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 6 :		(11) Numéro de publication internationale:
C12N 15/82, C07K 14/435, C12N 15/62, C12Q 1/68, A01H 5/00	**A1**	**WO 99/24594**
		(43) Date de publication internationale: 20 mai 1999 (20.05.99)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02375

(22) Date de dépôt international: 6 novembre 1998 (06.11.98)

(30) Données relatives à la priorité:
97/14263 7 novembre 1997 (07.11.97) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)*: FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint Cyr au Mont d'Or (FR). DEROSE, Richard [US/FR]; 31, rue du Bois Guillaume, F-91000 Evry (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR).

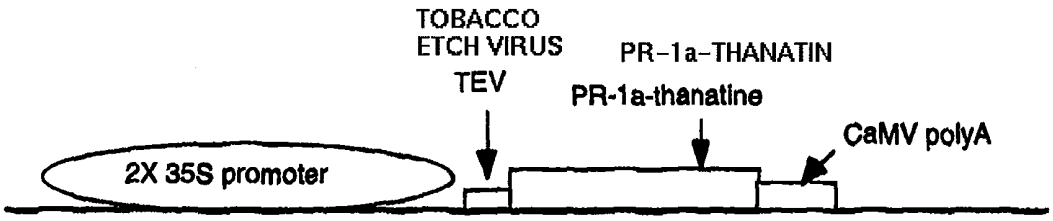
(74) Mandataire: TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro - DPI, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).

(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: GENE CODING FOR THANATIN, VECTOR CONTAINING SAME AND RESULTING TRANSFORMED DISEASE-RESISTANT PLANTS

(54) Titre: GENE CODANT POUR LA THANATINE, VECTEUR LE CONTENANT ET PLANTES TRANSFORMEES OBTENUES RESISTANTES AUX MALADIES



(57) Abstract

The invention concerns a DNA sequence coding for thanatin, a vector containing it for transforming a host organism and the transformation method. More particularly the invention concerns the transformation of plant cells and plants, the drosomycin produced by the plants providing them with resistance to diseases, particularly of fungal origin.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour la thanatine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation. L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, la drosomycine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

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.

AL	Albanie	**ES**	Espagne	**LS**	Lesotho	**SI**	Slovénie
AM	Arménie	**FI**	Finlande	**LT**	Lituanie	**SK**	Slovaquie
AT	Autriche	**FR**	France	**LU**	Luxembourg	**SN**	Sénégal
AU	Australie	**GA**	Gabon	**LV**	Lettonie	**SZ**	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	**GB**	Royaume-Uni	**MC**	Monaco	**TD**	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	**GE**	Géorgie	**MD**	République de Moldova	**TG**	Togo
BB	Barbade	**GH**	Ghana	**MG**	Madagascar	**TJ**	Tadjikistan
BE	Belgique	**GN**	Guinée	**MK**	Ex-République yougoslave de Macédoine	**TM**	Turkménistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Grèce			**TR**	Turquie
BG	Bulgarie	**HU**	Hongrie	**ML**	Mali	**TT**	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	**IE**	Irlande	**MN**	Mongolie	**UA**	Ukraine
BR	Brésil	**IL**	Israël	**MR**	Mauritanie	**UG**	Ouganda
BY	Bélarus	**IS**	Islande	**MW**	Malawi	**US**	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	**IT**	Italie	**MX**	Mexique	**UZ**	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	**JP**	Japon	**NE**	Niger	**VN**	Viet Nam
CG	Congo	**KE**	Kenya	**NL**	Pays-Bas	**YU**	Yougoslavie
CH	Suisse	**KG**	Kirghizistan	**NO**	Norvège	**ZW**	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**NZ**	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			**PL**	Pologne		
CN	Chine	**KR**	République de Corée	**PT**	Portugal		
CU	Cuba	**KZ**	Kazakstan	**RO**	Roumanie		
CZ	République tchèque	**LC**	Sainte-Lucie	**RU**	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Soudan		
DK	Danemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Suède		
EE	Estonie	**LR**	Libéria	**SG**	Singapour		

Gène codant pour la thanatine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues résistantes aux maladies

La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour la thanatine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, la thanatine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, le problème consiste à trouver de telles substances qui pourront non seulement être produites par des plantes transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

La thanatine est un peptide produit par induction bactérienne sur *Psodius sp*, de préférence *maculiventris* adultes. Sa préparation par induction bactérienne est décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, de même que ses propriétés antifongiques et antibactériennes *in vitro*.

