

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 23.09.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 26.03.99 Bulletin 99/12.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR.

⑦② Inventeur(s) : BROCARD INES, CHARLOT
FLORENCE, TEOULE EVELYNE et GUERCHE PHI-
LIPPE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ PROMOTEUR SPECIFIQUE DES PETALES ET PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES A FLEURS SANS
PETALE.

⑤⑦ L'invention concerne un promoteur spécifique des pé-
tales ainsi qu'un procédé d'obtention de plantes à fleurs
sans pétale.

FR 2 768 746 - A1



La présente invention concerne notamment un promoteur spécifique des pétales et un procédé d'obtention de plantes à fleurs sans pétale.

L'intérêt de l'obtention de plantes dépourvues de pétales est parti de l'observation que les pétales sénescents, en tombant sur les feuilles pourraient
5 fournir des foyers d'infection privilégiés pour les spores de certains champignons pathogènes. Dans le cas du colza, par exemple, le mode d'infection de *Sclerotinia sclerotiorum* suit principalement cette voie. Ce champignon est responsable en effet d'importants dommages sur les cultures de colza (Lamarque, 1983) et on ne connaît pas de résistance génétique à celui-ci ni chez le colza ni chez les espèces
10 apparentées. Ainsi, à l'heure actuelle, seuls les traitements chimiques préventifs sont utilisés.

La lutte contre *Sclerotinia sclerotiorum* par le biais de plantes dont les fleurs n'auraient pas de pétales permettrait de diminuer l'utilisation de fongicide et limiterait donc la pollution des sols subséquente.

15 Il s'agit donc de produire des plantes à fleurs sans pétale et d'éprouver ainsi une stratégie de lutte contre le susdit champignon basée sur une résistance "physique" et non pas sur l'utilisation de gènes de résistance au sens classique.

La présente invention propose donc d'obtenir des plantes dont les fleurs seraient dépourvues de pétales. Elle consiste à mettre en œuvre une région
20 promotrice contrôlant l'expression spécifiquement dans les pétales d'une séquence (orf) codant pour une molécule susceptible de modifier les caractéristiques naturelles du pétale voire d'en inhiber la formation.

Ainsi, on peut envisager de modifier la structure, la forme, la coloration et/ou la structure des pétales de fleurs en plaçant, en aval de la région promotrice
25 ci-dessus décrite des gènes impliqués dans la biosynthèse des pigments ou des gènes de régulation comme les protéines MYB (Noda et al. 1994). Ce type d'expérience a déjà été réalisé (Elomma et al., 1996 ; Gutterson, 1995). Toutefois, les promoteurs utilisés sont plutôt de types constitutifs comme le 35S du CaMV alors qu'il serait intéressant de confiner l'expression du transgène à l'organe ciblé.

On peut donc, dans le cadre de la présente invention, envisager la création de plantes ornementales originales.

La présente invention a donc pour objet une séquence nucléotidique dont il a été démontrée que le gène correspondant s'exprime spécifiquement dans le pétale, cette séquence nucléotidique correspond à SEQ ID N° 5.

Par conséquent, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique qui correspond à tout ou partie :

- a) de la séquence selon SEQ ID N° 5, ou
- b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
- 10 c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).

Dans le cadre de la présente invention, la partie la plus intéressante de cette séquence nucléotidique est la région promotrice définie comme étant la séquence précédant (côté 5') le codon du début de traduction (ATG). *Strito sensu* cette région promotrice s'étend du nucléotide 1 au nucléotide 3265 (c'est-à-dire au dernier nucléotide précédant immédiatement le codon ATG) mais, compte tenu
15 des sites de restriction, cette région s'étend préférentiellement du nucléotide 1 au nucléotide 3233 (correspondant au site *AvaI*) et plus préférentiellement encore du nucléotide 2911 au nucléotide 3233 de SEQ ID N° 5.

Cette région promotrice précède donc à l'état naturel, un orf qui est exprimé spécifiquement dans les pétales et dans le cas où cet orf est remplacé (par
20 manipulation génétique) par un autre orf dont le produit est une molécule cytotoxique, cette dernière est susceptible de ne détruire que lesdits pétales. Le remplacement peut également être réalisé par une partie de gène susceptible, lors de son expression spécifique dans le pétale, d'en modifier les caractéristiques
25 d'origine.

La présente invention a donc également pour objet des vecteurs d'expression cellulaire comprenant une région promotrice telle que ci-dessus décrite placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit capable de modifier la structure, la forme, la coloration et/ou la texture des pétales de fleurs,

ainsi qu'un procédé d'obtention de plantes ornementales comprenant l'insertion dans lesdites plantes d'un de ces vecteurs. L'invention comprend également le cas où ladite séquence d'ADN code pour un produit cytotoxique.

Avantageusement, le produit cytotoxique en question est une ribonucléase.

- 5 En effet, lorsque cette RNase s'exprimera spécifiquement dans les pétales, elle en détruira tous les ARN, ce à quoi le pétale ne pourra pas survivre. Préférentiellement, la RNase est la barnase, dont l'orf correspondant a été isolé de *Bacillus amyloliquefasciens* (Hartley RW, 1988).

- Il s'agit donc d'introduire un vecteur conforme à l'invention dans une
10 souche bactérienne susceptible de réaliser la transformation de cellules de plantes telles qu'*Agrobacterium tumefaciens*. Ceci peut notamment être réalisée par la méthode d'infiltration de plantes d'*Arabidopsis thaliana* décrite par Bechtold et al.; 1993. Cette technique consiste à introduire la bactérie dans les cellules des hampes florales par infiltration sous vide. Les plantes sont ensuite repiquées en
15 serre et leurs graines récoltées. Environ une graine sur mille donne naissance à des plantes dont toutes les cellules portent le transgène. La transformation d'autres plantes et notamment du colza peut être réalisée par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens* et/ou d'*Agrobacterium rhizogenes* à l'aide de diverses techniques, maintenant classiques (transformation de disques foliaires, d'hypo-
20 cotyles de hampes florales...) associant une phase de co-culture de la bactérie avec les tissus végétaux, suivie de la sélection et de la régénération des cellules transformées en plantes entières. D'autres techniques de transformation ne font pas intervenir cette bactérie et permettent de transférer directement le gène cloné dans
25 des cellules ou des tissus (électroporation, canon à particules...) et de sélectionner et d'obtenir des plantes transformées (technique revue par Siemens et Schieder).

La présente invention a également pour objet des cellules de plantes transformées avec un vecteur conforme à l'invention ainsi que des plantes comprenant lesdites cellules. L'invention a également pour objet des plantes dont les fleurs n'ont pas de pétales.

Comme indiqué précédemment, la présente invention permet donc l'obtention de plantes dont les fleurs n'ont pas de pétales ; le procédé conforme à l'invention comprenant l'insertion dans les plantes d'un vecteur tel que ci-dessus décrit et comprenant une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.

5 Dans le cadre de la présente invention, on peut également envisager d'obtenir des plantes hybrides par croisement de deux lignées dont on chercherait à associer les qualités agronomiques. Cependant, afin que la pollinisation entomophile s'opère de façon optimum, il est nécessaire que les parents de l'hybride en question portent des pétales. Un tel croisement n'est donc possible
10 qu'au moyen d'un système d'activation du gène toxique à double composante. Le principe d'un tel système consiste à disposer de deux lignées portant chacune un constituant n'ayant pas d'activité cytotoxique. L'activité toxique spécifique est alors restaurée dans les hybrides de ces deux lignées par combinaison des deux constituants.

15 Un exemple possible d'un tel système consiste à inactiver le produit d'expression que l'on veut contrôler par insertion d'au moins un codon stop au début de la séquence codante correspondante puis d'ajouter en *trans* dans le système, un ARNt dit "suppresseur" qui va reconnaître le ou les codon(s) stop et apporter l'acide aminé qu'il porte au lieu de terminer la traduction. La protéine
20 pourra alors être traduite intégralement et son activité restaurée. Un tel système a déjà été expérimenté concernant la séquence codante du gène GUS dans laquelle a été insérée le codon stop ambre, l'ARNt suppresseur utilisé étant porteur de la leucine. De plus, la fonctionnalité d'un tel système de transactivation utilisant un ARNt^{Leu} suppresseur a été vérifié *in planta* dans *Arabidopsis thaliana* et
25 *Nicotiana tabacum*. Ce modèle a été ensuite appliqué au cas de la barnase. Des gènes mutés (c'est-à-dire dans lesquels ont été insérés un codon stop) codant pour la barnase et dépendant de l'expression du gène de ARNt^{Leu} ont été obtenus et testés en expression transitoire dans des protoplastes de tabac (Choisne Nathalie, 1997).

La présente invention concerne donc également un procédé d'obtention de plantes hybrides dont les fleurs n'ont pas de pétale et comprenant les étapes de :

- a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur conforme à l'invention et comprenant une séquence d'ADN codant pour séquence cytotoxique modifiée par l'insertion d'au moins un codon stop,
- b) croisement des plantes de lignée A ainsi obtenues avec des plantes de lignée B exprimant le gène d'un ARNt suppresseur,
- c) sélection des plantes hybrides avec des fleurs sans pétales.

