



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

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C12N 15/82, 9/02, 5/10, G01N 33/50, A01H 5/00</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/23605</b> (43) Date de publication internationale: 27 avril 2000 (27.04.00)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB99/01719 (22) Date de dépôt international: 20 octobre 1999 (20.10.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/13283 20 octobre 1998 (20.10.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE JOSEPH FOURIER [FR/FR]; Boîte postale 53, F-38041 Grenoble Cedex 9 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CAROL, Pierre [FR/FR]; Université Joseph Fourier, Génétique Moléculaire des Plantes, Cermo Boîte Postale 53X, F-38041 Grenoble Cedex (FR). KUNTZ, Marcel [FR/FR]; Université Joseph Fourier, Génétique Moléculaire des Plantes, Cermo Boîte Postale 53X, F-38041 Grenoble Cedex (FR). MACHE, Régis [FR/FR]; Université Joseph Fourier, Génétique Moléculaire des Plantes, Cermo Boîte Postale 53X, F-38041 Grenoble Cedex (FR). (74) Mandataire: CABINET GERMAIN &amp; MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, IL, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	

(54) Title: cDNA SEQUENCE TRANSCRIBING A mRNA CODING FOR THE TERMINAL OXYDASE ASSOCIATED WITH CAROTENOID BIOSYNTHESIS AND USES

(54) Titre: SEQUENCE D'ADNc TRANSCRIVANT UN ARNm CODANT POUR L'OXYDASE TERMINALE ASSOCIEE A LA BIOSYNTHESE DES CAROTENOIDES ET UTILISATIONS

(57) Abstract

The invention concerns a cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) sequence represented by SEQ ID NO: 1, transcribing a mRNA (messenger deoxyribonucleic acid), itself coding for the TOCB (terminal oxydase associated with carotenoid biosynthesis) represented by SEQ ID NO: 2, and the complementary sequence of SEQ ID NO:1, vectors transforming cell, plant or fragment of plant, and the method for modifying the production of carotenoids in a plant.

(57) Abrégé

L'invention concerne une séquence d'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) représentée par SEQ ID NO:1, transcrivant un ARNm (acide désoxyribonucléique messenger), lui-même codant pour l'enzyme OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes) représentée par SEQ ID NO:2, ainsi que la séquence complémentaire de SEQ ID NO:1, des vecteurs de transformations de cellule, de plante ou fragment de plante, et le procédé pour modifier la production de caroténoïdes dans une plante.

```

1
CCG CTC ACA TTG GGA TTC GTC ATT CTT CTT CTA AAA CCC GCA AAA TTT CTC CAT TTC TAC
61
CAA AAA TAT CCA AAT TTT ACT TTT CTT TCC TGT GAA ATT ATC TCC TCA AAT CTT TGG TTC
121
CTC ACG GAG ATG GCG GCG ATT TCA GGC ATC TCC TCT GGT ACG TTT ACG ATT TCA CCG CCG
H A A I S G I S S G T I T I S E R P
181
TTG GTF ACT CTT GGA CCG TCT AGA GCG CCG CTT TCC TAC AGE TCC TCT GAG CAA TTG CTT
L V T L R R S R A A A V S Y S S S H R L L
241
CAT CAT CTT CCT CTC TCT TCT CCF CCF CTO CTA TTA ACG AAC AAT CAT CGA GTC CAA CCA
H K R P L S S R R F L L R N H R V D * A
301
ACO ATT TTG CAA GAC GAT GAA GAG AAA GTC GTC GAG GAA TCG TTT AAA OCC GAG ACT
T I L Q D D E E K V V V E E S F K A E T
361
TCT ACT GGT ACA GAA CCA CTT GAG GAG CCA AAT ATG AGT TCT TCT TCA ACT AGT CTT TTT
S T O T E P L E E P N H S S S S T S A F
421
GAG ACA TGG ATC ATC ACG CTT GAG CAA GGA GTC AAT GTF TCT CTT ACY GAC TCG GTF ATT
E T W I I K L E Q G V N V F L T D S V I
481
AGC ATA CTT GAC ACT TTG TAT COT GAC CCA ACA TAT GCA AGG TTC TTT GTF CTT GAG ACA
K I L D T L Y R D R T Y A R F F V L E T
541
ATF GCT AGA GTC CCT TAT TTT GCU TTT ATG TCT GTC CTA CAT ATG TAT GAG ACC TTT GGT
I A R V P Y F A F H S V L H N Y E T F G
601
TGG TGG AGG AGA CCA GAT TAT TTG AAA GTA CAC TTT CCT GAG AGC TGG AAT GAA ATG CAT
W R R A D Y L K V H F A E S W N E H H
661
CAC TTG CTC ATA ATG GAA GAA TTG GGT GGA AAT TCT TGG TGG TTT GAT CGT TTT CTG GCT
H L L I H E E L G G N S W W F D R F L A
721
CAG CAC ATA GCA ACC TTC TAC TAC TTC ATG ACA GTC TTC TTG TAT ATC TTA AGC CCT AGA
O H I A T P Y Y F H T V P L Y I L S P R
781
ATG GCA TAT CAC TTT TCG GAA TGT GTC GAG ACT CAT CCA TAT GAG ACT TAT GAT AAA TTT
H A Y H F S E C V E S H A Y E T Y D K F
841
CTC AAG GGC AGT GGA GAG TTG AAG AAT ATG CCT GCA CCG GAT ATC CCA GTA AAA TAC
L K A E G R F L K H N P A P D I A V K Y
901
TAT ACG GGA GGT GAC TTG TAC TTA TTT GAT GAG TTC CAA ACA TCA AGA ACT CCC AAT ACT
Y T G G D L Y L F D E F Q T S R T P H T
961
CGA AGA CCA GTA ATA GAA AAT CTA TAC GAT GTC TTT GTC AAC ATA AGA GAT GAT GAA GCA
R R P V I E N L Y D V F V N I R D D E A
1021
GAA CAC TCC AAG ACA ATG AGA OCT TGT GAC ACT CTA GGC AAT CTT GGT TCT CCA CAC TCC
E H C K T H R A C Q T L G S L R S P H S
1081
ATF TTA GAT GAT GAT GAT ACT GAA GAA GAA TCA GGG TGT GTF GTF CTT GAG GAG GCT CAT
I L D D D D T E E E S G C V V T E E A H
1141
TGC GAA GGT ATT GTA GAC TCC CTC AAG AAA TCC ATT ACA AGT TAA TAA ATT AGA AAG TAA
C E O I V D C L R K S I T S
1201
ACT AAA AAA GAT TAT TTG TAT CAG CTC ATG AAC AAT AGA TAT AAT CCC ATA TAC TTG GGA
1261
ATA AAG GAA TAA TGT GAA ATT CCC ATC GTF GTC CTA GTC TGT GAG AGA ATC AAA TCC CTT
1321
AAT GAT GTA AAT GTA CTT TGA TGA ACT TAA GTC GTF GTA CAC GAT TTT ATC AAA AAA
1381
AAA AAA AAA AAA A A
    
```

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

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

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

**SEQUENCE D'ADNc TRANSCRIVANT UN ARNm CODANT POUR L'OXYDASE TERMINALE  
ASSOCIEE A LA BIOSYNTHESE DES CAROTENOIDES ET UTILISATIONS**

L'invention concerne une séquence d'ADN (acide désoxyribonucléique) décrite par SEQ ID NO:1, transcrivant un  
5 ARNm (acide désoxyribonucléique messenger), lui-même codant pour l'enzyme OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes) décrite par SEQ ID NO:2, ainsi que des vecteurs de transformation de cellule, de plante ou fragment de plante, et le procédé pour modifier la production  
10 de caroténoïdes dans une plante.

Les caroténoïdes sont des pigments lipophiles synthétisés chez les plantes, les champignons et les bactéries. Dans les tissus photosynthétiques, les caroténoïdes ont une fonction de pigment accessoire d'absorption de la  
15 lumière et surtout de photoprotection contre les radicaux libres, tels que l'oxygène singulet.

Chez les plantes et certains micro-organismes, la voie biosynthétique des caroténoïdes produit des carotènes, des xanthophylles et leurs dérivés. Ces composés sont  
20 synthétisés à partir du phytoène qui est modifié par des réactions de déshydrogénation successives pour produire du phytofluène, du zéta-carotène, du neurosporène puis du lycopène. Le lycopène s'accumule dans certain cas, donnant par exemple le pigment rouge de la tomate, ou plus généralement se  
25 retrouve sous forme modifiée par cyclisation, pour former de l'alpha- ou du bêta-carotène. Ces caroténoïdes cyclisés sont les précurseurs de la vitamine A, et peuvent s'accumuler ou donner, par des réactions d'oxydation, les xanthophylles, qui sont des pigments jaunes, roses, oranges ou rouges.

30 Les étapes de déshydrogénation successives du phytoène sont catalysées chez la plupart des micro-organismes par une enzyme unique appelée phytoène désaturase CRTI. Chez les plantes et les cyanobactéries, deux enzymes apparentées existent. La première, appelée phytoène désaturase (PDS), catalyse la  
35 conversion du phytoène en phytofluène puis en zéta-carotène. La seconde, appelée zéta-carotène désaturase (ZDS), catalyse la

conversion du zéta-carotène en neurosporène puis en lycopène. Chacune de ces réactions de déshydrogénation nécessite le transfert de deux électrons et deux protons du substrat vers un accepteur. Ces réactions de  
5 déshydrogénation nécessitent donc des enzymes, dites structurales, et des cofacteurs, qui sont des intermédiaires dans les réactions d'oxydoréduction.

Les inventeurs de la présente invention ont découvert un nouveau gène codant pour une enzyme appelée  
10 OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes), impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes. Il semble que cette enzyme soit placée dans les membranes des chloroplastes et soit indispensable au bon fonctionnement de la PDS.

15 Un premier objet selon l'invention concerne donc une séquence d'ADN, comprenant au moins une région codante constituée par :

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO :1, transcrivant un ARNm, cet ARNm codant pour  
20 l'enzyme OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes) décrite par SEQ ID NO:2,

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence SEQ ID NO:1, telle que décrite ci-dessus, particulièrement par mutation et/ou addition et/ou  
25 suppression et/ou substitution d'un ou de plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm lui-même codant pour l'OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou codant pour une protéine modifiée de ladite OTBC, ladite protéine modifiée ayant une activité enzymatique  
30 équivalente à celle de l'OTBC représentée par SEQ ID NO:2.

En particulier, l'invention concerne les séquences codantes de l'OTBC de la tomate, identifiée par SEQ ID NO :3, et du poivron, identifiée par SEQ ID NO :4, respectivement, et toute séquence dérivée obtenue par  
35 modification de ces séquences.

Le gène codant pour l'OTBC est une double hélice d'ADN, comprenant des introns et des exons. La séquence SEQ ID NO:1 est le brin complémentaire (sans les introns) ou ADNc, correspondant au brin d'ADN transcrivant l'ARNm  
5 codant pour l'OTBC.

Par activité enzymatique équivalente, on entend que l'enzyme, bien que pouvant être modifiée structurellement dans certaines de ses parties, est néanmoins capable de modifier son substrat. Son activité  
10 est sensiblement la même que celle de l'enzyme native. On comprendra que cette enzyme ne peut pas être modifiée au niveau de son site actif. De ce fait, toute modification apportée à la séquence native, par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, s'entend  
15 comme engendrant une activité enzymatique équivalente dans la mesure où l'activité de la protéine native n'est pas affectée par ces modifications.