Après avoir d'abord identifié le gène de la thanatine, on a également trouvé qu'il pouvait être inséré dans un organisme hôte, en particulier une plante, pour exprimer la thanatine et conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques et aux maladies d'origine bactérienne, apportant une solution particulièrement avantageuse au problème énoncé ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet un fragment d'acide nucléique codant pour la thanatine, un gène chimère comprenant ledit fragment codant pour la thanatine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier dans les plantes et un vecteur pour la transformation des organismes hôtes contenant ce gène chimère, et l'organisme hôte transformé. Elle concerne aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide

nucléique codant pour la thanatine et une plante résistante aux maladies contenant la dite cellule, en particulier régénérée à partir de cette cellule. Elle concerne enfin un procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies dans lequel on insère un gène codant pour la thanatine au moyen d'un vecteur approprié.

Par thanatine, on entend selon l'invention tout peptide comprenant essentiellement la séquence peptidique de 11 acides aminés décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, ainsi que les séquences homologues équivalentes dans lesquelles certains acides aminés sont remplacés par des acides aminés différents mais équivalents sur des sites n'induisant pas de modification substantielle de l'activité antifongique ou antibactérienne de la dite séquence homologue. Par séquence peptidique comprenant essentiellement la séquence peptidique décrite.dans la demande de brevet FR 2 733 237, on entend non seulement la séquence définie par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), mais également une telle séquence comprenant à l'une ou l'autre de ses extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à son expression et ciblage dans un organisme hôte, en particulier une cellule végétale ou une plante.

La thanatine est un peptide de formule (I):

Xaa- Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys- Xab

(I)

dans laquelle:

Xaa est NH2 ou un reste variable de séquence comprenant de 1 à 10 acides aminés, et

Xab est OH ou un reste variable de séquence comprenant de 0 à 5 acides aminés.

De manière avantageuse, lorsque Xaa comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gly, Ser, Lys, Pro et Val. Lorsque Xab comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gln, Arg et Met.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les 2 résidus cystéines du peptide de formule (I) forment un pont disulfure intramoléculaire.

La présente invention concerne donc d'abord un fragment d'acide nucléique, en particulier d'ADN, codant pour la thanatine définie ci-dessus. Il peut s'agir selon l'invention d'un fragment isolé de *Psodius sp*, de préférence *maculiventris*, ou encore un fragment dérivé, adapté pour l'expression de la thanatine dans l'organisme hôte où le peptide sera exprimé, le fragment d'acide nucléique peut être obtenu selon les méthodes standards d'isolation et de purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont notamment décrites par Ausubel & coll.

Selon la présente invention, on entend par « fragment d'acide nucléique » une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN,

en particulier ADNc, notamment double brin.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour la thanatine comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

De manière avantageuse, le fragment d'acide nucléique selon l'invention comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

Par « homologue », on entend selon l'invention un fragment d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par l'identificateur de séquence n° 1 ou n° 2 et codant pour la thanatine. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence décrite par l'identificateur de séquence n° 1 ou n° 2 et l'homologue peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit d'un fragment d'ADN de taille inférieure à 100 acides nucléiques, réalisable par synthèse. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement neutres, c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de la thanatine résultante.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végéales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour la thanatine tel que défini ci-dessus.

Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou suppérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production de thanatine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, ou de préférence des cellules végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le

tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant pour la thanatine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

Le fragment d'acide nucléique selon l'invention peut également comprendre une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour la thanatine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-thanatine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques de l'organisme hôte permet la libération de la thanatine. Cette protéine fusionnée à la thanatine peut être un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de la thanatine de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou un promoteur inducible par les pathogènes comme PR-la du tabac ou AoPRT-L d'asperge, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par

exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.constituée d'une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909. Comme peptide de transit, on peut citer le peptide signal du gène PR-1a du tabac décrit par Cornelissen & coll., réprésenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 3.

La séquence codant pour la protéine de fusion peptide signal PR-1a-thanatine et cette protéine de fusion sont également partie de la présente invention. Cette séquence est notamment décrite par l'identificateur de séquence n° 5, plus particulièrement la partie codante de cette séquence, correspondant aux bases 12 à 164.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon la présente invention, le gène chimère peut également comprendre un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques, comme la pénicilline, ou encore un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de réplication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes

hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri *d'Agrobacterium rhizogenes*.

D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant une quantité efficace d'un gène chimère comprenant une séquence codante pour la thanatine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4.536.475, US 5.464.763, US 5.177.010, US 5.187.073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4.945.050, US 5.036.006, US 5.100.792, US 5,371.014, US 5.478.744, US 5.179.022, US 5,565.346, US 5.484.956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5.489.520, US 5.510.318, US 5,204.253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques ou bactériennes. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour la thanatine peut être intégrée avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, la thanatine étant efficace contre des maladies fongiques telles que celles causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophtora cinnamomi*.

Le gène chimère pourra comprendre également et de manière avantageuse au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

La séquence d'ADN codant pour la thanatine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences codant pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour la thanatine, d'autres séquences hétérologues codant pour d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour la thanatine et au moins une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour la thanatine, l'autre portant un gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Parmi les séquences codant pour d'autres peptides antifongiques, on peut citer celle codant pour la drosomycine, décrite dans la demande de brevet FR 2 725 992 et par Fehlbaum & coll. (1994), et dans la demande de brevet non publiée FR 97 09115 déposée le 24 juillet 1997, ou celle codant pour l'androctonine décrite dans la demande de brevet FR 2 745 004 et dans la demande de brevet non publiée FR 97 10362 déposée le 20 août 1997.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, la préparation de la séquence codant pour la thanatine, du gène chimère, du vecteur d'intégration et des plantes transformées. Les figures 1 à 5 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

Exemple 1: Construction des gènes chimères

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

pRPA-MD-P: Création d'un plasmide contenant le signal peptide du gène PR-1a du tabac.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 1 et Oligo 2 ci-après, sont hybridés à 65 °C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

Oligo 1: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 2: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 1 et l'Oligo 2, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabriquant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *NaeI* et cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les même enzymes de restriction. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour peptide signal du gène PR-1a du tabac (SEQ ID NO 3).

pRPA-PS-PR1a-than: Création d'une séquence codant pour la thanatine fusionée au signal peptide PR-1a sans région non transcrite en 3'.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 3 et Oligo 4 selon les conditions opératoires décrites pour pRPA-MD-P.

Oligo 3: 5' GGTTCCAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA CG 3'

Oligo 4: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCACATCC TCTGGCACTT ACCAGTCCTC CTGTTGCAGT AGATGATTGG CACTGGC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 3 et l'Oligo 4, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabriquant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. Cet oligonucléotide double brin contenant la partie codante de la thanatine (SEQ ID NO 1) est ensuite cloné directement

dans le plasmide pRPA-MD-P qui a été digéré avec l'enzyme de restriction *NaeI*. L'orientation correcte du clone obtenu est vérifiée par séquençage. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine située entre les sites de restriction *NcoI* à l'extrémité N-terminale et *ScaI*, *SacII* et *BamHI* à l'extrémité C-terminale (SEQ ID NO 4).

pRPA-RD-229: Création d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant la la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine.