Dans le cadre de la présente invention, les plantes de lignée A sont transformées par une construction similaire à pIB352 telle que représentée dans la figure 7.

Avantageusement, les plantes conformes à l'invention appartiennent à la famille des Brassicacées, préférentiellement, il s'agit du colza.

La figure 1 illustre l'analyse par hybridation de type Northern d'ARN polyA⁺ (2 µg) et des ARN totaux (10 µg) de colza. La membrane est hybridée avec l'ADNc 9.2 entier marqué au ³²P. La révélation est faite après 24 heures d'exposition à - 80°C avec un écran. Les ARNm identifiés ont une taille approximative de 800 pb. Plantule 1 : plantule d'une semaine ; Plantule 2 : plantule de deux semaines

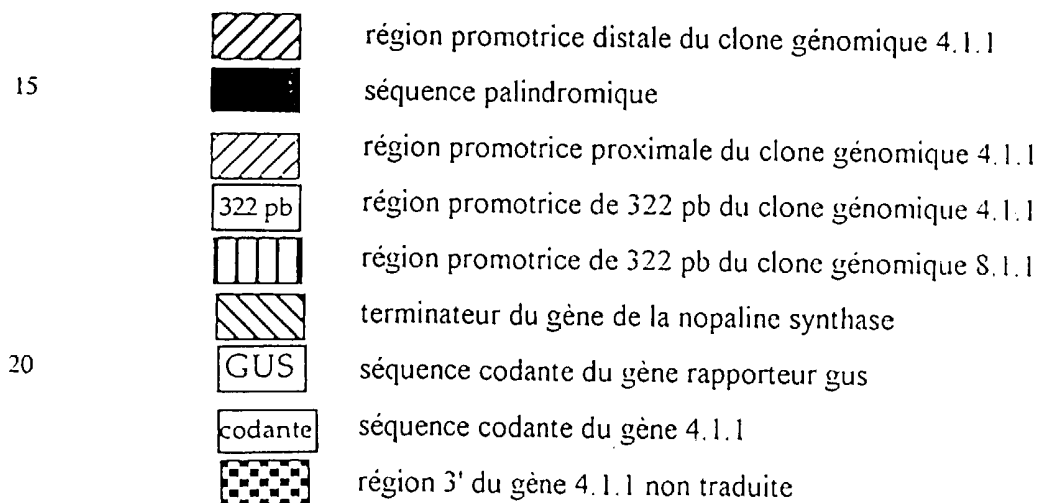
La figure 2 illustre la comparaison des séquences protéiques d'*Arabidopsis thaliana* (en haut) et du colza (en bas) déduites respectivement de ADNc X74360 (SEQ ID N° 1) et 9.2 (SEQ ID N° 2). La protéine d'*Arabidopsis thaliana* présente une longueur de 140 aa alors que la protéine de colza présente une longueur de 147 aa. L'homologie entre les deux étant de 74,6 %. Les étoiles repèrent les acides aminés communs aux deux séquences et les points figurant dans l'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* n'ont été indiqués que pour permettre de placer l'une en face de l'autre les séquences communes aux deux plantes, la séquence d'*Arabidopsis thaliana* devant se lire en continu, c'est-à-dire en faisant abstraction desdits points.

La figure 3 représente l'alignement des séquences nucléotidiques des ADNc 9.2 du colza (en bas) et X74360 d'*Arabidopsis thaliana* (en haut), les deux séquences présentant une homologie totale de 83 %.

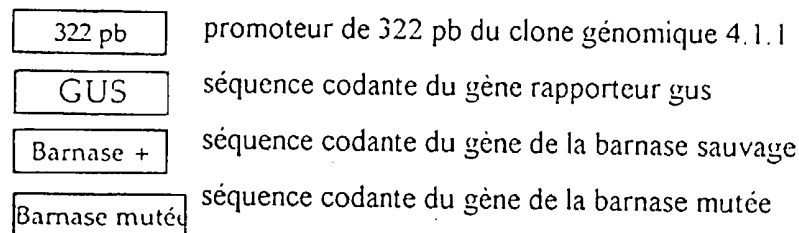
La figure 4 représente les cartes de restriction partielles des clones génomiques (A : *Ava*I, B : *Bam*HI, EI : *Eco*RI, EV : *Eco*RV, H : *Hind*III, Hc : *Hinc*II, P : *Pst*I, S : *Sac*I, S1 : *Sal*I, Xb : *Xba*I, Xh : *Xho*I).

La figure 5 représente la séquence 5'→3' du clone génomique 4.1.1 (SEQ ID N° 5). La séquence palindromique a été soulignée deux fois, la séquence codante a été soulignée une fois. Les sites de restriction suivants ont été repérés : *Bam*HI (en position 1) : GGATCC ; *Sal*I (en position 2911) : GTCGAC et *Ava*I (en position 3229) : CCGAG.

La figure 6 représente les constructions réalisées avec les promoteurs des clones génomiques 4.1.1 et 8.1.1.

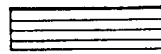


La figure 7 illustre les constructions réalisées avec le promoteur de 322 pb du clone génomique 4.1.1.





terminateur du gène de la nopaline synthase



terminateur 19S du CaMV

L'invention ne se limite pas à seule description ci-dessus, elle sera mieux
 5 comprise à la lumière des exemples ci-après qui ne sont cependant donnés qu'à titre illustratif.

EXEMPLE 1 : Mise en évidence d'un promoteur spécifique des pétales

10 La première étape a consisté en l'obtention de clones d'ADN complémentaires (ADNc) exprimés spécifiquement dans le pétale. Pour cela, les ADNc ont été synthétisés à partir d'ARN messagers (ARNm) de pétale de colza. Parallèlement, des ADNc ont été synthétisés à partir d'ARNm de feuilles, de boutons floraux dont les pétales ont été enlevés et d'étamines.

15 Les ADNc provenant desdits organes ou tissus ont été soustraits aux ADNc dérivés des ARNm exprimés dans le pétale de colza. Les molécules résultant de cette soustraction ont été utilisées lors d'une expérience d'hybridation différentielle d'une banque d'ADNc de pétale selon une technique similaire à celle présentée par Atanassov et al. 1996.

20 Plusieurs clones d'ADN de colza ont été isolés à l'issue de cette expérience. Leur profil d'expression a été étudié par la technique d'hybridation moléculaire de type Northern. En l'absence de clone strictement spécifiques du pétale (au seuil de détection de la technique) le candidat le plus pertinent a été retenu pour la suite des études ; il s'agit du clone 9.2. Ce clone est fortement exprimé dans le pétale au
 25 stade jeune (bouton de 3 mm environ) et très faiblement dans les étamines (figure 1).

Les recherches d'homologie de séquences dans les banques de données montrent une forte similitude entre la protéine déduite de la phase ouverte de lecture (orf) du clone 9.2 et la séquence codante d'un gène d'*Arabidopsis thaliana*

Les recherches d'homologie de séquences dans les banques de données montrent une forte similitude entre la protéine déduite de la phase ouverte de lecture (orf) du clone 9.2 et la séquence codante d'un gène d'*Arabidopsis thaliana* (X74360) codant pour une protéine putative de la paroi dont l'expression est
5 régulée par les gibbérellines (Phillips et Huttly, 1994) (figure 2). Le degré d'homologie présenté par les séquences d'ADNc respectives correspondantes est supérieur à 80 % dans les 500 premières bases puis disparaît totalement sur les 220 restantes (figure 3).

Le clone d'ADNc 9.2 de colza a servi de sonde pour cribler une banque
10 génomique de colza. Sept clones génomiques ont été isolés. Sur la base des cartes de restriction et des séquences, ces sept clones se répartissent en deux groupes suggérant l'existence chez le colza d'une famille d'au moins deux gènes nommés dans la suite du texte 4.1.1 et 8.1.1 (figure 4). L'ADNc 9.2 est dérivé du gène correspondant du clone génomique 4.1.1.

15 Une étude préliminaire par amplification PCR a été réalisée sur le clone 9.4.1 appartenant au groupe du 4.1.1. En effet, la structure du clone génomique a permis d'amplifier une région amont de 3233 pb en utilisant des techniques d'amplification de grands fragments d'ADN et de séquençage progressif par PCR.

Cette région de 3233 pb s'étend du nucléotide 1 au nucléotide 3233 de la
20 séquence représentée sur la figure 5 et elle se termine au niveau du site *AvaI* au niveau duquel la coupure a été effectuée ainsi que le clonage pour l'obtention de "bouts francs".

Puis les régions amonts susceptibles de contenir les séquences régulatrices ont été sous-clonées dans des vecteurs de clonage à partir des deux clones
25 génomiques (4.1.1 et 8.1.1). On dispose donc actuellement, pour le clone 4.1.1, de plus de 4 kb de séquence correspondant majoritairement à l'orf et aux régions amonts (figure 5).

