

(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
3 juillet 2003 (03.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/054229 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR02/04346
- (22) Date de dépôt international : 13 décembre 2002 (13.12.2002)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 01/16198 14 décembre 2001 (14.12.2001) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : GENO-PLANTE-VALOR [FR/FR]; 93, rue Henri Rochefort, F-91025 Evry Cedex (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GUILLET, Carine [FR/FR]; Appt. 92, 22, avenue du 8 mai 1945, F-86000 Poitiers (FR). BARRIERE, Yves [FR/FR]; 15, rue du Grand Queneux, F-86600 Cloue (FR). MURIGNEUX, Alain [FR/FR]; 7, impasse les Boutons d'Or, F-63670 La Roche Blanche (FR). MARTINANT, Jean-Pierre [FR/FR]; 6, rue de la Croix de l'Aire Basse, F-63910 Vertaizon (FR).
- (74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.; Cabinet Ores, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.



WO 03/054229 A2

(54) Title: MAIZE CCOAOMT2 GENE POLYMORPHISM, AND USES THEREOF TO ENHANCE PLANT DIGESTIBILITY

(54) Titre : POLYMORPHISMES DU GENE CCOAOMT2 DE MAÏS, ET LEURS UTILISATIONS POUR AMÉLIORER LA DIGESTIBILITÉ DES PLANTES.

(57) Abstract: The invention concerns maize CCoAOMT2 gene polymorphism, and uses of said polymorphism to develop and enhance forage crop plant digestibility.

(57) Abrégé : L'invention est relative à des polymorphismes du gène CCoAOMT-2 de maïs, et à l'utilisation de ces polymorphismes pour l'évolution et l'amélioration de la digestibilité des plantes fourragères.

POLYMORPHISMES DU GENE CCOAOMT2 DE MAÏS, ET LEURS
UTILISATIONS POUR AMÉLIORER LA DIGESTIBILITE DES PLANTES.

La présente invention est relative à des marqueurs génétiques associés à une meilleure digestibilité des plantes fourragères, et notamment à des variants de la
5 seconde isoforme de la Caféoyl Coenzyme-A 3-O Méthyl Transférase (CCoAOMT-2) améliorant la digestibilité des plantes qui les contiennent.

Un facteur important limitant la digestibilité
10 des plantes fourragères est lié à la présence dans les parois des cellules végétales, de composés phénoliques, en particulier des lignines. Les lignines établissent différents types de liaisons avec les autres constituants pariétaux et forment un maillage serré qui gêne l'accessibilité des
15 glucides, principales sources d'énergie pour les herbivores, aux enzymes digestives.

Par conséquent, une des voies privilégiées d'amélioration des qualités des plantes fourragères concerne la sélection ou la production par génie génétique de plantes
20 moins lignifiées ou à lignines modifiées. Parmi les plantes qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études dans ce but figure le maïs d'ensilage, qui est l'une des plantes fourragères dont l'usage est le plus répandu, notamment dans le cadre de la production laitière.

Il a ainsi été observé qu'une diminution de la teneur en lignine conduit à une forte amélioration de la digestibilité du maïs d'ensilage, qui se traduit par une augmentation de la production de lait et de la prise de poids par rapport aux animaux nourris avec une variété moins
25 digeste (EMILE, Annales de zootechnies, 1995).

On connaît des mutants de maïs, dénommés « brown midrib », qui ont une teneur en lignine fortement réduite (jusqu'à 40%) ; et une lignine de structure différente par rapport aux maïs normaux,. Ces maïs, et notamment ceux des
35 lignées dénommées « bm3 » dont le gène codant pour l'acide caféique O-méthyltransférase est muté (VIGNOLS et al., The Plant Cell, 7, 407-416, 1995), possèdent une digestibilité fortement augmentée par rapport aux maïs de type sauvage, et

améliorent significativement la production laitière lorsqu'ils sont utilisés en tant que fourrage.

Cependant, les maïs bm3 présentent des inconvénients limitant leur exploitation, tels qu'un
5 rendement en champ moindre, une susceptibilité à la verse accrue, un manque de croissance et de vigueur en début de végétation et un retard à la floraison (BARRIERE et ARGILLIER, *Agronomie*, 13, 865-876, 1993).

L'obtention de plantes fourragères et notamment
10 de maïs, plus digestes suite à une modification de la voie de biosynthèse des lignines, possédant de bons rendements et peu sensibles aux divers stress (pathologique, hydrique, mécanique...) est un des axes privilégiés d'amélioration des végétaux.

15 Les lignines sont des polymères insolubles de 3 monomères d'alcools ou monolignols, dérivant de la voie des phénylpropanoïdes (NEISH, *Constitution and Biosynthesis of Lignin*, eds New York: Springer Verlag pp. 1-43, 1968) : l'alcool p-coumarylique (sous-unités H), l'alcool
20 coniférylique (sous-unités G) et l'alcool sinapylique (sous-unités S).

Les O-méthyl transférases (S-adénosyl-L-méthionine O-méthyltransférase, EC 2.1.1.6) jouent un rôle important dans la biosynthèse des monolignols. Bien que les
25 mécanismes impliqués *in vivo* dans cette voie de biosynthèse ne soient pas complètement élucidés, il est généralement considéré que la formation des sous-unités S et G fait intervenir des réactions successives d'hydroxylation et de O-méthylation suivies de la conversion de la chaîne latérale
30 carboxyl en une fonction alcool.

Les enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse incluent :

- différentes O-méthyltransférases : l'acide caféique O-méthyltransférase (COMT) ; la 5-hydroxyconiferyl
35 aldéhyde O-méthyl transférase (AldOMT) ; les Caféoyl Coenzyme A 3-O méthyltransférases (CCoAOMT)
- des hydroxycinnamate coenzyme A ligases (4CL)
- une férulate 5-hydroxylase (F5H) à cytochrome P450

- et plusieurs isoformes de Cinnamoyl Co A réductase (CCR) et de Cinnamyl alcool déhydrogenase (CAD).

Les propriétés de ces différentes enzymes ont fait l'objet de revues (BOUDET et al., *New Phytol.*, 129, 203-236, 1995 ; DIXON et al., *Phytochemistry*, in press, 2001 ; WHETTEN et al., *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 49, 585-609, 1998 ; LI et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 6537-6545, 2000).

Les Caféoyl Coenzyme-A O-Méthyltransférases jouent un rôle majeur dans la voie de biosynthèse des monolignols et plus particulièrement des sous-unités G et S ; elles semblent intervenir au cours de plusieurs étapes de la voie de biosynthèse des lignines (GUO et al., *Plant Cell*, 13, 73-88, 2001), et il a été observé que l'activité CCoAOMT est étroitement liée à la lignification des tissus dans un certain nombre d'espèces de dicotylédones (ZHONG et al., *Plant Cell*, 10, 2033-2045, 1998).

Chez le maïs, deux gènes différents codant pour deux isoformes de CCoAOMT ont été identifiés (CIVARDI et al., *Plant Physiol.*, 120, 1206, 1999) : le gène *CCoAOMT1* (AJ242980) et le gène *CCoAOMT2* (AJ242981).

La séquence du gène *CCoAOMT2* de type sauvage utilisée comme référence dans l'exposé de la présente invention, correspond au numéro d'accèsion AJ242981 sur la base GenBank, et à celle de CIVARDI et al., *Plant Physiol.*, 120, 1206, (1999). Le gène *CCoAOMT2* décrit par CIVARDI et al. a été obtenu à partir de la variété W64A ; sa séquence est représentée sur la Figure 1. Le fragment représenté comprend 1181 paires de bases et comporte 4 exons et 3 introns. La région 5' non codante de cette séquence est définie par 70 paires de bases. Les sites d'épissage des introns sont les suivants : pour l'intron 1 (79 pb) AGGT...AGTA, pour l'intron 2 (108 pb) TGGT...AGGA, et pour l'intron 3 (84 pb) CGGT...AGAT. La séquence de ce fragment est également représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, et la séquence de son produit de traduction est représentée sous le numéro SEQ ID NO: 2.

Les Inventeurs ont mis en évidence la colocalisation du gène *CCoAOMT2*, situé sur le chromosome 9, avec un QTL de digestibilité et un QTL de teneur en lignine dans les parois. Ils ont en outre identifié des mutations du gène *CCoAOMT2* créant des allèles polymorphes associés à la digestibilité du maïs.