Un second objet selon l'invention concerne une séquence d'ADN comprenant au moins une région codante  
20 constituée par:

- la séquence nucléotidique complémentaire représentée par SEQ ID NO:1, cette séquence transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm transcrit par la séquence complémentaire de SEQ ID NO: 1,  
25

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence décrite ci-dessus, par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm  
30 mentionné ci-dessus,

- un fragment de l'une des séquences nucléotidiques mentionnées ci-dessus, ledit fragment transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm codé par la séquence complémentaire de SEQ ID NO:1.  
35

Par ADN, on peut entendre ADN complémentaire (ou ADNc), c'est à dire la copie de l'ARNm sous sa forme d'ADN

grâce à l'action d'une transcriptase inverse. L'ADNc ne comprend pas les introns des séquences d'ADN.

On entend par « capable de s'apparier » dans la présente invention, le fait que dans des conditions  
5 d'hybridations données, les séquences nucléotidiques complémentaires s'apparient. L'homme du métier connaît bien, selon les conditions d'hybridation utilisées, quel est le pourcentage d'identité que les séquences doivent présenter pour qu'un appariement ou une hybridation puisse  
10 se réaliser. Les conditions de stringence pour obtenir un appariement de séquences voisines sont par exemple une hybridation dans 50% de formamide à 35°C. Pour ce qui concerne les conditions d'hybridation, on se réfèrera notamment à l'article « Molecular Cloning, a laboratory  
15 manual, second edition, Sambrook, Fritch & Maniatis, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA ».

On entend par « séquence nucléotidique modifiée » dans la présente invention, toute séquence nucléotidique  
20 présentant avec la séquence de référence un degré d'identité inférieur à 100%.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, les séquences nucléotidiques modifiées selon la présente invention comprennent approximativement au  
25 moins 70%, et mieux encore au moins 80%, de nucléotides identiques à ceux de la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID NO:1, ou de sa séquence complémentaire.

On entend par « identité de nucléotide », la comparaison, lorsque les deux brins sont alignés, de la  
30 séquence des nucléotides identiques présents sur les deux brins. On obtient de ce fait, en ramenant au nombre de nucléotides totaux, le pourcentage de nucléotides identiques, c'est à dire l'identité de nucléotide.

Un troisième objet selon l'invention concerne un  
35 ARNm transcrit à partir de la séquence d'ADN selon la définition du premier objet, et plus particulièrement

transcrit à partir de la séquence d'ADN représentée par SEQ ID NO:1, ledit ARNm codant pour l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou pour un fragment ou une protéine modifiée de l'enzyme, et présentant une activité qui est  
5 équivalente à ladite enzyme dans la plante.

Un quatrième objet selon l'invention concerne un ARNm anti-sens transcrit à partir de la séquence d'ADN selon le second objet de l'invention, comprenant des nucléotides qui sont complémentaires de la totalité ou  
10 d'une partie des nucléotides constituant l'ARNm natif, et capables de s'apparier avec ledit ARNm.

Par « ARNm anti-sens », on entend une séquence d'ARN qui est complémentaire d'une séquence de bases d'un ARNm correspondant, complémentaire dans le sens où chaque  
15 base (ou la majorité des bases) dans la séquence anti-sens (se lisant dans le sens 3' vers 5') est capable de s'apparier avec la base correspondante (G avec C, A avec U) dans la séquence d'ARNm se lisant dans le sens 5' vers 3'.

Un cinquième objet selon l'invention concerne une protéine ayant l'activité de l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou toute protéine modifiée de ladite enzyme OTBC, particulièrement par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou  
20 tout fragment provenant de l'enzyme OTBC ou d'une séquence modifiée de l'enzyme, ledit fragment ou séquence modifiée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme OTBC.

Un sixième objet selon l'invention concerne un  
30 complexe formé entre un ARNm anti-sens défini dans le quatrième objet selon l'invention, et un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

Un septième objet selon l'invention est un ADN recombiné comprenant une séquence d'ADN définie dans le  
35 premier objet selon l'invention, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences

transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm codant pour tout ou partie de l'enzyme OTBC, cette dernière ayant une activité enzymatique équivalente à l'enzyme OTBC de la plante.

5 Par « séquence hétérologue » on entend, selon la présente invention, toute séquence pouvant être coupée par des enzymes, et servant de ce fait à insérer d'autres séquences présentant des activités diverses.

Un huitième objet selon l'invention est un ADN  
10 recombiné comprenant une séquence d'ADN définie dans le second objet selon l'invention, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm codant pour une enzyme  
15 OTBC dans la plante.

Un neuvième objet selon l'invention est un ADN recombiné défini dans le septième ou huitième objet selon l'invention, comprenant les éléments nécessaires pour contrôler l'expression de la séquence insérée,  
20 particulièrement une séquence promotrice et une séquence de terminaison de transcription desdites séquences.

Un dixième objet selon l'invention concerne un vecteur de transformation de plantes, adapté pour augmenter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant tout  
25 ou partie de la séquence nucléotidique de SEQ ID NO:1 comme définie dans le premier objet selon l'invention, codant pour tout ou partie d'une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoïdes, représentée par SEQ ID NO:2, précédé par une origine de répllication de la transcription  
30 des plantes, de manière à ce que le vecteur puisse générer de l'ARNm dans les cellules des plantes.

Un onzième objet selon l'invention concerne un vecteur de transformation de plantes, adapté pour diminuer ou arrêter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant  
35 tout ou partie du brin de la séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID NO:1 comme définie dans le second



objet selon l'invention, précédé par une origine de répllication de la transcription des plantes, de manière à ce que le brin complémentaire transcrit puisse s'apparier à l'ARNm codant pour l'enzyme OTBC de la plante impliquée  
5 dans la synthèse des caroténoïdes.

L'invention peut donc être utilisée pour modifier la synthèse des caroténoïdes, par exemple augmenter ou diminuer, voire arrêter, la production des couleurs associées à la déshydrogénation du phytoène. Par exemple,  
10 l'inhibition de la couleur rouge dans les fruits tels que les tomates, par transformation avec un vecteur comprenant une séquence anti-sens, donne un fruit d'une couleur attrayante se rapprochant du jaune, comme celle de certains poivrons. Il existe déjà des tomates jaunes de  
15 cette sorte, mais la présente invention fournit un moyen de transférer la caractéristique couleur dans des lignées, sans qu'un programme de reproduction prolongé ne soit nécessaire et puisse de ce fait engendrer l'altération d'autres caractéristiques de la plante.

20 L'augmentation de la synthèse des caroténoïdes, par transformation avec un vecteur comprenant une séquence sens, peut permettre de produire des tomates de couleur plus rouge, ce qui peut apparaître plus appétissant au consommateur. L'invention peut également servir à  
25 introduire une couleur rouge à l'intérieur d'une plante, ailleurs que dans le fruit. L'augmentation de la synthèse des caroténoïdes dans une plante peut être effectuée en insérant une ou plusieurs copies fonctionnelles du gène d'ADN complémentaire, ou le gène complet, sous contrôle  
30 d'un promoteur fonctionnel dans les cellules de plantes.

Les vecteurs de transformation des plantes pour diminuer ou arrêter la synthèse des caroténoïdes, c'est à dire les vecteurs anti-sens, peuvent être très courts. Dans un mode de réalisation préférentiel, on choisira des  
35 séquences de bases homologues ayant une longueur d'au moins 10 bases. Il n'existe pas de limite supérieure

théorique à la séquence de bases, elle peut être aussi longue que l'ARNm produit par la plante. Dans un mode de réalisation très préférentiel, on utilisera cependant des séquences de longueur comprise entre 100 et 1000 bases.

5 On sait que les plantes mutantes chez qui le gène OTBC est inactif présentent un aspect panaché, les plantes sont vertes et blanches. On propose une application de la stratégie anti-sens, qui vise à éliminer la production d'ARNm et donc de la protéine OTBC, qui viserait à  
10 produire des plantes au feuillage panaché comme par exemple des plantes ornementales, de type Nicotiana ou Pétunia ou toute autre plante ornementale, qui se prête à la transformation génétique et qui pourrait recevoir une construction anti-sens dans le but d'empêcher la  
15 production de la protéine OTBC.

Les produits de recombinaison d'ADN peuvent être fabriqués en utilisant des techniques standards. Par exemple, la séquence d'ADN à transcrire peut être obtenue en traitant un vecteur contenant ladite séquence avec des  
20 enzymes de restriction pour couper le segment approprié. La séquence d'ADN de transcription peut également être engendrée en cyclisant et liant des oligonucléotides synthétiques ou en utilisant des oligonucléotides synthétiques dans une PCR (« Polymerase Chain Reaction »)  
25 pour engendrer des sites de restriction à chaque extrémité. La séquence d'ADN est alors clonée à l'intérieur d'un vecteur contenant une séquence promotrice d'initiation et une séquence de terminaison. Si l'on désire obtenir une séquence d'ADN anti-sens, le clonage  
30 sera effectué de manière à ce que la séquence d'ADN coupée soit inversée par rapport à son orientation dans le brin duquel elle a été coupée.

Dans un produit de recombinaison exprimant un ARN anti-sens, le brin qui était initialement le brin matrice  
35 devient le brin codant, et vice versa. Le produit de recombinaison transcrit de ce fait un ARNm dont la

séquence de base est complémentaire de tout ou partie de la séquence de l'ARNm de l'enzyme. De ce fait, les deux brins d'ARN sont complémentaires non seulement dans leurs séquences de bases mais également dans leur orientation  
5 (5' vers 3').

Dans un produit de recombinaison exprimant un ARN sens, la matrice et les brins transcrits gardent l'orientation du gène initial de la plante. Les produits de recombinaison exprimant de l'ARN sens transcrivent un  
10 ARNm ayant une séquence de bases qui est homologue en tout ou partie avec la séquence de l'ARNm. Dans les produits de recombinaison exprimant l'enzyme fonctionnelle, la région codante complète du gène est reliée à des séquences de contrôle de la transcription capables de s'exprimer dans  
15 la plante.

Par exemple, les produits de recombinaison selon la présente invention peuvent être fabriqués comme décrit ci-après. Un vecteur adapté contenant la séquence de base souhaitée pour la transcription, tel que notamment un  
20 clone d'ADN complémentaire d'OTBC, est traité avec des enzymes de restriction pour couper la séquence. On clone alors l'ADN ainsi obtenu, dans une orientation inversée si on le souhaite, dans un second vecteur contenant la séquence promotrice souhaitée et la séquence de  
25 terminaison souhaitée. Parmi les promoteurs adaptés, on peut citer le promoteur nommé 35S du virus du CaMV, à titre d'exemple de promoteur considéré comme étant constitutif ; le promoteur du gène de la polygalacturonase de tomate (voir Bird et al., 1998, Plant Molecular  
30 Biology, 11:651-662) comme exemple de promoteur impliqué dans la régulation des fruits ; ou encore le promoteur du gène de la petite sous-unité de la ribulose bis-phosphate carboxylase, comme exemple de promoteur exprimé dans les tissus verts. Les séquences de terminaison comprennent le  
35 terminateur NOS du gène nopaline synthase.