EXEMPLE 2 : Vérification de la spécificité de la région promotrice

Différentes constructions comprenant le gène rapporteur GUS placé sous le contrôle de certaines de ces séquences ont été réalisées afin d'étudier l'expression de ces gènes chimériques (c'est-à-dire constitués de la séquence codante d'un gène connu précédé de la région promotrice conforme à l'invention)

5 dans des plantes transformées d'*Arabidopsis thaliana* et de colza.

Ces constructions se regroupent en deux catégories en fonction de l'orf placée sous le contrôle des séquences régulatrices :

- le gène rapporteur GUS pour étudier les profils d'expression et vérifier la spécificité conférée par le promoteur,
- 10 - le gène de barnase sauvage ou inactivé pour empêcher la formation du pétale par expression dans cet organe de ce gène toxique (les figures 6 et 7 détaillent la composition de chaque construction).

Les profils d'expression du gène rapporteur GUS chez les transformants d'*Arabidopsis* obtenus dans le cas du pIB100 montrent une certaine variabilité sur

15 l'ensemble des plantes (voir tableau 1 ci-après qui énumère les parties des plantes transformées chez lesquelles on a observé une coloration bleue). Cependant, chez près de la moitié des plantes présentant une coloration bleue (13/30), le gène rapporteur ne s'exprime que dans les pétales (au seuil de détection de la technique). On retrouve chez certaines plantes une faible expression dans les

20 étamines, peu surprenante du fait des résultats des hybridations de type Northern, mais aussi parfois une expression dans d'autres organes floraux ce qui pourrait suggérer l'influence d'effets de position du transgène dus à sa petite taille. Toutefois l'existence d'une proportion significative de plantes présentant le profil attendu laisse à penser que le fragment proximal de 322 pb est capable de conférer

25 une expression spécifique du pétale. La stabilité de cette expression a été testée sur les descendants en autofécondation de ces plantes. Pour la plupart, on retrouve bien la spécificité "pétale" (données non montrées).

Des séquences promotrices plus longues ont également été mises en œuvre par le biais des constructions pIB102 et pIB105 et les plantes transformées

d'*Arabidopsis thaliana* ont été observées (le tableau 2 énumère les parties des plantes transformées par pIB102 et présentant une coloration bleue, le tableau 3 énumère les parties des plantes transformées par pIB105 et présentant une coloration bleue). On ne retrouve pas la spécificité pétale dans la proportion
5 précédemment observée car dans presque tous les cas, le gène rapporteur est effectivement exprimé dans le pétale mais également dans d'autres organes de la fleur.

De même, des plantes transformées de colza ont été obtenues avec une construction comportant comme séquence régulatrice le fragment amont du gène
10 4.1.1 de 3233 pb cloné après amplification par PCR. Sur les neuf plantes de colza qui ont déjà pu être observées, le gène rapporteur s'exprime dans le pétale mais aussi dans d'autres organes de la fleur (données non montrées), comme on l'observe chez *Arabidopsis* avec ces grandes régions promotrices.

Ces résultats suggèrent que ces fragments sont trop longs alors que l'on
15 pense que le précédent (322 pb) pourrait être un peu court et donc amplifier les effets de position éventuels. Ce dernier cependant donne lieu aux résultats les plus prometteurs.

Les promoteurs pIB351 et pIB352 (figure 7) analogues au pIB100 mais comportant respectivement la séquence codante du gène de la barnase sauvage et
20 cette même séquence inactivée par insertion d'un codon stop (dénommée alors barnase mutée) au lieu de la séquence codante du gène rapporteur ont été introduites dans *Arabidopsis thaliana* (résultats non encore disponibles).

TABLEAU 2

[illegible]

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
- (B) RUE: 147 RUE DE L'UNIVERSITE
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75007

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PROMOTEUR SPECIFIQUE DES PETALES ET PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES A FLEURS SANS PETALE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 140 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: protéine A.thaliana

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

Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Ile	Thr	Ser	Ala	Val	Ile	Val	Val	Val	Leu	Ser
1				5					10					15	
Leu	Val	Leu	Gly	Ser	Val	Glu	Gln	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	His	Val	Pro
			20					25					30		
Lys	Ser	Pro	Lys	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	His	Pro	Asp	Phe	Leu	Val	Thr
		35					40					45			
Ile	Glu	Pro	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Ile	Pro	Gly	Val	Gly	Arg	Phe	Leu
50						55					60				

Leu Pro Pro Lys Cys Lys Lys Pro Phe Tyr Pro Tyr Asn Pro Val Thr
 65 70 75 80
 Gly Ala Pro Leu Thr Gly Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Asn Gly Gly Gln
 85 90 95
 Gly Ala Gly Pro His Thr Gln Leu Pro Gly Gly Asp Asp Thr Leu Val
 100 105 110
 Pro Asn Pro Gly Phe Glu Glu Pro Thr Pro Thr Ile Gly Ala Gly Thr
 115 120 125
 Gly Ser Asn Gly Gln Val Pro Pro Val Pro Leu Pro
 130 135 140

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 147 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: protéine colza

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

Met Ala Ser Ser Leu Leu Thr Leu Ala Ala Ala Ala Val Thr Val Met
 1 5 10 15
 Ile Leu Ser Leu Leu Leu Gly Pro Ala Glu Gln Val Ser Gly Leu Arg
 20 25 30
 His Ile Pro Lys Ser His Lys Thr Thr Asp Val Lys His Pro Glu Phe
 35 40 45
 Leu Val Thr Ile Glu Pro Lys Pro Thr Ile Leu Ile Pro Gly Val Gly
 50 55 60
 Arg Phe Leu Leu Pro Pro Lys Cys Lys Lys Pro Phe Tyr Pro Tyr Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Thr Gly Ala Pro Leu Thr Gly Gly Ser Ile Gly Gly Gln Ile
 85 90 95
 Pro Ser Phe Gly Gly Gly Gln Gly Gly Gly Ala Arg Thr Gln Leu Pro
 100 105 110

Gly Gly Asp Asp Thr Leu Val Pro Asn Pro Gly Phe Glu Thr Pro Thr
 115 120 125

Pro Ala Thr Gly Ala Gly Ala Gly Asn Asn Gly Gln Val Pro Pro Val
 130 135 140

Pro Leu Pro
 145

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 641 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: clone 9.2

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

AGCAGTCACT GTCATGATTC TTAGCCTACT GCTTGGACCT GCAGAGCAAG TTAGCGGACT	60
GCGTCATATT CCCAAGTCCC ATAAGACCAC TGATGTCAAA CACCCTGAGT TTCTTGTCAC	120
CATTGAGCCA AAACCAACTA TTCTCATCCC CGGTGTTGGA AGGTTCTTGC TTCCTCCCAA	180
ATGTAAGAAA CCATTCTACC CATACAATCC AGTCACTGGA GCTCCCCTTA CTGGCGGGTC	240
TATCGGTGGT CAAATCCCAT CATTTGGTGG TGGACAAGGA GGCGGAGCTC GCACCCAGCT	300
CCCTGGTGGC GATGATACCC TTGTCCCAA CCCCCGATTT GAAACTCCAA CCCCTGCCAC	360
TGGAGCTGGC GCTGGAAACA ACGGCCAAGT TCCTCCGGTG CCACTACCCT GATTTCTTTT	420
TCAATATCTG TCAACAAATA AGCATTTCTT TAATGCAAAA GTGTCTATTT GAGTCTTACC	480
TTCTGGTTTA CTAGCCGTCA CCTTAAGAGT CATATGTTTG TCATCTCTCT CTTTCTTTTT	540
GGAAGAGAGA ATCTTGTTGC TTATGCCGTC AGAAGAAATT TAAAGCATTT GTTTACATGC	600
CATTACATTC AACTATCAAA ATGCTTTATG ATAAAAAAAA A	641

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 711 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: X74360

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

GCTTTCTCCT CTACAACAAA ATAAATAAAA ATTAATGGCT TCTTCACTTA TCACCTCCGC	60
AGTCATTGTC GTGGTTTTAA GCCTAGTGCT TGGATCTGTA GAGCAAGTGA GTGGACTACG	120
TCACGTTCCC AAGTCCCCTA AGATCACTGA TGTCAAACAC CCTGACTTTC TTGTAACCAT	180
TGAGCCCAAA CCAACTATTC TCATTCCCGG TGTGGAAGG TTCTTGCTTC CTCCCAAATG	240
CAAGAAGCCG TTCTACCCTT ACAATCCTGT CACCGGAGCT CCACTTACTG GTGGGGGAAT	300
CCCATCATAT AATGGTGGAC AAGGGGCCCG ACCTCACACC CAACTCCCTG GTGGCGATGA	360
TACGCTTGTC CCAAACCCCG GATTTGAAGA GCCAACCCCG ACCATTGGAG CTGGCACAGG	420
AAGCAACGGC CAAGTTCCAC CAGTGCCACT ACCCTGAGTA TTATTAATCT GTCAACAAAT	480
AAGCATATCT TAGATGCAAA CATGTCTGTT TTGGTGTCTT GAGTCTTGGT TAGATAAGTA	540
ACCGCTACT TTACTAGCCG TTTCGTTTGC CATCTCTTTT TCTCTCTGTG TCTCTCTCTA	600
TTTGCTACAA AAAGAGAGAA TCTTGTTTCA TGTTTTTCAG TTTGTCTTTA GATGAATTCA	660
TTTTACATA CCATTATATT AAAATAAAGG AAATGTTCCG CAGTAAAAAA A	711

