

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 848 571

②① N° d'enregistrement national : **02 15696**

⑤① Int Cl⁷ : C 12 N 15/83, A 01 H 5/00, 5/10, C 12 N 15/53

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 12.12.02.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 18.06.04 Bulletin 04/25.

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) : BAYER CROPSCIENCE S.A Société
anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : FERULLO JEAN MARC, SAILLAND
ALAIN, SCHMITT FREDERIC et PAGET ERIC PAUL
CHRISTIAN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BAYER CROPSCIENCE S.A..

⑤④ CASSETTE D'EXPRESSION CODANT POUR UNE HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET
PLANTES CONTENANT UN TEL GENE TOLERANTES AUX HERBICIDES.

⑤⑦ La présente invention concerne une nouvelle cassette
d'expression comprenant une séquence d'acide nucléique
codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase
(HPPD) et son utilisation pour l'obtention de plantes résis-
tantes à certains herbicides.

FR 2 848 571 - A1



Cassette d'expression codant pour une Hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et plantes contenant un tel gène tolérantes aux herbicides.

La présente invention concerne une nouvelle cassette d'expression comprenant
5 une séquence d'acide nucléique codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

Les hydroxy-phényl pyruvate dioxygénases sont des enzymes qui catalysent la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate (HPP) en homogentisate. Cette réaction a lieu en présence de fer (Fe^{2+}) en présence d'oxygène (Crouch N.P. &
10 al., Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, 1997).

On connaît par ailleurs certaines molécules inhibitrices de cette enzyme, qui viennent se fixer à l'enzyme pour inhiber la transformation de l'HPP en homogentisate. Certaines de ces molécules ont trouvé un emploi comme herbicides, dans la mesure où l'inhibition de la réaction dans les plantes conduit à un blanchiment
15 des feuilles des plantes traitées, et à la mort des dites plantes (Pallett K. E. et al. 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). De tels herbicides ayant pour cible l'HPPD décrits dans l'état de la technique sont notamment les isoxazoles (EP 418 175, EP 470 856, EP 487 352, EP 527 036, EP 560 482, EP 682 659, US 5 424 276) en particulier l'isoxaflutole (IFT), herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631), en particulier la
20 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195), en particulier la sulcotrione ou la mésotrione, ou encore les pyrazolines.

Pour rendre les plantes tolérantes aux herbicides, on dispose de trois stratégies
25 principales, (1) la détoxification de l'herbicide par une enzyme venant transformer l'herbicide, ou son métabolite actif, en produits de dégradation non toxique, comme par exemple les enzymes de tolérance au bromoxynil ou au basta (EP 242 236, EP 337 899) ; (2) la mutation de l'enzyme cible en une enzyme fonctionnelle moins sensible à l'herbicide, ou son métabolite actif, comme par exemple les enzymes de tolérance au
30 glyphosate (EP 293 356, Padgett S. R. & al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991, FR 2 736 926) ; ou (3) la surexpression de l'enzyme sensible, de manière à produire dans la plante des quantités suffisantes d'enzyme cible au regard des constantes cinétiques de

cette enzyme vis à vis de l'herbicide de manière à avoir suffisamment d'enzyme fonctionnelle, malgré la présence de son inhibiteur.

C'est cette troisième stratégie qui a été décrite pour obtenir avec succès des plantes tolérantes aux inhibiteurs d'HPPD (WO 96/38567), étant entendu que pour la première fois une stratégie de simple surexpression de l'enzyme cible sensible (non mutée) était employée avec succès pour conférer aux plantes une tolérance à un niveau agronomique à un herbicide. Un niveau agronomique de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD a également été obtenue avec des HPPD chimères (WO 99/24586), et même amélioré avec des HPPD mutées dans leur partie C-terminale (WO 99/24586).

Alors que les HPPD de plantes sont des enzymes à localisation cytoplasmique (Garcia, I., et al. 1997. Biochem. J. 325 : 761-769), il a également été montré que la meilleure tolérance était obtenue lorsque l'HPPD exogène était accumulée dans les plastides, plus particulièrement les chloroplastes.

Différentes cassettes d'expression susceptible d'améliorer le niveau de tolérance des plantes transformées ont été décrites avec différents éléments de régulations, et notamment des promoteurs dits « lumière dépendants » (WO 99/25842) ou pour les plantes monocotylédones avec une séquence de régulation promotrice comprenant la combinaison du promoteur H3C4 d'histone de maïs et du premier intron de l'actine de riz (WO 99/34005).

La présente invention concerne donc une nouvelle cassette d'expression comprenant dans le sens de la transcription liées de manière fonctionnelle une séquence de régulation promotrice fonctionnelle dans les cellules végétales ou les plantes, une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD et une séquence de régulation terminatrice, fonctionnelle dans les cellules végétales ou les plantes, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice est une séquence d'acide nucléique choisie parmi les séquences de régulation promotrice du virus de plante CsVMV (Cassava Vein Mosaic Virus).

Selon un des aspect de la présente invention, la cassette d'expression comprend un activateur de transcription ("enhancer") ou un intron entre la séquence de régulation promotrice et la séquence » codant pour une HPPD.

Des séquences de régulation promotrice de CsVMV sont décrites dans la demande de brevet WO 97/48819, en particulier la séquence de régulation promotrice comprenant l'une des séquences nucléotidiques représentées par l'une des SEQ ID NO

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16 de la demande de brevet WO 97/48819, plus particulièrement la séquence d'acide nucléique représentée par la SEQ ID NO 3 de la demande de brevet WO 97/48819.

Selon un premier mode préférentiel de réalisation de l'invention, la séquence
5 de régulation promotrice comprend dans le sens de la transcription les séquences d'acide nucléique X, Y et Z telles que définies respectivement par les SEQ ID 1, 2 et 3 de la présente demande de brevet.

De manière préférentielle, la séquence de régulation promotrice est représentée par la SEQ ID NO 4 de la présente demande de brevet.

10 Selon un deuxième mode préférentiel de réalisation de l'invention, la séquence de régulation promotrice comprend dans le sens de la transcription les séquences d'acides nucléiques X, Y, Y et Z telles que définies précédemment. La séquence de régulation promotrice comprenant la duplication de la séquence d'acide nucléique Y sera appelée double CsVMV.

15 De manière préférentielle, la séquence d'acide nucléique du double CsVMV est représentée par la SEQ ID NO 5 de la présente demande de brevet.

Par HPPD, on entend selon l'invention toute enzyme HPPD native, mutée ou chimère, présentant l'activité HPPD. De nombreuses HPPD sont décrites dans la littérature, notamment les HPPD de bactéries comme *Pseudomonas*
20 (Rüetschi & al., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, WO 96/38567), de plantes comme d'*Arabidopsis* (WO 96/38567, Genbank AF047834) ou de carotte (WO 96/38567, Genbank 87257), de *Coccicoides* (Genbank COITRP), ou de mammifères comme la souris ou le cochon.

Par HPPD mutée, on entend selon l'invention les HPPD mutées pour obtenir
25 des propriétés de tolérance aux herbicides inhibiteurs d'HPPD améliorées par rapport à l'HPPD native correspondante. De manière avantageuse, l'HPPD mutée est une HPPD mutée dans sa partie C-terminale telle que décrite dans la demande de brevet WO 99/24585.

Par HPPD chimère, on entend une HPPD comprenant des éléments provenant
30 de différentes HPPD, notamment les HPPD chimères décrites dans la demande de brevet WO 99/24586.

De manière avantageuse, l'HPPD est une HPPD de *Pseudomonas fluorescens* (WO 96/38567).

De manière avantageuse, l'HPPD mutée comprend la mutation W336 telle que décrite dans la demande de brevet WO 99/24585.

Il est connu dans la littérature que l'ajout d'une séquence codante correspondant à un peptide supplémentaire en N-ou C-terminal de la protéine va
5 permettre le transport de celle ci vers un autre compartiment cellulaire que le cytoplasme où l'ARNm est traduit. Ce peptide dit peptide signal ou peptide de transit selon les cas, selon sa séquence va permettre le routage vers cet autre compartiment qui peut être par exemple le plaste (membrane ou stroma), le lumen du thylakoïde ou la membrane du thylakoïde, vers le réticulum endoplasmique, vers la vacuole, la paroi,
10 les mitochondries, sans que cela soit exhaustif

Le peptide de transit permet d'adresser l'HPPD chimère dans les plastes, plus particulièrement les chloroplastes, la protéine de fusion peptide de transit/HPPD étant clivée entre le peptide de transit et l'HPPD chimère au passage de la membrane des plastes. Le peptide de transit peut être simple, comme un peptide de transit d'EPSPS
15 (décrit dans le brevet US 5,188,642) ou un peptide de transit de celui de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (ssu RuBisCO) d'une plante, éventuellement comprenant quelques acides aminés de la partie N-terminale de la ssu RuBisCO mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la séquence N-terminale
20 d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la ssu RuBisCO de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la ssu RuBisCO de maïs fusionnée au peptide de transit de la ssu RuBisCO de maïs tel que décrit avec
25 sa séquence codante dans le brevet EP 508 909.

Par séquence protéique signal, on entend selon l'invention tout peptide signal ou de transit permettant l'adressage de l'HPPD dans les compartiments cellulaires autres que le cytoplasme ou les plastes (en particulier chloroplastes).

Le rôle de telles séquences protéiques sont notamment décrites dans le numéro
30 38 de la revue Plant molecular Biology (1998) consacré en grande partie aux transports des protéines dans les différents compartiments de la cellule végétale (Sorting of proteins to vacuoles in plant cells pp 127-144 ; the nuclear pore complex pp145-162 ; protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes pp 91-

207 ; multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts pp 209-221 ; mitochondrial protein import in plants pp 311-338).

De manière avantageuse, la séquence protéique signal permet l'adressage de l'HPPD vers le compartiment vacuolaire (vacuole). De tels peptides sont largement
5 décrits dans la littérature (Neuhaus J.M. and Rogers J.C Sorting of proteins to vacuoles in plant cells Plant molecular Biology 38 : 127-144, 1998).

De préférence, le peptide vacuolaire est le peptide vacuolaire de la protéine décrite dans J.M. Ferullo *et al* (Plant Molecular Biology 33 : 625-633, 1997), fusionné à la partie C-terminale de l'HPPD.

10 La présente invention concerne également les séquences capables de s'hybrider de manière sélective avec la séquence d'acide nucléique ci-dessus, les séquences homologues à la séquence ci-dessus, les fragments des dites séquences, et les séquences qui diffèrent des séquences ci-dessus mais qui du fait de la dégénérescence du code génétique, codent pour la même protéine de fusion.

15 Selon la présente invention, on entend par « séquence d'acide nucléique » une séquence nucléotidique ou polynucléotide, pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin.

Par « séquence capable de s'hybrider de manière sélective », on entend selon l'invention les séquences qui s'hybrident avec les séquences ci-dessus à un niveau
20 supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres séquences d'ADN présentes, notamment d'autres ADNc présentes dans une banque d'ADNc. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences définies par les identifiant de séquence (SEQ ID) ci-dessus selon l'invention est généralement 10
25 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la sonde avec des éléments radioactifs, comme le ³²P. L'hybridation sélective est généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ
30 50°C-60°C). L'hybridation peut bien entendu être effectuée selon les méthodes usuelles de l'état de la technique (notamment Sambrook & al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual).

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 codant pour la protéine de fusion selon l'invention. 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 selon l'invention et l'homologue correspondant peuvent être importantes. 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 et de préférence neutres, c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de la protéine de fusion.

Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul & al., 1993, J. Mol. Evol. 36 :290-300 ; Altschul & al., 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-10).

Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre polypeptides ou protéines sont également connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple le « package » UWGCG et le programme BESTFIT pour calculer les homologies (Deverexu & al., 1984, Nucleic Acid Res. 12, 387-395).

