

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 novembre 2019 (28.11.2019)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2019/224324 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/82 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2019/063377

(22) Date de dépôt international :
23 mai 2019 (23.05.2019)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1854405 24 mai 2018 (24.05.2018) FR

(71) Déposants : **MEIOGENIX** [FR/FR] ; 38 rue Servan, 75011 PARIS (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE** [FR/FR] ; 147 rue de l'Université, 75007 PARIS (FR). **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1** [FR/FR] ; 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69100 VILLEURBANNE (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR] ; 3 rue Michel Ange, 75016 PARIS (FR). **ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON** [FR/FR] ; 15, Parvis René Descartes, 69007 LYON (FR).

(72) Inventeurs : **BASTIANELLI, Giacomo** ; 85 boulevard de Picpus, 75012 PARIS (FR). **NICOLAS, Alain** ; 173 rue de la Croix Nivert, 75015 PARIS (FR). **ROGOWSKY, Peter** ; 45 rue du Rhône, 69007 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **CABINET BECKER ET ASSOCIES** ; 25, rue Louis le Grand, 75002 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,

FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2(a))

(54) Title: MEIOTIC PROMOTORS AND USES THEREOF

(54) Titre : PROMOTEURS MEIOTIQUES ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The present invention relates to novel transcriptional promoters which are functional during meiosis. As such, it provides novel tools, methods and compositions for protein expression during meiosis in an eukaryotic cell, and more particularly in a plant cell.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux promoteurs transcriptionnels fonctionnels durant la méiose. Elle fournit ainsi de nouveaux outils, méthodes et compositions pour l'expression de protéines lors de la méiose dans une cellule eucaryote, et plus particulièrement dans une cellule de plante.

WO 2019/224324 A1

PROMOTEURS MEIOTIQUES ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne des outils, méthodes et compositions pour l'expression de protéines lors de la méiose dans une cellule eucaryote, et plus particulièrement dans une cellule de plante.

ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE DE L'INVENTION

Afin d'optimiser les productions végétales, l'industrie de l'agriculture est en perpétuelle recherche de plantes présentant des caractéristiques améliorées notamment au niveau de la croissance, du rendement, des propriétés organoleptiques, de la résistance aux maladies ou aux aléas climatiques, ou encore au niveau de caractéristiques d'importance en chimie verte ou pour la production de biocarburant.

De manière classique, une plante présentant des propriétés particulières peut être obtenue par reproduction sexuée en croisant deux souches parentales présentant des caractéristiques intéressantes et en sélectionnant une souche hybride apportant l'amélioration recherchée. Cette méthode est cependant aléatoire et l'étape de sélection peut engendrer des délais conséquents.

De manière alternative, il peut également être envisagé de modifier génétiquement la plante par une technique d'ADN recombinant. Cette modification peut néanmoins constituer un frein à son exploitation, que ce soit pour des raisons réglementaires, sanitaires ou environnementales.

Une troisième alternative consiste à provoquer un réassortiment des allèles d'origine paternelle et maternelle dans le génome, au cours de la recombinaison méiotique. La recombinaison méiotique est un échange d'ADN entre chromosomes homologues au cours de la méiose. Elle est initiée par la formation de cassures double-brin dans l'une ou l'autre des chromatides des chromosomes homologues, suivie de la réparation de ces cassures, utilisant comme matrice une chromatide du chromosome homologue. Les recombinaisons méiotiques ont cependant l'inconvénient d'être distribuées de manière non-uniformes en terme de fréquence et de localisation le long des chromosomes.

Ces dernières années ont vu émerger de nouvelles technologies permettant d'influer sur la fréquence ou le positionnement des recombinaisons méiotiques. Il a ainsi été démontré qu'il était possible de modifier les sites de formation de cassures double-brin en exprimant des protéines recombinantes durant la prophase de la première division méiotique (Pecina et al, 2002 Cell, 111, 173-184 ; WO 2016/120480). Ces nouveaux outils ouvrent des perspectives

extrêmement intéressantes pour l'optimisation dirigée des végétaux via un réassortissement des gènes naturellement présents chez la plante.

La modulation des événements méiotiques via l'expression de protéines recombinantes nécessite cependant l'utilisation de promoteurs présentant une activité transcriptionnelle durant
5 cette phase. Certains de ces promoteurs ont été décrits tels que le promoteur du gène *DMC1* d'*Arabidopsis thaliana* (Klimyuk and Jones. Plant J. 1997 Jan;11(1):1-14) ou le promoteur du gène *SPO13* de *Saccharomyces cerevisiae* (Buckingham et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Dec;87(23):9406-10.) Le choix disponible reste cependant largement insuffisant pour couvrir toutes les applications envisagées. Il subsiste donc un réel besoin pour de nouveaux promoteurs
10 transcriptionnels permettant l'expression de protéines d'intérêt lors de la méiose.

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention propose un nouveau promoteur transcriptionnel fonctionnel durant la méiose. Ainsi, selon un premier aspect, elle concerne un acide nucléique isolé ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel lors de la méiose et comprenant, ou
15 consistant en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 1 et des variants fonctionnels de celle-ci, lesdits variants fonctionnels comprenant, ou consistant en,

- une séquence présentant au moins 70 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1 ;
- un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 d'au moins 50 nucléotides consécutifs, ou
20 - une séquence capable de s'hybrider en conditions de faible, moyenne ou forte stringence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou son brin complémentaire.

De préférence, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 1 et des variants fonctionnels de celle-ci présentant au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID
25 NO : 1. En particulier, il peut comprendre, ou consister en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué des séquences SEQ ID NO : 1, 2, 3 ou 4.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une cassette d'expression comprenant une séquence codante liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention. Elle concerne également un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique ou une cassette
30 d'expression selon l'invention.

La séquence codante peut notamment coder un polypeptide d'intérêt, de préférence une protéine rapportrice ou une protéine susceptible de moduler, de préférence d'augmenter, la fréquence des recombinaisons méiotiques, une protéine qui modifie la structure de la chromatine telle que par exemple des histone (dé)acétylases ou histone (dé)méthylases ou une protéine qui modifie la méthylation de l'ADN. Alternativement, la séquence codante code un acide nucléique d'intérêt, de préférence un siRNA, un shRNA, un ARNi, un miARN, un ARN antisens, un ribozyme, un DNAzyme ou un ARN guide capable de cibler l'action d'une endonucléase de type CRISPR, de préférence Cas9 ou dCas9, au niveau d'une séquence spécifique.

10 Selon un autre aspect, la présente invention concerne également une cellule hôte non humaine transfectée ou transformée avec un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur d'expression selon l'invention.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un procédé, de préférence un procédé *in vitro*, pour exprimer une séquence codante d'intérêt dans une cellule hôte non humaine lors de la méiose, comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un acide nucléique, d'une cassette d'expression ou d'un vecteur d'expression selon l'invention, de préférence une cassette d'expression ou un vecteur d'expression selon l'invention, ladite séquence codante étant liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention. Elle concerne également un procédé, de préférence un procédé *in vitro*, de production d'un organisme multicellulaire végétal exprimant une séquence codante d'intérêt lors de la méiose, comprenant l'introduction dans une cellule de plante d'un acide nucléique, d'une cassette d'expression ou d'un vecteur d'expression selon l'invention, de préférence une cassette d'expression ou un vecteur d'expression selon l'invention, ladite séquence codante étant liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention, et la reconstitution dudit organisme à partir de ladite cellule. De préférence la cellule hôte est une cellule de plante.

