'intérieur des urnes, cornets ou outres.
- 30 20. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que ladite plante carnivore possède des pièges à urnes et est choisie parmi les genres *Nepenthes* ou *Cephalotus*.
21. Procédé selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce que lesdits fluides se trouvant à l'intérieur des urnes sont récoltés avant l'ouverture naturelle des urnes de ladite plante.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdits fluides se trouvant à l'intérieur des urnes sont récoltés par sacrifice des urnes ou par un dispositif permettant la ponction desdits fluides à l'intérieur des urnes en conditions stériles.

5

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 22, caractérisé en ce que lesdits fluides se trouvant à l'intérieur des urnes sont récoltés à un stade de développement de la plante où les protéases natives produites par la plante ne se sont pas encore accumulées de manière massive dans lesdits fluides.

A



B



C

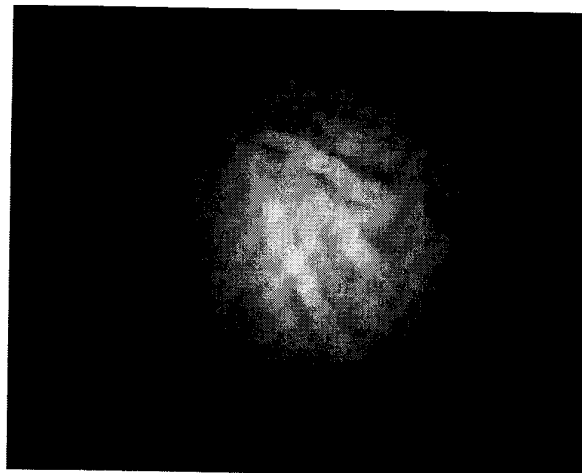


FIGURE 1

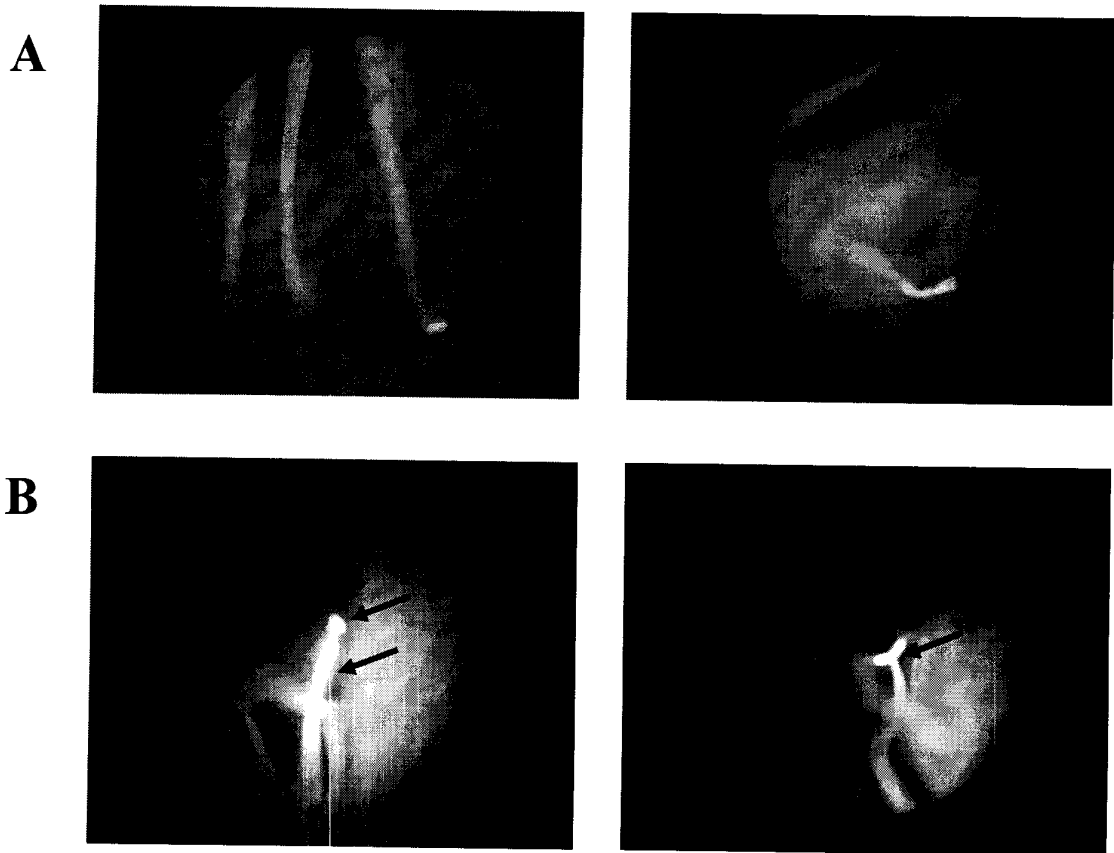
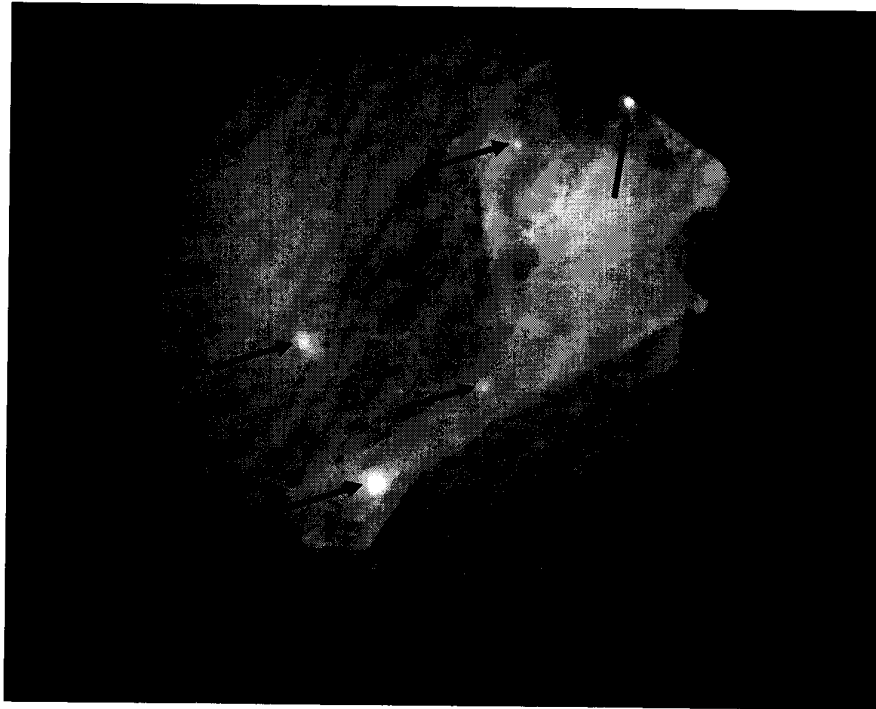