Par « fragments », on entend selon l'invention des fragments des séquences d'ADN selon l'invention, c'est à dire les séquences ci-dessus pour lesquelles des parties ont été déléetées mais qui conservent la fonction des dites séquences.

L'invention a encore pour objet l'utilisation de la cassette d'expression selon l'invention dans un procédé pour la transformation des plantes, comme gène marqueur ou comme séquence codante permettant de conférer à la plante une tolérance aux herbicides inhibiteurs d'HPPD. Cette cassette d'expression peut bien entendu également être utilisée en association avec d'autre(s) gène(s) marqueur(s) et/ou séquence(s) codante(s) pour une ou plusieurs propriétés agronomiques.

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
5 canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice selon l'invention, 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
10 la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed, ou du virus de la mosaïque du « figwort » (Figwort Mosaic Virus, US 5 994 521) ou encore des introns, en particulier des intron favorisant l'expression des gènes dans les plantes monocotylédones tels que l'intron 1 du gène de l'actine de riz tel que décrit dans la demande de brevet WO 99/34005, ou
15 l'intron adh1 de maïs

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*, d'origine virale, comme par exemple le terminateur du CaMV 35S, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un
20 terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/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 répllication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un
25 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
30 développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le vecteur comprend outre le

gène chimère selon l'invention, un autre gène chimère codant pour un autre gène d'intérêt. Il peut s'agir d'un gène codant pour un marqueur de sélection comme d'un gène conférant à la plante transformée de nouvelles propriétés agronomiques, ou d'un gène d'amélioration de la qualité agronomique de la plante transformée.

5 Marqueurs de Sélection

Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles), des gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

Gènes d'intérêt

Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une résistance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies, etc. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128.

20 Tolérance herbicide

Parmi les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, on peut citer le gène *Bar* conférant une tolérance au bialaphos, le gène codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible comme le glyphosate et ses sels (US 4,535,060, US 4,769,061, US 5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435, FR 2 736 926), le gène codant pour la glyphosate oxydoréductase (US 5,463,175).

Parmi les gènes codant pour une EPSPS appropriée conférant une résistance aux herbicides ayant l'EPSPS comme cible, on citera plus particulièrement le gène codant pour une EPSPS végétale, en particulier de maïs, présentant deux mutations 102 et 106, décrit dans la demande de brevet FR 2 736 926, dénommé ci-dessous EPSPS double mutant, ou encore le gène codant pour une EPSPS isolée d'*Agrobacterium* décrit par les SEQ ID 2 et ID 3 du brevet US 5,633,435, dénommé

ci-dessous CP4.

- Dans les cas des gènes codant pour EPSPS, et plus particulièrement pour les gènes ci-dessus, la séquence codant pour ces enzymes est avantageusement précédée par une séquence codant pour un peptide de transit, en particulier pour le peptide de transit tel que défini ci-dessus.

Résistance aux Insectes

- Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

Résistance aux Maladies

- Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et WO 99/09189), la drosomicine (WO 99/02717) ou la thanatine (WO 99/24594).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun & al., 1993 ; Panabières & al., 1995).

25 Modification de la qualité

- On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés (Korit, A.A. & al., Eur. J. Biochem. (1991) 195, 329-334 ; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire,

permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera
5 plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants: l'androctonine, la drosomicine ou la thanatine.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins une séquence
10 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, des protoplastes ou
15 des tissus 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
20 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 cellules végétales ou les plantes transformées et contenant un gène chimère selon l'invention. De préférence, le gène chimère est intégré de manière stable dans le génome des cellules végétales ou des
25 plantes.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, les cellules végétales ou les plantes comprennent outre le gène chimère selon l'invention, un autre gène chimère codant pour un autre gène d'intérêt tel que défini ci-dessus.

Les différents gènes chimères peuvent être intégrés dans le génome de
30 l'organisme hôte par transformation au moyen d'un vecteur selon l'invention comprenant les différents gènes chimères tels que définis ci-dessus.

Les différents gènes chimères peuvent également être intégrés de manière stable dans le génome de l'organisme hôte par co-transformation au moyen de

plusieurs vecteurs, chacun comprenant au moins un gène chimère devant être intégré dans le génome de l'organisme hôte.

La présente invention a encore pour objet les plantes transformées, dans le génome desquelles au moins un gène chimère selon l'invention est intégré de manière stable. Les plantes selon l'invention contiennent des cellules transformées telles que définies ci-dessus, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées ci-dessus. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend 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, lesdites plantes ou graines comprenant au moins un gène chimère selon l'invention.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les plantes transformées comprennent outre le gène chimère selon l'invention, un autre gène chimère codant pour un autre gène d'intérêt tel que défini ci-dessus.

Les différents gènes chimères dans les plantes transformées selon l'invention peuvent provenir soit de la même plante transformée parente, et dans ce cas la plante est issue d'un seul procédé de transformation/régénération avec les différents gènes chimères contenus dans un même vecteur ou par co-transformation au moyen de plusieurs vecteurs. Elle peut également être obtenue par le croisement de plantes parentes contenant chacune au moins un gène chimère, l'une des plantes parentes comprenant au moins un gène chimère selon l'invention.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre, le riz et

le maïs ou dicotyledones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, la betterave, le trèfle, etc.

L'invention a aussi pour objet un procédé de désherbage sélectif de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD notamment un herbicide
5 définit auparavant, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

La présente invention concerne également un procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines ou des plantes
10 transformées avec le gène chimère selon l'invention, lequel procédé consiste à appliquer dans la dite surface du champ une dose toxique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformée avec le dit gène chimère selon l'invention.

15 La présente invention concerne également un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention avec un gène chimère selon l'invention lequel procédé consiste à semer les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une dose toxique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible
20 l'HPPD défini ci-dessus en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

Par « sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes
25 transformées », on entend selon l'invention que les plantes comprenant la cassette d'expression selon l'invention, soumises à une application d'une dose d'herbicide toxique pour les mauvaises herbes, présentent une phytotoxicité légère ou nulle. Par dose toxique pour les mauvaises herbes, on entend selon l'invention une dose d'application de l'herbicide pour laquelle les mauvaises herbes sont tuées. Par
30 phytotoxicité légère on entend selon l'invention un pourcentage de feuilles blanchies inférieur à 25%, préférentiellement inférieur à 10%, plus préférentiellement inférieur à 5%. Il est entendu également selon la présente invention que l'application de la même dose toxique sur une plante autrement comparable non transformée, c'est à dire ne

comprenant pas la cassette d'expression selon l'invention, conduirait à observer sur ladite plante des symptômes de phytotoxicité supérieurs à ceux observés pour la plante transformée comprenant la cassette d'expression selon l'invention.

Dans les deux procédés ci-dessus, l'application de l'herbicide ayant pour cible l'HPPD peut être faite selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

Par herbicide au sens de la présente invention on entend une matière active herbicide seule ou associée à un additif qui modifie son efficacité comme par exemple un agent augmentant l'activité (synergiste) ou limitant l'activité (en anglais safener).

10 Les herbicides inhibiteurs d'HPPD sont en particulier définis auparavant. Bien entendu, pour leur application pratique, les herbicides ci-dessus sont associée de manière en soi connue aux adjuvants de formulations utilisés habituellement en agrochimie.

Dans les trois procédés cités ci-dessus, les herbicides inhibiteurs d'HPPD sont choisis parmi les isoxazoles en particulier l'isoxaflutole, les dicétonitriles en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones, en particulier la sulcotrione ou la mésotrione, ou les pyrazolines.

15

Lorsque la plante transformée selon l'invention comprend un autre gène de tolérance à un autre herbicide (comme par exemple un gène codant pour une EPSPS mutée ou non conférant à la plante une tolérance au glyphosate), ou lorsque la plante transformée est naturellement insensible à un autre herbicides, le procédé selon l'invention peut comprendre l'application simultanée ou décalée dans le temps d'un inhibiteur d'HPPD en association avec ledit herbicide, par exemple le glyphosate.

20

L'invention a encore pour objet l'utilisation du gène chimère codant pour une protéine de fusion selon l'invention comme gène marqueur au cours du cycle "transformation-régénération" d'une espèce végétale et sélection sur l'herbicide ci-dessus.

25

Lorsque le gène chimère selon l'invention est combiné dans un même vecteur à un autre gène chimère codant pour une protéine d'intérêt conférant de nouvelles propriétés agronomiques autre qu'un gène de tolérance herbicide (résistance aux insectes, résistance aux maladies, modification de la qualité), l'application de l'herbicide inhibiteur d'HPPD sur les plantes transformées et leurs descendances,

30

permet de sélectionner dans les champs les plantes issues d'un croisement entre une plante parente comprenant les deux gènes chimères et une plante non transformée qui auront conservé les gènes chimères.

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989) ou dans Molecular cloning, T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook,1982.

15 Description des figures :

Figure 1: extrait de la carte du plasmide pILTAB 357

Figure 2: séquence du promoteur CsVMV (de Hind III à Xba I, 539 bp)

Figure 3: carte du plasmide pRD 254

Figure 4: carte du plasmide pRD 257

20 Figure 5: carte du plasmide pCH 10

Figure 6: carte du plasmide pCH 27

Figure 7: carte du plasmide pCH 27 PCR 1

Figure 8: carte du plasmide pCH 27 PCR 2

Figure 9: carte du plasmide pCH 45

25 Figure 10: carte du plasmide pCH 13 D

Figure 11: carte du plasmide pCH 43 D

Figure 12: carte du plasmide pCH 55 D.

Figure 13: Essai de germination *in vitro* de descendants T1 de lignées de tabacs transformées avec pCH 43 K

30 Figure 14: Essai de germination *in vitro* de descendants T1 de lignées de tabacs transformées avec pCH 55 K

Tous les plasmides décrits ci-dessous ont été mobilisés dans la souche E.coli DH5 alpha, à l'exception de pTVK 291 et ses dérivés qui sont mobilisés dans C2110.

Exemple 1: Clonage de la séquence du promoteur CsVMV dans le vecteur de clonage multiple pRD 254

Le plasmide pILTAB 357 fourni par le The Scripps Research Institute, La Jolla, USA (Figure 1), contient les éléments suivants dans un vecteur pBIN 19 (Clontech):

- promoteur CsVMV (séquence donnée Figure 2, SEQ ID NO 4)
- site de clonage multiple
- terminateur NOS

Trois régions ont été définies dans la séquence du promoteur CsVMV, dénommées CsVMV X, CsVMV Y, et CsVMV Z.

CsVMV X : de la position 9 à la position 227 (SEQ ID NO 1, longueur 218 bp)

CsVMV Y : de la position 228 à la position 395 (SEQ ID NO 2, longueur 167 bp)

CsVMV Z : de la position 396 à la position 522 (SEQ ID NO 3, longueur 126 bp)

Dans la séquence originale du promoteur CsVMV, les régions X et Y sont adjacentes, ainsi que les régions Y et Z.

Le vecteur de clonage pRD 254 correspond au vecteur commercial pBlueScript II SK (-) (Clontech) mutagénisé pour remplacer le site unique Sca I contenu dans le gène ApR gene par un site Pvu II (Figure 3).

Les 532 bp contenues entre les sites Hind III et Xba I de pILTAB 357 a été cloné dans le vecteur de clonage pRD 254 pour obtenir le plasmide pRD 257 (Figure 4).

Exemple 2: Insertion de la séquence du CsVMV dans une cassette d'expression OTP-HPPD

pCH 10 est un plasmide de base pUC 19 qui contient une cassette d'expression OTP/HPPD. Cette cassette comprend les composants suivants:

- promoteur histone H3C4 de maïs
- premier intron du gène d'actine de riz
- peptide de transit optimisé (OTP)
- HPPD
- NOS.

La SEQ ID NO 6 en annexe décrit la séquence de pCH 10 comprise entre les sites NcoI et XbaI.