La présente invention concerne également un organisme multicellulaire végétal comprenant une cassette d'expression ou un vecteur d'expression selon l'invention, ainsi que l'utilisation d'un acide nucléique, d'une cassette d'expression ou d'un vecteur d'expression selon l'invention pour exprimer une séquence codante d'intérêt, de préférence hétérologue, dans une cellule hôte non humaine, de préférence une cellule de plante, lors de la méiose.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

Figure 1 : Séquence nucléotidique de la région génomique comprenant le dernier intron, le dernier exon et le 3'UTR du gène *ZmPHYC2* et la région intergénique en amont de *ZmSpo11-1*. Les séquences encadrées constituent des motifs conservés chez différentes espèces.

Figure 2 : Panicules. Les panicules des plantes homozygotes mutantes *Zmspo11-1* portent beaucoup moins d'anthères.

Figure 3 : Anthères. Les anthères des plantes homozygotes mutantes *Zmspo11-1* sont atrophiées.

Figure 4 : Pollen. Les anthères des plantes homozygotes mutantes *Zmspo11-1* contiennent beaucoup de grains de pollen avortés et quasiment pas de grains de pollen turgescents.

Figure 5 : Panicules. Panicules des plantes homozygotes mutantes *Zmspo11-1* (WT/Homo) complémentées par le transgène L1605 (TR *Spo11*/Homo) ou par le transgène L1604 (TR Ubi/Homo).

Figure 6 : Anthères. Anthères des plantes homozygotes mutantes *Zmspo11-1* (WT/Homo) complémentées par le transgène L1605 (TR *Spo11*/Homo) ou par le transgène L1604 (TR Ubi/Homo).

Figure 7 : Pollen. Pollen des anthères des plantes homozygotes mutantes *Zmspo11-1* (WT/Homo) complémentées par le transgène L1605 (TR *Spo11*/Homo) ou par le transgène L1604 (TR Ubi/Homo).

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente demande décrit l'identification et la caractérisation de séquences d'acide nucléique régulatrices d'origine végétale, qui permettent de contrôler l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule eucaryote, de préférence une cellule de plante, durant la méiose. Les inventeurs ont en effet identifié une séquence nucléotidique en amont du gène *ZmSpo11-1* (GeneID NCBI : 100279325) du maïs (*Zea mays*) présentant une activité de promoteur transcriptionnel durant la méiose. Ils ont également démontré que ce promoteur était plus performant durant la méiose qu'un promoteur constitutif fort tel que le promoteur de l'ubiquitine (*ZmUBI*).

Définitions

Dans la présente description, les termes «acide nucléique», «séquence nucléique», «polynucléotide», «oligonucléotide», «séquence nucléotidique», sont employés indifféremment et se réfèrent à un polymère de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides. Ces termes peuvent notamment inclure des molécules synthétiques ou semi-synthétiques, recombinantes, comprenant des bases non-naturelles ou des nucléotides modifiés comprenant par exemple une liaison modifiée, une base purique ou pyrimidique modifiée, ou un sucre modifié. L'acide nucléique selon l'invention peut être obtenu par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple par synthèse chimique et/ou par des techniques de recombinaison et/ou de mutagenèse. Selon certains modes de réalisation préférés, l'acide nucléique selon l'invention est une molécule d'ADN, de préférence une molécule d'ADN double brin. Cette molécule peut être obtenue par des techniques recombinantes bien connues de l'homme du métier.

Tel qu'utilisé ici, le terme « isolé » se réfère à un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement naturel. Plus particulièrement, le terme « acide nucléique isolé » se réfère à une molécule d'acide nucléique qui est séparée des acides nucléiques qui lui sont adjacents lorsqu'il est dans son environnement naturel, c'est-à-dire dans le génome à partir duquel il a été isolé. L'acide nucléique isolé peut être inclus dans un vecteur, un génome, une composition ou tout autre élément, tout en demeurant isolé, dans la mesure où cet élément ne constitue pas son environnement naturel.

Tel qu'utilisé ici, le terme « promoteur transcriptionnel » se réfère à un élément de régulation qui a la capacité d'initier la transcription d'un acide nucléique auquel il est lié de manière opérationnelle. L'activité d'un tel promoteur peut être évaluée par toute méthode connue de l'homme du métier, et notamment par toute méthode permettant de quantifier l'ARNm ou la protéine obtenu à partir du gène contrôlé par le promoteur. A titre d'illustration, l'activité peut être mesurée en évaluant la quantité d'ARNm, par exemple par Northern-blot ou RT-PCR, ou en évaluant la quantité de protéine traduite, par exemple par Western-blot, ELISA, tests colorimétriques, tests d'activité enzymatique ou en utilisant un système de gène rapporteur.

Tel qu'utilisé ici, l'expression « lié de manière opérationnelle » se réfère à des séquences nucléotidiques qui sont combinées/agencées de manière à ce que la fonction de l'une agisse sur

l'autre. Ainsi, un promoteur transcriptionnel et une séquence nucléotidique, par exemple une séquence codante, sont liés de manière opérationnelle lorsque l'expression de la séquence nucléotidique est contrôlée par ledit promoteur.

Le terme « % d'identité de séquence » ou « % d'identité », tel qu'utilisé ici, se réfère au pourcentage de nucléotides identiques dans un alignement de deux polynucléotides. Ce pourcentage peut être aisément calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence. L'identité de séquence est déterminée en comparant les séquences après les avoir alignées en maximisant les recouvrements et les identités tout en minimisant les espaces. En particulier, l'identité de séquence peut être déterminée en utilisant l'un des algorithmes mathématiques d'alignement global ou local disponibles. Les séquences de tailles similaires sont de préférence alignées au moyen d'un algorithme d'alignement global (e.g. Needleman and Wunsch, 1970) qui aligne les séquences de façon optimisée sur toute leur longueur. Les séquences de longueurs substantiellement différentes sont de préférence alignées en utilisant un algorithme d'alignement local (e.g. Smith and Waterman, 1981 ; Altschul et al., 1997; Altschul et al., 2005). Les alignements pour déterminer le pourcentage d'identité peuvent être réalisés par toute méthode connue de l'homme du métier, notamment en utilisant des programmes informatiques disponibles sur internet (par exemple, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> ou <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>). De préférence, la valeur du pourcentage d'identité se réfère ici à une valeur obtenue avec le programme EMBOSS Needle qui utilise l'algorithme d'alignement global Needleman-Wunsch avec les paramètres par défaut, à savoir : Scoring matrix = BLOSUM62, Gap open = 10, Gap extend = 0.5, End gap penalty = false, End gap open = 10 and End gap extend = 0.5.

Selon un premier aspect, la présente demande concerne un acide nucléique, de préférence isolé, ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel lors de la méiose et comprenant, ou consistant en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 1 et des variants fonctionnels de celle-ci.

L'acide nucléique selon l'invention a une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel lors de la méiose. Cela signifie qu'il est capable d'initier, durant la méiose, la transcription d'un acide nucléique auquel il est lié de manière opérationnelle. La méiose comprend deux divisions cellulaires successives. La première division méiotique est dite réductionnelle et comprend les étapes de prophase I, métaphase I, anaphase I et télophase I. La seconde division méiotique est

dite équationnelle comprend les étapes de métaphase II, anaphase II et télophase II. De préférence, l'acide nucléique selon l'invention a une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel au moins durant la prophase I de la méiose.