FIGURE 2

A



B



FIGURE 3

4/7

A



B

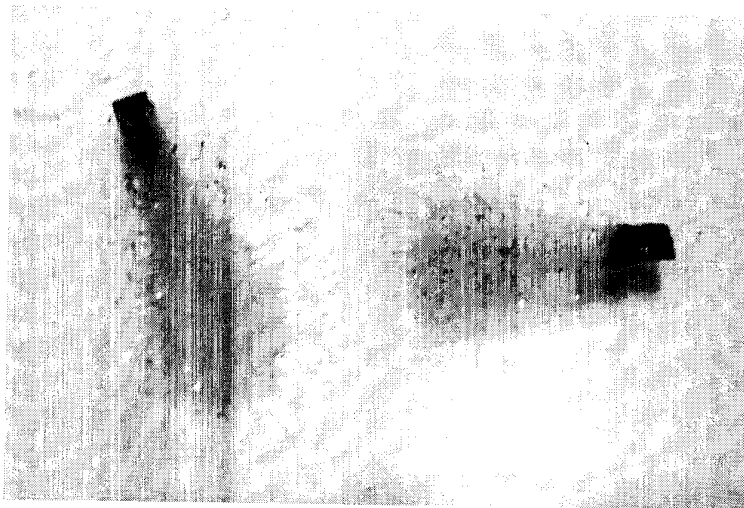


FIGURE 4

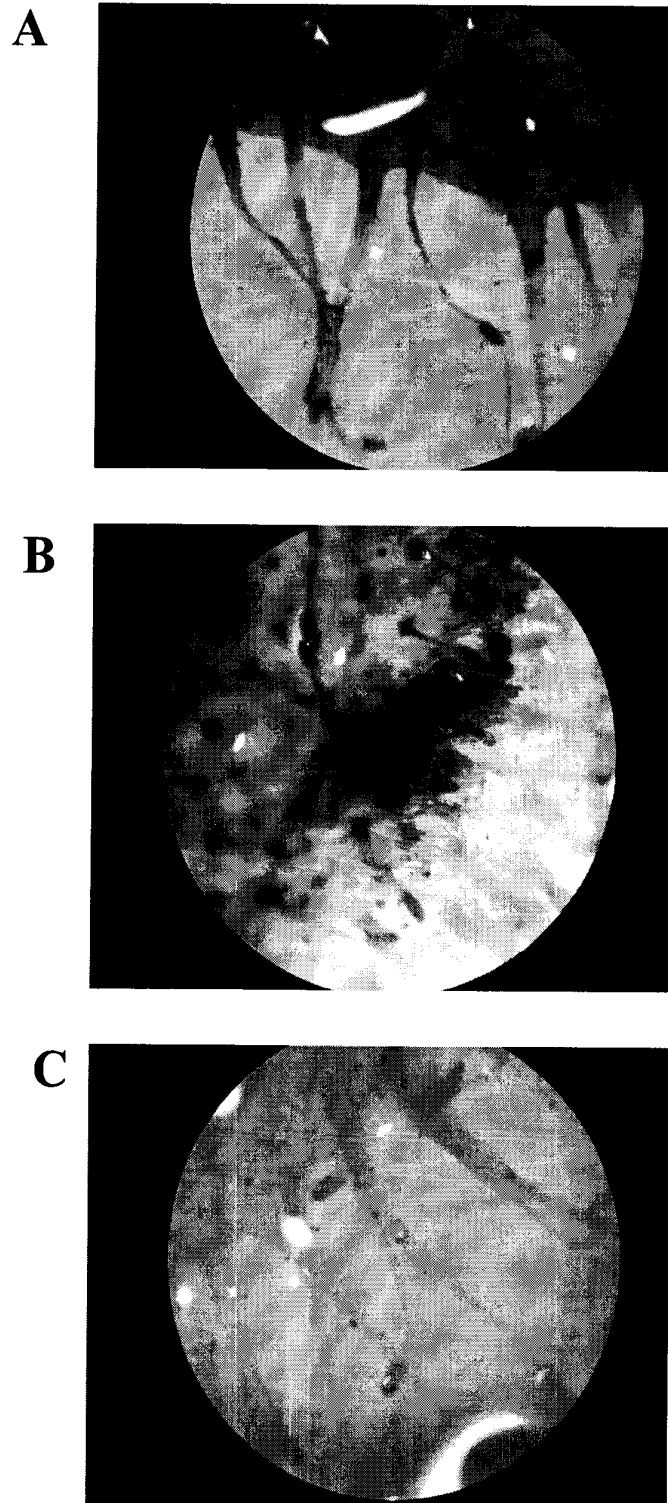
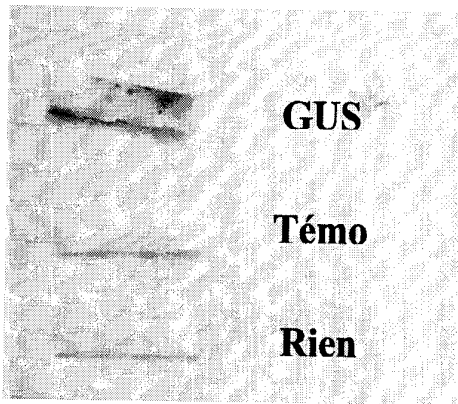
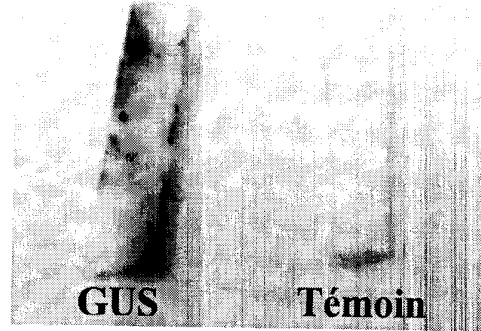