Il peut être intéressant de modifier l'activité enzymatique de la plante durant seulement le développement et/ou le mûrissement des fruits. L'utilisation d'un promoteur constitutif tendra à modifier le taux et  
5 l'activité des enzymes dans toutes les parties de la plante transformée, alors que l'utilisation d'un promoteur spécifique à un tissu contrôlera de manière plus sélective l'expression du gène et modifiera l'activité, par exemple la coloration des fruits. De ce fait, en mettant en oeuvre  
10 l'invention, par exemple dans des poivrons, il sera adapté d'utiliser un promoteur qui permettra l'expression spécifique au cours du développement et/ou le mûrissement des fruits. Enfin, l'ARN sens ou anti-sens sera alors produit seulement dans les organes de la plante où l'on  
15 souhaite qu'il y ait une action. Parmi les promoteurs spécifiques de développement et ou de mûrissement des fruits qui peuvent être utilisés, on peut citer le promoteur de stimulation de la polygalacturonase (Demande de brevet internationale publiée sous le numéro  
20 WO-A-92/08798), le promoteur E8 (Dieckman & Fiscer, 1998, EMBO, 7:3315-3320) et le promoteur spécifique des fruits 2A11 (Pear et al., 1989, Plant Molecular biology, 13: 639-651).

Un douzième objet selon l'invention concerne une  
25 cellule de plante transformée par un vecteur défini dans le dixième ou le onzième objet selon l'invention.

L'homme de l'art dans la technique du génie génétique végétal connaît bien aujourd'hui les différentes techniques d'obtention de plantes génétiquement modifiées.  
30 On sait que la paroi végétale constitue une barrière mécanique naturelle particulièrement efficace à la pénétration de tout matériel étranger dans la cellule et, en particulier, à celle d'ADN. Les différents techniques spécifiques d'introduction de l'ADN dans la cellule  
35 végétale sont par exemple l'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, l'électroporation de

protoplastes, la micro-injection d'ADN nu, l'utilisation de canon à particules ou biolistique, ou la transformation de protoplastes.

Afin de pouvoir sélectionner les cellules  
5 effectivement transformées, on introduit, en plus du gène codant pour le caractère que l'on recherche, un gène marqueur. On choisira préférentiellement un gène conférant une résistance à un antibiotique. Les cellules sont alors sélectionnées par culture sur un milieu contenant cet  
10 antibiotique. Seules les cellules possédant le gène de résistance pourront se multiplier. La présence du gène d'intérêt peut également être vérifiée par hybridation avec de l'ADN complémentaire de l'ADN introduit.

Le produit de recombinaison selon l'invention est  
15 transféré à l'intérieur d'une cellule de plante cible. La cellule de plante cible peut être une partie d'une plante complète ou peut être une cellule isolée ou partie d'un tissu qui peut être régénéré à l'intérieur d'une plante complète. La cellule de plante cible peut être choisie  
20 parmi toute espèce de plante monocotylédone ou dicotylédone. Les plantes adaptées comprennent toute plante portant des fruits, telles que notamment les tomates, les mangues, les pêches, les pommes, les poires, les fraises, les bananes, les melons, les poivrons, les  
25 piments, le paprika, les plantes ayant des feuilles, des fleurs ou tout autre organe dans lesquels on souhaite modifier le contenu en caroténoïdes.

Les produits de recombinaison selon l'invention peuvent être utilisés pour transformer toute plante, en  
30 utilisant toute technique adaptée pour transformer des plantes selon l'invention. Les cellules des plantes monocotylédones et dicotylédones peuvent être transformées de différentes manières connues par l'homme de l'art. Dans la plupart des cas, les cellules de ces plantes,  
35 particulièrement lorsque ce sont des cellules de plantes dicotylédones, peuvent être mise en culture pour générer

une plante entière qui se reproduit par la suite en engendrant des générations successives de plantes modifiées génétiquement. Tout procédé adapté pour la transformation des plantes peut être utilisé. Par exemple, 5 les plantes dicotylédones, telles que la tomate et le melon, peuvent être transformées en utilisant le plasmide Ti *Agrobacterium*. De telles plantes transformées peuvent se reproduire par croisement, ou par culture de cellule ou de tissu.

10 Un treizième objet selon l'invention concerne une plante, ou fragment de plante, particulièrement fruit, graine, pétale, feuille, comprenant des cellules définies selon le douzième objet de l'invention.

Les plantes ou fragments de plantes, génétiquement 15 modifiées selon l'invention avec un vecteur comprenant une séquence sens, notamment pour augmenter la production de caroténoïdes, comprennent un taux élevé en précurseur de la vitamine A par rapport au taux normal produit par la plante.

20 Les caroténoïdes, outre leur rôle dans la couleur de la plante, ont également un rôle de protection des plantes contre les dommages que peut produire une haute intensité lumineuse. De ce fait, les plantes, contenant par modification génétique un taux plus élevé de ces 25 caroténoïdes, peuvent présenter un grand intérêt pour les régions où la culture s'effectue avec des changements de température importants.

Les plantes modifiées génétiquement peuvent présenter des couleurs différentes, selon que l'on ait 30 augmenté ou diminué la synthèse des caroténoïdes. Plus particulièrement, les produits de recombinaison de l'OTBC peuvent être utilisés pour stimuler ou inhiber la production des couleurs associées aux caroténoïdes produits lors des réactions de désaturation, par exemple 35 le lycopène rouge, ou dérivés de produits comme la couleur jaune/orange associée au bêta-carotène. La stimulation de

la production des bêta-carotènes, avec un produit de recombinaison sens de sur-expression, peut permettre de produire des poivrons de couleur jaune/orange, ou bien une couleur déterminée par un dérivé des bêta-carotènes telle  
5 qu'un rouge plus intense, du fait de la biosynthèse de capsorubine ou de capsanthine. Les poivrons obtenus s'avéreront plus appétissants par le consommateur.

Comme exemple de plantes génétiquement modifiées selon la présente invention, on citera plus  
10 particulièrement les plantes portant des fruits. Les fruits de ces plantes peuvent donc être rendus plus attirants pour le consommateur, en stimulant ou intensifiant à l'intérieur une couleur spécifique. Comme autres plantes qui peuvent être modifiées génétiquement,  
15 on peut citer les tubercules tels que les radis, les navets et les pommes de terre, de même que les céréales tels que le maïs, le blé, l'orge et le riz.

Les plantes modifiées génétiquement selon l'invention, peuvent également contenir d'autres produits  
20 de recombinaison, par exemple des produits de recombinaison ayant d'autres effets, notamment sur le mûrissement des fruits. Par exemple, des fruits ayant une couleur plus intense, modifiés selon la présente invention, peuvent également contenir des produits de  
25 recombinaison, soit qui inhibent la production de certaines enzymes telles que la polygalacturonase et la pectinestérase, soit qui interfèrent avec la production d'éthylène. Les fruits qui contiennent ces deux types de produits de recombinaison peuvent être engendrés, soit par  
30 des transformations successives, soit en croisant deux variétés qui contiennent chacune un des produits de recombinaison, puis en sélectionnant parmi la descendance ceux qui contiennent les deux produits de recombinaison.

Un quatorzième objet selon l'invention concerne un  
35 procédé pour modifier la production de caroténoïdes dans une plante, soit en augmentant la production de

caroténoïdes, soit en abaissant ou inhibant la production de caroténoïdes par la plante, relativement au contenu normal de caroténoïdes produits par la plante, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites  
5 plantes à transformer avec un vecteur défini dans le dixième et le onzième objet selon l'invention.

Un quinzième objet selon l'invention concerne un procédé pour produire des caroténoïdes dans une cellule de plante, ou eucaryote ou procaryote, ledit procédé  
10 comprenant la transformation de cellules desdites plantes, des cellules eucaryotes ou procaryotes à transformer avec un vecteur défini dans le dixième objet selon l'invention.

Les bêta-carotènes, produits par un organisme eucaryote ou procaryote exprimant un produit de recombinaison codant pour l'enzyme OTBC, peuvent être  
15 extraits pour être utilisés en tant que colorant, anti-oxydant ou précurseur de la vitamine A.

Enfin, l'invention concerne aussi un procédé pour la sélection de composé présentant un caractère herbicide,  
20 selon lequel on met en contact ledit agent avec des cellules ou des membranes de cellules, notamment des cellules de l'invention, et on observe une diminution de la consommation d'oxygène par les membranes desdites cellules, liée à l'inhibition de l'oxydase terminale  
25 associée à la biosynthèse des caroténoïdes. Des techniques appropriées pour effectuer cette observation sont notamment illustrée dans l'exemple 6.

La figure 1 présente la séquence d'ADNc et la  
30 séquence d'acides aminés correspondante de l'OTBC. Le peptide N-terminal de transit potentiel du chloroplaste est souligné. Le point probable de clivage est indiqué par une étoile (\*). Les triangles ouverts indiquent la position des introns.

35 La figure 2 montre la comparaison entre la protéine OTBC et la protéine AOX de la graine de soja. (+)



indique les acides aminés similaires. Les acides aminés présentés dans une boîte font partie des domaines en hélice trans-membranaire prédits. Les motifs de liaison du fer sont surlignés.

5           La figure 3 présente l'alignement des séquences en acides aminés pour la tomate (T), le poivron (P) et Arabidopsis (A) et la séquence consensus. Dans cette séquence consensus, les acides aminés conservés sont indiqués en lettre majuscule et les acides aminés  
10 relativement conservés sont indiqués en lettre minuscule.

La figure 4 représente la consommation d'oxygène dans des membranes cellulaires de *E.coli* isolées pour des cellules témoins transformées par un vecteur de clonage de l'invention et pour des cellules exprimant le produit du  
15 gène « IMMUTANS » (plastid terminal oxidase).

**Exemple 1 : Détail du clonage du locus codant pour la protéine OTBC**

20           1- Isolement du mutant.

On a provoqué la mutation par l'utilisation d'un transposon introduit dans le génome de la plante *Arabidopsis thaliana* cultivar *landsberg-erecta*.

Cette technique est largement décrite dans un  
25 article (Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne, J., Puangsomlee P., and Coupland, G. (1993) The maize transposable element system Ac/ Ds as a mutagen in Arabidopsis : Identification of an albino mutation induced by Ds insertion. Pro. Natl. Science USA, 10, 10370-10374)  
30 et a été mise en oeuvre par d'autres au laboratoire de George Coupland au John Innes Centre for Plant Science, Colney, Norwich, NR4 7UH, Nordwich, Grande-Bretagne.

La transposition de l'élément transposable Dissociator (Ds) utilisé ici a été déclenchée par la  
35 production de la protéine transposase (ou Transposase de l'élément Activator, Ac).

Parmi la descendance d'une plante ayant subi la transposition de l'élément Ds, on a identifié plusieurs plantes à l'aspect mutant albinos, différent du sauvage par l'absence de pigmentation verte (chlorophylle). On a également identifié des plantes d'aspect sauvage mais qui transmettent la mutation à leur descendance. Ces plantes sont identifiées comme hétérozygotes, portant la mutation sur un seul chromosome. Les plantes homozygotes ont un phénotype mutant et portent la mutation sur les deux chromosomes homologues.

2- Test de liaison de la mutation à l'élément transposable Ds.

Cette expérience a été faite dans le but de prouver que la mutation observée est causée par l'insertion de l'élément Ds dans un gène nécessaire au bon fonctionnement de la plante et à son aspect sauvage.