Selon un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique selon l'invention a une activité de promoteur transcriptionnel durant la méiose, et plus particulièrement durant la prophase I de méiose, qui est supérieure à celle d'un promoteur constitutif fort. De préférence, l'acide nucléique selon l'invention a une activité de promoteur transcriptionnel durant la méiose qui est supérieure à celle du promoteur du gène de l'ubiquitine, et notamment du gène de l'ubiquitine du maïs (numéro d'entrée GenBank : S94464, position 4-1997). L'acide nucléique selon l'invention est donc, de préférence, capable d'induire, durant la méiose, et plus particulièrement durant la prophase I de méiose, l'expression d'une séquence codante d'intérêt de manière plus efficace qu'un promoteur constitutif fort, en particulier que le promoteur du gène de l'ubiquitine, et notamment du gène de l'ubiquitine du maïs. Cette caractéristique peut être évaluée par toute méthode connue de l'homme du métier, et en particulier selon la méthode décrite dans la partie expérimentale ci-dessous. Selon un mode de réalisation, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, la séquence SEQ ID NO : 1.

Selon un autre mode de réalisation, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, un variant fonctionnel de la séquence SEQ ID NO : 1.

Tel qu'utilisé ici, le terme « variant » se réfère à une séquence nucléotidique qui diffère de la séquence parente (e.g. SEQ ID NO : 1), mais qui en conserve les propriétés essentielles. La séquence du variant peut différer de la séquence parente par une ou plusieurs substitutions, délétions et/ou insertions. Le variant peut avoir une longueur identique ou différente (plus courte ou plus longue) de la séquence parente. Le terme « variant fonctionnel » se réfère à un variant tel que défini ci-dessus qui conserve l'activité de la demande parente, en l'occurrence une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel lors de la méiose.

Selon un mode de réalisation, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, un variant fonctionnel de la séquence SEQ ID NO : 1 sélectionné dans le groupe constitué de

- d'une séquence présentant au moins 70 %, de préférence au moins 80%, d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1 ;

- un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 d'au moins 50 nucléotides consécutifs, et

- d'une séquence capable de s'hybrider en conditions de faible, moyenne ou forte stringence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou son brin complémentaire.

Selon un mode de réalisation, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, un variant fonctionnel présentant une séquence ayant au moins 70%, au moins 71%, au moins 72%, au moins 73%, au moins 74%, au moins 75%, au moins 76%, au moins 77%, au moins 78%, au moins 79%, au moins 80%, au moins 81%, au moins 82%, au moins 83%, au moins 84%, au moins 85%, au moins 86%, au moins 87%, au moins 88%, au moins 89%, au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98% ou au moins 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence sur toute la longueur de la séquence SEQ ID NO : 1. L'acide nucléique selon l'invention peut différer de la séquence SEQ ID NO : 1 par au maximum 15, c'est-à-dire 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, substitutions, insertions et/ou délétions.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, un variant fonctionnel qui est un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 d'au moins 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 ou 170 nucléotides consécutifs. De préférence, le variant fonctionnel est un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 d'au moins 100 nucléotides consécutifs. De manière plus particulièrement préférée, le variant fonctionnel est un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 d'au moins 110 nucléotides consécutifs.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, un variant fonctionnel présentant une séquence capable de s'hybrider en conditions de faible, moyenne ou forte stringence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou son brin complémentaire, de préférence en conditions de moyenne ou forte stringence, et de manière plus particulièrement préférée en conditions de forte stringence.

Tel qu'utilisé ici, le terme « conditions de faible stringence » se réfère à une pré-hybridation et une hybridation à 42°C dans un milieu 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 µg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé et soniqué et 25% formamide, suivies des procédures classiques de Southern blot durant 12 à 24 heures. Le support est ensuite lavé trois fois durant 15 minutes dans un tampon 2X SSC, 0.2% SDS à 50°C. Tel qu'utilisé ici, le terme « conditions de moyenne stringence » se réfère à une pré-hybridation et une hybridation à 42°C dans un milieu 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 µg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé et soniqué et 35% formamide, suivies des procédures classiques de Southern blot durant 12 à 24 heures. Le

support est ensuite lavé trois fois durant 15 minutes dans un tampon 2X SSC, 0.2% SDS à 55°C. Tel qu'utilisé ici, le terme « conditions de forte stringence » se réfère à une pré-hybridation et une hybridation à 42°C dans un milieu 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 µg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé et soniqué et 50% formamide, suivies des procédures classiques de Southern blot durant 12 à 24 heures. Le support est ensuite lavé trois fois durant 15 minutes dans un tampon 2X SSC, 0.2% SDS à 65°C.

Selon des modes de réalisation préférés, les variants fonctionnels de la séquence SEQ ID NO : 1 comprennent, de préférence lorsqu'ils sont alignés avec la SEQ ID NO : 1 au moyen d'un algorithme mathématique d'alignement global ou local, au moins 1, 2 ou 3 motifs conservés choisis parmi les motifs suivants :

- TTGN[A/T]GG, de préférence TTGNAGG, et de manière particulièrement préférée, TTGAAGG, aux positions 62 à 68 de la SEQ ID NO : 1,
- CGANCGA, de préférence CGATCGA, aux positions 115 à 121 de la SEQ ID NO : 1,
- AAGCCNA, de préférence AAGCCTA, aux positions 94 à 100 de la SEQ ID NO : 1, et
- AAAANNAAAA (SEQ ID NO : 7), de préférence AAAATCAAAA (SEQ ID NO : 8), aux positions 152 à 161 de la SEQ ID NO : 1.

N peut être A, T, C ou G

De préférence, les variants fonctionnels comprennent ces 4 motifs conservés. Ces motifs sont encadrés dans la figure 1.

Selon un mode de réalisation particulier, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué des séquences SEQ ID NO : 2, 3 ou 4 et des variants fonctionnels de celles-ci, sous réserve que ces variants fonctionnels comprennent (i) au moins 50, au moins 60, au moins 70, au moins 80, au moins 90, au moins 100, au moins 110, au moins 120, au moins 130, au moins 140, au moins 150, au moins 160 ou au moins 170 nucléotides consécutifs de la SEQ ID NO : 1, et/ou (ii) comprennent une séquence présentant au moins 70%, au moins 71%, au moins 72%, au moins 73%, au moins 74%, au moins 75%, au moins 76%, au moins 77%, au moins 78%, au moins 79%, au moins 80%, au moins 81%, au moins 82%, au moins 83%, au moins 84%, au moins 85%, au moins 86%, au moins 87%, au moins 88%, au moins 89%, au moins 90%, au moins 91%, au moins 92%, au moins 93%, au moins 94%, au moins 95%, au moins 96%, au moins 97%, au moins 98% ou au moins 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1. De préférence, les variants

fonctionnels comprennent au moins 1, 2 ou 3 des motifs conservés mentionnés ci-dessus, de préférence les 4 motifs.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué
5 des séquences SEQ ID NO : 2, 3 ou 4 et des variants fonctionnels de celles-ci, sous réserve que ces variants fonctionnels comprennent (i) au moins 110 nucléotides consécutifs de la SEQ ID NO : 1, et/ou (ii) comprennent une séquence présentant au moins 70% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence au moins 70% d'identité de séquence sur toute la longueur de la séquence SEQ ID NO : 1. De préférence, les variants fonctionnels comprennent
10 au moins 1, 2 ou 3 des motifs conservés mentionnés ci-dessus, de préférence les 4 motifs.

Selon un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique selon l'invention comprend, ou consiste en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué de la séquence
SEQ ID NO : 1 et des variants fonctionnels de celle-ci présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence au moins 80% d'identité de séquence sur toute la
15 longueur de la séquence SEQ ID NO : 1.

Dans un second aspect, la présente invention concerne également une cassette d'expression comprenant une séquence codante d'intérêt liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention.