Des polymorphismes associés à une digestibilité accrue du maïs ont été identifiés sur un allèle du gène *CCoAOMT2* isolé à partir d'une lignée de maïs dénommée F4. Cette lignée F4 possède un niveau de digestibilité très élevé, voisin de celui des lignées *bm3*, et, contrairement à celles-ci, produit des lignines qui se caractérisent par un rapport S/G nettement plus élevé que celui observé dans les lignines issues des variétés classiques de maïs d'ensilage.

L'allèle du gène *CCoAOMT2* isolé à partir de la lignée F4 est représenté dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 3.

Certains des polymorphismes identifiés sur cet allèle sont localisés au niveau des régions codantes du gène, et se traduisent par des mutations dans la Caféoyl Coenzyme A 3-O méthyltransférase-2 (*CCoAOMT-2*) résultant de l'expression de ce gène. D'autres sont localisés dans la région 5' non codante et dans les introns, en particulier l'intron 3.

La mise en évidence par les Inventeurs de l'implication de la *CCoAOMT-2* dans la digestibilité, ainsi que l'identification dans le gène *CCoAOMT2* de polymorphismes associés à la digestibilité, fournit un ensemble de moyens permettant d'obtenir des plantes fourragères, notamment des monocotylédones, et en particulier des maïs ayant une digestibilité améliorée.

La présente invention a pour objet un procédé d'évaluation de la digestibilité d'une plante fourragère, et notamment de maïs, caractérisé en ce qu'il comprend la détection de la présence ou de l'absence, dans du matériel biologique provenant de ladite plante, d'un allèle favorable à la digestibilité du gène *CCoAOMT2*.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit allèle de *CCoAOMT2* favorable à la

digestibilité code pour une Caféoyl Coenzyme A 3-O méthyltransférase-2 (CCoAOMT-2) mutante comportant au moins l'une des mutations suivantes :

5 a) la délétion de la séquence peptidique Glu-Ala-Thr, située entre les positions 6 et 10 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

b) l'insertion d'au moins une copie du motif peptidique Asn-Gly entre les positions 26 et 27 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

10 c) la substitution du résidu His en position 37 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Arg.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, 1 à 3 copies du motif peptidique Asn-Gly sont insérées entre les positions 26 et 27 de la séquence SEQ
15 ID NO: 2.

Ledit allèle favorable à la digestibilité peut éventuellement comprendre en outre :

d) la substitution du résidu Asn en position 188 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Ser.

20 Ledit allèle favorable à la digestibilité comprend de préférence au moins la mutation a) et/ou la mutation b).

Pour la mise en œuvre de la présente invention, la détection de la présence d'un allèle du gène *CCoAOMT2*
25 favorable à la digestibilité peut s'effectuer par analyse de la protéine CCoAOMT-2, pour mettre en évidence une ou plusieurs des mutations mentionnées ci-dessus, qui se traduisent par la modification de la séquence peptidique de cette protéine, et en particulier au moins l'une des
30 mutations a) ou b)

Elle peut également s'effectuer par analyse de polymorphismes du gène *CCoAOMT2* de la plante à tester, pour déterminer si un ou plusieurs de ces polymorphismes sont présents sous leur forme associée à l'allèle favorable à la
35 digestibilité recherché.

Les polymorphismes mentionnés ci-dessus peuvent être des polymorphismes situés dans les régions codantes du gène *CCoAOMT2*, et qui se traduisent par des modifications de

la séquence peptidique de la protéine CCoAOMT-2, et notamment par les mutations mentionnées ci-dessus. Il peut également s'agir de polymorphismes situés dans la région 5' non codante ou dans les introns du gène CCoAOMT2, ou de polymorphismes situés dans les régions codantes mais ne se traduisant pas par une modification de séquence de la protéine CCoAOMT-2. En effet, bien que ces polymorphismes n'apparaissent pas directement impliqués dans la mutation de CCoAOMT-2 favorable à la digestibilité, ils sont toutefois étroitement liés à celle-ci, et leur présence constitue donc un indicateur de digestibilité de la plante.

Dans le cadre de la mise en œuvre de la présente invention, on peut ainsi utiliser un ou plusieurs des polymorphismes suivants, associés à l'allèle du gène CCoAOMT2 de maïs favorable à la digestibilité représenté par la séquence SEQ ID NO: 3 :

- une insertion de 5 paires de bases dans la région 5' non codante entre les nucléotides 55 et 56 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1. Le fragment inséré a pour séquence ACTGC, et correspond aux positions 56 à 60 de la séquence SEQ ID NO: 3. La région 5' non codante de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 1 au nucléotide 75 de cette séquence, ce qui correspond aux nucléotides 1 à 70 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

L'exon 1 de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 76 au nucléotide 228 de cette séquence, ce qui correspond aux nucléotides 71 à 214 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

Dans l'exon 1, l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 comporte les polymorphismes suivants :

- une délétion de 9 paires de bases, correspondant au fragment de séquence situé entre les nucléotides 81 et 91 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1. Le fragment délété a pour séquence : GGCGACCGA, et code pour la séquence peptidique Glu-Ala-Thr absente dans la séquence SEQ ID NO: 4 ;

- une insertion de 18 paires de bases entre les nucléotides 129 et 130 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1. Le fragment inséré correspond aux positions 125 à 144 de la séquence SEQ ID NO: 3. Ce fragment a pour séquence CAACGGCAACGGCAACGG, et code pour la séquence peptidique Asn-Gly-Asn-Gly-Asn-Gly insérée dans la séquence SEQ ID NO: 4 ; des insertions de 3 paires de bases ou de 9 paires de bases, correspondant respectivement à 1 et 3 répétitions de la séquence CAACGG codant pour le motif peptidique Asn-Gly, ont également été détectées, à la même localisation, dans d'autres allèles favorables à la digestibilité ;
- une substitution C →G en position 178 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant à la position 192 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;
- une substitution A → G en position 180 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant à la position 194 de la séquence SEQ ID NO: 3. Cette substitution se traduit par la substitution du résidu His en position 37 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Arg.

L'intron 1 de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 229 au nucléotide 307 de cette séquence, ce qui correspond aux nucléotides 215 à 293 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

Dans l'intron 1, l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 comporte les polymorphismes suivants :

- une substitution G →A en position 227 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant à la position 241 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;
- une substitution A →G en position 237 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant à la position 251 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;
- une substitution CG→TT aux positions 259-260 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant aux positions 273-274 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;

L'exon 2 de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 308 au nucléotide 387 de cette

séquence, ce qui correspond aux nucléotides 294 à 373 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

Dans l'exon 2, l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 ne comporte aucun polymorphisme par rapport à la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

L'intron 2 de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 388 au nucléotide 495 de cette séquence, ce qui correspond aux nucléotides 374 à 481 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

Dans l'intron 2, l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 comporte le polymorphisme suivant :

- une substitution A→G en position 466 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant à la position 480 de la séquence SEQ ID NO: 3.

L'exon 3 de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 496 au nucléotide 640, ce qui correspond aux nucléotides 482 à 626 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

Dans l'exon 3, l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 ne comporte aucun polymorphisme par rapport à la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

L'intron 3 de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 641 au nucléotide 754, ce qui correspond aux nucléotides 627 à 710 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

Dans l'intron 3, l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 comporte les polymorphismes suivants :

- une insertion de 15 paires de bases entre les nucléotides 631 et 632 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1. Le fragment inséré correspond aux positions 646 à 660 de la séquence SEQ ID NO: 3. Ce fragment a pour séquence : TGCCCCTTTCTCTCT.
- une insertion de 18 paires de bases entre les nucléotides 703 et 704 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1. Le fragment inséré correspond aux positions 730 à 747 de la séquence SEQ ID NO: 3. Ce fragment a pour séquence : CTCTCTGTTGCTCGTCCC.