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

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 4516 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: clone génomique 4.1.1

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

GGATCCGTTG TTAGGATTTT AGGGCTTTGT GAGTTCAGAA AATCTCTAAA GCTTCATTTT	60
TATCAATCAA GCTTTTTTTT TTAAATTAA ACATTCTAAA GTCTCTAAAG TCATTATAAG	120

TTTATTTCTC CTCTTTTGTG TTGGTTTTTC TAAAACCAAT AATGCGTGAT TTTTGCAATT	180
TTTTTTTTTC ACTAAAAATG TTTTATTTTC TTTTACTTT GTAACATAAT CACTTATTTA	240
AGTTTATAAC AATTTTCGTTG AAATTTAAAA TTGACAAATT AATCATTGAA TTTTTTTCTT	300
GTTCAATTTAA GATCCGTATT GTACTACTTT TATAATCATC TATATTTAAA TTTTAAATAG	360
TATCATAATT TTATTTTTTA ATAAAAATATT TAAATATTAT CCAAACCTAT AATTTTAATA	420
CCAATCTGTT TTAATAAAAC GTAAACGAAT CAGCCAAATT CCTATGGCCA TAATTCTGAA	480
TCCAAGCTTA AACAAAAGTA CTTATCAATC GGACCCTAAG AGTCCTCGTA ATTAGGGTTC	540
TTTAAGATTT TTACCATTTG AGCAGTTGAA TCAATGATCG TTTTCATGCG AGTAACTTA	600
TTTGTAATAT TTAGTGGGGG CAGCTGCCTC CTCCCTGAAC ACCGTAGATC TCCCCCTGT	660
TTCTATCTCT TACTGTGGAT GTAAGATCTA TTATTTTCTT GGGTTTTGTG TTTGTGAATG	720
CGTCTTATAT AGTGAGCATT AGCTTAGAGT TTCCCATTTT ATTGAATATT TTCATTCTTA	780
TTCATGTGGG TATCACAAAG GCATGGCCGA CTACCACTAT GTTATTCCTA TTCCTCCAGA	840
TATTGCACAG CAGAAGAAGA GGAAATGGAT GGAGGTGAAG TCGCTTGCAG GTGATTCTTT	900
TCCGTTTATT TTGGTATTTT CATTATATTG CAAATCTTAA TATTTTGTAG CGAAAAGAAT	960
ATTTTGTAGC ATAGTTTAAA ATTTTAAATA CGTATTCTTG CTTTAAGCTG TGTTTTGATG	1020
TAAAGTAAAA CATATGTACC AAAAGAACAA GACAATGTTC AAGTCTATAC GGAACCCATA	1080
CGGGACCCTT GTCCTTGTCC AGTTGACATT GTTCAGGCCA AGAACTACAC CAACAATTTT	1140
AAATCAACCT ATTGAAATTA GAAAAGAAAT CCGCTAATGC AAATAAAAAG AAGTGACTCG	1200
CATATAGTTG CCAACTAATT GTTGATGTTA ATTAATAAGA TTAAGTGTTA AATTTATGAT	1260
AAAAAAGTGT TTAGGGATTG GATCTGGTGA TAAAAAGAT TATGTAGATG TTTTGCAGA	1320
AAAAGTGCTA AATAACATTT GTTTATTTTG TCATTATGTG TAGAATACAA AGAAGAAATG	1380
AACTAAGACT TTATAGTATA AATTATTGTG GTTGATTAAT TTTAGATCTT TTCCTGAAGA	1440
ATGATTGCTG AATAATAAAA TGTTCAATTT CTTAATGAGT ATGTCTACTC TTTAGTTATT	1500
TCTGACCCGA AACCAACAAA CACTAATGAT TGATTAACT AACCAATCAA CTTAACTTGT	1560
AAAACGAGTT GGCTTAGAAC ATGATTATTG AGAGGTTCTT AGGGTGGAGT TCTTAGCGGA	1620
ATATAAGAAC CTGTGTCTTA ATTTTAAATT AAAAAGCTA AGAACTGGCT CTAAATAAG	1680
AGTTTAAGAG CCGGTTCTTA GTTTTTTTAG TTAAAGTTA AGAGTCAGGT TTTTATATTC	1740

CGTTAAGAAC TTCACCTTAA GGACCTTCTA ATAATCATGC TCTTACGTTA TCTGACCAAA	1800
AATACGAACA GAAAAAATAA AAACCTCACTT ACCTCATCAT ATGAGATATG ACAAATGCAC	1860
TACTATTTAA GAAAAACAT TAAAAAAAC ATTAATGGTG TGGGAGGGTC ATTAATGGAG	1920
GTCACACAAA AGAAAGGCCA GAGAAGGCAA ATTGAAGGTG ACTGTATACA AAAGTAGGTC	1980
TTTCAGTTTT GCNCAGAGGA AGCTCATGAC ATTCACCAAA GCAGCACGAA TGAAGTTCAT	2040
CAAGTTTTTA ATTAGGCTTC GCTTCTTGTG ATTCCTCGAA AATTTATATC ATTTCATACG	2100
TTCGTTCTTG TTTTCATGTG ACTTTCCTCT TCTCCTACCG TGAGTCTCAT CAATTTGTA	2160
GATCGCTANG TTAACGATCC ACGTATCATA NATACACTTC TTTCTATAGC CGTACGTATA	2220
CCACACATTA CNTCATCCCA CTTCNTAACT TATATAATTT TACTACTCAG ATCACNAGAG	2280
TACGTATATC AGGAAGTCAT TTCTTCTCCT TGTCTATTC CTCTCTTTCT TTGTCCGGCT	2340
CTTATCTTCG CTAGTAGGAA TTTTCCGACG CACCCTTATC CAAGTATGTA TGCTATTCTC	2400
TCTCACTCTC CTTAATTTTA CACACCTCTT TCACTATCTT CAATGTCTTT TAACTTGTTT	2460
CAATTATGTT CGTGTGGGTG GGCAGGTCAT AATCATCATC ATGTCGGAAT GATGGGTAGG	2520
ACAATGAAGC GTCAGAGGAG GCCGGACACG GTGCAGGTGG CAGGGTCTAG GCTGCCGGAC	2580
TGCTCACACG CGTGTGGCTC ATGCTCTCCA TGCCGTCTTG TGATGGTTAG CTTCGTGTGT	2640
GCATCGCTAG AGGAGGCTGA GACTTGTCCC ATGGCTTATA AGTGCATGTG CAAGAACAAA	2700
TCCTACCCAG TCCCATGATG AATTAGCCTC TCTCACACTT AACTCTATGC ATTCAGACGT	2760
TTTGTTTCTT TCCTTTTGCT TCTTCGGATA AATTACCCTG TGTATGTATA AAATGCATCT	2820
TTTCCTTTTT TTAATTCTTT TGTCTTTTTG ATATCTTAAA CACAGTTTTA CGAAACAAGA	2880
ATAAGATTAG TTGAGCCACT CAAAAGCGTG GTCGACTAAA TTGAAACAGA AAGCCACACA	2940
ACTCATTGGG CTCTTGTTTA TGGCCCATGA CACCGCATTT CAGACTGCAA CAACCAAAGT	3000
TGTAGAAAGA ATAATATTTA AAGGGCACGT ACATACGTTG TTGGCTTCCA CCAAACCTTG	3060
GAGGCTCTCT AATAATTAGC AACTCCATT CTATGCATTT GTTACACACC TTCTATTTTC	3120
AACCATTTCA TCTCACCTTT TTAAATGTT TCCACAGTTA GCTCAGTAAA TTCACTATAT	3180
ACAGACATAC ACCTTCCCTC CACAAGATCA AACAACCACA CTACCTTCCC CGAGTTTTCT	3240
CACTACAATT TAAAGAAAA AACAAATGGC TTCGTCCCTG CTAACACTCG CAGCAGCAGC	3300
AGTCACTGTC ATGATTCTTA GCCTACTGCT TGGACCTGCA GAGCAAGTTA GCGGACTGCG	3360