Tel qu'utilisé ici, le terme "cassette d'expression" se réfère à une construction d'acide
20 nucléique comprenant une séquence codante et une ou plusieurs séquences de contrôle requises pour l'expression de ladite séquence codante. En particulier, l'une de ces séquences de contrôle est un acide nucléique selon l'invention ayant une activité de promoteur. Généralement, la cassette d'expression comprend une séquence codante et des séquences régulatrices précédant
25 (séquences non codantes en 5') et suivant (séquences non codantes en 3') la séquence codante qui est requise pour l'expression du produit génique d'intérêt. Ainsi, une cassette d'expression comprend typiquement une séquence promotrice, une région 5' non traduite, une séquence codante et une région 3' non traduite qui contient habituellement un site de polyadénylation et / ou un terminateur de transcription. La cassette d'expression peut également comprendre des
30 éléments régulateurs supplémentaires tels que, par exemple, des séquences amplificatrices (« enhancers »), une séquence « polylinker » facilitant l'insertion d'un fragment d'ADN dans un

vecteur et / ou des signaux d'épissage. La cassette d'expression est habituellement incluse dans un vecteur, pour faciliter le clonage et la transformation.

De préférence, la cassette d'expression est une cassette d'expression recombinante, c'est-à-dire que l'acide nucléique selon l'invention est lié de manière fonctionnelle à une séquence codante hétérologue. Tel qu'utilisé ici, le terme "hétérologue" se réfère à une séquence codante qui est différente de celle auquel le promoteur est lié de manière fonctionnelle dans un génome naturel. En particulier, dans certains modes préférés de réalisation, la séquence codante d'intérêt n'est pas le gène *ZmSpo11-1* (GeneID : 100279325) du maïs (*Zea mays*).

La séquence codante d'intérêt liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention peut coder pour un polypeptide d'intérêt ou un acide nucléique d'intérêt.

Selon un mode de réalisation, la séquence codante d'intérêt liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention code pour un polypeptide d'intérêt. Le polypeptide d'intérêt peut être n'importe quel polypeptide dont l'expression est souhaitée durant la méiose. En particulier, le polypeptide d'intérêt peut être une protéine rapportrice, une protéine susceptible de moduler, de préférence d'augmenter, la fréquence des recombinaisons méiotiques, une protéine qui modifie la structure de la chromatine telle que par exemple des histone (dé)acétylases ou histone (dé)méthylases, et/ou une protéine qui modifie la méthylation de l'ADN.

La protéine rapportrice peut être aisément choisie par l'homme du métier selon la nature de la cellule hôte et la technique de détection. La protéine rapportrice peut être choisie, par exemple, parmi les protéines fluorescentes, les phosphatases alcalines, les bêta-glucuronidases, les bêta-galactosidases, les bêta-lactamases ou la peroxydase de raifort.

La protéine susceptible de moduler la fréquence des recombinaisons méiotiques peut également être aisément choisie par l'homme du métier. La modulation peut être une augmentation générale de la fréquence des recombinaisons ou une augmentation ciblée, c'est-à-dire une augmentation concernant une région génomique donnée. A titre d'exemple, cette protéine peut être une protéine obtenue en fusionnant une protéine Spo11 avec un domaine de liaison à l'ADN tel que l'activateur de transcription Gal4 (Pecina et al, 2002 Cell, 111, 173-184), le domaine ZF (Zinc Finger) ou le domaine TALE (Transcription Activator-Like Effector), ou encore une protéine obtenue en fusionnant une protéine Spo11 avec un domaine Cas9, de préférence un domaine « dead Cas9 » ou dCas9 dépourvu d'activité nucléase, et

utilisée en combinaison avec un ARN guide capable de cibler une séquence spécifique (WO 2016/120480).

Selon un autre mode de réalisation, la séquence codante d'intérêt liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention code pour un acide nucléique d'intérêt.

5 L'acide nucléique d'intérêt peut être n'importe quel acide nucléique dont l'expression est souhaitée durant la méiose. En particulier, l'acide nucléique d'intérêt peut être un siRNA, un shRNA, un ARNi, un miARN, un ARN antisens, un ribozyme, un DNase ou un ARN guide capable de cibler l'action d'une endonucléase de type CRISPR, de préférence Cas9 ou dCas9, au niveau d'une séquence spécifique.

10 La séquence codante d'intérêt liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention peut coder pour une ou plusieurs molécules d'intérêt, i.e. pour un ou plusieurs polypeptides d'intérêt et/ou un ou plusieurs acides nucléiques d'intérêt.

La cassette d'expression selon l'invention peut comprendre une ou plusieurs séquences codantes d'intérêt liées de manière opérationnelle à l'acide nucléique selon l'invention.

15 Tous les modes de réalisation concernant les autres aspects de l'invention sont également envisagés dans cet aspect.

Dans un troisième aspect, la présente invention concerne également un vecteur comprenant un acide nucléique selon l'invention ou une cassette d'expression selon l'invention.

20 Tel qu'utilisé ici, le terme "vecteur" se réfère à une molécule d'acide nucléique utilisée comme véhicule pour transférer un matériel génétique, et en particulier pour délivrer un acide nucléique dans une cellule hôte, soit *in vitro*, soit *in vivo*. Le vecteur peut être un ADN ou un ARN, circulaire ou non, simple- ou double-brin. Les vecteurs comprennent, mais sans y être limités, les plasmides, les phasmides, les cosmides, les éléments transposables, les virus et les
25 chromosomes artificiels (par exemple les YAC). Les vecteurs peuvent être construits par des techniques classiques de biologie moléculaire bien connues de l'homme du métier.

Avantageusement, le vecteur selon l'invention est un vecteur de plante, c'est-à-dire un vecteur capable de transformer une cellule végétale. Des exemples de vecteurs de plantes sont décrits dans la littérature, parmi lesquels on peut citer notamment les plasmides T-DNA de *A. tumefaciens* pBIN19 (Bevan et al., 1984, Nucleic Acids Research, vol. 12 : 8711-8721), le
30 vecteur pPZP100 (Hajdukiewicz et al. 1994, Plant Mol. Biol. 25: 989-994), les vecteurs de la

série pCAMBIA (R. Jefferson, 1987, Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405) ou encore les vecteurs décrits dans les articles de Karimi et al. (Plant Physiology; 2007, 145(4): 1183-91, et Plant Physiology; 2007, 145(4): 1144-54) qui sont plus spécifiques des monocots.

Les vecteurs selon l'invention peuvent comprendre, en outre, une ou plusieurs origines de
5 réplication bactériennes et/ou eucaryotes. Il peut notamment comprendre une origine de
réplication bactérienne permettant sa sélection lors des étapes de clonage, par exemple une
origine de réplication fonctionnelle chez *E. coli*, et une autre origine de réplication utilisée lors
du transfert dans la cellule végétale, par exemple une origine de réplication fonctionnelle chez
Agrobacterium tumefaciens. Le vecteur peut comporter en outre des éléments permettant sa
10 sélection dans une cellule hôte bactérienne ou eucaryote comme, par exemple, un gène de
résistance à un antibiotique, un gène permettant de compléter une auxotrophie ou un gène
conférant une tolérance à un herbicide. De tels éléments sont bien connus de l'homme du métier
et largement décrits dans la littérature.

Le vecteur d'expression peut également comprendre une ou plusieurs séquences permettant
15 l'insertion ciblée du vecteur, de la cassette d'expression ou de l'acide nucléique selon
l'invention dans le génome d'une cellule hôte.

Tous les modes de réalisation concernant les autres aspects de l'invention sont également
envisagés dans cet aspect.

20 Dans un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'un acide nucléique,
d'une cassette d'expression ou d'un vecteur d'expression selon l'invention pour transformer ou
transfecter une cellule hôte. Elle concerne également une cellule hôte transformée ou
transfectée par au moins un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur
d'expression selon l'invention. De préférence, la cellule hôte transformée ou transfectée
25 contient ledit acide nucléique, ladite cassette ou ledit vecteur selon l'invention sous forme non
intégrée ou intégrée dans le génome.