- une délétion de 3 paires de bases, correspondant au fragment de séquence situé entre les nucléotides 668 et 672 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1. Le fragment délété a pour séquence : TGA ;
- 5 - au moins une substitution C → T en position 635 ou 648 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant respectivement aux positions 664 et 677 de la séquence SEQ ID NO: 3.
- au moins une substitution T → C en position 638, 672 ou
10 692 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant respectivement aux positions 667, 698 et 718 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;
- une substitution A → C en position 667 de la séquence de référence SEQ ID N°1, correspondant à la position 696
15 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;
- une substitution C → G en position 698 de la séquence de référence SEQ ID N°1, correspondant à la position 724 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;
- une substitution TG → CC aux positions 664-665 de la
20 séquence de référence SEQ ID N°1, correspondant aux positions 693-694 de la séquence SEQ ID NO: 3 ;

L'exon 4 de l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 s'étend du nucléotide 755 au nucléotide 1180, ce qui correspond aux nucléotides 711 à 1136 de la séquence de
25 référence SEQ ID NO: 1.

Dans l'exon 4, l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3 comporte le polymorphisme suivant :

- une substitution A→G en position 904 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant à la
30 position 948 de la séquence SEQ ID NO: 3. Cette substitution se traduit par la substitution du résidu Asn en position 188 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Ser.

Des polymorphismes dont l'utilisation dans le cadre de la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention
35 est particulièrement avantageuse sont les suivants :

- une délétion de 9 paires de bases entre les nucléotides 81 et 91 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

- une insertion de 6 ou 18 paires de bases, correspondant à 1 ou 3 répétitions de la séquence CAACGG, entre les nucléotides 129 et 130 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

5 On peut par exemple détecter chez une plante, la présence d'un polymorphisme de *CCoAOMT-2* sous sa forme associée à un allèle favorable à la digestibilité, à partir d'un échantillon contenant du matériel génétique issu de la plante à tester, par hybridation sélective d'une sonde
10 polynucléotidique spécifique de cette forme allélique.

On définit ici comme sonde spécifique d'une forme allélique d'un polymorphisme, toute sonde polynucléotidique qui, dans des conditions de stringence appropriées, est capable de s'hybrider de manière sélective à tout allèle du
15 gène *CCoAOMT-2* contenant cette forme allélique, par rapport aux autres allèles du même gène, et aux gènes de séquence apparentée. Cette hybridation sélective se traduit par un signal d'hybridation significativement plus important avec ledit allèle qu'avec les autres allèles du même gène ou les
20 gènes de séquence apparentée, et de préférence par la présence d'un signal d'hybridation avec ledit allèle et l'absence de signal d'hybridation avec les autres allèles du même gène ou les gènes de séquence apparentée.

Les principes généraux de conception et
25 d'utilisation de sondes spécifiques permettant l'analyse de polymorphismes ne concernant qu'un petit nombre de nucléotides, voire un seul nucléotide, ont été initialement décrits par SAIKI et al. (Nature, 324, 163-166, 1986), et sont bien connus en eux-mêmes.

30 Des conditions de stringence appropriées à une hybridation sélective peuvent être facilement déterminées par l'homme du métier pour un polynucléotide donné ; elles dépendent notamment de la longueur du polynucléotide, de sa composition en bases, et du pourcentage de différences entre
35 les allèles à discriminer, au niveau de la portion du gène ciblée par l'hybridation.

On peut par exemple amplifier, à partir de matériel génétique issu de la plante à tester, le gène

CCoAOMT2 ou une région de celui-ci comprenant au moins l'un des polymorphismes définis ci-dessus, et détecter la présence ou l'absence, dans le produit d'amplification, de la forme dudit polymorphisme associée à l'allèle recherché. Dans ce cas, les amorces et les conditions d'amplification utilisées seront définies de manière à permettre l'amplification des différents allèles de CCoAOMT2.

La détection de la forme du polymorphisme associée à l'allèle recherché peut par exemple s'effectuer à l'aide d'une sonde polynucléotidique conforme à l'invention, comme indiqué ci-dessus. Elle peut également s'effectuer, notamment lorsque le polymorphisme est une insertion ou une délétion de plusieurs nucléotides, sur la base de la taille des fragments d'amplification.

Alternativement, on peut effectuer une amplification sélective de l'allèle recherché, en utilisant au moins une amorce d'amplification spécifique de cet allèle. Les conditions d'amplification seront définies selon l'amorce choisie, de manière à ce que ladite amorce ne s'hybride qu'avec sa séquence complémentaire présente dans l'allèle recherché. Dans ces conditions, on n'observe une amplification que si cet allèle est présent dans le matériel génétique analysé. La seconde amorce peut être commune à différents allèles, ou spécifique de l'allèle recherché.

La présente invention a également pour objet une CCoAOMT-2 mutante, caractérisée en ce qu'elle diffère de la CCoAOMT-2 de séquence SEQ ID NO: 2 par au moins l'une des mutations suivantes :

a) la délétion de la séquence peptidique Glu-Ala-Thr entre les positions 6 et 10 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

b) l'insertion d'au moins une copie, de préférence 1 à 3 copies du motif peptidique Asn-Gly entre les positions 26 et 27 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

c) la substitution du résidu His en position 37 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Arg ;

Éventuellement, ladite CCoAOMT-2 mutante peut comprendre en outre la mutation suivante :

d) la substitution du résidu Asn en position 188 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Ser.

De préférence, ladite CCoAOMT-2 mutante comprend au moins la mutation a) et/ou la mutation b).

5 Un exemple de CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention est illustré par la séquence SEQ ID NO: 4.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide isolé codant pour une Caféoyl Coenzyme A 3-O méthyltransférase-2 (CCoAOMT-2) de maïs mutante conforme à
10 l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit polynucléotide répond à une séquence choisie parmi :

- la séquence d'ADN génomique représentée dans la
15 liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 3 ; cette séquence est également représentée sur la Figure 2.

- la séquence d'ADNc dérivée de ladite séquence génomique.

La présente invention a également pour objet tout
20 fragment de plus de 10 pb, de préférence de plus de 15 pb, et de manière tout à fait préférée de plus de 20 pb, d'un polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, ledit fragment comprenant au moins l'un des polymorphismes mentionnés ci-dessus, ainsi que le complémentaire dudit fragment.

25 Le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, ou ses fragments définis ci-dessus peuvent notamment être utilisés, pour la détection dans des plantes fourragères, en particulier dans des monocotylédones, et notamment dans le maïs, d'un allèle favorable à la digestibilité du gène codant
30 pour la CCoAOMT-2. En particulier, ils peuvent être utilisés pour l'obtention de sondes polynucléotidiques ou d'amorces d'amplification permettant cette détection.

Par exemple, des sondes polynucléotidiques spécifiques de la forme allélique d'un polymorphisme de
35 CCoAOMT-2 présente sur l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3, peuvent comprendre notamment :

- le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3 ou son complémentaire ;

- les fragments dudit polynucléotide de plus de 10 pb, de préférence de plus de 15 pb, et de manière tout à fait préférée de plus de 20 pb, comprenant au moins l'un des polymorphismes mentionnés ci-dessus, ainsi que les complémentaires desdits fragments.

A titre d'autre exemple d'utilisation de fragments du polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, dans un procédé de détection d'un polymorphisme constitué par la délétion de plusieurs nucléotides, on peut amplifier la région de l'exon 1 comportant une délétion de 9 pb dans l'allèle SEQ ID NO: 3, à l'aide des amorces définies respectivement par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6. Le produit d'amplification obtenu à partir du matériel génétique issu d'un plant de la lignée de référence W64A (comprenant l'allèle SEQ ID NO: 1), a une longueur de 85 paires de bases, alors que le produit d'amplification obtenu à partir du matériel génétique issu d'un plant de la lignée F4 (comprenant l'allèle SEQ ID NO: 3) a une longueur de 76 pb.

La position des amorces SEQ ID NO: 5 et 6 est indiquée sur la Figure 2.

Pour effectuer une amplification sélective d'un allèle du gène *CCoAOMT-2* contenant la forme allélique d'un polymorphisme de *CCoAOMT-2* présente sur l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3, on pourra utiliser un couple d'amorces d'amplification dans lequel au moins une des amorces représente un fragment d'au moins 10 pb, de préférence au moins 15 pb, et de manière tout à fait préférée au moins 20 pb, du polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, ledit fragment comprenant au moins l'un des polymorphismes mentionnés ci-dessus, ou le complémentaire dudit fragment.

Les conditions d'amplification seront définies selon l'amorce choisie, comme indiqué ci-dessus.