Le plasmide pRTL-2 GUS, dérivé du plasmide pUC-19, a été obtenu auprès du Dr. Jim Carrington (Texas A&M University, non décrit). Ce plasmide dont la structure schématique est représentée sur la figure 1, contient le promoteur CaMV 35S dupliqué isolé du virus de la mosaïque du choux fleur (Promoteur CaMV 2x35S; Odell & coll., 1985) qui dirige l'expression d'un ARN contenant séquence non traduite en 5' du virus etch du tabac (TEV 5' UTR; Carrington & Freed, 1990), le gène de la β-glucuronidase de *E. coli* (GUS Jefferson & coll., 1987) suivi du site de polyadenylation de l'ARN 35S de CaMV (CaMV polyA; Odell & coll., 1985).

Le plasmide pRTL-2 GUS est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-PS-PR1a-than est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine est purifié. Les deux fragments d'ADN purifiés sont ensuite liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétise une protéine de fusion PR-1a-thanatine. La structure schématique de cette cassette d'expression est représentée sur la figure 2. « PR-1a-thanatine » représente la région codante pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine de pRPA-RD-230. La thanatine est transportée vers la matrice extra-cellulaire de la plante par l'action du peptide signal PR-1a.

pRPA-RD-195: Création d'un plasmide contenant un site de clonage multiple modifié.

Le plasmide pRPA-RD-195 est un plasmide dérivé du pUC-19 qui contient un site de clonage multiple modifié. Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 5 et Oligo 6 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 5: 5' AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC
GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG
CATGC 3'

Oligo 6: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT
GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGG 3'

L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase 1 de *E. coli*. On obtient un vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La structure schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 3.

pRPA-RD-232: Introduction de la cassette d'expression de PR-1a-thanatine de pRPA-RD-229 dans pRPA-RD-195.

Le plasmide pRPA-RD-230 est digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-thanatine est purifié. Le fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RP-195 qui a été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII* et déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau.

pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).

Le gène de tolérence au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et un site de clonage multiple entre ces deux gènes.

La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 4. Sur cette figure, "nos" représente le site de polyadenylation de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NPT II" représente le gène de la néomycine phosphotransphérase du transposon Tn5 de *E. coli* (Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la mosaïque du choux fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-174.

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 7 et Oligo 8 ci-après,

sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 7: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC
CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG
TACCTGGTTC AGG 3'

Oligo 8 : 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA
CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT
GTGGCCTGAC TGG 3'

L'oligonucléotide double brin hybridé (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *XmaI*, et le grand fragment d'ADN est purifié. Les deux fragents d'ADN obtenus sont ensuite liés.

On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 5 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la même signification que pour la figure 4.

pRPA-RD-235: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour la thanatine dirigée vers la matrice extracellulaire.

La plasmide pRPA-RD-232 est digéré avec les enzymes de restriction *PmeI* et *AscI* et le fragment d'ADN contenant le gène de PR-1a-thanatine est purifié. Le plasmide pRPA-RD-184 est digéré avec les même enzymes de restriction. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-thanatine est ensuite liée dans pRPA-RD-184. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine qui conduit à l'expression de la thanatine dans la matrice extracellulaire de la plante.

Exemple 2: Tolérance aux herbicides des tabacs transformés.

2.1- Transformation

Le vecteurs pRPA-RD-235 est introduit dans la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

2.2- Régénération

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants

foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et régénérées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

2.3- Tolérance au bromoxynil

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-235. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de Pardner correspondant à 0,2 kg de matière active bromoxynil par hectare.

Toutes les plantes montrant une tolérance complète au bromoxynil sont ensuites employées dans différentes expérimentations qui montrent que l'expression de la thanatine par les plantes transformées les rend résistantes aux agressions fongiques.

REFERENCES

Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ. Wiley & Sons.

Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. **11**:369-385.

Carrington and Freed (1990). J. Virol. **64**:1590-1597.

Ehret-Sabatier & coll. (1996) The Journal of Biological Chemistry, **271**, **47**, 29537-29544.

Horsch & coll. (1985). Science **227**:1229-1231.

Jefferson & coll. (1987). EMBO J. **6**:3901-3907.