Dans pCH10, la région promoteur histone de maïs + intron d'actine de riz été excisée avec les enzymes de restriction XhoI et Not I, pour être remplacée par la

5 séquence du promoteur CsVMV contenue dans pRD 257 comme suit:

1. Ouverture de pRD 257 avec Not I, remplissage de l'extrémité NotI avec une polymérase de Klenow et excision du fragment de promoteur avec XhoI.
2. Purification du fragment de 560 bp –XhoI-NotI contenant la séquence du promoteur CsVMV.
- 10 3. Ouverture de pCH 10 avec NcoI, remplissage de l'extrémité NcoI avec une polymérase de Klenow et excision du fragment promoteur histone de maïs + intron d'actine de riz avec XhoI.
4. Purification de la molécule acceptrice 4591 bp-XhoI-NcoI(filled in).
5. Ligation des deux fragments purifiés pour obtenir pCH 27 (Figure 6).

15

Example 3: Construction d'un promoteur chimère double-CsVMV

A partir de pCH 27, une version chimère du promoteur CsVMV a été préparée qui contient une duplication de la région interne Y. A cette fin, deux séries (Set1 et Set2 d'oligonucléotides ont été préparées, correspondant aux séquences suivantes:

20

Set1

Universal M13 primer: GAGGAAACAG CTATGACCAT GATT (SEQ ID NO 7)

CsVMV63: GGACTAGTGA CACGGAAAAA TATAAAAGG (SEQ ID NO 8)

25

Set 2

CsVMV222: GGACTAGTGA AGACGTAAGC ACTGACG (SEQ ID NO 9)

CsVMV3': AAGCCATGGG CCGCTTTAGA (SEQ ID NO 10)

Une réaction PCR a été conduite avec pCH 27 comme matrice et les oligonucléotides du set1 comme amorces pour obtenir un produit PCR de 493-bp

30 correspondant à la Figure 7 (PCR pCH27-1).

Une réaction PCR a été conduite avec pCH 27 comme matrice et les oligonucléotides du set2 comme amorces pour obtenir un produit PCR de 332-bp correspondant à la Figure 8 (PCR pCH27-2).

Un plasmide comprenant la région CsVMV Y dupliquée a été obtenu comme suit

1. Restriction de PCR pCH27-1 avec XhoI et SpeI
2. Restriction de pCR pCH 27-2 avec SpeI et NcoI
- 5 3. Restriction de pCH 27 avec XhoI et SpeI et purification du plasmide accepteur de 4591-bp
4. Ligation des 3 fragments pour generrer pCH 45 (Figure 9).

Example 4: Integration de la cassette d'expression dans un vecteur-tDNA

10 d'*Agrobacterium*

pCH 13 D (Figure 10) est un plasmide navette construit dans le laboratoire pour être recombiné dans le plasmide superbinaire pTVK 291 (Jun et al., 1987). La recombinaison entre les sites COS uniques présents sur les deux plasmides conduit à une molécule circulaire unique correspondant à la fusion des deux plasmides.

- 15 Le fragment PvuII-PvuII de 2791 bp contenant la cassette CsVMV-OTP-HPPD-NOS a été excisé de pCH 27 et cloné dans le site PmeI de pCH 13D pour donner pCH 43 D (Figure 11).

- 20 Le fragment XbaI-PvuII de 2821 bp contenant la cassette double CsVMV XYYZ-OTP-HPPD-NOS a été excisé de pCH 45 et cloné entre les sites AvrII and PmeI de pCH 13D pour donner pCH 55 D (Figure 12).

- La recombinaison entre pCH 43 D (ou respectivement pCH 55 D) et le plasmide superbinaire pTVK 291 a été obtenue par croisement triparental avec DH5 alpha [pCH 43 D] (resp. DH5 alpha [pCH 55 D]), C2110 [pTVK 291], et la souche helper JC 2073. Le plasmide résultant est dénommé pCH 43 K (resp. pCH 55 K). La
- 25 souche obtenue, C2110 [pCH 43 K] (resp. C2110 [pCH 55 K]) a été sélectionnée sur milieu LB contenant les 3 antibiotiques gentamycine, kanamycine et acide nalidixique. L'acide nalidixique permet la sélection de C2110 contre DH5 alpha ou JC2073; puisque C2110 contient une résistance chromosomale à l'acide nalidixique qui ne peut être transférée aux autres souches durant le croisement. L'association de la
- 30 gentamycine et de la kanamycine permet la sélection des bactéries contenant pCH 43 D (resp. pCH 55 D) et pTVK 291. De plus, pCH 43 D (resp. pCH 55 D) ne peut se répliquer dans C2110, à moins d'avoir été recombiné avec pTVK 291, puisque C2110

contient l'origine de réplication RK2 supportée par pTVK 291, mais pas l'origine de réplication pBR 322 supportée par pCH 43 D (resp. pCH 55 D).

Le plasmide recombiné a ensuite été transféré dans la souche d'*Agrobacterium* LBA 4404 par un deuxième croisement triparental. La souche résultante LBA 4404 [pCH 43 K] (resp. LBA 4404 [pCH 55 K]) a été sélectionnée sur milieu AB (selectif pour *Agrobacterium*) contenant de la kanamycine et de la gentamycine.

Exemple 5: Transformation de tabacs par *Agrobacterium tumefaciens* avec les cassettes d'expression

La transformation du tabac, *Nicotiana tabacum* var. *Petit Havana* par *Agrobacterium* a été effectuée selon les procédures standard d'infection et de régénération de disques foliaires et sélection par la kanamycine.

Dix lignées de tabac ont été obtenues avec LBA 4404 [pCH 43 K], et 13 lignées de tabac ont été obtenues avec LBA 4404 [pCH 55 K]. Les plantes régénérées ont été transférées en serre. Après floraison et autopolinisation, les graines T1 de chaque lignée ont été recueillies. Les lignées transformées avec LBA 4404 [pCH 43 K] ont été ensuite référencées 43.1, 43.2, 43.3, 43.4, 43.5, 43.6, 43.7, 43.8, 43.9 et 43.11. Les lignées transformées avec LBA 4404 [pCH 55 K] ont été ensuite référencées 55.1, 55.2, 55.6, 55.8, 55.11, 55.12, 55.13, 55.14, 55.15, 55.16, 55.17, 55.18 et 55.19.

Exemple 6: Test de germination in vitro

Dans ce test, des graines de *Petit Havana* sauvage ont été employées comme contrôle négatif. Comme contrôle positif, les graines de lignées transgéniques PBD6 T2 ont été employées comme référence. Cette lignée transgénique comprend une cassette d'expression codant pour une HPPD sous le contrôle d'un promoteur de la petite sous unité de la RuBisCO de tournesol (*Helianthus annuus*) Cette lignée référencée 7.1, décrite dans la demande de brevet WO 99/25842 a montré la meilleure tolérance à l'IFT jamais décrite à notre connaissance dans le tabac. Des boîtes de petri carrées contenant 16 puits carrés de 30 mm de profondeur ont été remplies avec un milieu Murashige and Skoog ½ autoclavé (Difco) contenant 15 g/L de phyto Agar (Difco), 10 g/L de sucrose, et soit 0 ou 8 ppm de DKN [lequel] (4 mL dans chaque puit). Les capsules de tabac contenant T1 ont été aspergées avec de l'éthanol à 70%

puis ouvertes avec des instruments stériles pour obtenir des graines stériles. Pour chaque lignée et chaque concentration en DKN, 25 graines ont été placées à la surface d'un milieu solide pour germination dans une chambre de culture (24°C, 16h jour/ 8h nuit). Après une période de croissance de 10 jours, une note de 0 à 4 a été attribuée à chaque plantule ayant poussé avec 8 ppm de DKN, selon la grille de notation suivante:

taille:

- taille normale (comparée aux plantules non traitées de la même lignée): 2

points

- taille « naine » (cotyledons non développés): 0 point

10 - taille intermédiaire: 1 point

Symptomes de phytotoxicité:

- aucuns: 2 points

- intermédiaire (quelques parties vertes): 1 point.

- complètement brûlées ou blanchies: 0 point

15 - pas de germination: non comptée

- complètement blanche (plantes non transgéniques): non comptées

La somme des scores de toutes les plantules de la même lignée, exprimée en pourcentage de la notation totale des lignées contrôles 7.1, sont reportées sur la Figure 13. Les numéros entre parenthèses indiquent le nombre de plantules notées pour une ligne donnée après élimination des plantes transgéniques ou des graines non germées. Le test a été répété une fois par deux personnes différentes. Les notes observées avec les lignées transgéniques transformées avec LBA 4404 [pCH 55 K] sont donnés sur la Figure 14. L'absence de données correspond à des cellules contaminées. Dans ce test, les notes observées pour toutes les lignées testées ont été trouvées entre 2 et 9 fois plus
25 grandes que celles de la lignée contrôle.

Example 7: Evaluation en serre en pré-émergence

Dans ce test, les mêmes contrôles positifs et négatifs de l'exemple 6 ont été employés. Approximativement 100 graines T1 de chaque lignée ont été semées sur 3
30 plateaux (20 cm longueur x 15 cm largeur x 5 cm profondeur) remplis de vermiculite préalablement imbibée avec une solution nutritive standard 20:20:20 (3 plateaux par lignée). Deux plateaux ont été aspergés avec une solution d'IFT à deux concentrations (0.1 g/L et 0.2 g/L respectivement). L'appareil pour asperger a été calibré pour délivrer

une dose d'IFT correspondant à 50 g/ha pour le premier plateau et 100g/ha pour le second. Le troisième plateau est resté non traité (contrôle).

Durant les 3 premiers jours suivant le semis les plateaux ont été couverts avec une feuille de matière plastique transparente recouverte par une feuille de papier blanche de manière à réduire l'intensité lumineuse. Après le troisième jour, les plateaux ont été découverts et les plantules laissées croître pendant 7 jours supplémentaires avec arrosage quotidien avec une solution nutritive. Pour chaque plateau, le niveau de phytotoxicité et le retard à la croissance par rapport au plateau non traité a été estimé et rapporté dans le Tableau ci-dessous. Les plantules T1 non transgéniques apparaissant complètement blanches sur les plateaux traités sont comptés pour déterminer le nombre de locus indépendants pour l'intégration des tDNA dans chaque lignée. Les résultats sont présentés sur les Tableaux 1 et 2 ci-dessous.

Tableau 1: Lignées transformées avec pCH 43 K

	Dose IFT g/ha	7.1	43.1	43.2	43.3	43.4	43.5	43.6	43.7	43.8	43.9	43.11
Phytotoxicité	50	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	100	-	-	-	+	+	+	++	+	+	+	-
Retard Croissance	50	++	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
	100	+++	+	+	++	+	+	++	++	+	++	-
Nb de Locus			1	1	1	1	1	1	1	1	1	2

15

Tableau 2: Lignées transformées avec pCH 55 K

	Dose IFT g/ha	55.1	55.2	55.6	55.8	55.11	55.12	55.13	55.14	55.15	55.16	55.17	55.18	55.19
Phytotoxicité	50	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	100	+	+	++	++	-	+	+	+	++	+	+	+	++
Retard	50	-	-	+	++	+	++	++	-	++	-	-	-	-
	100	-	-	++	+++	++	+++	+++	-	+++	+	+	+	-
Nb de locus		1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1

Phytotoxicité:

-: nulle

+: légère (5-25 % surface de feuilles blanchies)

++: intermédiaire (25-50% surface de feuilles blanchies)

+++ : intense (>50% surface de feuilles blanchies)

20

Retard de croissance (comparé aux contrôles non traités):

-: nul

+: léger (cotylédons complètement développés, première feuilles retardée)

++: intermédiaire (cotylédons développés, pas de première feuilles visibles)

5 +++ : intense (cotylédons non développés).