Par exemple, on peut utiliser un couple d'amorces définies respectivement par les séquences SEQ ID NO: 7 et SEQ ID NO: 8.

L'amorce SEQ ID NO: 7 est constituée par un fragment de la séquence SEQ ID NO: 3 encadrant l'emplacement

de la délétion de 9 pb dans le premier exon, auquel ont été ajoutées 4 bases supplémentaires (les 4 premières bases de la séquence SEQ ID NO: 7), pour augmenter la T_m (température de fusion) de l'amorce, et donc la spécificité d'hybridation.

5 L'amorce SEQ ID NO: 8 est commune aux différents allèles du gène *CCoAOMT2* ; elle est située juste avant le codon stop de ce gène.

La position des amorces SEQ ID NO: 7 et 8 est indiquée sur la Figure 2.

10 Ce couple d'amorces amplifie l'allèle de séquence SEQ ID NO: 3, sans amplifier l'allèle de référence défini par la séquence SEQ ID NO: 1.

La présente invention a également pour objet des amorces oligonucléotidiques utilisables pour la mise en œuvre
15 des méthodes de détection définies ci-dessus.

En particulier la présente invention a pour objet :

- tout couple d'amorces permettant l'amplification d'une région du gène *CCoAOMT2* comprenant au
20 moins l'un des polymorphismes mentionnés ci-dessus ; à titre d'exemple, on citera le couple d'amorces défini par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6.

- tout couple d'amorces dont au moins une amorce représente un fragment d'au moins 10 pb, de préférence au
25 moins 15 pb, et de manière tout à fait préférée au moins 20 pb, du polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, comprenant au moins l'un des polymorphismes mentionnés ci-dessus, ou le complémentaire dudit fragment ; à titre d'exemple, on citera le couple d'amorces défini par les séquences SEQ ID NO: 7 et
30 SEQ ID NO: 8.

L'invention a également pour objet un procédé pour identifier une plante fourragère, et notamment un maïs, comprenant un allèle de *CCoAOMT2* favorable à la digestibilité, caractérisé en ce qu'il comprend la détection
35 de la présence, dans un échantillon issu de ladite plante, d'une *CCoAOMT-2* mutante telle que définie ci-dessus.

La détection d'une *CCoAOMT-2* mutante conforme à l'invention peut s'effectuer par exemple, à l'aide

d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux reconnaissant sélectivement ladite protéine, c'est à dire ne présentant pas de réactions croisées avec d'autres protéines de maïs, et notamment ne présentant pas de réactions croisées avec la CCoAOMT-2 de type sauvage ou avec la CCoAOMT-1.

Ces anticorps, qui font également partie de l'objet de l'invention, peuvent être obtenus facilement par les méthodes classiques de préparation d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, en immunisant un animal avec une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention, ou un fragment de celle-ci portant au moins une des mutations identifiées ci-dessus, et notamment un fragment portant au moins la mutation a) et/ou la mutation b), et en sélectionnant, parmi les anticorps obtenus, ceux qui, dans les mêmes conditions réactionnelles, forment un complexe anticorps/antigène détectable avec une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention, mais pas avec d'autres protéines de maïs, et notamment la CCoAOMT-2 de type sauvage ou la CCoAOMT-1.

Les anticorps conformes à l'invention peuvent éventuellement être marqués, afin de permettre la révélation du complexe anticorps/antigène.

La présente invention a également pour objets des kits pour la mise en œuvre d'un procédé conforme à l'invention, de détection d'un allèle de CCoAOMT2 favorable à la digestibilité. Ces kits comprennent, outre un ou plusieurs réactifs conformes à l'invention (notamment anticorps, sonde polynucléotidique ou amorces) des moyens appropriés pour la mise en œuvre de la réaction utilisée pour la détection, et/ou des moyens appropriés pour la révélation du produit de cette réaction.

A titre d'exemple, on citera :

Des kits comprenant au moins une sonde polynucléotidique conforme à l'invention, éventuellement associée à des réactifs permettant la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation, à des moyens de détection de l'hybride formé, et/ou à des témoins positifs et/ou des témoins négatifs d'hybridation ;

Des kits comprenant au moins un couple d'amorces conforme à l'invention, éventuellement associé à des réactifs permettant la mise en œuvre d'une réaction d'amplification, à des moyens de détection du produit d'amplification, et/ou à
5 des témoins positifs et/ou des témoins négatifs d'amplification ;

Des kits comprenant au moins un anticorps conforme à l'invention, éventuellement associé à des réactifs permettant la mise en œuvre d'une réaction
10 anticorps/antigène, à des moyens de détection d'un complexe anticorps/antigène, et/ou à des témoins positifs et/ou des témoins négatifs de réaction.

Ces kits peuvent comprendre, outre les réactifs conformes à l'invention permettant la détection d'un allèle
15 de *CCoAOMT2* favorable à la digestibilité, d'autres réactifs permettant la détection d'autres caractères agronomiques d'intérêt.

La présente invention peut être mise en œuvre dans le cadre de la sélection de plantes, notamment de maïs,
20 possédant une digestibilité améliorée.

Elle présente un intérêt tout particulier dans le cadre de la sélection assistée par marqueurs (SAM). Cette méthode de sélection est bien plus efficace qu'une simple évaluation phénotypique puisque tous les loci correspondant à
25 différents caractères d'intérêt peuvent être analysés ensemble sur un seul échantillon d'ADN, indépendamment des conditions de culture de la plante d'où est issu l'échantillon. La sélection assistée par marqueurs permet de mettre en œuvre les techniques de rétrocroisements accélérés
30 consistant à utiliser la liaison existant entre un marqueur moléculaire et un gène d'intérêt agronomique, en l'occurrence codant pour la *CCoAOMT-2*, pour transférer celui-ci dans différents génotypes afin de leur apporter une digestibilité accrue.

35 La présente invention peut également être mise en œuvre pour suivre l'intégration d'un allèle du gène *CCoAOMT2* favorable à la digestibilité, par exemple dans le cadre de

techniques d'introggression par croisements successifs entre plantes présentant cet allèle.

La présente invention peut également être utilisée dans le cadre d'études phylogénétiques, de la caractérisation de relations génétiques parmi les variétés végétales, de l'identification de croisements ou d'hybridations somatiques, de la localisation de segments chromosomiques affectant les caractères monogéniques, du clonage basé sur les cartes génétiques, et de l'identification de QTL et/ou de PQL.

Les polynucléotides conformes à l'invention, et notamment le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, ou leurs fragments comprenant au moins l'un des polymorphismes définis ci-dessus peuvent également être utilisés pour la production, sous forme recombinante, de CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention, ou de fragments de celle-ci, ainsi que pour améliorer la digestibilité de plantes fourragères, en particulier de monocotylédones, et notamment du maïs, par l'expression dans lesdites plantes d'une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention.

La présente invention a ainsi pour objet :

- une cassette d'expression recombinante comprenant un polynucléotide conforme à l'invention ou un fragment de celui-ci, comprenant au moins l'un des polymorphismes définis ci-dessus placé sous contrôle de séquences hétérologues de régulation de la transcription et de la traduction (notamment promoteur et terminateur de transcription).

- un vecteur recombinant résultant de l'insertion, dans un vecteur-hôte approprié, d'un polynucléotide conforme à l'invention ou d'un fragment de celui-ci, comprenant au moins l'un des polymorphismes définis ci-dessus, ou d'une cassette d'expression conforme à l'invention.

La présente invention englobe également un procédé de production d'un polypeptide recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation d'une cellule hôte, procaryote ou eucaryote, par une séquence

polynucléotidique codant pour une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention, ou pour un fragment de celle-ci comprenant au moins l'une des mutations identifiées ci-dessus, et la récupération de ladite CCoAOMT-2 mutante ou dudit fragment
5 produits par ladite cellule.

La présente invention englobe aussi des cellules-hôtes génétiquement transformées par un polynucléotide conforme à l'invention.

Les cellules hôtes peuvent être des cellules
10 eucaryotes ou procaryotes. A titre d'exemples on citera des bactéries, notamment *E. coli* ou *Agrobacterium*, des levures, par exemple *Saccharomyces*, des cellules animales ou, préférentiellement, des cellules végétales.

La présente invention englobe également des
15 plantes transgéniques génétiquement transformées par un polynucléotide conforme à l'invention. Il s'agit préférentiellement de monocotylédones, et en particulier du maïs.