Komari & coll. (1986). J. Bacteriol. **166**:88-94.

Rothstein & coll. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **45**: 99-105.

Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. **263**:6310-6314.

Odell, J.T. & coll. (1985). Nature **313**:810-812.

REVENDICATIONS

1. Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour la thanatine.

2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une séquence nucléotidique de type ADN.

3. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique de type ADN comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

4. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 3, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique de type ADN comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour la thanatine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-thanatine ».

6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce que la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.

7. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 6, caractérisé en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.

8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 5 (SEQ ID NO 5), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

9. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend la partie codante de la SEQ ID NO 5, correspondant aux bases 12 à 164.

10. Protéine de fusion « protéine-thanatine », caractérisée en ce que la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.

11. Protéine de fusion selon la revendication 10, caractérisée en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.

12. Protéine de fusion selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est décrite par l'identificateur de séquence n° 5 (SEQ ID NO 5).

13. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les plantes, caractérisé en ce que la séquence codante comprend au moins un fragment d'ADN codant pour la thanatine tel que défini dans les revendications 1 à 9.

14. Gène chimère selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les cellules végétales et les plantes.

15. Gène chimère selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce qu'il comprend également un marqueur de sélection.

16. Vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte craractérisé en ce qu'il comprend au moins une origine de réplication et au moins un gène chimère tel que défini dans les revendications 13 à 15.

17. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression.

18. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide.

19. Organismes hôtes transformés, caractérisés en ce qu'ils contiennent une quantité efficace d'un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

20. Organisme hôte transformé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit de cellules végétales ou de plantes.

21. Organisme hôte transformé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une plante contenant des cellules transformées.

22. Organisme hôte selon la revendication 21, caractérisé en ce que la plante est régénérée à partir des cellules transformées.

23. Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

24. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cellule végétale transformée selon la revendication 23.

25. Plante transformée selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle est résistante aux maladies causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophtora cinnamomi*.

26. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle est issue de la culture et/ou du croisement des plantes selon l'une des revendications 24 ou 25.

27. Graines de plantes transformées selon l'une des revendications 24 à 26.

28. Procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce que l'on insère dans ledit organisme hôte au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon l'une des revendication 13 à 15.

29. Procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies fongiques ou bactériennes, caractérisé en ce que l'on insère dans la plante au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.

30. Procédé selon l'une des revendications 28 ou 29, caractérisé en ce que le gène chimère est inséré au moyen d'un vecteur selon l'une des revendications 16 à 18.