L'élément transposable, ou transposon, Ds, est construit de façon à porter un gène de résistance à l'antibiotique hygromycine (décrit dans les références précédentes). On a fait pousser la descendance de 35 plantes hétérozygotes qui portent la mutation albinos sur un milieu gélosé contenant une dose létale d'hygromycine, toutes les plantes qui portent la mutation sont aussi résistantes à l'hygromycine. On en tire la conclusion que la mutation est liée au gène de résistance porté par le transposon.

On a isolé une portion d'ADN de plante résistante à l'antibiotique hygromycine, jouxtant le transposon. Ceci a été fait selon la méthode IPCR ou PCR-inverse décrite dans les références précédentes.

Par expérience dite de « Southern blot », on a remarqué que les lignées qui portent la mutation ont une altération de l'ADN génomique. Cette altération est révélée lorsque l'on utilise comme « sonde » la portion d'ADN isolée jouxtant le transposon.

### 3- Isolement du gène

On a, en utilisant une méthode de criblage de banque d'ADN génomique, isolé un clone contenant un  
5 fragment d'ADN génomique pouvant contenir la version sauvage inaltérée du gène interrompu chez le mutant.

La banque d'ADN criblée a été construite. Elle est décrite dans la publication de Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol P., Anderson, M.L., Cowl, J.S. &  
10 Harberd, N.P. (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *The Plant Cell* 5, 757-768.

On a déterminé la séquence totale d'un fragment de restriction obtenu par digestion enzymatique du clone  
15 d'ADN génomique par l'enzyme EcoR I. La séquence obtenue couvre 3000 paires de bases. Parmi ces 3000 paires de bases, on trouve une partie identique à la séquence du fragment bordure préalablement isolé, confirmant l'identité entre l'ADN isolé et le gène interrompu par le  
20 transposon.

### 4- Isolement et caractérisation de la séquence codante.

On a utilisé une banque d'ADNc, qui est une banque  
25 commerciale vendue par CLONTECH Laboratories, Inc.. Il s'agit d'une banque d'ADNc faite à partir d'ARNm extraits d'*Arabidopsis thaliana*, transformés en ADNc, puis clonés dans le vecteur plasmidique pGAD10.

A partir de cette banque de données d'ADNc, et  
30 selon les techniques habituelles, utilisant le gène identifié précédemment comme sonde, on a isolé plusieurs clones contenant un ADNc d'une taille d'environ 1400 paires de bases.

On a déterminé la séquence totale de l'ADNc et  
35 montré que celui-ci est entièrement compris dans le fragment d'ADN génomique préalablement identifié. On a

placé la partie codante (ou exons) et la partie non codante (introns) du gène sur la séquence du gène. Le gène porte 9 exons et 8 introns. L'insertion du transposon Ds est identifiée au début du deuxième exon et vient donc  
5 interrompre la partie codante du gène.

La séquence de l'ADNc présente un codon de départ potentiel suivi par un cadre de lecture ouvert de 350 acides aminés, codant pour une protéine potentielle de 39 kDa dénommé OTBC. Une recherche d'homologie en utilisant  
10 le programme blastp [(Altshul et al. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402] a révélé une homologie faible mais significative avec des polypeptides appartenant à la famille des protéines  
15 oxydase alternative ou terminale oxydase de mitochondries (AOX). Aucune autre homologie significative n'a été trouvée. L'homologie commence à l'acide aminé 111 et présente 29% d'identité (45% de similarité) avec l'oxydase de soja. Malgré la faible identité avec la protéine AOX,  
20 une recherche par ordinateur de structures secondaires et des domaines potentiels de la signification biologique ont révélé une similarité structurale entre la protéine OTBC et AOX. Des domaines en hélice trans-membranaire trouvés dans AOX sont situés à des positions similaires sur la  
25 séquence peptidique de l'OTBC, suggérant une localisation membranaire de l'OTBC et également une configuration similaire à celle de l'AOX dans la membrane. De plus, un motif de liaison du fer se trouve conservé entre OTBC et AOX. L'alignement des séquences entre les protéines OTBC  
30 et AOX montre une insertion de 19 acides aminés dans la protéine OTBC qui correspond à une partie des exons 7 et 8.

La séquence N-terminale de la protéine OTBC présente les caractéristiques d'un peptide de transit du  
35 chloroplaste, qui est riche en leucine, arginine et sérine / thréonine. Une analyse par ordinateur du

potentiel peptide de transit (psort software, Nakai and Kanehisa, 1992) a suggéré une cible possible de OTBC au niveau des compartiments des thylakoides du chloroplaste.

5 5- Identification de la mutation.

L'aspect du mutant est proche de celui d'un mutant déjà décrit dans la littérature : le mutant "immutans", Wetzell C.M., Jiang C-Z., Meehan L.J., Voytas D.L., Rodermel S.R. (1994) Nuclear-organelle interactions: the  
10 immutans variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis, Plant Journal 6, 161-175.

On a croisé le mutant « immutans » (allèle spotty, cf. référence précédente) avec celui qui a été isolé selon  
15 l'invention. La descendance du croisement est d'aspect mutant, ce qui est un résultat attendu si les deux mutations affectent le même gène. On peut donc affirmer que le gène identifié correspond à la version sauvage du locus IMMUTANS et que le mutant obtenu porte une version  
20 interrompue du gène dont le produit est alors inactif.

Le premier objet de la présente invention se distingue donc du mutant ci-dessus, en ce qu'il code pour une protéine présentant une activité enzymatique identique ou équivalente à celle de l'OTBC, alors que le produit  
25 codé par « immutans » n'a pas d'activité.

**Exemple 2 : Construction d'un vecteur de l'invention par introduction d'ADNc codant pour l'OTBC de poivron dans un vecteur d'expression de plantes**

30

Le vecteur pBI121 (commercialisé par Clontech laboratories, Inc) est un vecteur adapté à cette construction.

Il comporte une région T-DNA que la bactérie  
35 *Agrobacterium tumefaciens* peut transférer dans le génome des plantes.

Cette région T-DNA comporte, entre autres, un promoteur constitutif (le promoteur nommé 35S du virus CaMV), le gène GUS suivi du terminateur NOS (du gène nopaline synthase). Le gène GUS ne présentant aucun  
5 intérêt pour l'invention, est remplacé par un ADNc codant pour l'OTBC. Cet ADNc sera donc placé sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur NOS.

Tout autre promoteur constitutif ou non (dans ce dernier cas, il devra être spécifique de l'organe dont on  
10 souhaite modifier les propriétés) et tout autre terminateur sont également utilisables.

Un ADNc codant pour l'OTBC a été sous-cloné originellement dans le site de restriction NotI du plasmide bactérien pBluescriptKS : il a ainsi été flanqué  
15 de sites de coupures BamHI en 5' et SacI en 3'.

Cet ADNc est excisé du plasmide pBluescriptKS par les enzymes de restriction BamHI et SacI. Ce fragment BamHI-SacI est inséré dans le vecteur pBI121 lui-même coupé par ces enzymes : le site BamHI se trouve en 3' du  
20 promoteur 35S et en 5' du gène GUS, le site SacI se trouve en 3' du gène GUS et en 5' du terminateur NOS.

Après ligation, sont sélectionnés les dérivés du vecteur pBI121 dans lequel l'ADNc codant pour l'OTBC (c'est-à-dire sans intron) a remplacé le gène GUS.

25

**Exemple 3 : Transformation d'une cellule de plante pour obtenir une cellule transformée de l'invention.**

Le vecteur de transformation de plante dérivé de  
30 pBI121 obtenu à l'exemple 2 est introduit dans la souche d'Agrobacterium LBA4404 par électroporation. La souche recombinante est sélectionnée en présence de 50 µg/ml de kanamycine.

Cette souche transformée d'Agrobacterium est  
35 utilisée pour la transformation de cellules de plantes, par exemple de tabac.

La technique utilisée à cet effet et qui peut être remplacée par toute autre technique de transformation, est celle de l'infection de disques foliaires de plantules de tabac cultivées in vitro. Les cellules transformées de  
5 plantes sont sélectionnées en présence de kanamycine. Agrobacterium est éliminé par l'antibiotique céfotaxime. Les disques foliaires sont cultivés sur milieu de culture végétale en présence d'hormones végétales (auxine et cytokinines) favorisant la croissance de cals. Les cals  
10 issus de la croissance des cellules transformées sont utilisés pour la régénération de plantes entières par les techniques classiques. Par exemple, les cals sont transférés sur milieu de culture végétale en présence de cytokinine pour induire la formation de pousses. Celles-ci  
15 sont ensuite coupées et transférées sur milieu de culture végétale sans hormone afin de régénérer des racines. Les antibiotiques kanamycine (afin de sélectionner la croissance de tissus transformés) et céfotaxime (afin d'éliminer complètement Agrobacterium) sont maintenus  
20 pendant toutes ces phases de culture.

Les plantes transformées sont mises en culture stérilement en présence de kanamycine et céfotaxime puis sont transférées en terre et cultivées en serre jusqu'à la récolte des graines. La présence du transgène a été  
25 confirmée par hybridation de l'ADN génomique de ces plantes avec une sonde spécifique issue du vecteur de transformation utilisé.

**Exemple 4 : Clonage et caractérisation d'ADNc de  
30 fruits de poivron et de tomate correspondant à l'enzyme oxydase terminale associée à la biosynthèse des caroténoïdes (OTBC)**

On a utilisé la partie d'ADNc de « immutans »  
35 d'Arabidopsis codant pour le peptide OTBC mature comme sonde pour rechercher une banque d'ADNc de poivron vert ou

rouge dans des conditions non stringentes. Tous les clones positifs qui ont été analysés, ont semblé dériver du même gène, comme le suggèrent les séquences identiques observées dans la région non traduite en 3'. La séquence d'ADN du clone complet est présentée dans la liste de séquence sous l'identificateur SEQ ID NO :3. La séquence déduite en acides aminés est présentée dans la liste de séquences sous l'identificateur SEQ ID NO :4. L'ADNc de poivron a ensuite été utilisé pour isoler l'ADNc correspondant à partir d'une banque d'ADNc de tomate rouge (SEQ ID NO :5).

La figure 3 présente la comparaison entre la séquence déduite en acides aminés précitée et les séquences de l'OTBC de poivron et d'Arabidopsis.

Les peptides de transit utilisés pour le ciblage dans les plastides ont révélés une similarité de séquence, à l'exception de la région N-terminale et de la région près du site de clivage supposé (ATR/Q-AT). Les polypeptides d'OTBC mature partagent pourtant une forte similarité de séquence, ce qui signifie qu'ils présentent les mêmes propriétés.

Un alignement des séquences de l'OTBC a en outre révélé la présence de deux domaines trans-membranaires potentiels conservés, séparés par un segment hydrophile fortement conservé. Le domaine N-terminal est essentiellement hydrophile et contient un long segment d'acides aminés faiblement conservés. Le domaine C-terminal est aussi principalement hydrophile et contient un motif (EAEH) conservé qui concorde avec un site putatif de fixation du fer (ExxH). En outre, la région contient 6 résidus cystéine conservés dans l'OTBC, alors que le reste du polypeptide est dépourvu de résidus cystéine.

Certains de ces résidus cystéine peuvent être impliqués dans la dimérisation covalente de la protéine.



**Exemple 5 : Expression des gènes de l'OTBC au cours du mûrissement du fruit chez le poivron et la tomate**

Afin de définir le mécanisme d'expression des gènes de l'OTBC, on a extrait l'ARN total du fruit à différents stades du mûrissement. Le mécanisme d'expression a été déterminé par transcription inverse de l'ARN total, suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).