Les techniques classiques de construction de
20 vecteurs recombinants, de transformation de cellules ou d'organismes hôte, et de production de protéines recombinantes, sont utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention.

Le choix du vecteur-hôte, et des séquences de
25 régulation de l'expression seront effectuées en fonction de la cellule hôte ou de l'organisme hôte choisi et de l'application envisagée.

Par exemple, pour la production de polypeptides recombinants, on utilise fréquemment des cellules hôtes de
30 bactéries, notamment *E. coli* ou de levures notamment *Saccharomyces cerevisiae* : de nombreux systèmes d'expression dans l'un ou l'autre de ces deux organismes sont connus en eux-mêmes et disponibles dans le commerce.

Pour l'expression dans des cellules végétales ou
35 des plantes on pourra utiliser le promoteur endogène du gène CCoAOMT2.

On peut également utiliser un promoteur hétérologue ; de très nombreux promoteurs utilisables pour la

transformation de cellules végétales sont connus en eux-mêmes. A titre d'exemples, on citera :

- des promoteurs constitutifs, tels que le promoteur 35S de CaMV, ou ses dérivés, ou le promoteur de l'ubiquitine ;
- des promoteurs inductibles, par exemple le promoteur Hsp70 qui est inductible par un choc thermique ;
- des promoteurs tissu-spécifiques.

Parmi les terminateurs de transcription pouvant être utilisés, on citera notamment le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou le terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non-codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline.

La transformation de cellules végétales peut être réalisée par diverses méthodes telles que, par exemple, le transfert du polynucléotide d'intérêt dans les protoplastes végétaux après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol en présence de cations divalents (Ca²⁺), l'électroporation (FROMM et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 82, 5824, 1985), l'utilisation d'un canon à particules, notamment selon la méthode décrite par FINER et al. (Plant Cell Report, 11, 323-328, 1992), ou la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire (NEUHAUS et al., Theor. Appl. Genet., 75(1), 30-36, 1987).

On peut aussi infecter les cellules végétales par un hôte cellulaire bactérien comprenant le vecteur contenant la séquence d'intérêt. L'hôte cellulaire peut être *Agrobacterium tumefaciens* (AN et al., Plant Physiol., 81, 86-91, 1986), ou *A. rhizogenes* (GUERCHE et al., Mol. Gen. Genet., 206, 382, 1987). Dans ce cas, de manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extrachromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*A. tumefaciens*, en utilisant un système binaire (WATSON et al., ADN recombinant, Ed. De Boeck Université, 273-292, 1994). Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à

l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus
5 d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir* nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

Pour la transformation des monocotylédones, en particulier le maïs on pourra appliquer avantageusement la
10 méthode décrite par ISHIDA et al. (Nature Biotechnology, 14, 745-750, 1996).

La transformation génétique de plantes par un polynucléotide codant pour une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention permet l'obtention de plantes transgéniques, et
15 notamment de maïs, possédant une digestibilité accrue.

Il est toutefois nécessaire que l'allèle présent naturellement dans la plante soit inactivé. L'inactivation de cet allèle peut être obtenue par exemple par insertion dans le gène CCoAOMT2 (préférentiellement dans la région codante)
20 d'un ADN-T ou tout autre élément transposable.

La présente invention a ainsi plus particulièrement pour objet un procédé de production de maïs transgénique présentant un taux de digestibilité accru, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25 a) l'inactivation de l'allèle naturel du gène CCoAOMT2 de la plante à transformer ;

b) la transformation génétique de la plante résultant de l'étape a) par un polynucléotide codant pour une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention.

30 Alternativement, des maïs possédant une digestibilité accrue peuvent être obtenus par mutagenèse dirigée, afin d'introduire dans l'allèle naturel du gène CCoAOMT2 les modifications nécessaires pour l'expression d'une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention.

35 Des méthodes de mutagenèse dirigée utilisables dans le cadre de la présente invention sont connues en elles-mêmes de l'homme du métier ; elles sont par exemples décrites dans l'ouvrage de D. TAGU (eds INRA 1999).

Avantageusement, à l'issue de la transgénèse ou de la mutagénèse dirigée, les plantes contenant le gène codant pour une CCoAOMT-2 mutante conforme à l'invention pourront être sélectionnées par détection de ce gène en utilisant l'un des procédés de détection conformes à l'invention décrits ci-dessus.

L'invention concerne également les plantes transformées obtenues par un procédé de transgénèse ou de mutagénèse dirigée conforme à l'invention, ainsi que les descendants de ces plantes. L'invention englobe également les produits obtenus à partir de ces plantes, tels qu'organes ou tissus végétaux, cellules, semences etc.

Enfin, l'invention concerne également les produits dérivés, et notamment le fourrage, obtenus à partir de ces plantes.

Des allèles du gène *CCoAOMT2* favorables à la digestibilité, et contenant des polymorphismes différents de ceux identifiés dans l'allèle SEQ ID NO:3 peuvent être identifiés à partir de lignées de maïs à digestibilité élevée, et produisant des lignines possédant un rapport S/G plus élevé que celui des lignines issues des variétés classiques de maïs d'ensilage. Les allèles de *CCoAOMT2* présents dans ces lignées peuvent être isolés et séquencés et leurs séquences comparées avec celle du gène *CCoAOMT2* de type sauvage, afin de détecter les polymorphismes associés à ces allèles. Des polynucléotides reproduisant la séquence de ces allèles, ainsi que des CCoAOMT-2 mutantes produites par ceux ci peuvent être utilisés dans toutes les applications décrites ci-dessus.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs de mise en œuvre de méthodes de détection d'un allèle du gène *CCoAOMT2* favorable à la digestibilité, et d'utilisation de cet allèle pour l'obtention de plantes transgéniques.

EXEMPLE 1 : MISE AU POINT D'UN TEST DE DETECTION D'UN MARQUEUR POLYMORPHIQUE ASSOCIE A LA DIGESTIBILITE.

Les 9 lignées suivantes de maïs (classées par ordre de digestibilité décroissante) ont été testées pour
5 rechercher la présence de l'un des marqueurs polymorphiques identifiés sur la séquence SEQ ID NO: 3.

Lignées F4 > A>B>C>D>E>F>G

La lignée F4 est celle à partir de laquelle a été obtenu l'allèle SEQ ID NO: 3.

10 **Amorces utilisées**

Le marqueur choisi est la délétion de 9 nucléotides comprise entre les nucléotides 86 et 87 de la séquence SEQ ID NO: 3 ce qui correspond aux nucléotides 81 à 91 de la séquence SEQ ID NO: 1.

15 2 couples d'amorces ont été définis :

Le premier est destiné à permettre une amplification sélective de l'allèle portant la délétion recherchée. Si cet allèle n'est pas présent dans l'échantillon, aucune amplification n'est observée.

20 Le deuxième encadre l'emplacement de la délétion recherchée. La présence ou l'absence d'un allèle portant cette délétion sont détectées par la taille du produit d'amplification.

Le premier couple d'amorces comprend :

25 - une amorce sens sélective, située à cheval sur l'emplacement de la délétion. Cette séquence est représentée par la séquence SEQ ID NO: 7 ; les 4 premières bases de cette séquence correspondent à des bases supplémentaires ajoutées pour augmenter la température de fusion de l'amorce et donc
30 augmenter la spécificité de la PCR ;

- une amorce antisens, non-sélective : Cette amorce, située immédiatement avant le codon stop du gène, est commune aux différents allèles du gène CCoAOMT2. Sa séquence est représentée sous le numéro SEQ ID NO: 8.

35 Le second couple d'amorces comprend une amorce sens définie par la séquence SEQ ID NO: 5 et une amorce antisens définie par la séquence SEQ ID NO: 6.

Chacun de ces couples d'amorces a été testé sur du matériel génétique obtenu à partir des lignées E, D, F, G et F4 (30 ng d'ADN génomique de chaque lignée).

Amplification par le couple d'amorces SEQ ID NO: 7 et SEQ ID

5 NO: 8

La PCR est effectuée dans un volume de 50 μ l de mélange ayant la composition suivante :

Matrice : 30 ng ADN génomique

amorces : 0,2 μ M de chaque

10 dNTPs : 200 μ M de chaque

Tampon : 5 μ l de tampon 10 X contenant 100 mM de tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ et 0,01% de gélatine

pH : 8,3

15 Polymérase : REDTaq GENOMIC DNA POLYMERASE (SIGMA). 2,5 Unités de polymérase sont ajoutées aux 50 μ l de mélange réactionnel.