FIGURE 5

A



B



C

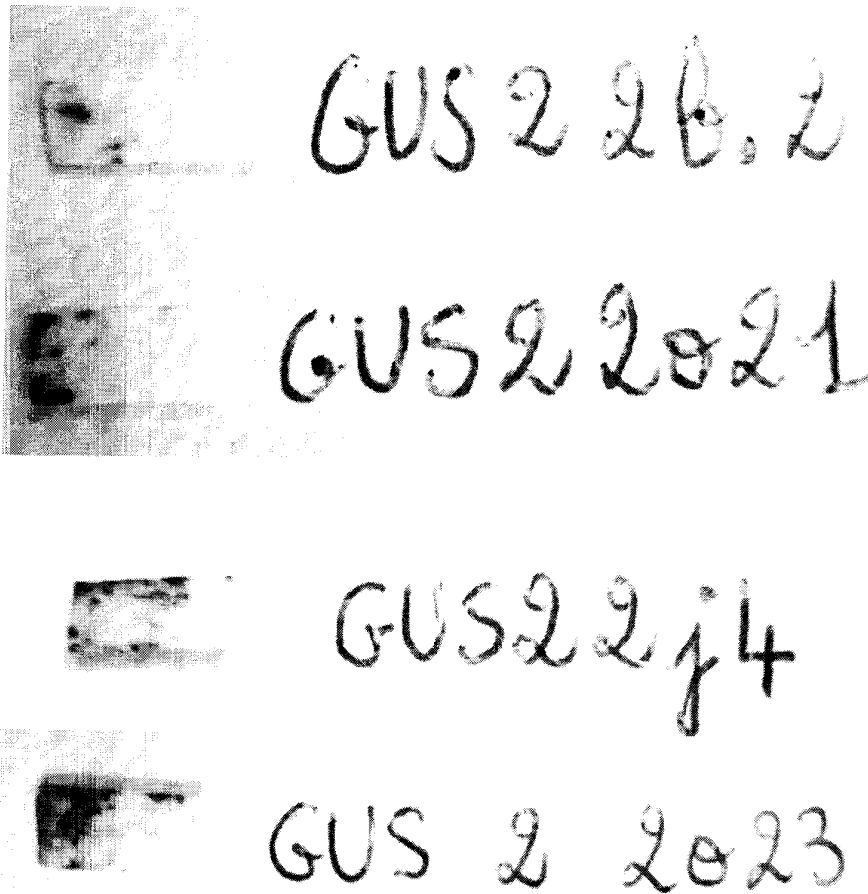


FIGURE 6

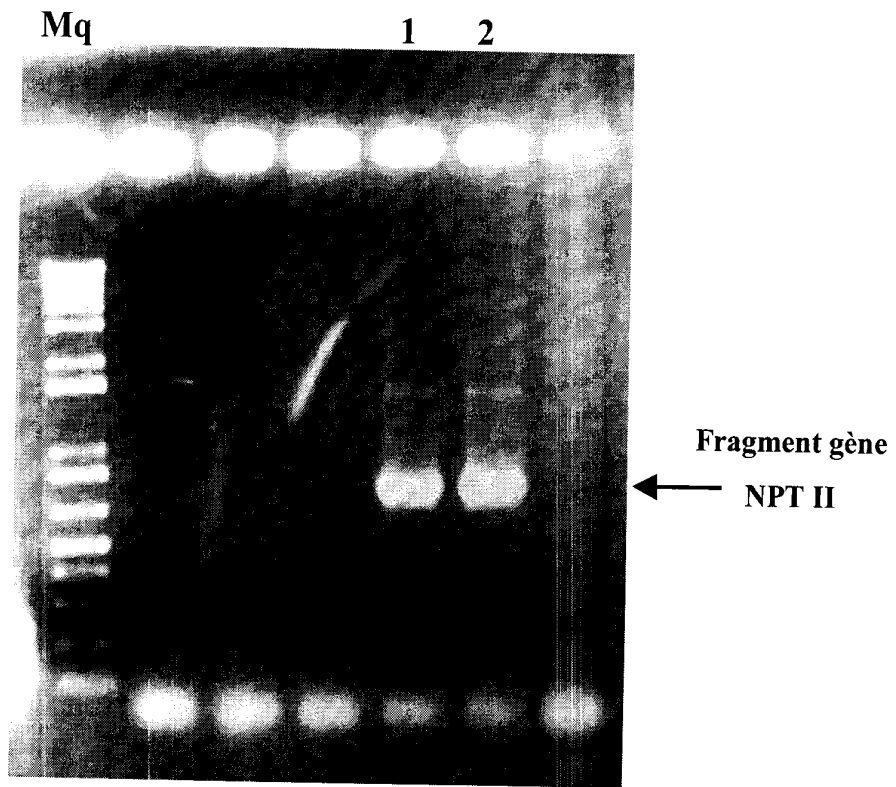


FIGURE 7



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 685586
FR 0608693

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X,D	HIRSIKORPI MERJA ET AL: "Agrobacterium-mediated transformation of round leaved sundew (Drosera rotundifolia L.)" PLANT SCIENCE (SHANNON), vol. 162, no. 4, avril 2002 (2002-04), pages 537-542, XP008077550 ISSN: 0168-9452	1,3,4,6, 13,14, 18,20	C12N15/09 C12P21/00 A01H5/00 C12N15/82
Y	* le document en entier *	2,7-9, 11,12	
X	----- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; mars 2004 (2004-03), KITKO R D ET AL: "Drosera capensis (Droseraceae) a model carnivorous plant." XP008077532 Database accession no. PREV200400439018 * abrégé * & JOURNAL OF THE PENNSYLVANIA ACADEMY OF SCIENCE, vol. 77, no. March, mars 2004 (2004-03), page 137, 80TH ANNUAL MEETING OF THE PENNSYLVANIA ACADEMY OF SCIENCE; MONROEVILLE, PA, USA; MARCH 26-28, 2004 ISSN: 1044-6753 * abrégé *	1,3,4,6, 13,14, 18,20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12N
Y	----- WO 99/38990 A (TRUSTEES RUTGERS THE STATE UNI [US]; RASKIN ILYA [US]) 5 août 1999 (1999-08-05) * abrégé; revendications 1-7 * * page 8, ligne 24 - ligne 29 * ----- -/--	2,11,12	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12 avril 2007		Gurdjian, Didier	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 3



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 685586
FR 0608693

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y,D	PRATELLI REJANE ET AL: "A new catch in the SNARE" TRENDS IN PLANT SCIENCE, vol. 9, no. 4, avril 2004 (2004-04), pages 187-195, XP002428634 ISSN: 1360-1385 * figures 1,2; tableaux 1,2 *	12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	WO 2004/011657 A (UNIV LAVAL [CA]; MICHAUD DOMINIQUE [CA]; RIVARD DANIEL [CA]; ANGUENOT) 5 février 2004 (2004-02-05) * revendications 1-18 *	7-9	