Exemple 8 : Insertion de la séquence du CsVMV dans une cassette d'expression -
ActinOS intron-OTP-HPPD

10

pCH 10 (figure 5) est un plasmide de base pUC 19 qui contient une cassette
d'expression OTP/HPPD. Cette cassette comprend les composants suivants:

promoteur histone H3C4 de maïs (Mc Elroy et al., 1990, Plant Cell 2(2) :
163-171).

15 premier intron du gène d'actine de riz (Mc Elroy et al., , MGG 231(1) : 150-
160).

peptide de transit optimisé (OTP)

HPPD

NOS.

20 La SEQ ID NO 6 décrit la séquence de pCH 10 comprise entre les sites NcoI
et XbaI.

Dans pCH10, la région promoteur histone de maïs a été excisé par
les enzymes de restriction XhoI et SacII, pour être remplacé par la séquence
du CsVMV contenue dans le pRD257. Le fragment du CsVMV a été
25 obtenu par digestion de pRD257 par XhoI et SacII. La ligation de la
molécule acceptrice 5107bp (XhoI-SacII) et de la séquence du CsVMV
566bp (XhoI-SacII) a donné pCH26 (figure 15)

30 **Exemple 9:** Intégration de la cassette d'expression dans un vecteur-tDNA
d'*Agrobacterium*

pCH 21 D (Figure 16) est un plasmide navette construit dans le laboratoire
pour être recombinaison dans le plasmide superbinaire pTVK 291 (Jun et al., 1987). La

recombinaison entre les sites COS uniques présents sur les deux plasmides conduit à une molécule circulaire unique correspondant à la fusion des deux plasmides.

Le fragment PacI-PvuII de 3197bp contenant la cassette CsVMV-intron actin-OTP-HPPD-Nos a été excisé de pCH26 et cloné dans les sites

- 5 PacI-MscI de pCH21D pour donner pCH31D (Figure 17).

Le fragment PacI-PvuII de 2679bp contenant la cassette CsVMV-OTP-HPPD-Nos a été excisé de pCH27 et cloné dans les sites PacI-MscI de pCH21D pour donner pCH32D (Figure 18).

- La recombinaison entre pCH 31 D (ou respectivement pCH 32 D) et le
 10 plasmide superbinaire pTVK 291 a été obtenue par croisement triparental avec DH5 alpha [pCH 31 D] (resp. DH5 alpha [pCH 32 D]), C2110 [pTVK 291], et la souche helper JC 2073. Le plasmide résultant est dénommé pCH 31 K (resp. pCH 32 K). La souche obtenue, C2110 [pCH 31 K] (resp. C2110 [pCH 32 K]) a été sélectionnée sur milieu LB contenant les 3 antibiotiques gentamycine, kanamycine et acide
 15 nalidixique. L'acide nalidixique permet la sélection de C2110 contre DH5 alpha ou JC2073; puisque C2110 contient une résistance chromosomale à l'acide nalidixique qui ne peut être transférée aux autres souches durant le croisement. L'association de la gentamycine et de la kanamycine permet la sélection des bactéries contenant pCH 31 D (resp. pCH 32 D) et pTVK 291. De plus, pCH 31 D (resp. pCH 32 D) ne peut
 20 se répliquer dans C2110, à moins d'avoir été recombiné avec pTVK 291, puisque C2110 contient l'origine de réplication RK2 supportée par pTVK 291, mais pas l'origine de réplication pBR 322 supportée par pCH 31 D (resp. pCH 32 D).

- Le plasmide recombiné a ensuite été transféré dans la souche d'*Agrobacterium* LBA 4404 par un deuxième croisement triparental. La souche résultante LBA 4404
 25 [pCH 31 K] (resp. LBA 4404 [pCH 32 K]) a été sélectionnée sur milieu AB (selectif pour *Agrobacterium*) contenant de la kanamycine et de la gentamycine.

- Le plasmide pCH 68 (figure 19) ayant servi de contrôle à été construit de manière similaire (non détaillée) en utilisant l'élément promoteur du gène actine-1 de riz (Mc Elroy et al., 1990) et l'intron de ce même gène (McElroy et al, 1991). puis intégré dans
 30 un vecteur t-DNA d'*agrobactérium* selon la méthode décrite dans cet exemple pour donner la souche d'*Agrobactérium* LBA 4404 [pCH 68 k].

Exemple 10 : transformation de maïs par *Agrobacterium tumefaciens* avec les cassettes d'expression.

La transformation du génotype de maïs A188 à été effectuée selon la méthode décrite
 5 par Ishida, Y. et al., Nature Biotechnology, 1996, 14, 745-750. En résumé des
 embryons immature de maïs sont co-cultivés en présence des agrobacéries puis les
 cals obtenus sont sélectionnés en présence de phosphinotricine (5 mg/l).
 L'enracinement des plantes est réalisé en tube sur milieu gélosé en présence de DKN
 (100mg/l) et les plantes tolérantes sont acclimatées en serre puis fécondées avec du
 10 maïs A188 non transgénique afin de produire des graines.

Un échantillon de graines de la descendance obtenue est semé en serre (*voir protocole
 détaillé dans l'exemple YY*) et traité en pré-émergence avec l'IFT à 200g/ha afin de ne
 sélectionner que lignées transformées ayant une tolérance minimale.

Les lignées C92A1, C99A1, L72A1, L74Q1, L78A2, L80A1, L80C3, L89B2,
 15 F85B3, L72H1, L74A4 ont ainsi été obtenues avec LBA4404 [pCH31 k].

Les lignées C111D3, C111H1, C112A1, C112A3, F100A2, F100D7, F102G3 ont été
 obtenues avec LBA4404 [pCH32 k].

Les lignées C62B2, F79-1A1, C60-1A1, L45B2, L54C1, C114B3M, C123B4M,
 C58C1F, C60-1B1M, L102F1M, L45B2M, L53A1M ont été obtenues avec
 20 LBA4404 [pCH68 k].

Exemple 11 : Mesure de la tolérance du Maïs à l'IFT appliqué en pré-
 émergence en serre

25 Afin de mesurer la tolérance à l'IFT appliqué en pré-émergence des lignées de maïs
 produites des semis en barquettes ont été réalisés. Des barquettes (15 x 20 x 5 cm)
 remplies de sable (granulométrie 3) ont été préparées et le sable a été mouillé par
 arrosage. 15 graines de chaque lignée ont été semées à une profondeur de 0.5 cm dans
 30 chaque barquette. Après semis les barquettes ont été recouvertes d'une plaque de
 verre pour assurer un taux d'humidité propice à la levée.

Le lendemain du semis une barquette de chaque lignée utilisée a été traitée à l'aide
 d'une tour de traitement calibrée afin de délivrer un volume correspondant à 500 l/ha

sur chaque barquette. Les doses suivantes ont été pulvérisées : NT : eau pure, IFT 200 g/ha (soit 200g de matière active pour 500 litres), IFT 400 g/ha ; IFT 600 g/ha, IFT 800 g/ha.

Après traitement les barquettes sont à nouveau recouvertes d'une plaque de verre.

- 5 La plaque de verre est retirée après trois jours afin de permettre le développement des plantules.

L'arrosage des plantules est réalisé dans les plateaux contenant les barquettes tous les deux à trois jours en fonction des besoins des plantes. Une fois par semaine une solution nutritive complète (Fertigofol 313[®] à 2.5l/ha) est ajoutée à l'eau
10 d'arrosage.

La mesure de la hauteur des plantes est effectuée 30 jours après le traitement au niveau du cornet.

La figure 20 montre les résultats obtenus. La réduction de taille est calculée pour chaque dose par rapport au contrôle non traité. La valeur représente pour chaque
15 dose la moyenne des mesures effectuées sur les plantes des lignées utilisées pour chaque construction (respectivement pCH31D et pCH68), voir tableau 3. Les lignées utilisées sont toutes hétérozygotes pour le gène HPPD introduit.

Des plantes de maïs A188 sauvages ont été utilisées comme contrôle négatif. Dès la dose d'IFT 200g/ha toutes les plantes sauvages ont été détruites par le traitement
20 herbicide.

Tableau 3

Plasmide	Promoteur	Lignée	nbre total de graines semées	% de germination	% de plantes tolérantes toutes doses cumulées sauf non traité
-	-	A188	75	100	0
pCH31D	CsVMV	C99A1	75	100	39
pCH31D	CsVMV	F85B3	75	100	27
pCH31D	CsVMV	L72H1	75	100	53
pCH31D	CsVMV	L74A4	75	100	32
pCH31D	CsVMV	L78A2	75	100	41
pCH68	R.Actin	C62B2	75	100	27
pCH68	R.Actin	F79-1A1	75	100	37
pCH68	R.Actin	L45B2	75	100	32
pCH68	R.Actin	L54C1	75	100	49

5

Exemple 12 : Traitement en plein champ de lignées tolérantes à l'IFT.

Les lignées transformées soit avec pCH31D (lignées C92A1, C99A1, L72A1, L74Q1, L78A2, L80A1, L80C3, L89B2), soit avec pCH32D (lignées C111D3, C111H1, C112A1, C112A3, F100A2, F100D7, F102G3), soit avec pCH68 (lignées C114B3, C123B4, C58C1, C60-1B1, L102F1, L45B2, L53A1, L54C1) ont été testées en champ. Les graines ont été plantées à une profondeur de 2 cm sur deux rangées (2 m de long, 20 plantes par rangées).

15 L'irrigation des plantes a été effectuée par goutte à goutte au pied des plantes sans mouillage des parties foliaires.

Les plantes ont été traitées en post-émergence au stade V3-V4 (3 à 4 feuilles) avec l'IFT à 250g/ha additionné d'un pour cent d'huile de colza . Les résultats ont été mesurés 14 jours après traitements.

20 La phytotoxicité a été évaluée en mesurant la surface foliaire présentant des symptômes de blanchiment et/ou de nécroses. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats du traitement à l'IFT en plein champ

Plasmide	Nombre de lignées testées	Nombre de Plantes	Moyenne du % de Phytotoxicité	Déviati on standard.
pCH31D (CsVMV + intron)	8	60	4,5	4,4
pCH32D (CsVMV)	7	55	4,5	1,1
pCH68 (RiceActin + intron)	8	67	12	3,8

REVENDICATIONS

1. Cassette d'expression comprenant dans le sens de la transcription liées de manière fonctionnelle une séquence de régulation promotrice fonctionnelle dans les
5 cellules végétales ou les plantes, une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD et une séquence de régulation terminatrice fonctionnelle dans les cellules végétales ou les plantes, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice est une séquence d'acide nucléique choisie parmi les séquences de régulation promotrice du virus de plante CsVMV (Cassava Vein Mosaic Virus).
- 10 2. Cassette d'expression selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice comprend dans le sens de la transcription les séquences d'acide nucléique X, Y et Z telles que définies respectivement par les SEQ ID 1, 2 et 3.
3. Cassette d'expression selon l'une des revendications 1 ou 2,
15 caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice est représentée par la SEQ ID NO 4.
4. Cassette d'expression selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice comprend dans le sens de la transcription les séquences d'acides nucléique X, Y, Y et Z (double CsVMV).
- 20 5. Cassette d'expression selon la revendication 4, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice du double CsVMV est représentée par la SEQ ID NO 5.
6. Cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD est une séquence
25 codant pour une enzyme HPPD choisie parmi les HPPD natives, mutées ou chimères.
7. Cassette d'expression selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'HPPD est choisie parmi les HPPD de bactéries comme *Pseudomonas*, de plantes comme d'*Arabidopsis* ou de carotte, de *Coccicoides* ou de mammifères comme la souris ou le cochon.
- 30 8. Cassette d'expression selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'HPPD est une HPPD de *Pseudomonas fluorescens*.