Conditions d'amplification :

5 min 95°C

33 cycles :

20 $\left(\begin{array}{l} 30s \ 95^{\circ}C \\ 30 \ s \ \text{à} \ 67^{\circ}C \\ 1 \ \text{min} \ \text{à} \ 72 \ ^{\circ}C \end{array} \right)$

5 min à 72°C

25 Pour obtenir des témoins positifs d'amplification, on utilise le couple d'amorces suivant, qui amplifie le gène CCoAOMT2 pour toutes les lignées, avec une efficacité moindre d'amplification pour la lignée F4, car une partie de l'amorce sens recouvre la zone délétée dans cette lignée):

30 Amorce sens :

GCG ACC GAG GCG ACC AAG ACG (SEQ ID NO: 9) correspondant aux positions 83 à 103 de la séquence SEQ ID NO: 1.

Amorce antisens :

CTT GAC GCG GCG GCA GAG CGT GAC GCC GTC GC (SEQ ID NO: 8)

35 25 μ l du produit de la réaction PCR sont déposés sur mini gel d'agarose (1%) additionné de bromure d'éthidium.

La migration est effectuée à 100 volts pendant 15 à 20 minutes.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3 :

5 Les 5 premiers dépôts correspondent aux amplifications obtenues avec le couple d'amorces SEQ ID NO: 7 et SEQ ID NO: 8 sur les lignées (de gauche à droite) G (piste 1), F (piste 2), E (piste 3), D (piste 4) et F4 (piste 5).

Le dépôt central (piste 6) correspond au marqueur de taille moléculaire de 1 kb.

10 Les 5 derniers dépôts correspondent aux témoins positifs, obtenus avec le couple d'amorces témoin SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 8 : lignées G (piste 7), F (piste 8), E (piste 9), D (piste 10) et F4 (piste 11).

15 La lignée F4 se caractérise par une bande nette d'environ 1 kb, correspondant au produit d'amplification obtenu avec les amorces SEQ ID NO: 7 et SEQ ID NO: 8. Pour les autres lignées, et avec ces mêmes amorces soit aucune bande n'apparaît à ce niveau, soit les bandes ont une intensité très faible.

20 D'autres expérimentations ont été effectuées en utilisant une température d'hybridation des amorces variant de 66°C à 68°C. La même spécificité d'amplification a été observée pour le couple d'amorces SEQ ID NO: 7 et SEQ ID NO: 8.

25 **Amplification par le couple d'amorces SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6**

Le couple d'amorces définies par les séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6 a été testé sur les lignées E, D, F, G et F4.

30 Le milieu réactionnel est le même que celui utilisé ci-dessus mais le volume réactionnel est doublé soit 100 µl afin de pouvoir déposer 70 µl du produit PCR sur un gel agarose-metaphoré (TEBU) à 4% additionné de bromure d'éthidium. Ce gel possède une forte capacité de résolution, 35 permettant de mettre en évidence une différence de taille de 4 bp pour des fragments d'ADN dont la taille est comprise entre 200 et 16 pb.

Cycle :

5 min 95°C

30 cycles : 30 s 95°C

30 s à 65°C

5 30 s à 72 °C

5 min à 72°C

La migration se déroule pendant 4 h à 90 V.

Les résultats sont illustrés par la Figure 4.

Le premier dépôt (piste 1) correspond au marqueur
10 de taille moléculaire de 100 pb.

Les 5 dépôts suivants correspondent au produits
d'amplification des lignées D (piste 2), G (piste 3), F
(piste 4), E (piste 5), F4 (piste 6).

Ces résultats montrent que l'amplifiat obtenu à
15 partir de la lignée F4 est plus petit que celui obtenu à
partir des autres lignées. Le couple d'amorces utilisé est
donc bien distinctif du polymorphisme recherché.

**EXEMPLE 2 : TRANSFORMATION DE PLANTES PAR UN ALLELE DU GENE
CCOAMT2 FAVORABLE A LA DIGESTIBILITE**

20 La lignée F4 de maïs, qui présente une
digestibilité importante, a été utilisée comme matériel de
départ.

Le gène CCoAMT2 a été obtenu à partir d'ADNc
extrait de cette lignée par amplification PCR, à l'aide des
25 amorces SEQ ID NO: 8 et SEQ ID NO: 9.

Le clonage des fragments PCR obtenus
correspondant à la région codante de la CCoAMT-2 a été
réalisé à l'aide du système PGEM-T EASY vector selon les
instructions du fournisseur (PROMEGA).

30 Le fragment PCR est ligaturé dans le Vecteur
pGEM-T EASY (PROMEGA). Les bactéries compétentes *E. coli*
JM109 (commercialisées par PROMEGA) sont transformées à
l'aide de cette construction.

**Transformation des cellules végétales par *Agrobacterium*
35 *tumefaciens***

La technique de transformation décrite par ISHIDA
et al. (1996, précité) est utilisée à partir d'embryons

immatures de 10 jours après la fécondation. Tous les milieux utilisés sont décrits dans cette publication.

On construit un vecteur superbinaire par recombinaison homologue entre un vecteur intermédiaire (pBS11
5 ou pBS12) portant un marqueur de résistance, et dans lequel a été préalablement inséré le gène *CCoAOMT2* mutant excisé du vecteur pGEM-T EASY, et le vecteur pSB1 de JAPAN TOBACCO (EP 672 752) qui contient : les gènes *virB* et *virG* du plasmide pTiBo542 présent dans la souche supervirulente A281
10 d'*Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 37349). Les vecteurs pBS11, pBS12, et pSB1 sont décrits dans la Demande EP 672 752 au nom de JAPAN TOBACCO.

La transformation s'effectue par mise en contact des embryons immatures des plantes de maïs pendant au moins
15 5 minutes avec *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 contenant le vecteur superbinaire.

Les embryons sont ensuite placés sur milieu LSAs pendant 3 jours à l'obscurité et à 25°C. Une première sélection est effectuée sur les cals transformés : les cals
20 embryogènes sont transférés sur milieu LSD5 contenant de la phosphinotricine à 5 mg/l et de la céfotaxime à 250 mg/l (élimination ou limitation de la contamination par *Agrobacterium tumefaciens*). Cette étape est menée 2 semaines à l'obscurité et à 25°C. La deuxième étape de sélection est
25 réalisée par transfert des embryons qui se sont développés sur milieu LSD5, sur milieu LSD10 (phosphinotricine à 10 mg/l) en présence de céfotaxime, pendant 3 semaines dans les mêmes conditions que précédemment. La troisième étape de sélection consiste à exciser les cals de type I (fragments de
30 1 à 2 mm) et à les transférer 3 semaines à l'obscurité et à 25°C sur milieu LSD 10 en présence de céfotaxime.

La régénération des plantules est effectuée en excisant les cals de type I qui ont proliféré et en les transférant sur milieu LSZ en présence de phosphinotricine à
35 5 mg/l et de céfotaxime pendant 2 semaines à 22°C et sous lumière continue.

Les plantules régénérées sont transférées sur milieu RM + G2 contenant 100 mg/l d'AUGMENTIN® pendant

2 semaines à 22°C et sous illumination continue pour l'étape de développement. Les plantes obtenues sont alors transférées au phytotron en vue de leur acclimatation.

Transformation des cellules végétales par bombardement

5 Des cals âgés de 2 mois, obtenus après la mise en culture d'embryons immatures sur un milieu de callogénèse sont utilisés pour la transformation.

Un traitement plasmolysant permet de réduire le volume de la vacuole et limite ainsi les éclatements
10 cellulaires lors du tir (prétraitement de 4 heures et un post-traitement de 16 heures sur un milieu Sorbitol 0.2M et Mannitol 0,2 M).

Le matériel végétal est réparti de façon homogène sur l'ensemble de chacune des boîtes.

15 15 mg de microbilles de tungstène stériles sont mélangées dans 150 µl d'eau stérilisée par microfiltration.

Le gène *CCoAOMT2* mutant est inséré dans un plasmide pDM302 portant un marqueur de sélection.