TCATATTCCC AAGTCCCATA AGACCACTGA TGTCAAACAC CCTGAGTTTC TTGTCACCAT	3420
TGAGCCAAAA CCAACTATTC TCATCCCCGG TGTGGAAGG TTCTTGCTTC CTCCCAAATG	3480
TAAGAAACCA TTCTACCCAT ACAATCCAGT CACTGGAGCT CCCCTTACTG GCGGGTCTAT	3540
CGGTGGTCAA ATCCCATCAT TTGGTGGTGG ACAAGGAGGC GGAGCTCGCA CCCAGCTCCC	3600
TGGTGGCGAT GATACCCTTG TCCCAAACCC CGGATTGAA ACTCCAACCC CTGCCACTGG	3660
AGCTGGCGCT GGAAACAACG GCCAAGTTCC TCCGGTGCCA CTACCCTGAT TTCTTTTTCA	3720
ATATCTGTCA ACAAATAAGC ATTTCTTTAA TGCAAAAGTG TCTATTTGAG TCTTACCTTC	3780
TGGTTTACTA GCCGTCACCT TAAGAGTCAT ATGTTTGTCA TCTCTCTCTT TCTTTTTGGA	3840
AGAGAGAATC TTGTGTCTTA TGCCGTCAGA AGAAATCTAA AGCATTTGTT TACATGCCAT	3900
TACATTCAAC TATCAAAATG CTTTATGATA CATGTACTCT ACTCCTCCAT TTCGCATACT	3960
AAGTAGACTA GATGAAGACA AGTACTCAAT CAAAGCTGAA TACACTAATC ACCCATTCOA	4020
ATTATTTCTT AGAATTTGAA TGAACCAAAC TAACAAAAAA GAACAATTAC AACCTAATGA	4080
TACGCTGATG CAAAACCTACA AAAGGAGGTC GAATAAGGTA AGAGGATGGA GCAGAGTCGT	4140
ATATATCAGA GAAAGATAGT ATAGTAAGAG AAAAAGAGGA AACACACAAA TGACAAATGA	4200
TAGTATTACA TTTTCTCATC ATTATTCAGA GTAAACAAAG CAATAAAGTG AAAGAATTCA	4260
CATAGTGTA TCTTGGAATT GAGTATCTAC GGGGAGGAAG AAACCTGATC AGCCTCAATC	4320
ATGGACTTTA TGTNGTACTC TCCTGCTTTG TACGACGACC TAACCATCGG CCCTGATGCT	4380
ACGTACCTGA ATCCCTGTTT AACCAACAAA CCCATTTAGC CCTCTCCTTG TTTCCCATCA	4440
AATTTCCNGA ACTAAAAACA GANNAGANAN NAGGCTTACC ATTTCCATGC CNAGANGANG	4500
GTATCTCTCC AAAGCC	4516

REFERENCES

- 5 Atanassov I et al. (1996) Plant Science 118, 185-194

- Bechtold N. et al (1993) Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences 316,
 1194-1199

- 10 Choisne Nathalie (1997). Etude de l'expression *in vivo* d'une gène d'ARNt leu
 de *Phaseolus vulgaris* et l'utilisation de ce gène dans un système de suppression.
 Thèse de doctorat de l'université de Paris XI (N° d'ordre 4691).

- Elomaa P. et al. (1996). Molecular Breeding 2 : 41-50.
- 15 Gutterson N. (1995). HortScience, Vol. 30(5), August 1995.

- Hartley RW, 1988. Barnase and barstar : expression of its cloned inhibitor permits
 expression of a cloned ribonuclease. J. Mol. Biol, 202, 913-915.
- 20 Lamarque C. (1983) Proc. 6th int. Rapeseed Cong. 1983, Paris, France, pp 903-
 907

- Noda K-I, et al. (1994). Nature. Vol 369. 23 June 1994.
- 25 Phillips A.L. and Huttly A.K. (1994). Plant Mol Biol. 24 : 603-615

- Siemens and Schieder 1996. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2, 66-75

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie :
 - a) de la séquence selon SEQ ID N° 5, ou
 - 5 b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
 - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 correspondant à tout ou partie :
 - 10 a) de la séquence s'étendant du nucléotide 1 au nucléotide 3233 et de préférence du nucléotide 2911 au nucléotide 3233 de SEQ ID N° 5, ou
 - b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
 - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
- 15 3. Vecteur d'expression cellulaire comprenant une séquence selon la revendication 2 placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit capable de modifier la structure, la forme, la coloration et/ou la texture des pétales de fleurs.
- 20 4. Vecteur d'expression cellulaire comprenant une séquence selon la revendication 2 placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.
- 25 5. Vecteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que le produit cytotoxique est une ribonucléase et de préférence la barnase.
6. Cellules de plante transformées par un vecteur selon l'une des revendications 3 à 5.
- 30 7. Plantes comprenant des cellules selon la revendication 6.
8. Plantes dont les fleurs n'ont pas de pétale.

9. Procédé d'obtention de plantes ornementales comprenant l'insertion dans lesdites plantes d'un vecteur selon la revendication 3.
- 5 10. Procédé d'obtention de plantes dont les fleurs n'ont pas de pétale comprenant l'insertion dans lesdites plantes d'un vecteur selon la revendication 4 ou 5.
11. Procédé d'obtention de plantes hybrides dont les fleurs n'ont pas de pétale
10 comprenant les étapes de :
- a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur selon la revendication 4 ou 5 modifié par insertion d'au moins un codon stop dans la séquence codante de l'ADN,
 - b) croisement des plantes de lignée A obtenues en a) avec des plantes de
15 lignées B exprimant le gène d'un ARNt suppresseur,
 - c) sélection des plantes hybrides avec des fleurs sans pétale.
12. Plantes selon la revendication 7 ou 8 ou obtenues par la mise en œuvre du procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisées en ce qu'elles
20 appartiennent à la famille des Brassicacées et de préférence en ce qu'il s'agit du colza.

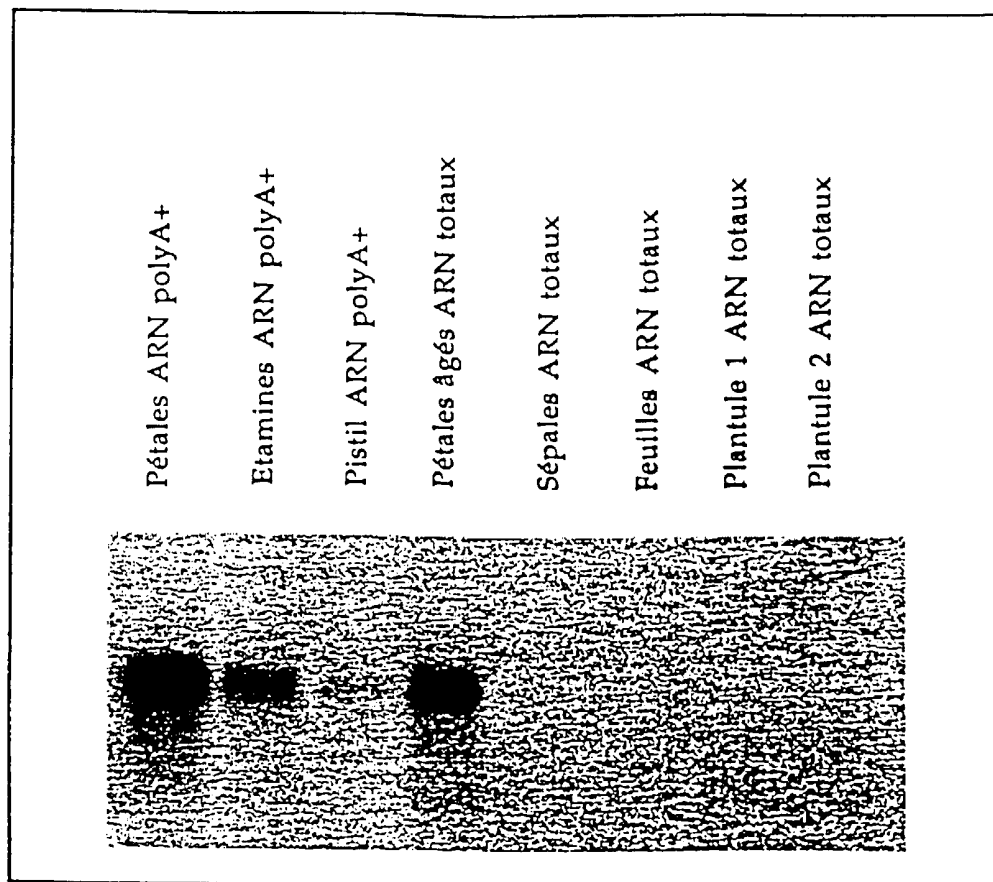


FIGURE 1

MASSL..ITSAVIVVLSVLGSVEQVSGLRHVPKSPKITDVKHPDFLVTIEPKPTILIPGVGRFLL

** * *** ** ***** *** * ***** *****
MASSLTLAAAATVMILSLLGPAEQVSGLRHIPKSHKTTDVKHPEFLVTIEPKPTILIPGVGRFLL
PPCKKKPFYPNPVTGAPLTGGIPSYNGGQGAGPH...TQLPGGDDTLVPNPGFEEPTPTIGAGTG