1/2

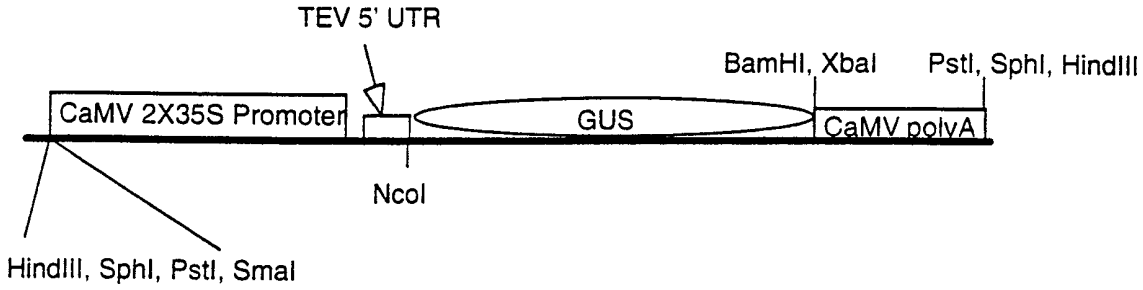


Fig. 1

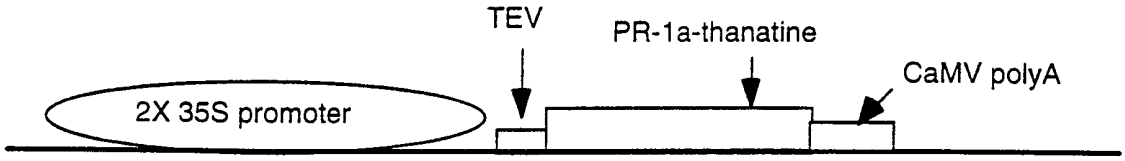


Fig. 2

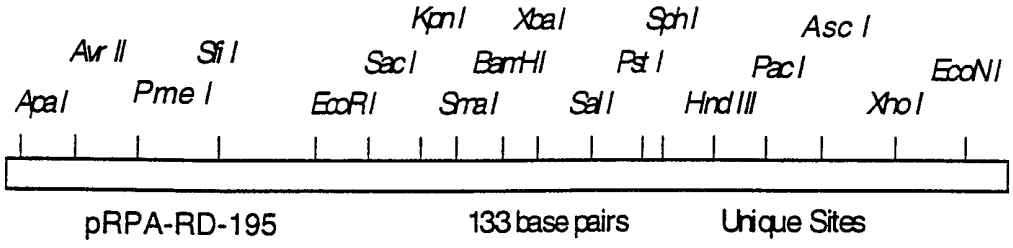


Fig. 3

2/2

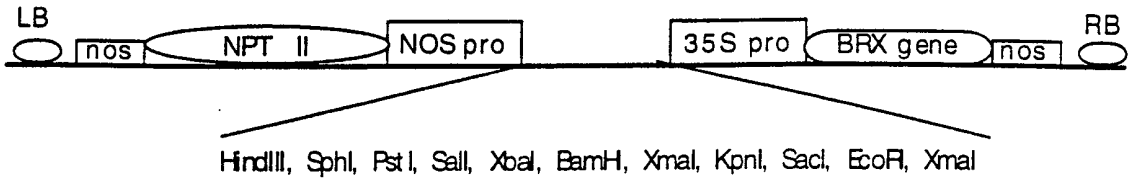

LB
nos
NPT II
NOS pro
35S pro
BRX gene
nos
RB
HindIII, SphI, PstI, SalI, XbaI, BamH, XmaI, KpnI, SacI, EcoRI, XmaI

Fig. 4

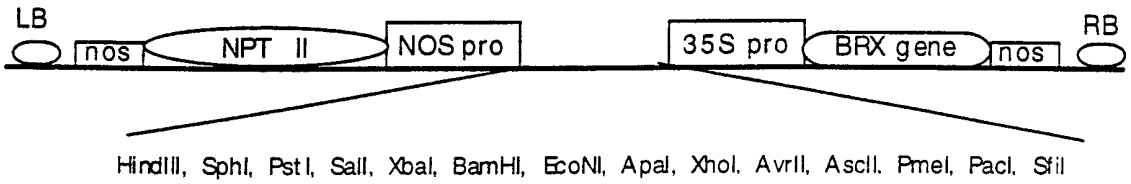

LB
nos
NPT II
NOS pro
35S pro
BRX gene
nos
RB
HindIII, SphI, PstI, SalI, XbaI, BamHI, EcoNI, ApaI, XhoI, AvrII, AscII, PmeI, PacI, SfiI

Fig. 5

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 13

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 33 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:1..33

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

```
ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT AAG TGC                          33
Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys
 1               5                  10
```

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 63 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:1..63

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

```
GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT      48
Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly
 1               5                  10                  15

AAG TGC CAG AGG ATG                                                 63
Lys Cys Gln Arg Met
            20
```

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 98 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:1..63

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

```
GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT        48
Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly
  1               5                  10                  15

AAG TGC CAG AGG ATG TGAGCTCGGC GAGGCGAACG TGTCGACGGA TCCGG           98
Lys Cys Gln Arg Met
            20
```

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 106 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:12..101

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

```
GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT      50
             Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu
               1               5                  10

CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT       98
Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg
     15                  20                  25

GCC GGCGA                                                          106
Ala
 30
```

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 197 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:12..164