Pour 5 tirs, le mélange suivant est préparé :
20 25 µl de microbilles de tungstène,
2,5 µl d'ADN du plasmide portant le gène d'intérêt (à 1 µg/µl),
2,5 µl d'ADN (à 1 µg/µl) du plasmide portant le gène *CCoAOMT2* et le marqueur de sélection,
25 25 µl de CaCl₂ à 2,5 M,
10 µl de spermidine à 0,1 M.

Ce mélange est laissé à décanter dans la glace pendant au moins 5 minutes.

30 Cinq boîtes de Pétri contenant le matériel à bombarder sont placées sur des boîtes Agar à 15 g/L.

50 µl de surnageant du tube décanté sont éliminés et le mélange restant est vortexé, puis 2 µl de celui-ci sont déposés sur la grille de la seringue stérile, qui est vissée sur le support dans le canon.

35 Un filtre de gaze stérile est placé sur la boîte de Pétri qui est disposée à 19 cm dans l'enceinte du canon.

Le vide est poussé à l'intérieur de l'enceinte à la pression de 25 mbars

Le tir est déclenché. La pression de l'hélium dans le canon est de 8 bars.

5 Le matériel végétal bombardé est remis sur sa boîte de Pétri d'origine (Mannitol/Sorbitol). Les boîtes sont placées à 26°C et à l'obscurité pendant 16 heures pour un traitement plasmolysant post-bombardement (mannitol/sorbitol).

10 La pression de sélection est appliquée 16 heures après le tir et est maintenue à la même concentration de l'agent sélectif (BIALAPHOS à 5 mg/L) pendant toutes les étapes de régénération. Les plantules sont ensuite repiquées dans du terreau (petits pots) pendant 1 semaine puis transférées en pots de 20 litres (mélange tourbe-podzolane)

15 dans la serre transgénique ou en chambre climatisée (Température 24°C jour/20°C nuit ; photopériode 16 h jour / 8 h nuit, hygrométrie 80%). Les plantes sont autofécondées ou croisées.

20 **EXEMPLE 3 : TEST D'ASSOCIATION ENTRE LA DIGESTIBILITE ET LES REPETITIONS DU MOTIF CAACGG**

L'alignement multiple de 27 séquences du gène *CCoAOMT2* de différentes lignées de maïs a permis de constater que le motif "CAACGG" (inséré entre les nucléotides 129 et 130 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1, correspondant à

25 l'allèle de la lignée F4) pouvait être répété 3 fois, 4 fois ou 6 fois.

La digestibilité de ces variétés a été déterminée. Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous.

Tableau I

Lignées	Nombre de répétitions du motif CAACGG	Digestibilité
DE811, Mo17, B14, W64, Lan496, F64, F7012, MBS847, F288, B73, F113, Du101	3	2,75
Wis94, Wis93, LUS16, W117; Lus212, F66, F324, F1, EP1, F7025, F271, F286, F564, F2	4	3,46
F4	6	5

Ces résultats montrent que la répétition du motif CAACGG est liée à la digestibilité avec une probabilité de 0,037776

REVENDEICATIONS

1) Procédé d'évaluation de la digestibilité d'une plante fourragère, caractérisé en ce qu'il comprend la détection de la présence ou de l'absence, dans du matériel biologique provenant de ladite plante, d'un allèle favorable à la digestibilité du gène CCoAOMT2.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite plante fourragère est le maïs.

3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit allèle favorable à la digestibilité code pour une protéine CCoAOMT-2 mutante présentant par rapport à la protéine CCoAOMT-2 de type sauvage de séquence SEQ ID NO: 2, au moins l'une des mutations suivantes :

a) la délétion de la séquence peptidique Glu-Ala-Thr, située entre les positions 6 et 10 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

b) l'insertion d'au moins une copie du motif peptidique Asn-Gly entre les positions 26 et 27 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

c) la substitution du résidu His en position 37 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Arg.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite CCoAOMT-2 mutante comprend au moins la mutation a) et/ou la mutation b).

5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la détection de la présence d'un allèle du gène CCoAOMT2 favorable à la digestibilité s'effectue par détection de la forme associée audit allèle d'au moins un polymorphisme dudit gène.

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit polymorphisme est choisi parmi :

- une insertion de 5 paires de bases, de séquence ACTGC, entre les nucléotides 55 et 56 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;

- une délétion de 9 paires de bases, entre les nucléotides 81 et 91 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;

- une insertion de 6 ou 18 paires de bases, correspondant à 1 ou 3 répétitions de la séquence CAACGG, entre les nucléotides 129 et 130 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- 5 - une substitution C →G en position 178 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- une substitution A → G en position 180 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- une substitution G→ A en position 227 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- 10 - une substitution A →G en position 237 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- une substitution CG→TT aux positions 259-260 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- 15 - une substitution A→G en position 466 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- une insertion de 15 paires de bases, de séquence TGCCCCTTCTCTCT, entre les nucléotides 631 et 632 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- 20 - une insertion de 18 paires de bases, de séquence CTCTCTGTTGCTCGTCCC, entre les nucléotides 703 et 704 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- une délétion de 3 paires de bases, entre les nucléotides 668 et 672 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- 25 - au moins une substitution C → T en position 635 ou 648 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- au moins une substitution T → C en position 638, 672 ou 692 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- une substitution A → C en position 667 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- 30 - une substitution C → G en position 698 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- une substitution TG → CC aux positions 664-665 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1 ;
- 35 - une substitution A →G en position 904 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit polymorphisme est une délétion de 9 paires de

bases entre les nucléotides 81 et 91 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

8) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit polymorphisme est une insertion de 6 ou 18 paires de bases, correspondant à 1 ou 3 répétitions de la séquence CAACGG, entre les nucléotides 129 et 130 de la séquence de référence SEQ ID NO: 1.

9) Procédé selon une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que la détection dudit polymorphisme comprend l'hybridation sélective, avec du matériel génétique issu de ladite plante, d'au moins une sonde polynucléotidique spécifique de la forme dudit polymorphisme présente dans l'allèle de *CCoAOMT2* recherché.

10) Procédé selon une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend l'amplification, à partir de matériel génétique issu de ladite plante, du gène *CCoAOMT2* ou d'une région de celui-ci comprenant au moins un polymorphisme à détecter, et la détermination de la forme dudit polymorphisme présente dans ladite plante.

11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la forme dudit polymorphisme présente dans ladite plante est déterminée par la taille du produit d'amplification.

12) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la détection de la présence ou de l'absence d'un allèle du gène *CCoAOMT2* favorable à la digestibilité s'effectue par détection d'une protéine *CCoAOMT-2* mutante présentant par rapport à la protéine *CCoAOMT-2* de type sauvage de séquence SEQ ID NO: 2, au moins l'une des mutations définies dans la revendication 3.

13) Caféoyl Coenzyme A 3-O méthyltransférase-2 (*CCoAOMT-2*) mutante, caractérisée en ce qu'elle diffère de la *CCoAOMT-2* de séquence SEQ ID NO: 2 par au moins l'une des mutations suivantes :

a) la délétion de la séquence peptidique Glu-Ala-Thr, située entre les positions 6 et 10 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

5 b) l'insertion d'au moins une copie du motif peptidique Asn-Gly entre les positions 26 et 27 de la séquence SEQ ID NO: 2 ;

c) la substitution du résidu His en position 37 de la séquence SEQ ID NO: 2 par un résidu Arg ;

10 14) CCoAOMT-2 mutante selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins la mutation a) et/ou la mutation b).

15 15) CCoAOMT-2 mutante selon une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence SEQ ID NO: 4.

16) Polynucléotide codant pour une CCoAOMT-2 mutante selon une quelconque des revendications 13 à 15.

17) Polynucléotide selon la revendication 16, caractérisé en ce que sa séquence est choisie parmi ;

20 - la séquence d'ADN génomique représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 3 ;

- la séquence d'ADNc dérivée de ladite séquence génomique.

18) Polynucléotide choisi parmi :

25 - un fragment de plus de 10 pb d'un polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, ledit fragment comprenant au moins l'un des polymorphismes définis dans la revendication 6 ;

- le complémentaire dudit fragment.

30 19) Sonde polynucléotidique pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend un polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 3, ou son complémentaire, ou un polynucléotide selon la revendication 18.