PPCKKKPFYPNPVTGAPLTGGSIGGQIPSFGGGGGARTQLPGGDDTLVPNPGFEEPTPTATGAGAG
SNGQVPPVPPLP

NNGQVPPVPPLP

FIGURE 2

FIGURE 3

AthX74	GCTTTCTCCT	CTACAACAAA	ATAAAATAAA	ATTAATGGCT	TCTTCACTTA
9.2	-----	-----	-----	-----	-----
	51				100
AthX74	TCACCTCCGC	AGTCATTGTC	GTGGTTTTAA	GCCTAGTGCT	TGGATCTGTA
9.2	-----AGC	AGTCACTGTC	ATGATTCTTA	GCCTACTGCT	TGGACCTGCA
	101				150
AthX74	GAGCAAGTGA	GTGGACTACG	TCACGTTCCC	AAGTCCCCTA	AGATCACTGA
9.2	GAGCAAGTTA	GCGGACTGCG	TCATATTCCC	AAGTCCCATA	AGACCACTGA
	151				200
AthX74	TGTCAAACAC	CCTGACTTTC	TTGTAACCAT	TGAGCCCAAA	CCAACATATC
9.2	TGTCAAACAC	CCTGAGTTTC	TTGTCACCAT	TGAGCCCAAA	CCAACATATC
	201				250
AthX74	TCATTCCCCG	TGTTGGAAGG	TTCTTGCTTC	CTCCCAAATG	CAAGAAGCCG
9.2	TCATCCCCCG	TGTTGGAAGG	TTCTTGCTTC	CTCCCAAATG	TAAGAAACCA
	251				300
AthX74	TTCTACCCTT	ACAATCCTGT	CACCGGAGCT	CCACTTACT.	
9.2	TTCTACCCAT	ACAATCCAGT	CACTGGAGCT	CCCCTTACTG	GCGGGTCTAT
	301				350
AthX74	.GGTGGGGGA	ATCCCATCAT	ATAATGGTGG	ACAAGGGGCC	GGACCTCACA
9.2	CGGTGGTCAA	ATCCCATCAT	TTGGTGGTGG	ACAAGGAGGC	GGAGCTCGCA
	351				400
AthX74	CCCAACTCCC	TGGTGGCGAT	GATACGCTTG	TCCCAAACCC	CGGATTTGAA
9.2	CCCAGCTCCC	TGGTGGCGAT	GATACCCCTG	TCCCAAACCC	CGGATTTGAA
	401				450
AthX74	GAGCCAACCC	CGACCATTGG	AGCTGGCACA	GGAAGCAACG	GCCAAGTTCC
9.2	ACTCCAACCC	CTGCCACTGG	AGCTGGCGCT	GGAAACAACG	GCCAAGTTCC
	451				500
AthX74	ACCAGTGCCA	CTACCCTGAG	TATTATT...	.AATCTGTCA	ACAAATAAGC
9.2	TCCGGTGCCA	CTACCCTGAT	TTCTTTTCA	ATATCTGTCA	ACAAATAAGC
	501				550
AthX74	ATATCTTAGA	TGCAAACATG	TCTGTTTTGG	TGTCTTGAGT	CTTGGTTAGA
9.2	ATTTCTTTAA	TGCAAAAGTG	TCTATTT..G	AGTCTTACCT	TCTGGTTTAC
	551				600
AthX74	TAAGTAACCC	GCTACTTTAC	TAGCCGTTTC	GTTTGCCATC	TCTTTTCTC
9.2	TAGCCGTAC	CTTAAGAGTC	ATATGTTTGT	CATCTCTCTC	TTTCTTTTGT
	601				650
AthX74	TCTGTGTCTC	TCTCTATTTG	CTACAAAAAG	AGAGAATCTT	GTTTCATGTT
9.2	GAAGAGAGAA	TCTTGTGTCT	TATGCCGTCA	GAAGAAATTT	AAAGCATTGT
	651				700
AthX74	TTTCAGTTTG	TCTTTAGATG	AATTCATTTT	CACATACCAT	TATATTAAAA
9.2	TTT..ACATG	CCATTACATT	CAACTATCAA	AATGCTTTAT	GATAAAAAAA
	701		727		
AthX74	TAAAGGAAAT	GTTCCGCAGT	AAAAAAA		
9.2	AA-----	-----	-----		