10 Le gène de l'OTBC est exprimé au cours du développement et du mûrissement du fruit pour le poivron. En outre, il a un mécanisme d'expression similaire à celui des gènes codant pour les caroténoïde-désaturases, c'est-à-dire la phytoène-désaturase et la zéta-carotène-  
15 désaturase. On observe une augmentation du taux de transcription entre le stade vert non mûr et le stade vert mûr (fruit d'une taille adulte), suivie d'une autre augmentation entre le stade vert mûr et le stade de dégradation (signes visibles précoces de changement de  
20 couleur). Le taux de transcription reste ensuite assez constant (avec une légère diminution au cours de l'étape de rougissement).

Le gène de l'OTBC est également exprimé durant le développement et le mûrissement du fruit chez la tomate.  
25 Chez la tomate, il présente aussi un mécanisme d'expression similaire à celui des gènes codant pour les caroténoïde-désaturases (phytoène-désaturase et zéta-carotène-désaturase). On observe une augmentation du taux de transcription entre le stade vert non mûr et le stade  
30 vert mûr (fruit d'une taille adulte), suivie d'une autre augmentation plus forte entre le stade vert mûr et le stade de dégradation.

Lorsque l'empreinte de la protéine des fruits du poivron et de la tomate a été recherchée, en utilisant des  
35 anticorps dirigés contre l'OTBC, ce polypeptide a été retrouvé à différents stades de développement du fruit.

Ces essais ont mis en évidence une augmentation du taux de la protéine OTBC, depuis le stade vert mûr vers le stade de dégradation. Ce taux de protéine est resté élevé au cours du mûrissement du fruit.

5 Ces résultats démontrent que les gènes de l'OTBC sont exprimés et que la protéine OTBC est présente dans le fruit. De manière analogue aux enzymes structurales intervenant dans la désaturation des caroténoïdes, le gène de l'OTBC est induit et les protéines sont accumulées au  
10 cours du mûrissement quand la biosynthèse des caroténoïdes est accrue.

Les résultats exposés dans la description mettent en évidence que l'OTBC est un élément du système de la biosynthèse des caroténoïdes.

15 On peut envisager d'utiliser la protéine OTBC pour modifier la biosynthèse des caroténoïdes, notamment dans les tissus ou les cellules végétales ou dans les bactéries présentant un système de biosynthèse des caroténoïdes peu efficace ou inefficace. L'OTBC pourrait être produite en  
20 même temps que les enzymes structurales de la biosynthèse des caroténoïdes pour accroître l'efficacité de la production des caroténoïdes.

**Exemple 6 : Propriétés catalytiques de l'OTBC  
25 analysées après son expression chez *E. coli***

Un produit de synthèse consistant en la région codant pour le polypeptide mature OTBC de *Arabidopsis* a été inséré dans un vecteur d'expression procaryote (tel  
30 que pQE31, commercialisé par QIAGEN, étant entendu que tout autre vecteur conduirait à des résultats identiques).

La région codante destinée à être insérée dans le vecteur d'expression peut être obtenue par clivage à l'aide d'enzymes de restriction intervenant près des  
35 codons correspondant au site de clivage du peptide de transit.

Alternativement, une amplification par PCR de la région codante peut être effectuée. Les oligonucléotides suivants seront avantageusement utilisés pour l'amplification de la séquence de l'OTBC d'Arabidopsis :

5           5'-GCAACGATTTTGCAAGACG-3' et  
          5'-TTAACTTGTAATGGATTTCTTGAG-3'

D'autres produits d'assemblage comportant la région codante pour l'OTBC chez d'autres espèces (comme le poivron ou la tomate) peuvent aussi être employés.

10           Ces plasmides peuvent être introduits dans des cellules de *E.coli* selon des techniques classiques. Afin d'obtenir la protéine recombinante chez *E.coli*, les cellules sont cultivées dans les conditions suivantes :  
15 riche sont déposées dans 300 ml de milieu M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 34mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22mM, NH<sub>4</sub>Cl 18 mM, NaCl 8,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, thiamine 1 mM) contenant 0,2% de glycérol et l'apport en antibiotique nécessaire pour stopper la  
20 développement des bactéries est poursuivi à 37°C sous agitation vigoureuse jusqu'à la phase de développement mi-exponentielle, de préférence jusqu'à lecture d'une densité optique de 0,3 à 600 nm.

Après induction de ce gène chimère par l'inducteur  
25 IPTG et addition de FeSO<sub>4</sub> à 1 mg/l, la culture est entretenue à 25°C sous agitation vigoureuse pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite recueillies par centrifugation à 4°C, lavées avec du MgCl<sub>2</sub> 10 mM, du saccharose 0,75 M, du Tris-HCl 20 mM, à pH 7,5, et de  
30 nouveau centrifugées. Les cellules sont ensuite mises en suspension dans du saccharose 0,75 M, du Tris-HCl 20 mM, à pH 7,5, et lysées par addition de lysozyme (0,2 mg/ml) et de EDTA (25 mM) à 30°C pendant 30 minutes, puis soumises à  
35 traitées aux ultrasons à 0°C. Une centrifugation standard dans une centrifugeuse à vitesse lente permet d'éliminer

les cellules non lysées et les débris. Une centrifugation à grande vitesse (par exemple dans un rotor 50Ti de Beckman à 40 000 tours / min) à 4°C conduit à l'obtention d'une membrane qui est mise en suspension dans du  
5 saccharose 0,75 M, Tris-HCl 20 mM, à pH 7,5, et maintenue à 4°C.

Pour tester l'activité enzymatique de l'OTBC, la consommation d'oxygène par les membranes résultantes est mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène standard et est  
10 exprimée en nmoles d'O<sub>2</sub> consommé par minute et par gramme de protéine.

Comme le montre la Figure 4, l'addition de NADH provoque la consommation d'oxygène à la fois dans la membrane témoin (transformée par le vecteur de clonage) et  
15 dans la membrane contenant l'OTBC. Cette consommation d'oxygène augmente lorsque l'on ajoute de la plastoquinone 0,2 mM. L'addition de KCN inhibe fortement la consommation d'oxygène dans les membranes témoins. Dans les membranes contenant l'OTBC, on observe une consommation d'oxygène  
20 résistant au cyanure élevée. Ceci reflète l'activité oxydoréductase plastoquinol : oxygène de l'OTBC, laquelle activité peut être inhibée par addition de gallate de n-propyle (nPG) 0,5 mM. L'addition de nPG (0,5 mM) à la membrane témoin avant le KCN ne produit pas d'effet  
25 indiquant que le composé n'interfère pas avec le flux normal d'électrons dans les membranes de *E.coli* (Figure 4).

Ce test peut être utilisé pour étudier le pouvoir inhibiteur d'un composé sur l'activité de l'OTBC. Ainsi un  
30 inhibiteur peut être contrôlé quand il n'a pas d'effet sur la chaîne respiratoire endogène de *E.coli*, en particulier sur le complexe I de la chaîne qui oxyde NADH. Néanmoins, si tel est le cas, NADH peut être substitué par le succinate en tant que donneur d'électrons sans passer par  
35 le complexe I. Tout inhibiteur de l'activité de l'OTBC peut être testé sur des plants appropriés, par arrosage du

sol, addition d'un milieu de culture et dépôt direct sur les feuilles, vis-à-vis de l'inhibition de la biosynthèse des caroténoïdes entraînant un blanchiment et alors trouver une application comme herbicide.

5 L'essai décrit peut être modifié pour réaliser un criblage à grande échelle d'inhibiteurs de l'activité de l'OTBC, et leur application en tant qu'herbicide. Dans ce cas, la mesure de la consommation d'oxygène à l'aide d'une électrode à oxygène sera de préférence remplacée par une  
10 autre méthode de mesure.

L'activité oxydase de l'OTBC peut être déterminée en mesurant la consommation de NADH au cours de la réaction, par exemple, par spectrophotométrie, en mesurant l'absorbance à 340 nm. La consommation de NADH et la  
15 production de NAD au cours de l'essai doit entraîner une diminution de l'absorbance à 340 nm. Alternativement, on peut utiliser toute coloration spécifique de NAD ou de NADH pour contrôler les changements de NAD ou de NADH pendant l'essai.

20 Si l'on utilise le succinate comme donneur d'électrons, dans l'essai, l'activité respiratoire des membranes bactériennes conduira à l'oxydation du succinate en fumarate. Alors l'activité de l'OTBC pourra être suivie en présence de KCN, en mesurant les concentrations en  
25 succinate et fumarate qui évoluent au cours de l'essai.

Selon une autre possibilité, on peut utiliser un donneur d'électrons artificiel. Le Phéazine Méto-sulfate (PMS) en est un exemple. Il peut être oxydé par la succinate déshydrogénase des membranes bactériennes ; il  
30 est incolore à l'état réduit et est coloré en jaune à l'état oxydé.

Des échantillons de membrane bactérienne contenant l'OTBC vont oxyder le PMS en présence de KCN. Un inhibiteur de l'activité de l'OTBC empêchera l'apparition  
35 de la couleur jaune due à l'oxydation du PMS. Ce test de mise en oeuvre simple peut être conduit dans des boîtes

multi-puits permettant de réaliser un dépistage en masse de molécules capables d'inhiber l'activité de l'OTBC.

**REVENDEICATIONS**

1. Séquence d'ADN, comprenant au moins une région codante constituée par:

- la séquence nucléotidique représentée par  
5 SEQ ID NO: 1, transcrivant un ARNm, cet ARNm codant pour l'enzyme Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoïdes (OTBC) décrite par SEQ ID NO:2,

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence SEQ ID NO:1, telle que décrite ci-dessus,  
10 particulièrement par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou de plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm lui-même codant pour l'OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou codant pour une protéine modifiée de ladite OTBC,  
15 ladite protéine modifiée ayant une activité enzymatique équivalente à celle de l'OTBC décrite par SEQ ID NO:2.

2. Séquence d'ADN comprenant au moins une région codante constituée par:

- la séquence nucléotidique complémentaire de  
20 celle représentée par SEQ ID NO:1, cette séquence transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'hybrider avec l'ARNm codé par la séquence SEQ ID NO: 1,

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence décrite ci-dessus, par mutation et/ou addition  
25 et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'hybrider avec un ARNm mentionné ci-dessus,

- un fragment de l'une des séquences  
30 nucléotidiques mentionnées ci-dessus, ledit fragment transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm codé par la séquence complémentaire de SEQ ID NO:1.

3. ARNm transcrit à partir de la séquence d'ADN selon la revendication 1, et plus particulièrement  
35 transcrit à partir de la séquence d'ADN complémentaire représentée par SEQ ID NO:1, ledit ARNm codant pour

l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID NO:2, ou pour un fragment ou une protéine modifiée de l'enzyme, et présentant une activité qui est équivalente à ladite enzyme dans la plante.

5           4. ARNm anti-sens transcrit à partir de la séquence d'ADN complémentaire selon la revendication 2, comprenant des nucléotides qui sont complémentaires de la totalité ou d'une partie des nucléotides constituant l'ARNm natif, et capables de s'hybrider avec ledit ARNm.

10           5. Protéine ayant l'activité de l'enzyme OTBC native décrite par SEQ ID NO:2, ou toute protéine modifiée de ladite enzyme OTBC, particulièrement par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou tout fragment provenant de l'enzyme OTBC ou  
15 d'une séquence modifiée de l'enzyme, ladite protéine modifiée ou fragment présentant une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme OTBC.