Tel qu'utilisé ici, le terme « cellule hôte » se réfère à une cellule procaryote ou une cellule
eucaryote non humaine. De préférence, la cellule hôte est une cellule eucaryote non humaine
choisie parmi une cellule de levure, de plante, de champignon ou une cellule animale. De
30 manière plus particulièrement préférée, la cellule hôte est une cellule de plante. Selon certains
modes de réalisation, ce terme englobe également les protoplastes végétaux.

Dans un mode de réalisation préféré, la cellule hôte est une cellule de plante. En particulier, la cellule hôte peut être une cellule de plante sélectionnée dans le groupe constitué des céréales telles que le maïs, le riz, le blé, l'orge, le sorgho, le millet, l'avoine et le seigle, du tournesol, du colza, de plantes modèles telles qu'*Arabidopsis thaliana* ou *Brachypodium distachyon*, des
5 légumineuses tels que la tomate, le poivron, le piment, le chou, le chou-fleur ou la laitue, des légumineuses telles que les fèves, les haricots, les lentilles, les pois cassés, les pois chiches, le soja, la féverole ou la luzerne, du coton, des plantes sucrières telles que la canne à sucre ou la betterave, et les plantes fruitières telles que les plantes produisant les agrumes (par exemple, les citrons, les oranges ou les pamplemousses), les baies (par exemple, les fraises, les groseilles,
10 les framboises ou les raisins), les fruits à pépins (par exemple, les pommes ou les poires), les fruits à noyau (par exemple, les abricots, les cerises ou les pêches) ou les fruits à coque (par exemple, les noisettes ou les noix). De manière plus particulièrement préférée, la cellule hôte est une cellule de maïs.

La cellule hôte peut être transformée/transfectée de manière transitoire ou stable. L'acide
15 nucléique, la cassette ou le vecteur selon l'invention peut être contenu dans la cellule sous forme non intégrée ou intégrée dans le génome.

Les techniques de transfection ou de transformation des cellules hôtes sont bien connues de l'homme du métier. En particulier, les techniques de transgénèse végétale sont bien connues et comprennent par exemple l'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*,
20 l'électroporation, le transfert direct, des techniques biolistiques, etc.

Une technique communément utilisée repose sur l'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, qui consiste essentiellement à introduire la construction d'intérêt (acide nucléique, cassette, vecteur, etc.) dans la bactérie *A. tumefaciens*, puis à mettre en contact cette bactérie transformée avec des explants appropriés de la plante choisie. L'introduction de la cassette
25 d'expression dans la bactérie est typiquement réalisée en utilisant comme vecteur un plasmide avec un T-DNA désarmé, qui peut être transféré dans la bactérie, par exemple, par choc thermique. L'incubation de la bactérie transformée avec les explants appropriés permet d'obtenir le transfert du T-DNA contenant la cassette d'expression dans le génome des cellules des disques. Ceux-ci peuvent éventuellement être cultivés dans des conditions appropriées pour
30 reconstituer une plante transgénique dont les cellules comprennent la construction de l'invention. Pour plus de détails ou des variantes de mise en œuvre de la technique de transformation par *A. tumefaciens*, on peut se référer par exemple à Horsch et al., (1985)

Science 227:1229-1231, Hooykaas and Schilperoort (1992) Plant Mol. Biol. 19:15-38 ou encore Ishida et al. (2007) Nat Protoc, 2(7):1614-21.

Une autre technique de transformation végétale est basée sur la projection de microparticules (typiquement des microbilles) auxquelles sont attachées les constructions
5 génétiques, directement sur des cellules végétales, suivie de la culture de ces cellules pour reconstituer une plante transgénique. Les particules utilisées sont typiquement des particules d'or, qui sont projetées typiquement au moyen d'un canon à particules (voir notamment Russell et al., In Vitro Cell. Dev. Biol., 1992, 28P, p. 97-105 et Klein et al. Plant Physiol. 1989 Sep;91(1):440-4).

10 La technique de microinjection consiste essentiellement à injecter des constructions génétiques dans des embryons ou protoplastes végétaux, puis à cultiver ces tissus de manière à régénérer des plantes complètes. D'autres techniques de transgénèse végétale sont bien connues, ou d'autres protocoles mettant en œuvre les techniques ci-dessus sont décrits dans l'art antérieur (Siemens, J and Schieder, 1996, Plant Tiss. Cult. Biotechnol. 2:66-75) et peuvent
15 être appliqués à la présente invention.

Tous les modes de réalisation concernant les autres aspects de l'invention sont également envisagés dans cet aspect.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé pour exprimer une
20 séquence codante d'intérêt dans une cellule hôte lors de la méiose, comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un acide nucléique, d'une cassette d'expression ou d'un vecteur d'expression selon l'invention, ladite séquence codante étant liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention. Elle concerne également l'utilisation d'un acide nucléique, d'une cassette d'expression ou d'un vecteur d'expression selon l'invention pour exprimer une
25 séquence codante d'intérêt, de préférence hétérologue, dans une cellule hôte lors de la méiose.

La séquence codante d'intérêt peut être hétérologue vis-à-vis du promoteur, c'est-à-dire différente de celle auquel le promoteur est lié de manière fonctionnelle dans un génome naturel, et/ou hétérologue vis-à-vis de la cellule hôte, c'est-à-dire une séquence qui n'est pas naturellement présente dans la cellule hôte. De préférence, la séquence codante d'intérêt est
30 hétérologue vis-à-vis du promoteur, et optionnellement hétérologue vis-à-vis de la cellule hôte.

La séquence codante d'intérêt est soit comprise dans la cassette d'expression ou le vecteur d'expression selon l'invention et y est liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention, soit déjà présente dans le génome de la cellule hôte. Dans ce dernier cas, l'acide nucléique selon l'invention est inséré dans le génome de la cellule de sorte à être lié de manière opérationnelle à ladite séquence et ainsi permettre son expression lors de la méiose.

Tous les modes de réalisation concernant les autres aspects de l'invention sont également envisagés dans cet aspect.

Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne un organisme multicellulaire végétal, comprenant une cassette d'expression ou un vecteur selon l'invention. Elle concerne également un procédé de production d'un organisme multicellulaire végétal exprimant une séquence codante d'intérêt lors de la méiose, comprenant l'introduction dans une cellule de plante d'un acide nucléique, d'une cassette d'expression ou d'un vecteur selon l'invention, de préférence d'une cassette d'expression ou d'un vecteur selon l'invention, ladite séquence codante étant liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'invention, et la reconstitution dudit organisme à partir de ladite cellule. De préférence, la séquence codante d'intérêt est hétérologue vis-à-vis du promoteur, et optionnellement hétérologue vis-à-vis de la cellule de plante.

Optionnellement, le procédé peut également comprendre une étape de sélection des organismes contenant l'acide nucléique, la cassette ou le vecteur selon l'invention. Cette sélection peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, notamment par des méthodes d'amplification de l'ADN utilisant des amorces ciblant une séquence spécifique de l'acide nucléique, de la cassette ou du vecteur.

Le procédé peut également comprendre en outre une étape de croisement des organismes obtenus entre eux ou avec d'autres plantes de la même espèce ou d'espèces différentes. A l'issue de ce croisement, il est possible de sélectionner des organismes contenant l'acide nucléique, la cassette ou le vecteur selon l'invention.

L'introduction de l'acide nucléique, de la cassette ou du vecteur selon l'invention dans la cellule peut être effectué par tout moyen connu de l'homme du métier, par exemple par l'une des méthodes décrites ci-dessus.