Alignement nucléotidique des ADNc X74360 et 9.2

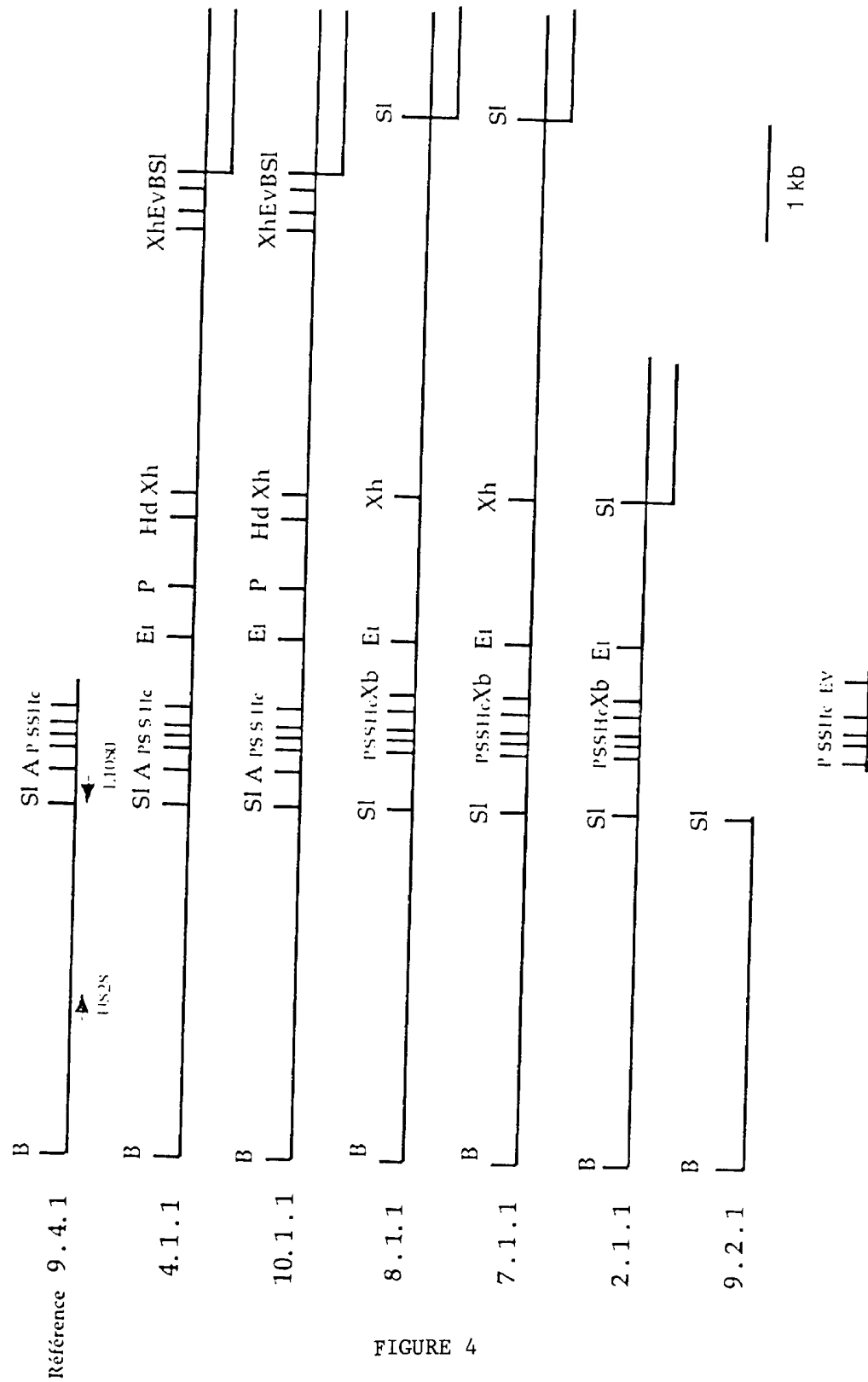


FIGURE 4

FIGURE 5

1 GGATCCGTTG TTAGGATTTT AGGGCTTTGT GAGTTCAGAA AATCTCTAAA
 51 GCTTCATTTT TATCAATCAA GCTTTTTTTT TTTAAATTAA ACATTCTAAA
 101 GTCTCTAAAG TCATTATAAG TTTATTTCTC CTCTTTTGTG TTGGTTTTTC
 151 TAAAACCAAT AATGCGTGAT TTTTGCAATT TTTTTTTTTC ACTAAAAATG
 201 TTTTATTTTC TTTTACTTT GTAACATAAT CACTTATTTA AGTTTATAAC
 251 AATTTTCGTTG AAATTTAAAA TTGACAAATT AATCATTGAA TTTTTTCTT
 301 GTTCATTTAA GATCCGTATT GTACTACTTT TATAATCATC TATATTTAAA
 351 TTTTAAATAG TATCATAATT TTATTTTTTA ATAAAATATT TAAATATTAT
 401 CCAAACCTAT AATTTTAATA CCAATCTGTT TTAATAAAAC GTAAACGAAT
 451 CAGCCAAATT CCTATGGCCA TAATTCTGAA TCCAAGCTTA AACAAAAGTA
 501 CTTATCAATC GGACCCTAAG AGTCCTCGTA ATTAGGGTTC TTAAAGATTT
 551 TTACCATTTG AGCAGTTGAA TCAATGATCG TTTTCATGCG AGTAACTTA
 601 TTTGTAATAT TTAGTGGGGG CAGCTGCCTC CTCCTGAAC ACCGTAGATC
 651 TCCCCCTGT TTCTATCTCT TACTGTGGAT GTAAGATCTA TTATTTCTT
 701 GGGTTTTGTG TTTGTGAATG CGTCTTATAT AGTGAGCATT AGCTTAGAGT
 751 TTCCCATTTT ATTGAATATT TTCATTCTTA TTCATGTGGG TATCACAAAG
 801 GCATGGCCGA CTACCACTAT GTTATTCCTA TTCCTCCAGA TATTGCACAG
 851 CAGAAGAAGA GGAAATGGAT GGAGGTGAAG TCGCTTGCAG GTGATTCTTT
 901 TCCGTTCAAT TTGGTATTTT CATTATATTG CAAATCTTAA TATTTTGTAG
 951 CGAAAAGAAT ATTTTGTAGC ATAGTTTAAA ATTTTAAATA CGTATTCTTG
 1001 CTTTAAGCTG TGTTTTGATG TAAAGTAAAA CATATGTACC AAAAGAACAA
 1051 GACAATGTTT AAGTCTATAC GGAACCCATA CGGGACCCTT GTCCTTGTC
 1101 AGTTGACATT GTTCAGGCCA AGAACTACAC CAACAATTTT AAATCAACCT
 1151 ATTGAAATTA GAAAAGAAAT CCGCTAATGC AAATAAAAAG AAGTGACTCG
 1201 CATATAGTTG CCAACTAATT GTTGATGTTA ATTAATAAGA TTAAGTGTTA
 1251 AATTTATGAT AAAAAAGTGT TTAGGGATTG GATCTGGTGA TAAAAAGAT
 1301 TATGTAGATG TTTTGCAGA AAAAGTGCTA AATAACATTT GTTTATTTTG
 1351 TCATTATGTG TAGAATACAA AGAAGAAATG AACTAAGACT TTATAGTATA
 1401 AATTATTGTG GTTGATTAAT TTTAGATCTT TTCCTGAAGA ATGATTGCTG

6/11

FIGURE 5 (suite)

1451 AATAATAAAA TGTTCAATTTG CTTAATGAGT ATGTCTACTC TTTAGTTATT
 1501 TCTGACCCGA AACCAACAAA CACTAATGAT TGATTAAACT AACCAATCAA
 1551 CTTAACTTGT AAAACGAGTT GGCTTAGAAC ATGATTATTG AGAGGTTCTT
 1601 AGGGTGGAGT TCTTAGCGGA ATATAAGAAC CTGTGTCTTA ATTTTAAATT
 1651 AAAAAGCTA AGAACTGGCT CTAAATAAG AGTTTAAGAG CCGGTTCTTA
 1701 GTTTTTTTAG TTTAAAGTTA AGAGTCAGGT TTTTATATTC CGTTAAGAAC
 1751 TTACCTTAA GGACCTTCTA ATAATCATGC TCTTACGTTA TCTGACCAAA
 1801 AATACGAACA GAAAAATAA AAACCTACTT ACCTCATCAT ATGAGATATG
 1851 ACAAATGCAC TACTATTTAA GAAAAACAT TAAAAAAAC ATTAATGGTG
 1901 TGGGAGGGTC ATTAATGGAG GTCACACAAA AGAAAGGCCA GAGAAGGCAA
 1951 ATTGAAGGTG ACTGTATACA AAAGTAGGTC TTTCAGTTTT GCNCAGAGGA
 2001 AGCTCATGAC ATTCACCAA GCAGCACGAA TGAAGTTCAT CAAGTTTTTA
 2051 ATTAGGCTTC GCTTCTTG TG ATTCTCGAA AATTTATATC ATTTTCATACG
 2101 TTCGTTCTTG TTTTCATGTG ACTTTCCTCT TCTCCTACCG TGAGTCTCAT
 2151 CAATTTCTGTA GATCGCTANG TTAACGATCC ACGTATCATA NATACACTTC
 2201 TTTCTATAGC CGTACGTATA CCACACATTA CNTCATCCCA CTTCNTAACT
 2251 TATAAATTT TACTACTCAG ATCACNAGAG TACGTATATC AGGAAGTCAT
 2301 TTCTTCTCCT TGTCCTATTC CTCTCTTTCT TTGTCCGGCT CTTATCTTCG
 2351 CTAGTAGGAA TTTTCCGACG CACCCTTATC CAAGTATGTA TGCTATTCTC
 2401 TCTCACTCTC CTTAATTTTA CACACCTCTT TCACTATCTT CAATGTCTTT
 2451 TAACTTGTTT CAATTATGTT CGTGTGGGTG GGCAGGTCAT AATCATCATC
 2501 ATGTCGGAAT GATGGGTAGG ACAATGAAGC GTCAGAGGAG GCCGGACACG
 2551 GTGCAGGTGG CAGGGTCTAG GCTGCCGGAC TGCTCACACG CGTGTGGCTC
 2601 ATGCTCTCCA TGCCGTCTTG TGATGGTTAG CTTCTGTGTG GCATCGCTAG
 2651 AGGAGGCTGA GACTTGTCCC ATGGCTTATA AGTGCATGTG CAAGAACAAA
 2701 TCCTACCCAG TCCCATGATG AATTAGCCTC TCTCACACTT AACTCTATGC
 2751 ATTCAGACGT TTTGTTTCTT TCCTTTTGCT TCTTCGGATA AATTACCCTG
 2801 TGTATGTATA AAATGCATCT TTTCCFTTTT TTAATTCCTT TGTCTTTTGT
 2851 ATATCTTAAA CACAGTTTTA CGAAACAAGA ATAAGATTAG TTGAGCCACT

7/11

FIGURE 5 (suite)