          6. Complexe formé entre un ARNm anti-sens selon la revendication 4, et un ARNm codant pour une enzyme OTBC  
20 dans la plante.

          7. ADN recombiné caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN selon la revendication 1, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une  
25 séquence ARNm codant pour tout ou partie de l'enzyme OTBC, cette dernière ayant une activité enzymatique équivalente à l'enzyme OTBC de la plante.

          8. ADN recombiné caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence d'ADN selon la revendication  
30 2, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

          9. ADN recombiné selon la revendication 7 ou 8,  
35 caractérisé en ce qu'il comprend les éléments nécessaires pour contrôler l'expression de la séquence nucléotidique



insérée, particulièrement une séquence promotrice et une séquence de terminaison de transcription.

10. Vecteur de transformation de plantes, adapté pour augmenter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant  
5 tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID NO:1 selon la revendication 1, codant pour tout ou partie d'une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoïdes, décrite par SEQ ID NO:2, précédé par une origine de répllication de la transcription des plantes, de manière à  
10 ce que le vecteur puisse générer de l'ARNm dans les cellules des plantes.

11. Vecteur de transformation de plantes, adapté pour diminuer ou arrêter la biosynthèse des caroténoïdes, comprenant tout ou partie du brin de la séquence  
15 nucléotidique complémentaire de SEQ ID NO:1 selon la revendication 2, précédé par une origine de répllication de la transcription des plantes, de manière à ce que le brin complémentaire transcrit puisse s'apparier à l'ARNm codant pour l'enzyme OTBC de la plante impliquée dans la synthèse  
20 des caroténoïdes.

12. Cellule de plante transformée par un vecteur selon la revendication 10 ou 11.

13. Plante, ou fragment de plante, particulièrement fruit, graine, pétale, feuille,  
25 comprenant des cellules selon la revendication 12.

14. Procédé pour modifier la production de caroténoïdes dans une plante, soit en augmentant la production de caroténoïdes, soit en abaissant ou inhibant la production de caroténoïdes par la plante, relativement  
30 au contenu normal de caroténoïdes produits par la plante, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites plantes à transformer avec un vecteur selon la revendication 10 ou 11.

15. Procédé pour produire des caroténoïdes dans  
35 une cellule de plante, ou eucaryote ou procaryote, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites

plantes, des cellules eucaryotes ou procaryotes à transformer avec un vecteur selon la revendication 10.

16. Procédé pour la sélection de composé présentant un caractère herbicide, selon lequel on met en contact ledit agent avec des cellules ou des membranes de 5 cellules de la revendication 12, et on observe une diminution de la consommation d'oxygène par les membranes desdites cellules, liée à l'inhibition de l'oxydase terminale associée à la biosynthèse des caroténoïdes.

FIG 1

1  
 CCG CTC ACA TTG GGA TTC GTC ATT CTT CTT CTA AAA CCC GCA AAA TTT CTC CAT TTC TAC  
 61  
 CAA AAA TAT CCA ACT TTT ACT TTT CTT TCC TGT GAA ATT ATC TGC TCA AAT CTT TGG TTC  
 121  
 CTG ACG GAG ATG GCG GCG ATT TCA GGC ATC TCC TCT GGT ACG TTG ACG ATT TCA CGG CCT  
M A A I S G I S S G T L T I S R P  
 181  
 TTG GTT ACT CTT CGA CGC TCT AGA GCC GCC GTT TCG TAC AGC TCC TCT CAC CGA TTG CTT  
L V T L R R S R A A V S Y S S S H R L L  
 241  
 CAT CAT CTT CCT CTC TCT TCT CGT CGT CTG CTA TTA AGG AAC AAT CAT CGA GTC CAA GCA  
H H L P L S S R R L L L R N N H R V O A  
 301  
 ACG ATT TTG CAA GAC GAT GAA GAG AAA GTG GTG GTG GAG GAA TCG TTT AAA GCC GAG ACT  
 T I L Q D D E E K V V V E E S F K A E T  
 361  
 TCT ACT GGT ACA GAA CCA CTT GAG GAG CCA AAT ATG AGT TCT TCT TCA ACT AGT GCT TTT  
 S T G T E P L E E P N M S S S S T S A F  
 421  
 GAG ACA TGG ATC ATC AAG CTT GAG CAA GGA GTG AAT GTT TTC CTT ACA GAC TCG GTT ATT  
 E T W I I K L E Q G V N V F L T D S V I  
 481  
 AAG ATA CTT GAC ACT TTG TAT CGT GAC CGA ACA TAT GCA AGG TTC TTT GTT CTT GAG ACA  
 K I L D T L Y R D R T Y A R F F V L E T  
 541  
 ATT GCT AGA GTG CCT TAT TTT GCG TTT ATG TCT GTG CTA CAT ATG TAT GAG ACC TTT GGT  
 I A R V P Y F A F M S V L H M Y E T F G  
 601  
 TGG TGG AGG AGA GCA GAT TAT TTG AAA GTA CAC TTT GCT GAG AGC TGG AAT GAA ATG CAT  
 W W R R A D Y L K V H F A E S W N E M H  
 661  
 CAC TTG CTC ATA ATG GAA GAA TTG GGT GGA AAT TCT TGG TGG TTT GAT CGT TTT CTG GCT  
 H L L I M E E L G G N S W W F D R F L A  
 721  
 CAG CAC ATA GCA ACC TTC TAC TAC TTC ATG ACA GTG TTC TTG TAT ATC TTA AGC CCT AGA  
 Q H I A T F Y Y F M T V F L Y I L S P R  
 781  
 ATG GCA TAT CAC TTT TCG GAA TGT GTG GAG AGT CAT GCA TAT GAG ACT TAT GAT AAA TTT  
 M A Y H F S E C V E S H A Y E T Y D K F  
 841  
 CTC AAG GCC AGT GGA GAG GAG TTG AAG AAT ATG CCT GCA CCG GAT ATC GCA GTA AAA TAC  
 L K A S G E E L K N M P A P D I A V K Y  
 901  
 TAT ACG GGA GGT GAC TTG TAC TTA TTT GAT GAG TTC CAA ACA TCA AGA ACT CCC AAT ACT  
 Y T G G D L Y L F D E F Q T S R T P N T  
 961  
 CGA AGA CCA GTA ATA GAA AAT CTA TAC GAT GTG TTT GTG AAC ATA AGA GAT GAT GAA GCA  
 R R P V I E N L Y D V F V N I R D D E A  
 1021  
 GAA CAC TGC AAG ACA ATG AGA GCT TGT CAG ACT CTA GGC AGT CTG CGT TCT CCA CAC TCC  
 E H C K T M R A C Q T L G S L R S P H S  
 1081  
 ATT TTA GAT GAT GAT GAT ACT GAA GAA GAA TCA GGG TGT GTT GTT CCT GAG GAG GCT CAT  
 I L D D D D T E E E S G C V V P E E A H  
 1141  
 TGC GAA GGT ATT GTA GAC TGC CTC AAG AAA TCC ATT ACA AGT TAA TAA ATT AGA AAG TAA  
 C E G I V D C L K K S I T S  
 1201  
 ACT AAA AAA GAT TAT TTG TAT CAG CTC ATG AAC AAT AGA TAT AAT CCC ATA TAC TTG GGA  
 1261  
 ATA AAG GAA TAA TGT GAA ATT CCC ATC GTT GTG CTA GTG TGT GAG AGA ATC AAA TAC CCT  
 1321  
 AAT GAT GTA AAT GTA CTT TGA TGA GCT TAA GTC GTT GTA GAC CAT TTT ATC AAA AAA AAA  
 1381  
 AAA AAA AAA AAA AAA A

FIG 2

IMM : 111 FLTDSVIKILDITLYRDRTYA-REFVLELLARVPEAFMSVLHMYETFGWRRADYLKVHF 169  
 + T ++++I L+ R Y R +LET+A VP +LH+ + + ++K  
 AOX : 136 YRTVKLLRIPD~~LF~~FKRRYGCRA~~MMLEHVA~~VPGMVGGMLLHLRLSRKFKFQQSGGWIKALL 195  
  
 IMM : 170 AESWNEMHLLIMEELGGNS'WWFDRELAQHIATFYLFMEVELYILSPRMA YHFSECVESH 229  
 E+ NE HL+ M EL W++R L + ++ LYLLSP++A+ +E  
 AOX : 196 EEAENERMHLMTMVEL-VKPKWYERILVLAVOGVEFNAFVLYIISPKVAHRIVGYLEEE 254  
  
 IMM : 230 AYETYDKFLK-ASGEELKNMPAPDIAVKYYTGGDLYLDFEFQTSRTPNTRRPVIENTLYDV 288  
 A +Y ++LK ++N+PAP IA+ Y+ R P L DV  
 AOX : 255 AIHSYTEYLLKDLKLESGAIENVPAPAIADYW-----RLPKDARLKD V 295  
  
 IMM : 289 FVNIRDDEAEH 299  
 IR DEA H  
 AOX : 296 ITVIRADEAHH 306

### FIG 3

T 1 MAISISAMSFGTSVSSYSFCFRARSFEKSSVLCNSQNPCRFNSVFP. IRKSDGASRCSVSR  
P 1 MAISISAMSFRTSVSS.....SY..SAFLCNSKNPFCLNSLFS. LRNSHRTFQPPLSR  
A 1 MA.AISGISSGTLTIS.....RPLVTLRRSRAAVSYSSSHRLLHHLPLSSRRLLR

consensus

1 MA ISamS T S L S S lr l R

T 60 KSCRVRATLLQENEEVVVEKSFAPKSFDPNVGGGNGKPPDDSSS. NGLEKWVIKLEQS  
P 51 KSSRV RATLLKENEEVVVEKSFAPKSFPGNVGGGNGEPPDNSSS. NGLEKWVIKIEQS  
A 51 NNHRVQATILQDDEEKVVVEESFKAE...TSTGTEPLEEPNMSSSSTSAFETWIKLEQG

consensus

61 RV ATll e EE VVVE SF G P SSS g E WvIKiEQ

T 119 VNILLTDSVIKILDTLYHNRNYARFFVLETIARVPYFAFISVLHMYESFGWRRADYMKV  
P 110 VNIFLTDSVIKILDTLYHDRHYARFFVLETIARVPYFAFISVLHLYESFGWRRADYLKV  
A 108 VNVFLTDSVIKILDTLYRDRTYARFFVLETIARVPYFAFM SVLHMYETFGWRRADYLKV

consensus

121 VNi LTDSVIKILDTLYh R YARFFVLETIARVPYFAFiSVLHLYEsFGWRRADYLKV

T 179 HFAESWNEMHLLIMEELGGNAWWFDRFLAQHIAIFYFMTVLMYALSPRMAYHFSECVE  
P 170 HFAESWNEMHLLIMEELGGNAWWFDRFLAQHIAVFYFMTVSMYALSPRMAYHFSECVE  
A 168 HFAESWNEMHLLIMEELGGNSWWFDRFLAQHIATFYFMTVFLYILSPRMAYHFSECVE

Consensus

181 HFAESWNEMHLLIMEELGGN WWFDRFLAQHIA FYYFMTV mY LSPRMAYHFSECVE

T 239 SHAYETYDKFIKDQGEELKNLPAPKIAVDYYTGGDLYLFDEFQTSREPNTRRPKIDNLYD  
P 230 HHAYETYDKFIKDQEAELKKLPAPKIAVSYYTGGDLYLFDEFQTSREPNTRRPKIDNLYD  
A 227 SHAYETYDKFLKASGEELKNMPAPDIAVKYYTGGDLYLFDEFQTSRTPNTRRPVIENTLYD

Consensus

241 HAYETYDKFiK ELK lPAP IAV YYTGGDLYLFDEFQTSR PNTRRP IdNLYD

T 299 VFMNIRDDEAEHCKTMKACQTHGSLRSPHTD. PCDDSEDDTGCSVP. QADCIGIVDCIKK  
P 290 VFMNIRDDEAEHCKTMKACQTHGSLRSPHTN. PCDESEDDPGCSVP. QADCVGIVDCITK  
A 287 VFNIRDDEAEHCKTMRACQTLGSLRSPHSILDDDDTEESGCVVPEEAHCEGIVDCLKK

Consensus

301 VFmNIRDDEAEHCKTMkACQT GSLRSPHT DdsEdd GC VP A C GIVDCi K

FIG 3 (suite)

T 357 SVTDTQVTKR

P 348 SVADPNVGRR

A 347 SITS.....