Tel qu'utilisé ici, le terme « organisme multicellulaire végétal » se réfère à une plante entière, des parties de plante telles que des fleurs, des graines, des feuilles, des tiges, des fruits, du pollen, des tubercules, du bois, ou des structures multicellulaires telles que des cals, des organes de plante, en particulier des panicules méiotiques et épi méiotiques, ou des embryons immatures (e.g. explants utilisés pour la transgénèse). Dans certains modes de réalisation préférés, l'organisme multicellulaire végétal est une plante entière ou une graine.

La reconstitution d'un organisme multicellulaire végétal tel que défini ci-dessus à partir d'une cellule de plante transfectée ou transformée fait appel à des techniques de routine bien connues de l'homme du métier.

Tous les modes de réalisation concernant les autres aspects de l'invention sont également envisagés dans cet aspect.

Les procédés selon l'invention peuvent être des procédés *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. De préférence, les procédés selon l'invention sont des procédés *in vitro*.

Les exemples qui suivent sont présentés dans un but illustratif et non limitatif.

EXEMPLES

Les inventeurs ont identifié un promoteur transcriptionnel fonctionnel durant la méiose et démontré que l'utilisation de ce promoteur permettait d'exprimer une protéine de fusion comprenant un domaine ZmSpo11-1 et un domaine de liaison à l'ADN pendant la méiose.

Le gène ZmSpo11-1 porte l'identifiant GRMZM2G129913_T04 (gene model T04 du gène GRMZM2G129913) dans la version 3 de la séquence de référence du génotype B73 du maïs. Dans le génome de ce génotype, le gène ZmPHYC2 (GRMZM2G129889_T01) est inhabituellement proche de ZmSpo11-1, avec seulement 162 pb entre la fin du 3'UTR prédit de ZmPHYC2 et le début du 5'UTR prédit de ZmSpo11-1. Afin de faciliter le clonage de la région promotrice, un site de restriction NcoI interne a été éliminé par mutation ponctuelle, maintenant ainsi un site unique NcoI à l'extrémité 3' du fragment, qui chevauche le codon START de ZmSpo11-1. A l'extrémité 5' un site de restriction I-SceI a été ajouté. La séquence utilisée dans les clonages décrits ci-après et comprenant le promoteur ZmSpo11-1 est présentée en Figure 1.

Une analyse phylogénétique impliquant plusieurs espèces de céréales, à savoir *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Setaria italica*, *Oryza sativa japonica*, *Brachypodium distachyon*, *Triticum*

aestivum, *Saccharum officinarum* et *Hordeum vulgare*, a permis de mettre en évidence une forte divergence des séquences au niveau de la région intergénique et la présence dans cette région de quatre motifs conservés, à savoir TTGX[A/T]GG, CGAXCGA, AAGCCXA et AAAAXXAAAA (SEQ ID NO : 7). Ces motifs sont encadrés dans la figure 1.

5

Constructions plasmidiques

Une cassette comprenant le gène chimère TAL-ZmSpo11-1 placé sous le contrôle du promoteur ZmSpo11-1 contenu dans la SEQ ID NO : 5 (Figure 1) a été insérée dans un plasmide afin d'obtenir le plasmide L1605. Le domaine TAL est un domaine de liaison à l'ADN qui a été
10 dessiné pour reconnaître la séquence 5'-TGGTTCTGTGACTACAAGTACAATG-3' (SEQ ID NO : 6). Sa séquence codante a été placée en phase en amont de l'ADNc de ZmSpo11-1, un espaceur de 36 pb sans codon STOP faisant la jonction. Une séquence de 18 pb codant pour un tag 6-His a été ajoutée en phase à la fin du gène ZmSpo11-1 juste avant le codon STOP.

Un plasmide L1604 a été obtenu de manière similaire et contenait une cassette comprenant
15 le gène chimère TAL-ZmSpo11-1 placé sous le contrôle du promoteur constitutif fort du gène de l'ubiquitine du maïs, ZmUBI (numéro d'entrée GenBank : S94464). Le plasmide L1604 est identique au plasmide L1605 à l'exception du promoteur ZmUBI qui remplace le promoteur ZmSpo11-1.

Mutant Zmspo11-1

20 Les inventeurs ont utilisé un plant de maïs comprenant une mutation consistant en une délétion d'une partie du gène ZmSpo11-1 (fourni par Arnaud Ronceret). Ce mutant présente de nombreux défauts de la recombinaison, de l'appariement des chromosomes et des synapses lors de la méiose et montre une stérilité complète mâle et presque complète femelle.

La floraison mâle et la production de pollen de plantes hétérozygotes et homozygotes pour
25 cette délétion ont été caractérisées au niveau de la panicule, de l'anthère et du pollen.

Il a ainsi été montré que les panicules des plantes mutantes portent beaucoup moins d'anthères, et que les anthères des plantes mutantes sont atrophiées et contiennent beaucoup de grains de pollen avortés et quasiment pas de grains de pollen turgescents (Figures 2 à 4).

Plantes transgéniques contenant le promoteur ZmSpo11-1

Le génotype A188 du maïs a été transformé avec les plasmides L1604 et L1605 selon le protocole standard d'Ishida et al (Nat Protoc. 2007;2(7):1614-21).

5 Pour chaque construction, un seul évènement de transformation a été obtenu, chaque fois représenté par deux plantes issues d'un même cal. Les plantes T0 comprenant soit le plasmide L1604 (promoteur ZmUBI), soit le plasmide L1605 (promoteur ZmSpo11-1) ont été croisées avec le mutant Zmspo11-1.

Complémentation du mutant Zmspo11-1

10 Pour tester la complémentation du mutant Zmspo11-1 par les transgènes L1604 (promoteur ZmUBI - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1) ou L1605 (promoteur ZmSpo11-1 - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1), les plantes T0 ont été croisées avec des plantes hétérozygotes portant la mutation Zmspo11-1.

15 Les plantules T1 issues de ces croisements ont été génotypées pour identifier les plantules portant à la fois le transgène et la mutation. Les plantes hémizygotes pour le transgène et hémizygotes pour la mutation Zmspo11-1 ont été autofécondées.

20 Les plantules T2 issues des autofécondations ont été génotypées. Des plantules homozygotes pour la mutation Zmspo11-1 et (i) portant le transgène L1604 (promoteur ZmUBI - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1), (ii) portant le transgène L1605 (promoteur ZmSpo11-1 - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1), ou (iii) ne portant pas de transgène, ont été retenues pour analyse phénotypique.

Les résultats de cette analyse sont présentés sur les Figures 5 à 7 et montrent que

- les panicules des plantes homozygotes mutantes complémentées par le transgène L1605 (promoteur ZmSpo11-1 - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1) portent un nombre normal d'anthères, alors que la complémentation par le transgène L1604 (promoteur ZmUBI - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1) n'augmente que faiblement le nombre d'anthères du mutant (WT/Homo),

- les anthères des plantes homozygotes mutantes sans complémentation (WT/Homo) ou complémentées par L1604 (promoteur ZmUBI - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1) sont

atrophées, alors que les anthères complémentées par L1605 (promoteur ZmSpo11-1 - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1) sont normales (turgescents),

- les anthères des plantes homozygotes mutantes sans complémentation (WT/Homo) ou complémentées par L1604 (promoteur ZmUBI - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1) contiennent beaucoup de grains de pollen avortés et quasiment pas de grains de pollen turgescents, alors que les anthères complémentées par L1605 (promoteur ZmSpo11-1 - protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1) contiennent des quantités normales de pollen turgescents.