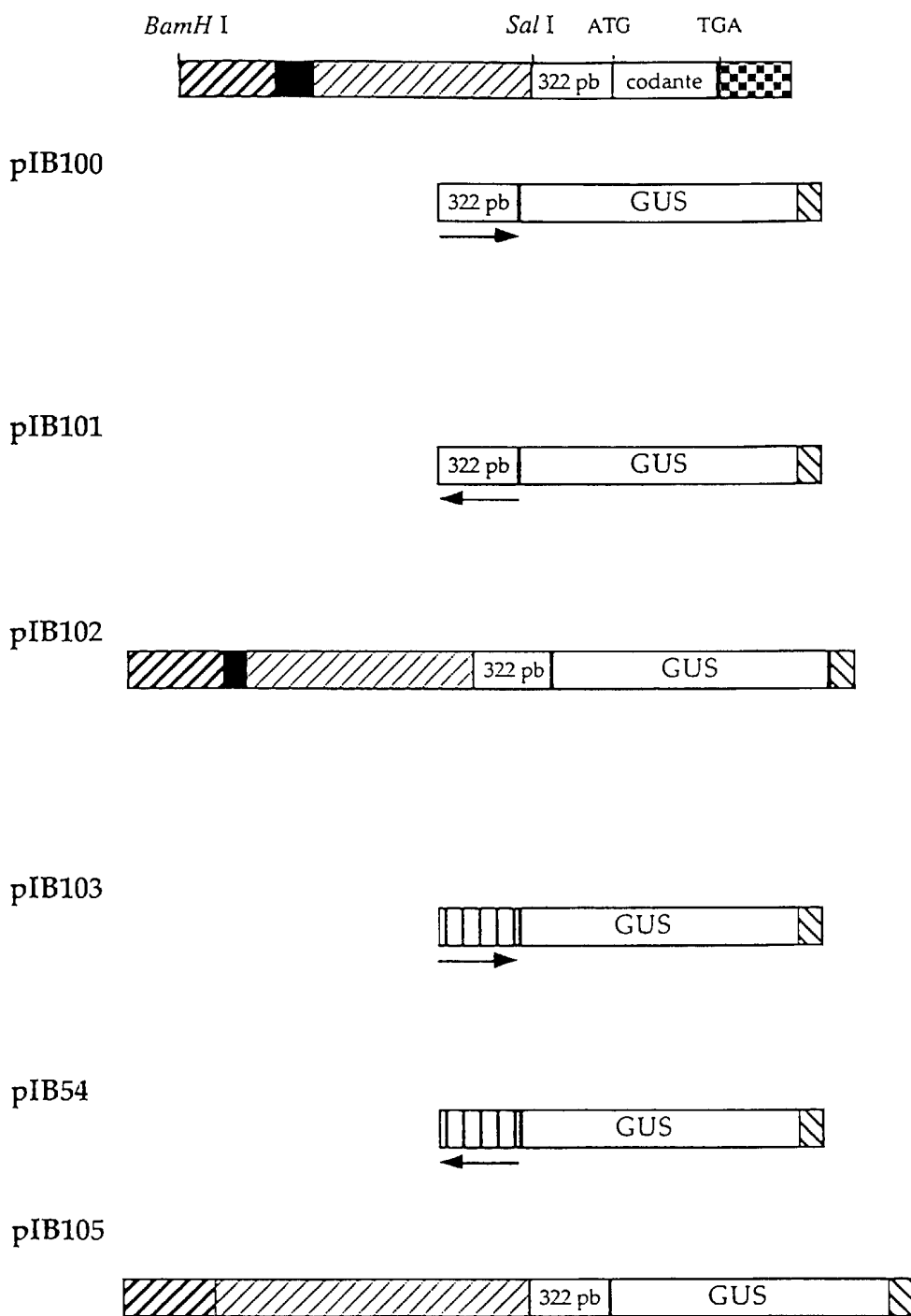
2901 CAAAAGCGTG GTCGACTAAA TTGAAACAGA AAGCCACACA ACTCATTGGG
2951 CTCTTGTTTA TGGCCCATGA CACCGCATTT CAGACTGCAA CAACCAAAGT
3001 TGTAGAAAGA ATAATATTTA AAGGGCACGT ACATACGTTG TTGGCTTCCA
3051 CCAAACCTTG GAGGCTCTCT AATAATTAGC AACTCCATT CTATGCATTT
3101 GTTACACACC TTCTATTTTC AACCATTTC A TCTCACCTTT TTAAATGTT
3151 TCCACAGTTA GCTCAGTAAA TTCACTATAT ACAGACATAC ACCTTCCCTC
3201 CACAAGATCA AACAACCACA CTACCTTCC CGAGTTTTCT CACTACAATT
3251 TAAAAGAAAA AACAATGGC TCGTCCCTG CTAACACTCG CAGCAGCAGC
3301 AGTCACTGTC ATGATTCTTA GCCTACTGCT TGGACCTGCA GAGCAAGTTA
3351 GCGGACTGCG TCATATTCCC AAGTCCCATA AGACCACTGA TGTCAAACAC
3401 CCTGAGTTTC TTGTCACCAT TGAGCCAAAA CCAACTATTC TCATCCCCGG
3451 TGTTGGAAGG TTCTTGCTTC CTCCCAAATG TAAGAAACCA TTCTACCCAT
3501 ACAATCCAGT CACTGGAGCT CCCCTTACTG GCGGGTCTAT CGGTGGTCAA
3551 ATCCCATCAT TTGGTGGTGG ACAAGGAGGC GGAGCTCGCA CCCAGCTCCC
3601 TGGTGGCGAT GATACCCTTG TCCCAAACCC CGGATTTGAA ACTCCAACCC
3651 CTGCCACTGG AGCTGGCGCT GGAAACAACG GCCAAGTTCC TCCGGTGCCA
3701 CTACCCTGAT TTCTTTTCA ATATCTGTCA ACAAATAAGC ATTTCTTTAA
3751 TGCAAAAGTG TCTATTTGAG TCTTACCTTC TGGTTTACTA GCCGTCACCT
3801 TAAGAGTCAT ATGTTTGTC TCTCTCTCTT TCTTTTGGGA AGAGAGAATC
3851 TTGTGTCTTA TGCCGTCAGA AGAAATCTAA AGCATTGTGTT TACATGCCAT
3901 TACATTCAAC TATCAAAATG CTTTATGATA CATGTACTCT ACTCCTCCAT
3951 TTCGCATACT AAGTAGACTA GATGAAGACA AGTACTCAAT CAAAGCTGAA
4001 TACACTAATC ACCCATTC AA ATTATTTCTT AGAATTTGAA TGAACCAAAC
4051 TAACAAAAA GAACAATTAC AACCTAATGA TACGCTGATG CAAACTACA
4101 AAAGGAGGTC GAATAAGGTA AGAGGATGGA GCAGAGTCGT ATATATCAGA
4151 GAAAGATAGT ATAGTAAGAG AAAAAGAGGA AACACACAAA TGACAAATGA
4201 TAGTATTACA TTTTCTCATC ATTATTCAGA GTAAACAAAG CAATAAAGTG
4251 AAAGAATTCA CATAGTGTA TCTTGGAATT GAGTATCTAC GGGGAGGAAG
4301 AAACGATC AGCCTCAATC ATGGACTTTA TGTNGTACTC TCCTGCTTTG
4351 TACGACGACC TAACCATCGG CCCTGATGCT ACGTACCTGA ATCCCTGTTT

4401 AACCAACAAA CCCATTTAGC CCTCTCCTTG TTTCCCATCA AATTTCNGA
4451 ACTAAAAACA GANNAGANAN NAGGCTTACC ATTTCCATGC CNAGANGANG
4501 GTATCTCTCC AAAGCC

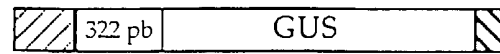
FIGURE 5 (suite)

FIGURE 6

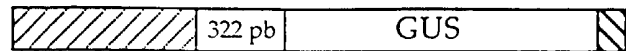
clone génomique 4.1.1



pIB56



pIB57



pIB58

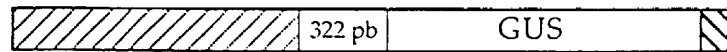


FIGURE 6 (suite)

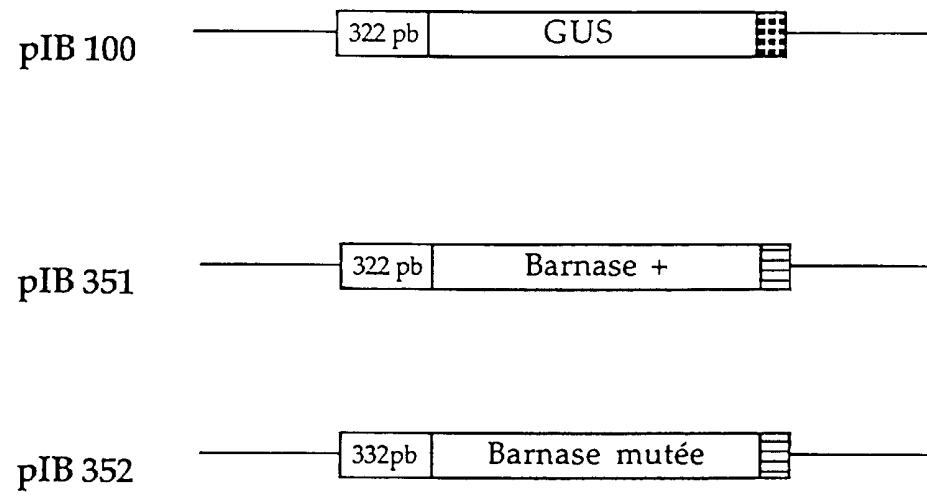


FIGURE 7

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 550222
FR 9711832

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 94 00582 A (CENTRE FOR PLANT BREEDING AND REPRODUCTION RESEARCH (CPRO-DLO)) 6 janvier 1994 * le document en entier *	1-4,6-10
A	EP 0 524 910 A (SANDOZ LTD ;SANDOZ AG) 27 janvier 1993 * abrégé * * page 4, ligne 35-55; exemples 4.2,8 *	1-3,6,7, 10
A	WO 93 14211 A (E. COEN ET AL.,) 22 juillet 1993 * page 2, ligne 33 - page 3, ligne 9 * * page 8, ligne 7-25 *	1-3,6,7, 10
D,A	A.L. PHILLIPS AND A.K. HUTTLY: "Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from Arabidopsis thaliana by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel, gamma-TIP, is increased by GA3" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 24, 1994, BE, pages 603-615, XP002070644 * abrégé * * figure 3B * * page 612, colonne 2 * * page 613, colonne 2 *	1,2
A	C.D. DAY ET AL., : "Genetic ablation of petal and stamen primordia to elucidate cell interactions during floral development" DEVELOPMENT, vol. 121, 1995, CAMBRIDGE, GB, pages 2887-2895, XP002070645 * le document en entier *	1,3,4, 6-8,10
		1
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 juillet 1998		Mateo Rosell, A.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire 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		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 550222
FR 9711832

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	N. CHOISNE ET AL., : "Transactivation of a target gene using a suppressor tRNA in transgenic tobacco plants" THE PLANT JOURNAL, vol. 11, no. 3, 1 mars 1997, GB, pages 597-604, XP002070646 * le document en entier *	1,11
E	EP 0 823 480 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 11 février 1998 * page 6, ligne 27 - page 8, ligne 5; exemples IV,V *	1,4-6, 11,12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
7 juillet 1998		Mateo Rosell, A.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général 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 & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)