Consensus

361 Sv

FIG 4

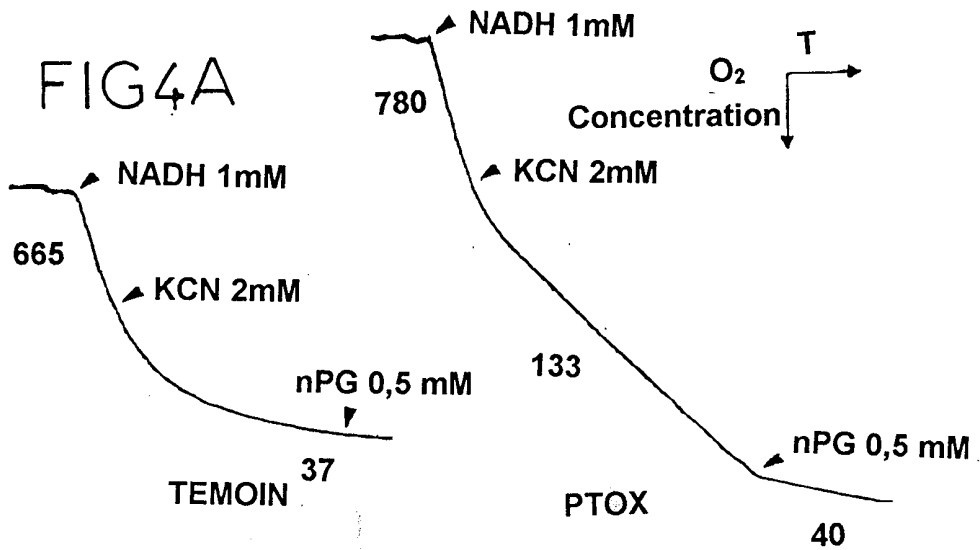
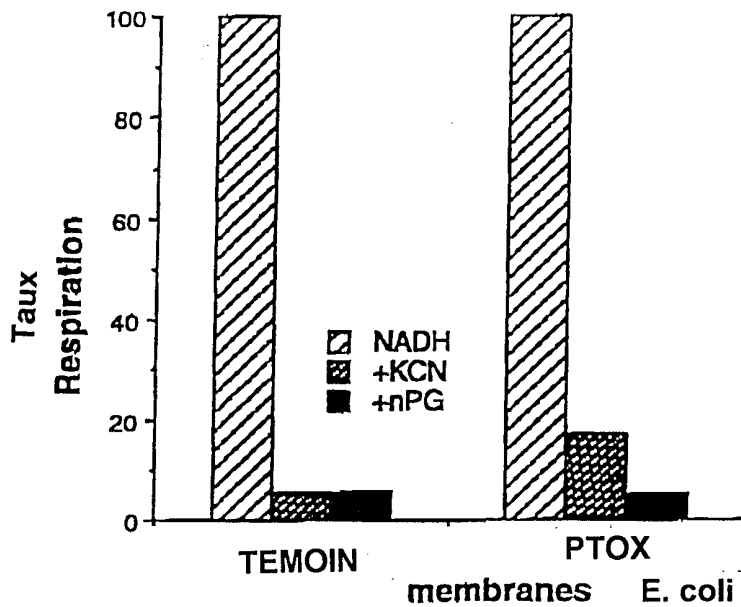


FIG 4B



## LISTE DE SEQUENCES

<110> UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

<120> Séquence d'ADNc transcrivant un ARNm codant pour  
l'oxydase terminale associée à la biosynthèse des  
caroténoïdes et utilisations

<130> OTBC

<140>

<141>

<150> FR9813283

<151> 1998-10-20

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1396

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

ccgctcacat tgggattcgt cattcttctt ctaaaacccg caaaatttct ccatttctac 60
caaaaatata caactttttac ttttctttcc tgtgaaatta tctgctcaaa tctttggttc 120
ctgacggaga tggcggcgat ttcaggcatc tcctctggta cgttgacgat ttcacggcct 180
ttggttactc ttcgacgctc tagagccgcc gtttcgtaca gtcctctca ccgattgctt 240
catcatcttc ctctctcttc tcgtcgtctg ctattaagga acaatcatcg agtccaagca 300
acgattttgc aagacgatga agagaaagtg gtggtggagg aatcgtttaa agccgagact 360
tctactggta cagaaccact tgaggagcca aatatgagtt cttcttcaac tagtgctttt 420
gagacatgga tcatcaagct tgagcaagga gtgaatgttt tccttacaga ctcggttatt 480
aagatacttg acactttgta tcgtgaccga acatatgcaa ggttctttgt tcttgagaca 540
attgctagag tgccttattt tgcgtttatg tctgtgctac atatgtatga gacctttggt 600
tggtggagga gagcagatta tttgaaagta cactttgctg agagctggaa tgaaatgcat 660
cacttgctca taatggaaga attgggtgga aattcttggt ggtttgatcg ttttctggct 720
cagcacatag caaccttcta ctacttcatg acagtgttct tgtatatctt aagccctaga 780
atggcatatc acttttcgga atgtgtggag agtcatgcat atgagactta tgataaattt 840
ctcaaggcca gtggagagga gttgaagaat atgcctgcac cggatatcgc agtaaaatac 900
tatacgggag gtgacttgta cttatttgat gagttccaaa catcaagaac tccaataact 960
cgaagaccag taatagaaaa tctatacgat gtgtttgtga acataagaga tgatgaagca 1020
gaacactgca agacaatgag agcttgtcag actctaggca gtctgcgttc tccacactcc 1080
atttttagatg atgatgatac tgaagaagaa tcagggtgtg ttgttcctga ggaggctcat 1140
tgcgaaggta ttgtagactg cctcaagaaa tccattacaa gttaataaat tagaaagtaa 1200
actaaaaaag attatttgta tcagctcatg aacaatagat ataatcccat atacttggga 1260
ataaaggaat aatgtgaaat tcccatcgtt gtgctagtgt gtgagagaat caaataccct 1320

```



aatgatgtaa atgtactttg atgagcttaa gtcggttag accattttat caaaaaaaaa 1380  
 aaaaaaaaaa aaaaaa 1396

<210> 2

<211> 351

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Ala Ile Ser Gly Ile Ser Ser Gly Thr Leu Thr Ile Ser Arg  
 1 5 10 15

Pro Leu Val Thr Leu Arg Arg Ser Arg Ala Ala Val Ser Tyr Ser Ser  
 20 25 30

Ser His Arg Leu Leu His His Leu Pro Leu Ser Ser Arg Arg Leu Leu  
 35 40 45

Leu Arg Asn Asn His Arg Val Gln Ala Thr Ile Leu Gln Asp Asp Glu  
 50 55 60

Glu Lys Val Val Val Glu Glu Ser Phe Lys Ala Glu Thr Ser Thr Gly  
 65 70 75 80

Thr Glu Pro Leu Glu Glu Pro Asn Met Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ala  
 85 90 95

Phe Glu Thr Trp Ile Ile Lys Leu Glu Gln Gly Val Asn Val Phe Leu  
 100 105 110

Thr Asp Ser Val Ile Lys Ile Leu Asp Thr Leu Tyr Arg Asp Arg Thr  
 115 120 125

Tyr Ala Arg Phe Phe Val Leu Glu Thr Ile Ala Arg Val Pro Tyr Phe  
 130 135 140

Ala Phe Met Ser Val Leu His Met Tyr Glu Thr Phe Gly Trp Trp Arg  
 145 150 155 160

Arg Ala Asp Tyr Leu Lys Val His Phe Ala Glu Ser Trp Asn Glu Met  
 165 170 175

His His Leu Leu Ile Met Glu Glu Leu Gly Gly Asn Ser Trp Trp Phe  
 180 185 190

Asp Arg Phe Leu Ala Gln His Ile Ala Thr Phe Tyr Tyr Phe Met Thr  
 195 200 205

Val Phe Leu Tyr Ile Leu Ser Pro Arg Met Ala Tyr His Phe Ser Glu  
 210 215 220

Cys Val Glu Ser His Ala Tyr Glu Thr Tyr Asp Lys Phe Leu Lys Ala  
 225 230 235 240

Ser Gly Glu Glu Leu Lys Asn Met Pro Ala Pro Asp Ile Ala Val Lys  
 245 250 255

Tyr Tyr Thr Gly Gly Asp Leu Tyr Leu Phe Asp Glu Phe Gln Thr Ser  
 260 265 270

Arg Thr Pro Asn Thr Arg Arg Pro Val Ile Glu Asn Leu Tyr Asp Val  
 275 280 285

Phe Val Asn Ile Arg Asp Asp Glu Ala Glu His Cys Lys Thr Met Arg  
 290 295 300

Ala Cys Gln Thr Leu Gly Ser Leu Arg Ser Pro His Ser Ile Leu Asp  
 305 310 315 320

Asp Asp Asp Thr Glu Glu Glu Ser Gly Cys Val Val Pro Glu Glu Ala  
 325 330 335

His Cys Glu Gly Ile Val Asp Cys Leu Lys Lys Ser Ile Thr Ser  
 340 345 350

<210> 3

<211> 1387

<212> ADN

<213> poivron

<400> 3

ccacgcgtcc gataaaaaaa tcaagaatgg cgatttccat atctgctatg agttttcgaa 60  
 cttcagtttc ttcttcatat tcagcatttt tgtgcaattc caagaacca ttttgtttga 120  
 attctctatt ttcacttagg aattctcata gaacttttca gccttcgta tcaaggaaat 180  
 caagtagagt tcgagcaacg ttgttaaaag agaatgaaga agaagtgggt gtggagaaat 240  
 cttttgcacc taagagtttt cctggtaatg tgggaggggg aaataatggg gagccaccgg 300  
 ataattcatc ctcgaacggt ctggagaaat gggttataaa gattgagcag tctgtaaata 360  
 tctttctcac ggattcagtg ataaagattc ttgacacttt gtatcacgac cgacactatg 420  
 cgaggttttt cgttctggaa acaattgcaa gagttcctta ttttgcaatt atatctgttc 480  
 ttcacttgta cgagagcttt ggttggtgga gacgagcaga ttatctgaag gtgcattttg 540  
 ccgagagctg gaatgagatg caccatttac tcattatgga ggaattaggt ggaaatgctt 600  
 ggtggtttga ccgattcctt gcgcaacata ttgctgtatt ctattatttc atgacagtct 660  
 cgatgtatgc tttgagcccg agaatggcat atcattttctc tgaatgtgtg gagcaccatg 720

catacgagac ttacgataaa ttcacatcaagg atcaagaagc ggaattgaag aaattgcccg 780  
 ctccaaagat tgcagtgagc tactacaccg gagtgactt gtatttggtc gatgagtttc 840  
 aaacatcacg agagcctaact actcgaaggc caaaaataga taatctgtac gacgtattca 900  
 tgaacatcag agatgacgaa gcagagcatt gtaagacaat gaaagcgtgt caaacccatg 960  
 ggagcctccg ctcccctcac acaaatccat gcgatgagtc tgaagacgat ccaggttggt 1020  
 cagtgccctca ggccgattgt gtaggtatcg tggattgtat aacgaaatct gtcgctgatc 1080  
 ctaacgctcg cagaaggtag ggaaaggaaa aacgcagaac gaaactatac atgtatatac 1140  
 cagtacagcc aatatataca gaaatataca tacatattgt atcttttact ctctgaggaa 1200  
 gagcttgctca aattgcccga aaaatgggta ggcaacttgg tttgttttca cctttcaata 1260  
 atttgacta aactatgaac aaatttgctc cggcacacta caactccata ggggtcctgt 1320  
 tacgcttctg aactaaattt taacatattt ttgtcaacct tctcagcaaa aaaaaaaaaa 1380  
 aaaaaaa 1387

<210> 4

<211> 357

<212> PRT

<213> poivron

<400> 4

Met Ala Ile Ser Ile Ser Ala Met Ser Phe Arg Thr Ser Val Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Tyr Ser Ala Phe Leu Cys Asn Ser Lys Asn Pro Phe Cys Leu Asn  
 20 25 30  
 Ser Leu Phe Ser Leu Arg Asn Ser His Arg Thr Phe Gln Pro Ser Leu  
 35 40 45  
 Ser Arg Lys Ser Ser Arg Val Arg Ala Thr Leu Leu Lys Glu Asn Glu  
 50 55 60  
 Glu Glu Val Val Val Glu Lys Ser Phe Ala Pro Lys Ser Phe Pro Gly  
 65 70 75 80  
 Asn Val Gly Gly Gly Asn Asn Gly Glu Pro Pro Asp Asn Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Asn Gly Leu Glu Lys Trp Val Ile Lys Ile Glu Gln Ser Val Asn Ile  
 100 105 110  
 Phe Leu Thr Asp Ser Val Ile Lys Ile Leu Asp Thr Leu Tyr His Asp  
 115 120 125  
 Arg His Tyr Ala Arg Phe Phe Val Leu Glu Thr Ile Ala Arg Val Pro  
 130 135 140  
 Tyr Phe Ala Phe Ile Ser Val Leu His Leu Tyr Glu Ser Phe Gly Trp



<400> 5