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

```
GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT        50
             Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu
               1               5                  10

CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT        98
Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg
     15                  20                  25

GCC GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT       146
Ala Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr
 30                  35                  40                  45

GGT AAG TGC CAG AGG ATG TGAGCTCGGC GAGGCGAACG TGTCGACGGA TCC          197
Gly Lys Cys Gln Arg Met
                50
```

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 75 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 1"

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

```
GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA      60

CTCTTCTTCT TTTCC                                                       75
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 72 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG 60

AAAGATGGAA GC 72

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 44 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléeotide synthétique 3"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGTTCCAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA CG 42

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 97 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 4"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCACATCC TCTGGCACTT ACCAGTCCTC 60

CTGTTGCAGT AGATGATTGG CACTGGC 87

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 85 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 5"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC 60

CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC 85

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 110:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 66 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucl,ique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 6"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC 60

TAGAGG 66

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 93 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 7"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT 60

GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG 93

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 93 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 8"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGGCC 60

GCGTTTAAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG 93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No
PCT/FR 98/02375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/62 C12Q1/68 A01H5/00

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 6 C12N C07K C12Q 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.
A	FR 2 733 237 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 25 October 1996 cited in the application page 4, ligne 20-21; page 8, ligne 16 - page 9, ligne 11; revendications	1-30
A	FEHLBAUM, P., ET AL.: "structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, February 1996, pages 1221-1225, XP002071913 see the whole document	1-30

-/--

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

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 February 1999	25/02/1999

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

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte .onal Application No
PCT/FR 98/02375

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 732 345 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 4 October 1996 see page 5, line 15 - line 21 ---	1-30
A	EP 0 798 381 A (NAT INST AGROBIO RES) 1 October 1997 page 6, ligne 8-20; examples, revendications ---	1-30
A	WO 90 14098 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 29 November 1990 page 3, page 6, ligne 5 -18; page 6, ligne 34 - page 7, ligne9; examples, revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM P ET AL: "INSECT IMMUNITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 52, 30 December 1994, pages 33159-33163, XP002061373 see the whole document -----	1-30

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte onal Application No
PCT/FR 98/02375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2733237 A	25-10-1996	NONE	
FR 2732345 A	04-10-1996	NONE	
EP 0798381 A	01-10-1997	JP 9252779 A	30-09-1997
		JP 10028487 A	03-02-1998
		CA 2198920 A	26-09-1997
WO 9014098 A	29-11-1990	AU 5662990 A	18-12-1990

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le internationale No
PCT/FR 98/02375

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/62 C12Q1/68 A01H5/00

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 6 C12N C07K C12Q 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 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
A	FR 2 733 237 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 25 octobre 1996 cité dans la demande page 4, ligne 20-21; page 8, ligne 16 - page 9, ligne 11; revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM, P., ET AL.: "structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, février 1996, pages 1221-1225, XP002071913 voir le document en entier --- -/--	1-30

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

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

° Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
18 février 1999	25/02/1999

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	Holtorf, S

1

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

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e internationale No
PCT/FR 98/02375

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec,le cas échéant. l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 732 345 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 4 octobre 1996 voir page 5, ligne 15 - ligne 21	1-30
A	EP 0 798 381 A (NAT INST AGROBIO RES) 1 octobre 1997 page 6, ligne 8-20; examples, revendications	1-30
A	WO 90 14098 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 29 novembre 1990 page 3, page 6, ligne 5 -18; page 6, ligne 34 - page 7, ligne9; examples, revendications	1-30
A	FEHLBAUM P ET AL: "INSECT IMMUNITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 52, 30 décembre 1994, pages 33159-33163, XP002061373 voir le document en entier	1-30

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 98/02375

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2733237	A	25-10-1996	AUCUN		
FR 2732345	A	04-10-1996	AUCUN		
EP 0798381	A	01-10-1997	JP	9252779 A	30-09-1997
			JP	10028487 A	03-02-1998
			CA	2198920 A	26-09-1997
WO 9014098	A	29-11-1990	AU	5662990 A	18-12-1990