Le gène Spo11-1 est reconnu chez de nombreuses espèces d'eucaryotes comme indispensable pour la recombinaison méiotique (Grelon et al. EMBO J. 2001 Feb 1;20(3):589-600; Stacey et al. Plant J. 2006 Oct;48(2):206-16) et la protéine SPO11-1 comme nécessaire pour initier la recombinaison par une coupure double brin de l'ADN (Shingu et al. FEBS J. 2010 May;277(10):2360-74; Hartung et al. Plant Cell. 2007 Oct;19(10):3090-9) au sein d'un complexe protéique formé avec SPO11-2 et TOPOVIB (Vrielynck et al. Science. 2016 Feb 26;351(6276):939-43). Des mutants spo11-1 sont caractérisés par des aberrations de la méiose menant à la stérilité. Le fait qu'une protéine de fusion TAL-ZmSpo11-1 sous contrôle d'un promoteur selon l'invention présent dans le plasmide L1605 complémente la mutation Zmspo11-1, démontre que ce promoteur est un promoteur fonctionnel durant la méiose. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent également que ce promoteur permet d'obtenir un niveau d'expression durant la méiose supérieur à celui obtenu avec un promoteur constitutif fort tel que le promoteur de l'ubiquitine.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique isolé ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel lors de la méiose et comprenant, ou consistant en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 1 et des variants fonctionnels de celle-ci, lesdits
5 variants fonctionnels comprenant, ou consistant en,

- une séquence présentant au moins 70 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1 ;
- un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 d'au moins 50 nucléotides consécutifs, ou
- une séquence capable de s'hybrider en conditions de faible, moyenne ou forte stringence avec la séquence SEQ ID NO : 1 ou son brin complémentaire.

10

2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend, ou consiste en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 1 et des variants fonctionnels de celle-ci, lesdits variants fonctionnels comprenant, ou consistant en,

- 15 - une séquence présentant au moins 70 % d'identité de séquence sur tout la longueur de la séquence SEQ ID NO : 1 ; ou
- un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 d'au moins 110 nucléotides consécutifs.

3. Acide nucléique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend, ou
20 consiste en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué de la séquence SEQ ID NO : 1 et des variants fonctionnels de celle-ci présentant au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence au moins 80% d'identité de séquence sur toute la longueur de la séquence SEQ ID NO : 1.

25 4. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend, ou consiste en, une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué des séquences SEQ ID NO : 1, 2, 3 ou 4.

5. Cassette d'expression recombinante comprenant une séquence codante liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4.

6. Cassette d'expression recombinante selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4 est lié de manière fonctionnelle à une séquence codante hétérologue.

7. Cassette d'expression selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que la séquence codante code un polypeptide d'intérêt, de préférence une protéine rapportrice ou une protéine susceptible de moduler, de préférence d'augmenter, la fréquence des recombinaisons méiotiques, une protéine qui modifie la structure de la chromatine telle que par exemple des histone (dé)acétylases ou histone (dé)méthylases ou une protéine qui modifie la méthylation de l'ADN.

8. Cassette d'expression selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que la séquence codante code un acide nucléique d'intérêt, de préférence un siRNA, un shRNA, un ARNi, un miARN, un ARN antisens, un ribozyme, un DNAzyme ou un ARN guide capable de cibler l'action d'une endonucléase de type CRISPR, de préférence Cas9 ou dCas9, au niveau d'une séquence spécifique.

9. Vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4 ou une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.

10. Cellule hôte non humaine transfectée ou transformée avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, ou un vecteur d'expression selon la revendication 9.

11. Cellule hôte non humaine selon la revendication 10, contenant l'acide nucléique, la cassette d'expression ou le vecteur d'expression sous forme non intégrée ou intégrée dans le génome.

12. Procédé, de préférence *in vitro*, pour exprimer une séquence codante d'intérêt dans une cellule hôte non humaine lors de la méiose, comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, d'une cassette d'expression selon l'une
5 quelconque des revendications 5 à 8, ou d'un vecteur d'expression selon la revendication 9, ladite séquence codante étant liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4.

13. Procédé de production d'un organisme multicellulaire végétal exprimant une séquence
10 codante d'intérêt lors de la méiose, comprenant l'introduction dans une cellule de plante d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, d'une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, ou d'un vecteur d'expression selon la revendication 9, ladite séquence codante étant liée de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, et la reconstitution dudit organisme à partir de ladite cellule.

15

14. Cellule selon la revendication 10 ou 11 ou procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la cellule hôte est une cellule de plante.

15. Organisme multicellulaire végétal comprenant une cassette d'expression selon l'une
20 quelconque des revendications 5 à 8, ou un vecteur d'expression selon la revendication 9.

16. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, d'une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, ou d'un vecteur d'expression selon la revendication 9, pour exprimer une séquence codante d'intérêt dans une cellule hôte
25 non humaine, de préférence une cellule de plante, lors de la méiose.

1/3

tagggataaacagggtaaatctcatcttgggtctttcgatagctgttcttgaactgaaaggatga
 Site I-SceI
 tttgacaaataagtgaactactaaattgtacatctagtttctattaactcagcacaactcca
 acatttgtctcttgtaaataactttcgcagtgctcctaattgtgttagttataatccacgaa
 aaggattgtatgttgacaaggaacagataagacctaatagttagcaaattcacttctgaacat
 ctttaactcctaaaaaaaaattcgaccttctcacgtaggtcaagaaaaccctgaaccctgtca
 catccatacaaagtgatattatagcccatgtgagaacgaccgggaccggtccttagacctct
 gcttactcagcttaaaattcgctcccacgaggagt cgaatctatcctgggtcactgcaccagc
 caagatgcagtgatacatgtcacttcaggcatgtagttacactttgcagtttgaaacaatgg
 aaatgatccctgtgtaaaattggcgctatccctgccattctatatacactgcaatgtggcga
 atgcgagtatattgggtgggtgatgggagctgtgtaactgattgactcaatgtgcag**GATTGTCCA**
TCCAGCTCCAGGCGTTCCAGAGGCCCTGATACAGGAGATGTTCCAGCACAAACCAGGGGTGT
CCAGGGAGGGTCTCGGCCTGTACATAAGCCAGAAGCTGGTGAAAACGATGAGCGGCACGTTG
 Partie codante du dernier exon de ZmPHYC2
CAGTACCTACGAGAAGCCGACACCTCTTCGTTTCATCATCCTGATAGAGTTCCCGGTGCCCCA
GCTCAGCAGCAAGCGGTCCAAGCCTTCGCCAAGTAAATTCTGAcactgatgctcctggaact
 gcagtgacgggttcggccgtgtcaaattctcgggtgtagggtgtacctctggccaagtgactg
 atattctgaaaaacatacggacttctagtataggagaagaggaatcctaatactagtaatta
 Partie 3'UTR du dernier exon de ZmPHYC2
 tatcttagtagatatgtgcttagtctcttgtaattttttgtcttgagaggactatatatac
 tgataaagtgataattttattcagagaataaagaatgggctccatgctttgtctat**gtattct**
cttcttgagggcaatttacgcctcttgagaagggtggcttcggtgttgggctcttgaaggcc
cacgcagtccaacggagcccact**aagccta**attctgtttcttcg**cgatcgat**tagctgatta
 gctCcatggcggtcttcgaa**aaaatcaaaa**t**aaaaaactagcgcc**ATGG (SEQ ID NO : 5)
 Mutation
 ponctuelle
 Partie 5'UTR du premier
 exon de ZmSpo11-1