```

gaattcggca cgagcggcac gagcagaaaa ctaacaactt tcccactttg gaatthttctt 60
taccttacct aagaagggtta ttaatttgat tcttgtggga aggaagaagg atcaagaatg 120
gcgatttcga tttctgctat gagttttgga acctcagttt cttcatattc ttgttttaga 180
gctaggagtt ttgagaagtc atcagtttta tgcaattccc agaaccatg tccgtttaat 240
tctgtttttc cgattcggaa atctgatggg gtttcacggg gttctgtttc taggaaatca 300
tgtagagttc gagcaacggt gttacaagag aatgaagaag aagtggttgt ggagaaatct 360
tttgaccta agagtthttcc tgataacgtg ggagggggaa gtaatgggaa gccaccagat 420
gattcatcct ctaacgggtct agagaaatgg gttataaagc ttgagcagtc tgtaaataatc 480
ttactcacgg attcagtgat aaagattctt gacactttgt atcacaaccg aaactatgcg 540
aggthttttg ttctggaaac aattgcaagg gttccttatt ttgcatttat atcggttctt 600
cacatgtatg agagctthtg ctgggtggaga agggcagatt atatgaaagt gcattthtgct 660
gaaagctgga atgagatgca ccatttgctc attatggaag aattaggggg aatgcttg 720
tggtthgatc gattthcttgca acaacatata gctatattct attattthcat gacagthctg 780
atgtatgctt tgagcccggag aatggcatat cattthctctg aatgtgtgga gagccatgca 840
tacgagactt acgataaatt catcaaggat caaggagagg aattgaagaa thtgcccgct 900
ccaaagattg cagthgacta ctacacggga ggtgacttat atthattthga thgattthcaa 960
actthcacgag agcctaatac tcgaagacca aaaatagata atctctatga cgtattthcatg 1020
aacattagag atgacggaagc agagcattgt aaaacgatga aagcctgtca aactthacggg 1080
agcctthcgtt ctccacacac agatthcatgc gatgattctg aagatgatac agggthgtcc 1140
gtacctcaag ctgattgtat aggtatcgtg gattgtataa agaagthcagth caccgatact 1200
caagthacca aaagthtagga aaagthaaaa cgcgthacaaa ctatactthgt atatactagth 1260
atagthacaaa aaaaaaaaaa aaaa
1284

```

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 99/01719

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50 A01H5/00

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N A01H

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

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WETZEL, C.M., ET AL.: "nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis"</p> <p>THE PLANT JOURNAL, vol. 6, no. 2, 1994, pages 161-175, XP002110646</p> <p>cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1,3

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2000

Date of mailing of the international search report

09/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 99/01719

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NEWMAN, T., ET AL.: "Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 February 1995 (1995-02-03), XP002110647 heidelberg, germany accession no. T42793 ---	1
X	BEVAN, M., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 4, BAC clone T10I14" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 February 1998 (1998-02-03), XP002110648 accession no. AL021712 ---	2,4
A	BEVAN, M., ET AL.: "hypothetical 38.7 KD protein" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 1 June 1998 (1998-06-01), XP002110649 heidelberg, germany accession no. 049631 ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL.: "untitled" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 15 July 1998 (1998-07-15), XP002110650 heidelberg, germany accession no. 003376 ---	1-15
A	WO 95 34668 A (BIOSOURCE TECH INC) 21 December 1995 (1995-12-21) abstract; pages 3,5,4 the whole document ---	1-15
A	WO 91 09128 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 27 June 1991 (1991-06-27) pages 1,6; examples; revendications ---	1-15
A	FINNEGAN, P.M., ET AL.: "differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 114, no. 2, June 1997 (1997-06), pages 455-466, XP002131002 the whole document ---	1-15
P,X	CAROL, P., ET AL.: "mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with Phytoene desaturation" THE PLANT CELL, vol. 11, January 1999 (1999-01), pages 57-68, XP002110651 the whole document ---	1-3,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/IB 99/01719

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WU, D., ET AL.: "THE IMMUTANS VARIATION LOCUS OF ARABIDOPSIS DEFINES A MITOCHONDRIAL ALTERNATIVE OXIDASE HOMOLOG THAT FUNCTIONS DURING EARLY CHLOROPLAST BIOGENESIS" THE PLANT CELL, vol. 11, January 1999 (1999-01), pages 43-55, XP002131003 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,5
T	<p>SMITH, H.: "photosynthetic pigmentation - variegations on a theme" THE PLANT CELL, vol. 11, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 1-3, XP002131004 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 99/01719

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9534668	A	21-12-1995	US 5922602	A 13-07-1999
			AU 710588	B 23-09-1999
			AU 2653495	A 05-01-1996
			CA 2193094	A 21-12-1995
			EP 0804600	A 05-11-1997
			JP 10501968	T 24-02-1998
			ZA 9504451	A 05-02-1996
WO 9109128	A	27-06-1991	AU 645534	B 20-01-1994
			AU 6893891	A 18-07-1991
			CA 2070831	A 14-06-1991
			EP 0505405	A 30-09-1992
			EP 0699765	A 06-03-1996
			JP 5502160	T 22-04-1993
			US 5750865	A 12-05-1998
			US 5304478	A 19-04-1994

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. Je internationale No

PCT/IB 99/01719

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50 A01H5/00

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

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N G01N A01H

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

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WETZEL, C.M., ET AL.: "nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of Arabidopsis is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis"</p> <p>THE PLANT JOURNAL, vol. 6, no. 2, 1994, pages 161-175, XP002110646</p> <p> cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,3

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

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/03/2000

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

Fonctionnaire autorisé

Holtorf, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: Je Internationale No

PCT/IB 99/01719

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>NEWMAN, T., ET AL.: "Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1995 (1995-02-03), XP002110647 heidelberg, germany accession no. T42793</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
X	<p>BEVAN, M., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 4, BAC clone T10I14" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 3 février 1998 (1998-02-03), XP002110648 accession no. AL021712</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2,4
A	<p>BEVAN, M., ET AL.: "hypothetical 38.7 KD protein" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 1 juin 1998 (1998-06-01), XP002110649 heidelberg, germany accession no. 049631</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
A	<p>FINNEGAN, P.M., ET AL.: "untitled" EMBL SEQUENCE DATA LIBRARY, 15 juillet 1998 (1998-07-15), XP002110650 heidelberg, germany accession no. 003376</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
A	<p>WO 95 34668 A (BIOSOURCE TECH INC) 21 décembre 1995 (1995-12-21) abstract; pages 3,5,4 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
A	<p>WO 91 09128 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 27 juin 1991 (1991-06-27) pages 1,6; exemples; revendications</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
A	<p>FINNEGAN, P.M., ET AL.: "differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 114, no. 2, juin 1997 (1997-06), pages 455-466, XP002131002 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-15
P,X	<p>CAROL, P., ET AL.: "mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with Phytoene desaturation" THE PLANT CELL, vol. 11, janvier 1999 (1999-01), pages 57-68, XP002110651 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3,5

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. de Internationale No

PCT/IB 99/01719

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>WU, D., ET AL.: "THE IMMUTANS VARIATION LOCUS OF ARABIDOPSIS DEFINES A MITOCHONDRIAL ALTERNATIVE OXIDASE HOMOLOG THAT FUNCTIONS DURING EARLY CHLOROPLAST BIOGENESIS"                      THE PLANT CELL,                      vol. 11, janvier 1999 (1999-01), pages 43-55, XP002131003                      le document en entier</p>	1-3,5
T	<p>SMITH, H.: "photosynthetic pigmentation - variegations on a theme"                      THE PLANT CELL,                      vol. 11, 1 janvier 1999 (1999-01-01), pages 1-3, XP002131004                      le document en entier</p>	1-16

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/IB 99/01719

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9534668 A	21-12-1995	US 5922602 A	13-07-1999
		AU 710588 B	23-09-1999
		AU 2653495 A	05-01-1996
		CA 2193094 A	21-12-1995
		EP 0804600 A	05-11-1997
		JP 10501968 T	24-02-1998
		ZA 9504451 A	05-02-1996
WO 9109128 A	27-06-1991	AU 645534 B	20-01-1994
		AU 6893891 A	18-07-1991
		CA 2070831 A	14-06-1991
		EP 0505405 A	30-09-1992
		EP 0699765 A	06-03-1996
		JP 5502160 T	22-04-1993
		US 5750865 A	12-05-1998
		US 5304478 A	19-04-1994