9. Cassette d'expression selon l'une des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'HPPD mutée est choisie parmi les HPPD mutées dans leur partie C-terminale.
10. Cassette d'expression selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'HPPD mutée comprend la mutation W336.
11. Cassette d'expression selon l'une des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'HPPD chimère est une HPPD comprenant des éléments provenant de différentes HPPD.
12. Cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD comprend une séquence codant pour un peptide signal ou peptide de transit.
13. Cassette d'expression selon la revendication 12, caractérisée en ce que le peptide de transit est un peptide de transit chloroplastique.
14. Cassette d'expression selon la revendication 13, caractérisée en ce que le peptide de transit est un peptide de transit optimisé.
15. Cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'elle comprend un activateur de transcription ("enhancer") ou un intron entre la séquence de régulation promotrice et la séquence » codant pour une HPPD.
16. Cassette d'expression selon la revendication 15, caractérisée en ce que l'activateur de transcription est choisi parmi les activateurs de transcription des virus de la mosaïque du tabac (VMT), et du tabac (TEV), ou de la mosaïque du « figwort ».
17. Cassette d'expression selon la revendication 15, caractérisée en ce que les introns sont choisis parmi l'intron 1 du gène de l'actine de riz ou l'intron adh1 de maïs.
18. Cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisée en ce que la séquence de régulation terminatrice est choisie parmi les séquences codant pour le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, le terminateur du CaMV 35S, ou le terminateur d'histone de plante.
19. Vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation de cellules végétales ou de plantes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 18.

20. Cellules végétales caractérisées en ce qu'elles comprennent une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 19.
21. Cellules végétales selon la revendication 20, caractérisée en ce que la cassette d'expression est intégrée de manière stable dans son génome.
- 5 22. Plante, caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules selon l'une des revendications 20 ou 21.
23. Plante transformée caractérisée en ce que une cassette d'expression selon l'une des revendications 1 à 19 est intégrée de manière stable dans son génome.
24. Plantes transformées selon l'une des revendications 22 ou 23,
10 caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les plantes monocotylédones telles que les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs ou les plantes dicotylédones comme le tabac, la soja, le colza, le coton, la betterave, le trèfle.
25. Graines de plantes transformées selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisées en ce qu'elles comprennent une cassette d'expression selon l'une des
15 revendications 1 à 19.
26. Procédé de désherbage sélectif de plantes à l'aide d'un herbicide inhibiteur de l'HPPD, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes selon l'une des revendications 22 à 24.
27. Procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ
20 comprenant des graines selon la revendication 25 ou des plantes selon l'une des revendications 23 à 24, caractérisé en ce qu'il consiste à appliquer dans la dite surface du champ une dose toxique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformée avec le dit gène chimère selon l'invention.
- 25 28. Procédé de culture des plantes selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il consiste à semer les graines des dites plantes dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une dose toxique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour
30 cible l'HPPD en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

29. Procédé selon l'une des revendications 26 à 28, caractérisé en ce que l'application de l'herbicide ayant pour cible l'HPPD est faite en présemis, en prélevée et/ou en postlevée de la culture.

30. Procédé selon l'une des revendications 26 à 29, caractérisé en ce que les
5 herbicides inhibiteurs d'HPPD sont choisis parmi les isoxazoles en particulier l'isoxaflutole, les dicétonitriles en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones, en particulier la sulcotrione ou la mésotrione, ou les pyrazolines.

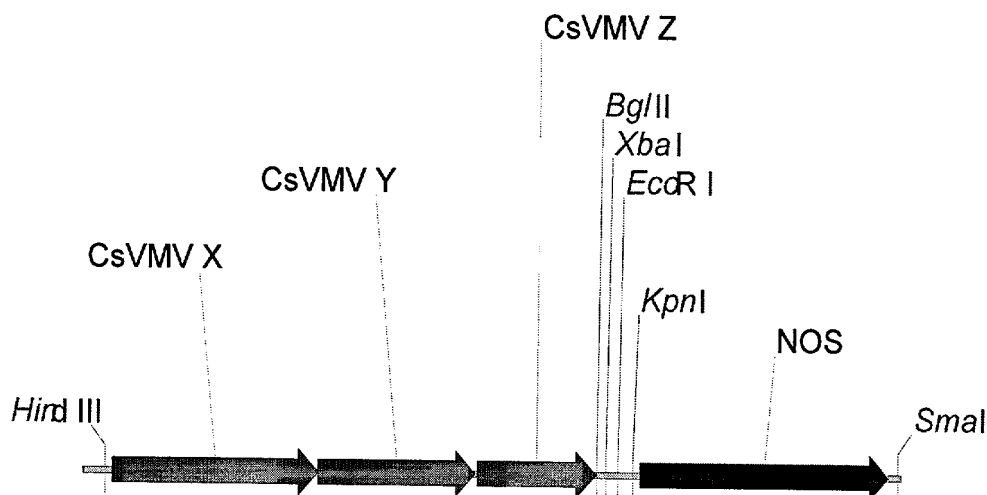
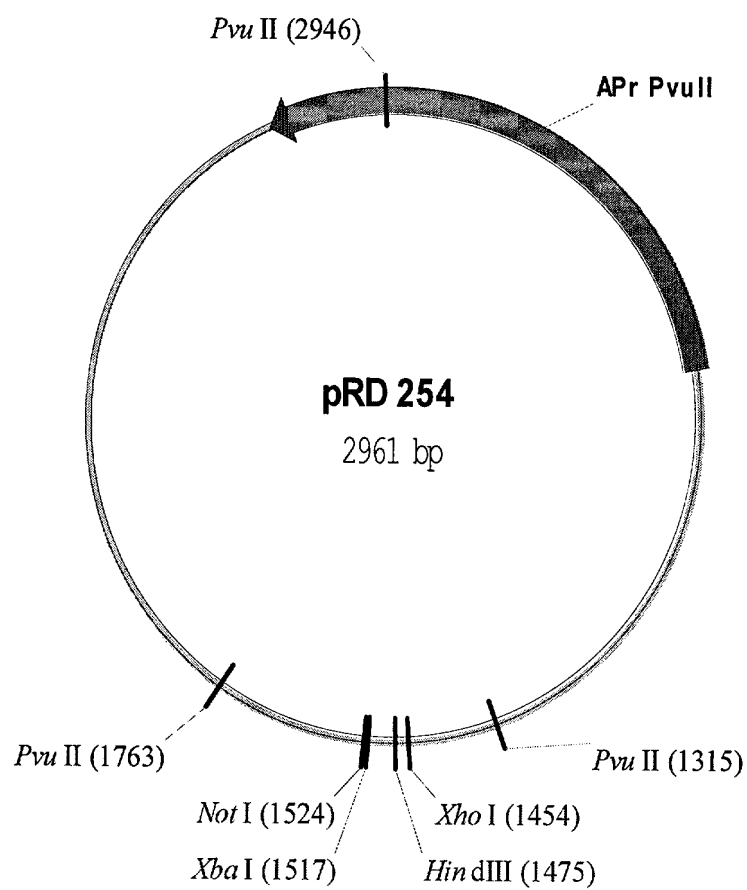
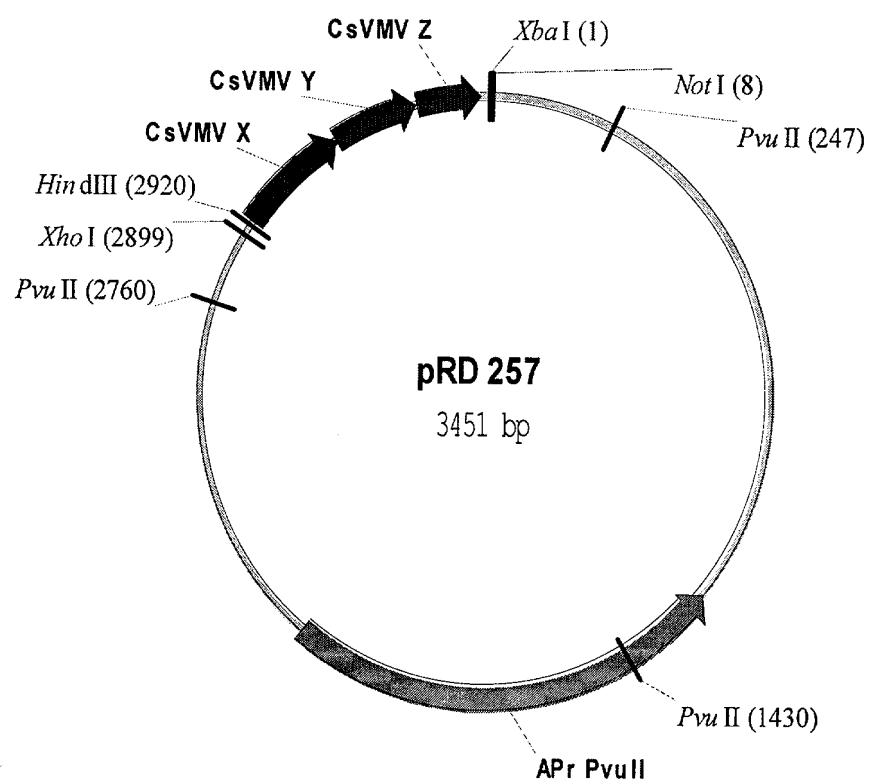


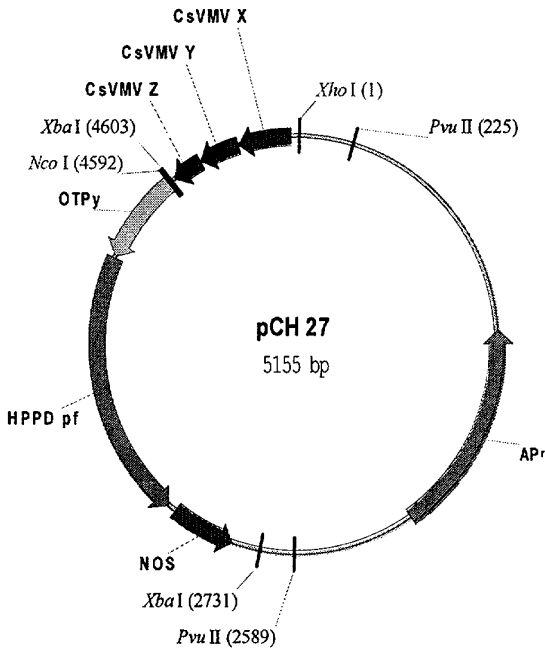
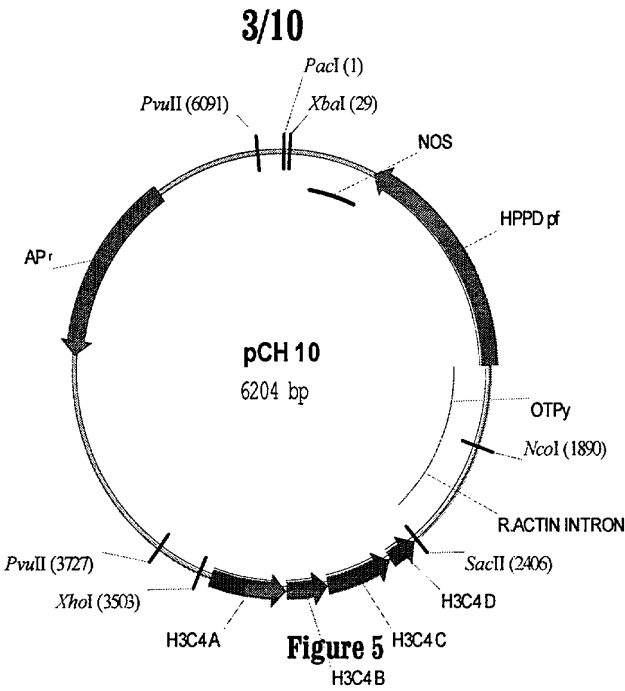
Figure 1