A	KAMARAINEN, T. ; LAINE, K.; HOHTOLA, A.; JALONEN, J.: "Production of 7-methyljuglone in Drosera rotundifolia in vitro and ex vitro" ACTA HORTICULTURAE, vol. 616, 2003, pages 507-517, XP008077528	1,3,4,6, 13,14, 18,20	
A	SCHULZE WALTRAUD ET AL: "Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant Nepenthes" PLANT JOURNAL, vol. 17, no. 6, mars 1999 (1999-03), pages 637-646, XP002418467 ISSN: 0960-7412	1,3,4,6, 13,14, 18,20	
A,D	WO 02/057408 A2 (UNIV RAMOT [IL]; ZILBERSTEIN AVIAH [IL]; EILENBERG HAVIVA [IL]; SCHUST) 25 juillet 2002 (2002-07-25) * abrégé; revendications 16,17 *	1,3,4,6, 13,14, 18,20	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12 avril 2007		Gurdjian, Didier	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

3
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 685586
FR 0608693

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A,D	GALLIE DANIEL R ET AL: "Signal transduction in the carnivorous plant <i>Sarracenia purpurea</i> . Regulation of secretory hydrolase expression during development and in response to resources" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 115, no. 4, décembre 1997 (1997-12), pages 1461-1471, XP002428642 ISSN: 0032-0889 * abrégé * -----	1,3,4,6, 13,14, 18,20	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		12 avril 2007	Gurdjian, Didier
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 3

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0608693 FA 685586**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 12-04-2007

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9938990 A	05-08-1999	AU 768697 B2	08-01-2004
		AU 2570199 A	16-08-1999
		CA 2319732 A1	05-08-1999
		EP 1049792 A1	08-11-2000
		JP 2002501755 T	22-01-2002
		US 6096546 A	01-08-2000
WO 2004011657 A	05-02-2004	AU 2003250692 A1	16-02-2004
		BR 0313015 A	05-07-2005
		CA 2492501 A1	05-02-2004
		CN 1671849 A	21-09-2005
		EP 1525319 A1	27-04-2005
		JP 2005534301 T	17-11-2005
		MX PA05001035 A	08-06-2005
		NZ 538431 A	28-07-2006
WO 02057408 A2	25-07-2002	CA 2440317 A1	25-07-2002
		EP 1463811 A2	06-10-2004
		JP 2004526431 T	02-09-2004
		US 2004078842 A1	22-04-2004