Figure 1

2/3

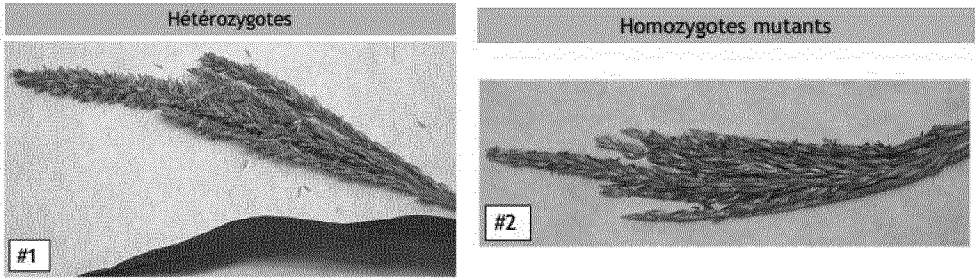


Figure 2

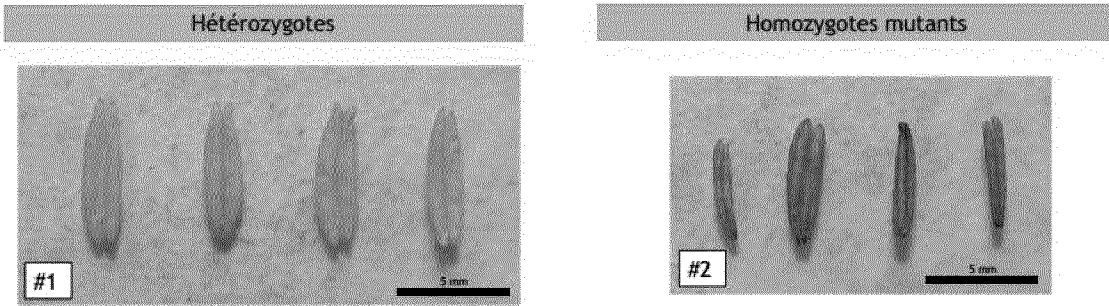


Figure 3

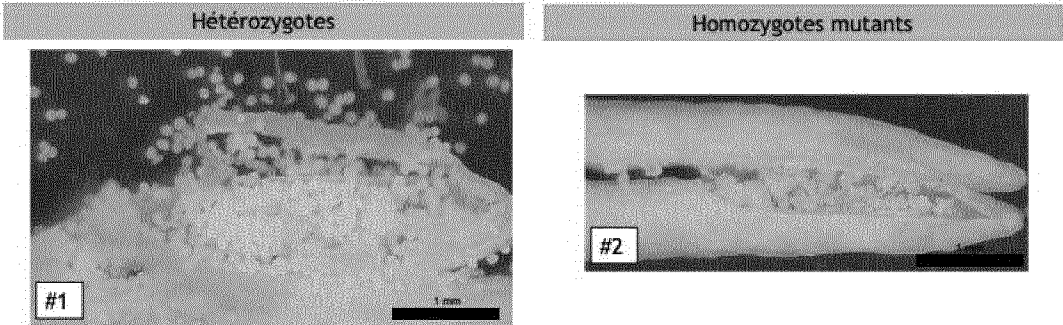


Figure 4

3/3

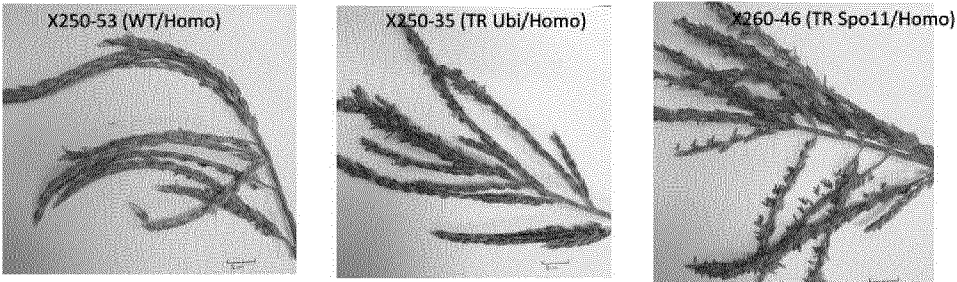


Figure 5

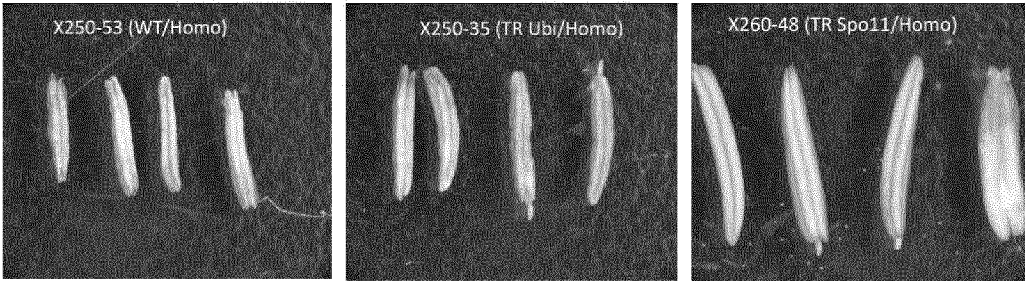


Figure 6



Figure 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/063377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C12N 15/82**(2006.01)i

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)

C12N

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017161264 A1 (PIONEER HI-BRED INT INC [US]; DU PONT [US]) 21 September 2017 (2017-09-21) abstract sequences 13, 19 table 1 page 61, line 29 - page 62, line 7 page 62, line 25 - line 27 page 64, line 26 - page 65, line 3	1-16
A	WO 2015001521 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; INST NAT) 08 January 2015 (2015-01-08) page 13, line 7 - line 10 page 16, line 7 - line 10	1-16
A	EP 3150626 A1 (UNIV OF VIENNA [AT]) 05 April 2017 (2017-04-05) paragraph [0053] paragraph [0055]	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family 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 application or patent 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

05 June 2019

Date of mailing of the international search report

25 June 2019

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Mundel, Christophe

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/063377

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/063377

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)			Patent family member(s)				Publication date (day/month/year)		
WO	2017161264	A1		21	September	2017	AU	2017234920	A1		20	September	2018
							CA	3016487	A1		21	September	2017
							US	2019098858	A1		04	April	2019
							WO	2017161264	A1		21	September	2017
WO	2015001521	A1		08	January	2015	FR	3008106	A1		09	January	2015
							WO	2015001521	A1		08	January	2015
EP	3150626	A1		05	April	2017	NONE						

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N15/82
ADD.

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)
C12N

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 cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2017/161264 A1 (PIONEER HI-BRED INT INC [US]; DU PONT [US]) 21 septembre 2017 (2017-09-21) abrégé séquences 13, 19 tableau 1 page 61, ligne 29 - page 62, ligne 7 page 62, ligne 25 - ligne 27 page 64, ligne 26 - page 65, ligne 3 -----	1-16
A	WO 2015/001521 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; INST NAT) 8 janvier 2015 (2015-01-08) page 13, ligne 7 - ligne 10 page 16, ligne 7 - ligne 10 ----- -/-	1-16



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

5 juin 2019

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/06/2019

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,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mundel, Christophe

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 3 150 626 A1 (UNIV OF VIENNA [AT]) 5 avril 2017 (2017-04-05) alinéa [0053] alinéa [0055] -----	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2019/063377

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2017161264 A1	21-09-2017	AU 2017234920 A1	20-09-2018
		CA 3016487 A1	21-09-2017
		US 2019098858 A1	04-04-2019
		WO 2017161264 A1	21-09-2017
WO 2015001521 A1	08-01-2015	FR 3008106 A1	09-01-2015
		WO 2015001521 A1	08-01-2015
EP 3150626 A1	05-04-2017	AUCUN	