HindIII	~~~~~	
1	AAGCTTCCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT	
	TTCGAAGGTC TTCCATTAAT AGGTTCTACA TCGTAGTTCT TAGGTTACAA	
51	TACGGGAAAA ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA	
	ATGCCCTTTT TGATACCTTC ATAATACACT CGAGTCGTTT TTCGTCTAGT	
101	ATATGCGGCA CATATGCAAC CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA	
	TATACGCCGT GTATACGTTG GATACAAGTT TTTACTTCTT ACATGTCTAT	
151	CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA GAATACGTAG AAATTGAAAA	
	GTTCTAGGAT ATGACGGTCT TATGCTTCTT CTTATGCATC TTTAACTTTT	
201	AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC ACTGACGACA	
	TCTTCTTGGT CCGCTTCTTT TCTTAGAACT TCTGCATTCT TGACTGCTGT	
251	ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGTGA TTGTGAAAGA GACATAGAGG	
	TGTTACTTTT CTTCTTCTAT TCCAGCCACT AACACTTTCT CTGTATCTCC	
301	ACACATGTAA GGTGGAAAAT GTAAGGGCGG AAAGTAACCT TATCACAAAG	
	TGTGTACATT CCACCTTTTA CATTCCCGCC TTTCATTGGA ATAGTGTTC	
351	GAATCTTATC CCCCACTACT TATCCTTTTA TATTTTTCCG TGTCATTTTT	
	CTTAGAATAG GGGGTGATGA ATAGGAAAAT ATAAAAAGGC ACAGTAAAAA	
401	GCCCTTGAGT TTTCTATAT AAGGAACCAA GTTCGGCATT TGTGAAAACA	
	CGGGAACTCA AAAGGATATA TTCCTTGTT CAAGCCGTAA AACTTTTGT	
451	AGAAAAAATT TGGTGTAAGC TATTTTCTTT GAAGTACTGA GGATACAACT	
	TCTTTTTTAA ACCACATTCG ATAAAAGAAA CTTCATGACT CCTATGTTGA	
		XbaI
	~~~~~	
501	TCAGAGAAAT TTGTAAGTTT GTAGATCTCG ATTCTAGA	
	AGTCTCTTTA AACATTCAAA CATCTAGAGC TAAGATCT	

Figure 2

2/10

**Figure 3****Figure 4**



**Figure 6**

4/10



Figure 7



Figure 8

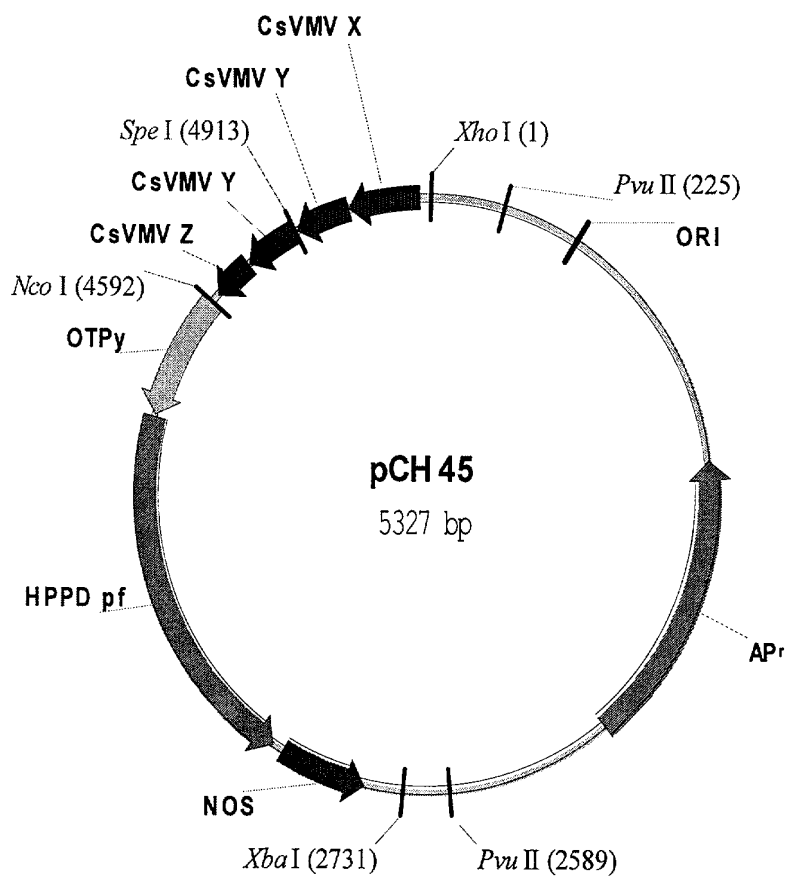


Figure 9

5/10

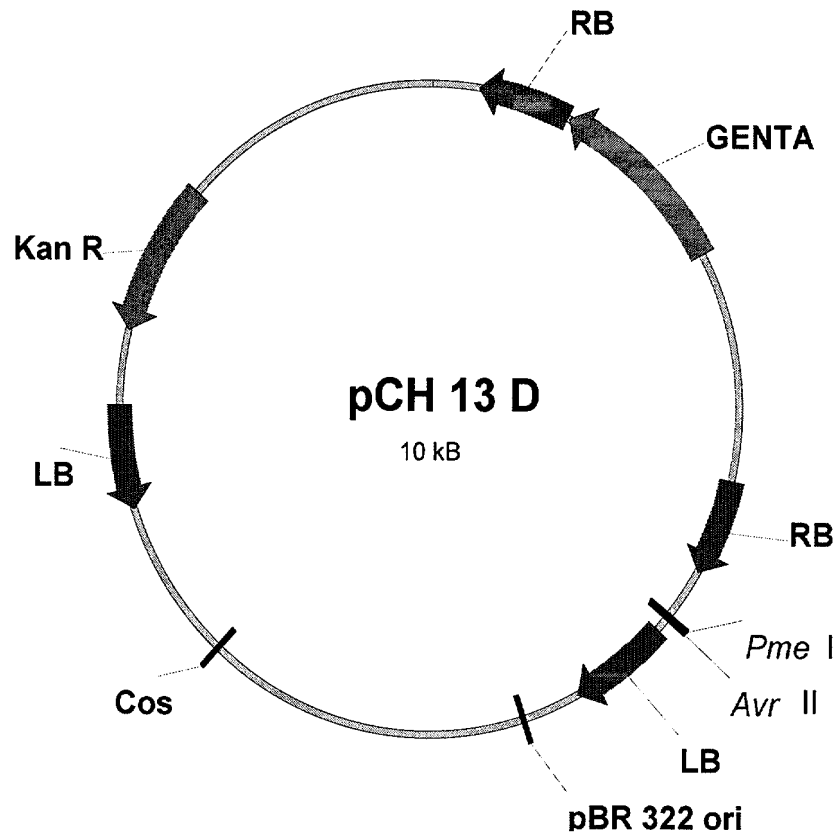


Figure 10

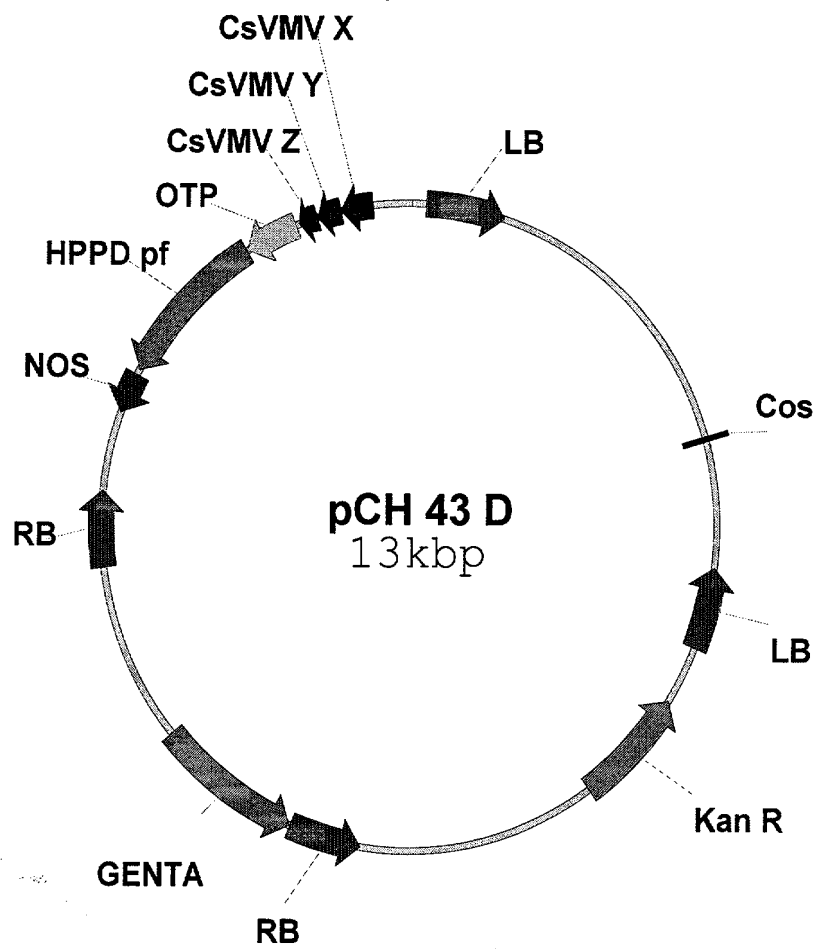


Figure 11

6/10

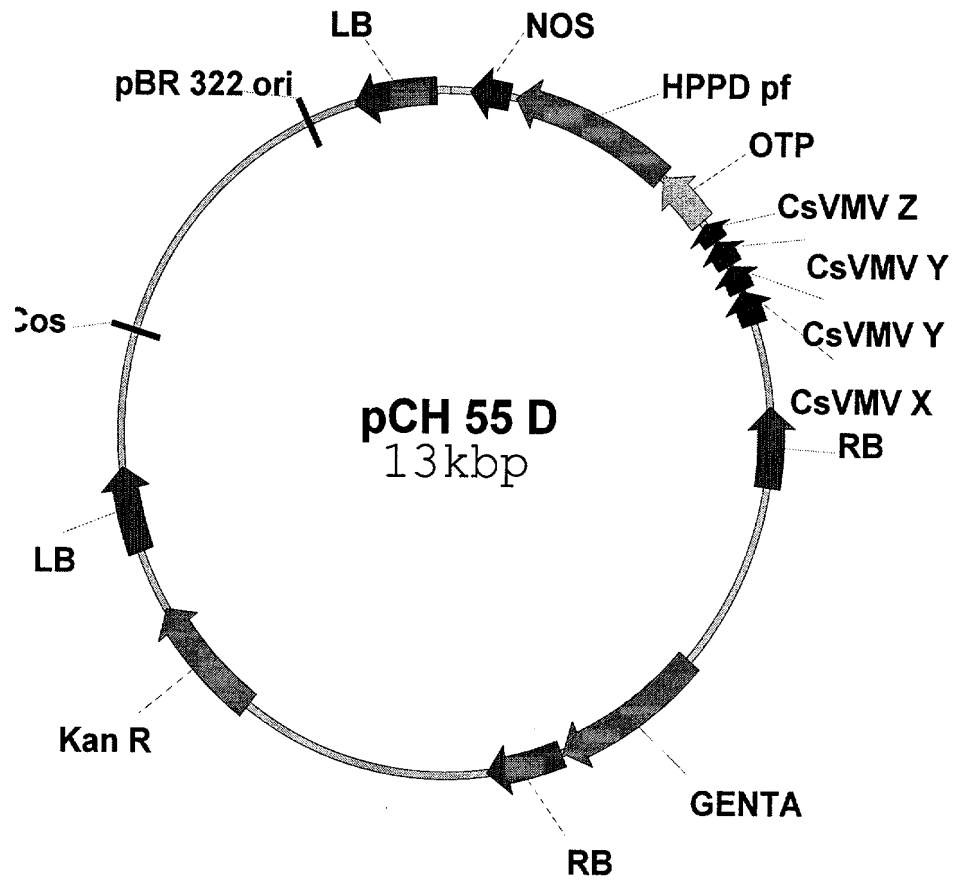


Figure 12

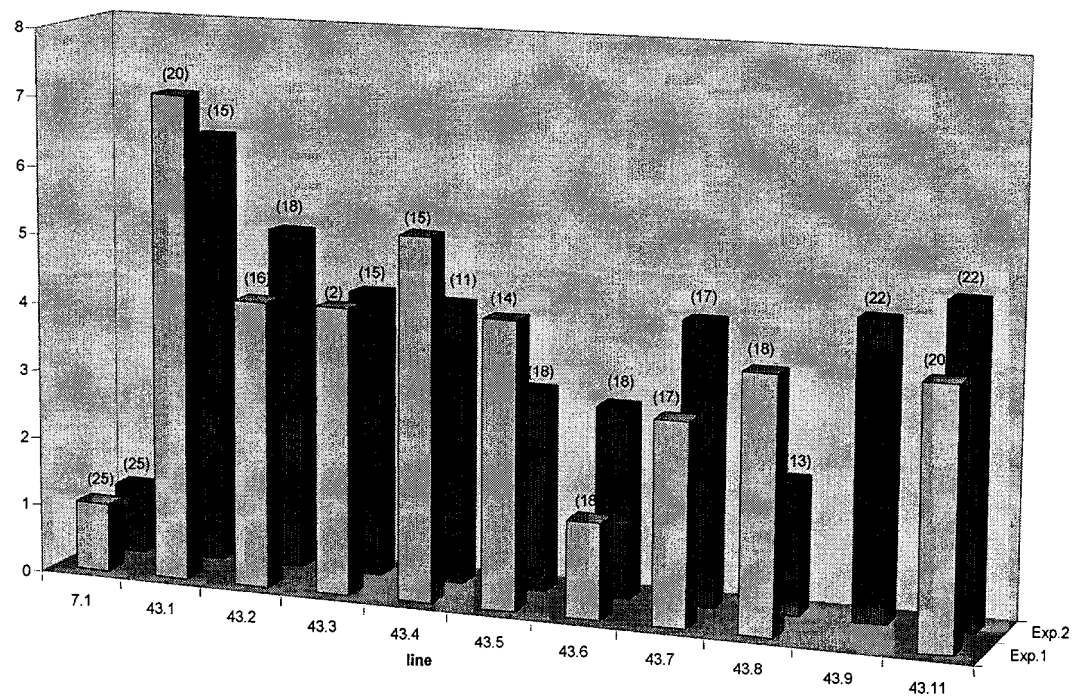


Figure 13

7/10

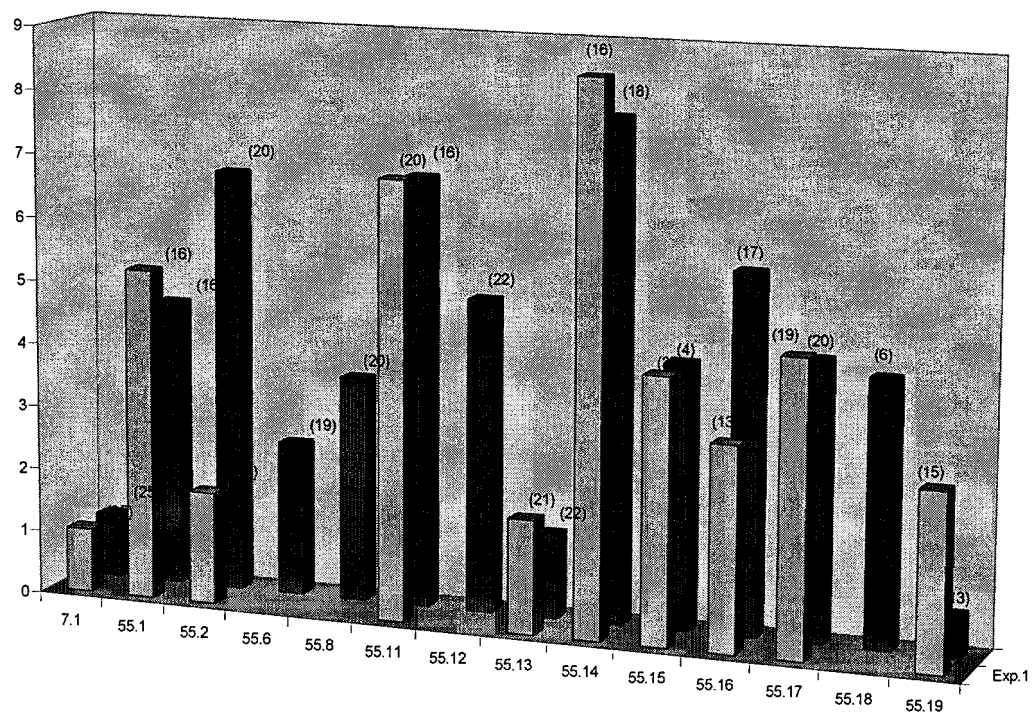


Figure 14

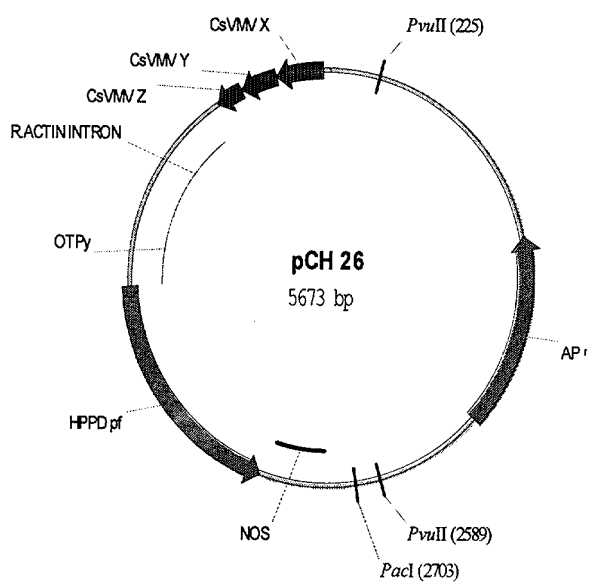


Figure 15

8/10

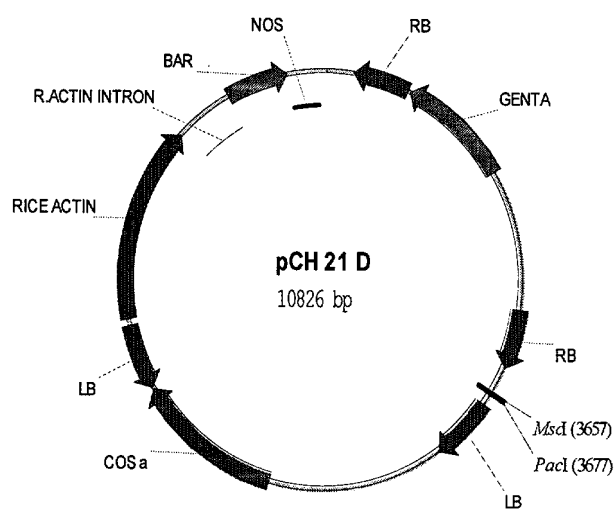


Figure 16

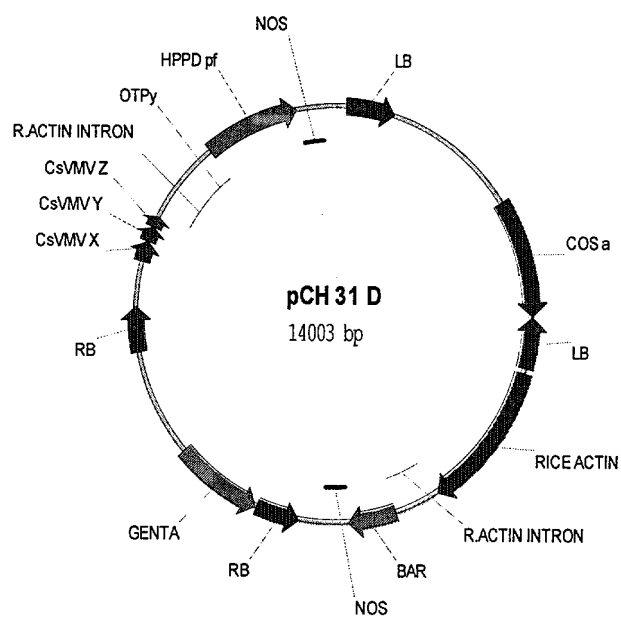
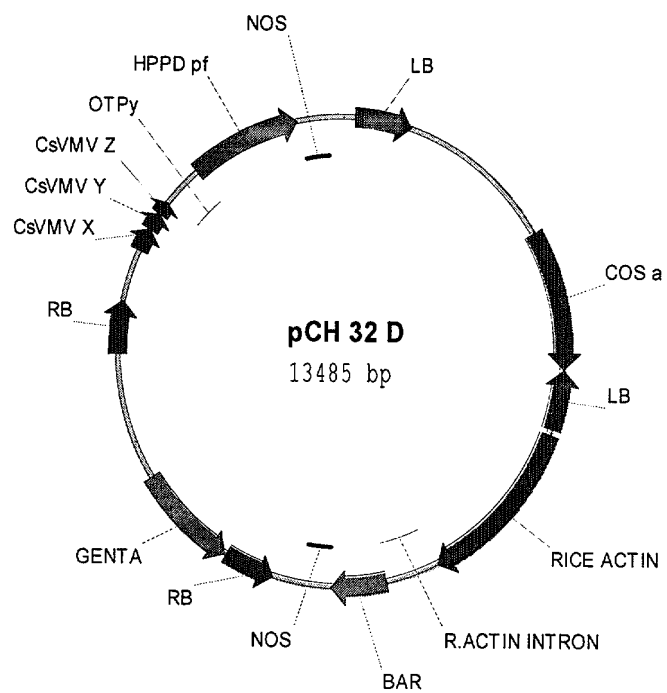
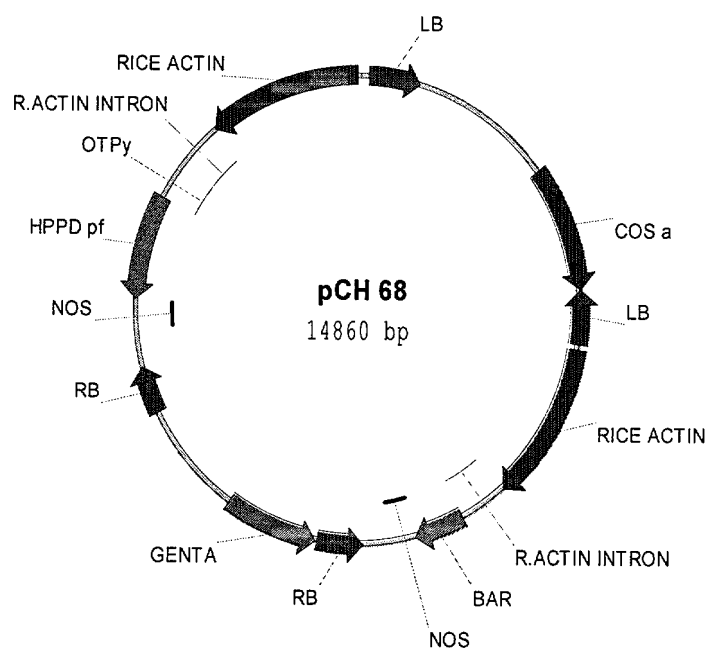
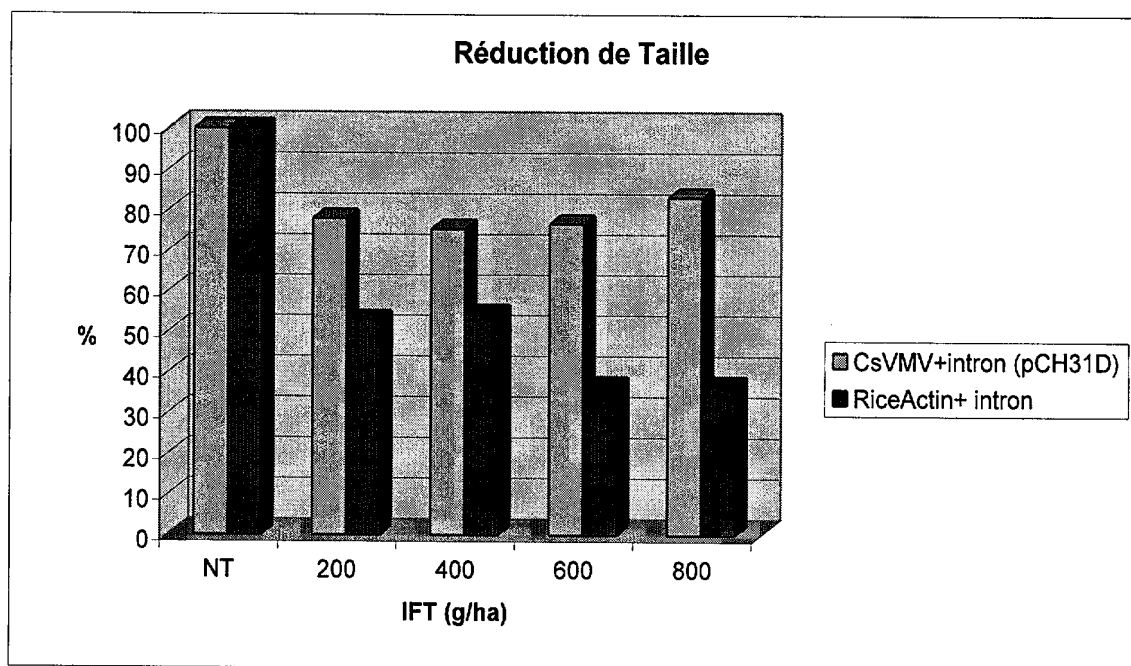


Figure 17

9/10

**Figure 18****Figure 19**

**Figure 20**

## LISTE DE SEQUENCE

<110> Bayer CropScience

<120> Cassette d'expression codant pour une Hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et plantes contenant un tel gène tolérantes aux herbicides.

<130> BCS 02 4011

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 219

<212> DNA

<213> Cassava vein mosaic virus

<400> 1

agaaggtaat tatccaagat gtagcatcaa gaatccaatg ttacgaggaa aaactatgga 60

agtattatgt gagctcagca agaagcagat caatatgcgg cacatatgca acctatgttc 120

aaaaatgaag aatgtacaga tacaagatcc tatactgcca gaatacgaag aagaatacgt 180

agaaattgaa aaagaagaac caggcgaaga aaagaatct 219

<210> 2

<211> 168

<212> DNA

<213> Cassava vein mosaic virus

<400> 2

tgaagacgta agcactgacg acaacaatga aaagaagaag ataaggtcgg tgattgtgaa 60

agagacatag aggacacatg taagggtgaa aatgtaaggc cggaagtaa ccttatcaca 120

aaggaatctt atccccact acttatcctt ttatatTTTT cgtgtca 168

<210> 3

<211> 127

<212> DNA

<213> Cassava vein mosaic virus

<400> 3

TTTTTgcct tgagTTTTcc tatataagga accaagttcg gcatttTgtga aaacaagaaa 60

aaatttggtg taagctatTT tctttgaagt actgaggata caacttcaga gaaatttTgt 120

agtttTgt 127

<210> 4

<211> 538

<212> DNA

<213> Cassava vein mosaic virus

<400> 4

aagcttccag aaggtaatta tccaagatgt agcatcaaga atccaatgtt tacgggaaaa 60

actatggaag tattatgtga gctcagcaag aagcagatca atatgcgga catatgcaac 120  
ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta tactgccaga atacgaagaa 180  
gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa agaattctga agacgtaagc 240  
actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga ttgtgaaaga gacatagagg 300  
acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct tatcacaag gaattctatc 360  
ccccactact taccctttta ttttttccg tgtcattttt gcccttgagt tttcctatat 420  
aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt tgggtgaagc tttttctttt 480  
gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt gtagatctcg attctaga 538

<210> 5  
<211> 710  
<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 5  
aagcttcag aaggaatta tccaagatgt agcatcaaga atccaatgtt tacgggaaaa 60  
actatggaag tattatgtga gctcagcaag aagcagatca atatgcgga catatgcaac 120  
ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta tactgccaga atacgaagaa 180  
gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcgaagaaa agaattctga agacgtaagc 240  
actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga ttgtgaaaga gacatagagg 300  
acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct tatcacaag gaattctatc 360  
ccccactact taccctttta ttttttccg tgtcactagt gaagacgtaa gcaactgacga 420  
caacaatgaa aagaagaaga taaggctcgg gattgtgaaa gagacataga ggacacatgt 480  
aaggtggaag atgtaagggc ggaaagtaac cttatcaca aggaattctta tccccacta 540  
cttatccttt tatatttttc cgtgtcattt ttgcccttga gttttcctat ataaggaacc 600  
aagttcggca tttgtgaaaa caagaaaaaa tttgggtgaa gctattttct ttgaagtact 660  
gaggatacaa cttcagagaa atttgtaagt ttgtagatct cgattctaga 710

<210> 6  
<211> 1868  
<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 6  
ccatggcttc gatctcctcc tcagtcgcga ccgttagccg gaccgccct gctcaggcca 60  
acatgggtggc tccgttcacc ggccttaagt ccaacgccgc cttcccacc accaagaagg 120  
ctaacgactt ctccaccctt cccagcaacg gtggaagagt tcaatatatg cagggtgtggc 180

cggcctacgg caacaagaag ttcgagacgc tgtcgtacct gccgcgctg tctatggcgc 240  
 ccaccgtgat gatggcctcg tcggccaccg ccgtcgctcc gttccagggg ctcaagtcca 300  
 ccgccagcct ccccgctgcc cgccgctcct ccagaagcct cggcaacgtc agcaacggcg 360  
 gaaggatccg gtgcatggca gatctatacg aaaacccaat gggcctgatg ggctttgaat 420  
 tcatcgaatt cgcgtcgccg acgccgggta ccctggagcc gatcttcgag atcatgggct 480  
 tcaccaaagt cgcgaccac cgttccaaga acgtgcacct gtaccgccag ggcgagatca 540  
 acctgatcct caacaacgag cccaacagca tcgcctccta ctttgcggcc gaacacggcc 600  
 cgtcgggtgtg cggcatggcg ttccgctga aggactcgca aaaggcctac aaccgcgcc 660  
 tggaaactcg cgcccagccg atccatattg acaccgggcc gatggaattg aacctgccgg 720  
 cgatcaaggg catcggcggc gcgccgttgt acctgatcga ccgtttcggc gaaggcagct 780  
 cgatctacga catcgacttc gtgtacctcg aagggtgtga gcgcaatccg gtcggtgcag 840  
 gtctcaaagt catcgaccac ctgaccaca acgtctatcg cggccgcatg gtctactggg 900  
 ccaacttcta cgagaaattg ttcaacttcc gtgaagcgcg ttaacttcgat atcaagggcg 960  
 agtacaccgg cctgacttcc aaggccatga gtgcgccgga cggcatgatc cgcacccgc 1020  
 tgaacgaaga gtcgccaag ggcgcggggc agatcgaaga gttcctgatg cagttcaacg 1080  
 gcgaaggcat ccagcacgtg gcgttcctca ccgacgacct ggtcaagacc tgggacgcgt 1140  
 tgaagaaaat cggcatgcmc ttcatgaccg cgccgccaga cacttattac gaaatgctcg 1200  
 aaggccgcct gcctgaccac ggcgagccgg tggatcaact gcaggcacgc ggtatcctgc 1260  
 tggacggatc ttccgtggaa ggcgacaaac gcctgctgct gcagatcttc tcggaaaacc 1320  
 tgatgggccc ggtgttcttc gaattcatcc agcgcaaggc cgacgatggg tttggcgagg 1380  
 gcaacttcaa ggcgctgttc gagtccatcg aacgtgacca ggtgcgtcgt ggtgtattga 1440  
 ccgccgatta agcgtcaaaa agcccggccg aggggtgactc gacgaatttc cccgatcggt 1500  
 caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta 1560  
 tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcgatgcgt 1620  
 tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt atacatttaa tacgcgatag 1680  
 aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac 1740  