35 20) Couple d'amorces pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une amorce comprenant un polynucléotide selon la revendication 18.

21) Couple d'amorces selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- un couple d'amorces constitué par les oligonucléotides de séquence SEQ ID NO: 7 et SEQ ID NO: 8.

5 - un couple d'amorces constitué par les oligonucléotides SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6.

22) Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 18 pour la détection d'un allèle du gène *CCoAOMT2* du maïs favorable à la digestibilité.

10 23) Anticorps reconnaissant sélectivement une protéine *CCoAOMT-2* mutante selon une quelconque des revendications 13 à 15, ou un fragment de celle-ci comprenant au moins une des mutations définies dans la revendication 13.

15 24) Cassette d'expression recombinante comprenant un polynucléotide selon une quelconque des revendications 16 à 18.

20 25) Vecteur recombinant résultant de l'insertion d'un polynucléotide selon une quelconque des revendications 16 à 18, ou d'une cassette d'expression selon la revendication 24, dans un vecteur-hôte.

25 26) Procédé de production d'un polypeptide recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation d'une cellule hôte, procaryote ou eucaryote, par un polynucléotide codant pour une *CCoAOMT-2* mutante selon une quelconque des revendications 13 à 15, ou pour un fragment de celle-ci comprenant au moins l'une des mutations définies dans la revendication 13, et la récupération de ladite *CCoAOMT-2* mutante ou dudit fragment produits par ladite cellule.

30 27) Cellule génétiquement transformée par un polynucléotide selon une quelconque des revendications 16 à 18.

28) Cellule selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule végétale.

35 29) Procédé de production d'une plante fourragère transgénique présentant un taux de digestibilité accru, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) l'inactivation de l'allèle naturel du gène *CCoAOMT2* de la plante à transformer ;

b) la transformation génétique de la plante résultant de l'étape a) par un polynucléotide selon une
5 quelconque des revendications 16 à 17.

30) Procédé de production d'une plante fourragère présentant un taux de digestibilité accru, caractérisé en ce qu'il comprend la mutagenèse dirigée de l'allèle du gène *CCoAOMT2* présent dans la plante à transformer pour obtenir un
10 allèle du gène *CCoAOMT2* ayant la séquence d'un polynucléotide selon une quelconque des revendications 16 à 17.

31) Plante génétiquement transformée par un polynucléotide selon une quelconque des revendications 16 à
17.

15

1 / 3

W64A CCoAOMT2

1 CGCAAGCCAG TGCCGCGCCC AGATCTCCGC GACAGATCAG TCGTTCGTCC

51 AGCTAACTGC ACTGCACGCA **ATGGCCACCA** CGGCGACCGA GGCGACCAAG
amorce sens encadrant délétion

101 ACGACTGCAC CGGCGCAGGA **GCAGCAGGCC AACGGCAACG** GCAACGGCGA
amorce antisens encadrant délétion

151 GCAGAAGACG CGCCACTCCG AGGTCGGCCA CAAGAGCCTG CTCAAGAGCG

201 ACGACCTCTA CC**AGGTAAAC** AAGCTGGGCG CAATGAATGG CTGAATCTGA
intron 1

251 CCGGGATCCG AGTCTCTGAC CGCGGGGGGA GAATGATCCG **CAGTACATCC**

301 TGGACACGAG CGTGTACCCG CGGGAGCCGG AGAGCATGAA GGAGCTGCGC

351 GAGATCACCG CCAAGCACCC **ATGGTATGTC** CCGCTAGCTT TTCGCCCTGT

401 CGTACGTGGT GGATTCGAGT GTGTGGGCT GCTGGACGTG GACAGACCGA
intron 2

451 GATCTGAGAA CGAACATGGC GTGGCGTGCA **GGAACCTGAT** GACCACCTCC

501 GCCGACGAGG GCCAGTTCCT CAACATGCTC ATCAAGCTCA TCGGCGCCAA

551 GAAGACCATG GAGATCGGCG TCTACACCGG CTAATCGCTC CTCGCCACCG

601 CGCTCGCACT CCCGGAGGAC GGCAC**CGGTCG** GTTCCCTTTC TCTCTCTCTC

651 CCAGATCTGC CACTGAACTG ATAGACCAAG GATCTTTACC CTTCTCTCTC
Intron 3

701 TCTCCCGC**AG** ATCTTGGCCA TGGACATCAA CCGCGAGAAC TACGAGCTAG

751 GCCTTCCCTG CATCAACAAG GCCGGCGTGG GCCACAAGAT CGACTTCCGC

801 GAGGGCCCCG CGTCCCCGT CCTGGACGAC CTCGTGGCGG ACAAGGAGCA

851 GCACGGGTCG TTCGACTTCG CCTTCGTGGA CGCCGACAAG GACAACTACC

901 TCAACTACCA CGAGCGGCTC CTGAAGCTGG TGAGGCCCGG CGGCCTCATC

951 GGCTACGACA ACACGCTGTG GAACGGCTCC GTCGTGCTCC CCGACGACGC

1001 GCCCATGCGC AAGTACATCC GCTTCTACCG CGACTTCGTC CTCGCCCTCA

1051 ACAGCGCGCT CGCCGCCGAC GACCGCGTCG AGATCTGCCA GCTCCCCGTC

1101 **GGCGACGGCG ICACGGCTCTG CCGCCGGGTC AAGT**GAAAAA AAGAAAGAAA
amorce antisens commune à tous les allèles Stop

1151 AAAAAAACAC ACATACCCTG CGTTCCTGCTG

FIGURE 1

3 / 3

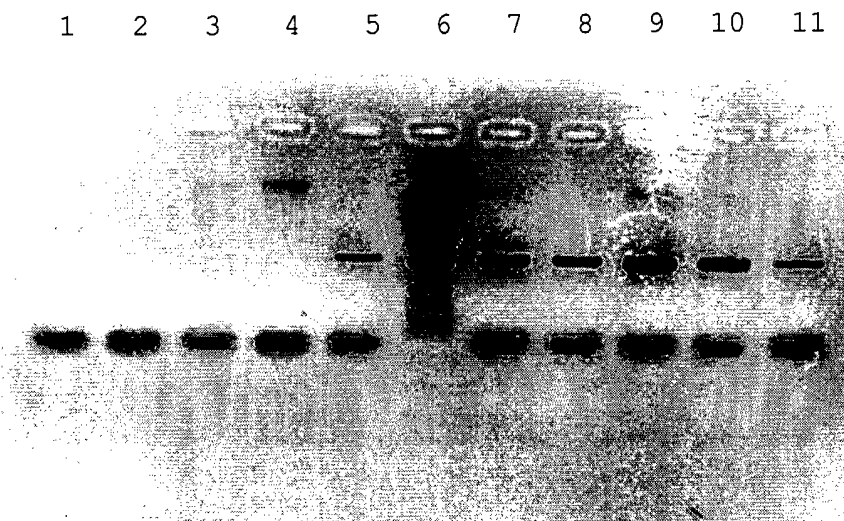


FIGURE 3

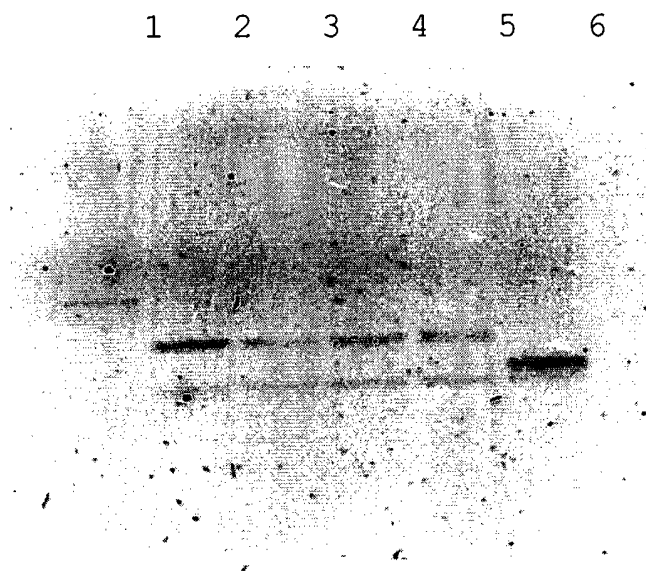


FIGURE 4