 tagatcggga attgcggccg caattcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa 1800  
 aaccctggcg ttacccaact taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc caggggggatc 1860  
 ctctagag 1868

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 24

<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 7  
gaggaaacag ctatgaccat gatt

24

<210> 8  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 8  
ggactagtga cacggaaaaa tataaaaagg

29

<210> 9  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 9  
ggactagtga agacgtaagc actgacg

27

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<400> 10  
aagccatggg ccgctttaga

20



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement  
national

FA 629732  
FR 0215696

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	WO 02 36787 A (AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.) 10 mai 2002 (2002-05-10) * page 9, ligne 19 - ligne 24; figures 10-14 * * page 12, ligne 11 - ligne 20 * * page 15, ligne 10 - ligne 31 * * page 19, ligne 16 - ligne 20 * ---	1-30	C12N15/83 A01H5/00 A01H5/10 C12N15/53
X	WO 01 14573 A (PROFIGEN INC) 1 mars 2001 (2001-03-01) SEQ ID NO:1-6 * page 5, ligne 12 - ligne 26 * * page 12, ligne 16 - ligne 23 * * page 14, ligne 7-10 * ---	1-30	
X	WO 02 00890 A (BIOGEMMA (FR)) 3 janvier 2002 (2002-01-03) * page 10, ligne 22 - page 11, ligne 2; figure 4; exemple 3 * ---	1-25	
A	VERDAGUER B ET AL: "FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE CASSAVA VEIN MOSAIC VIRUS (CSMV) PROMOTER" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 37, no. 6, août 1998 (1998-08), pages 1055-1067, XP000944363 ISSN: 0167-4412 * le document en entier * --- -/--	1-19	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)  C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 août 2003		Schönwasser, D	
<b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b>   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   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 &amp; : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement  
national

FA 629732  
FR 0215696

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	LI Z ET AL: "Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (Vitis vinifera)" PLANT SCIENCE, vol. 160, no. 5, avril 2001 (2001-04), pages 877-887, XP002225335 ISSN: 0168-9452 * figures 1,3 *	1-30	
A	WO 99 53053 A (RHONE POULENC AGRO S.A.) 21 octobre 1999 (1999-10-21) SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20 * page 28, ligne 13 - ligne 22 *	1-30	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
13 août 2003		Schönwasser, D	
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			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0215696 FA 629732**

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 **13-08-2003**  
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 0236787 A	10-05-2002	FR 2815969 A1	03-05-2002
		AU 1508702 A	15-05-2002
		CA 2427316 A1	10-05-2002
		EP 1330530 A2	30-07-2003
		WO 0236787 A2	10-05-2002
WO 0114573 A	01-03-2001	BR 0007019 A	03-07-2001
		WO 0114573 A1	01-03-2001
WO 0200890 A	03-01-2002	FR 2810994 A1	04-01-2002
		AU 7073701 A	08-01-2002
		CA 2414588 A1	03-01-2002
		EP 1294900 A1	26-03-2003
		WO 0200890 A1	03-01-2002
WO 9953053 A	21-10-1999	FR 2777568 A1	22-10-1999
		AU 754856 B2	28-11-2002
		AU 3152599 A	01-11-1999
		BR 9909745 A	26-12-2000
		CA 2325658 A1	21-10-1999
		CN 1305526 T	25-07-2001
		EP 1071767 A1	31-01-2001
		WO 9953053 A1	21-10-1999
		HU 0102302 A2	28-09-2001
		JP 2002511260 T	16-04-2002
		NO 20005173 A	15-12-2000
		PL 345243 A1	03-12-2001
		TR 200002989 T2	21-12-2000