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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
9 février 2006 (09.02.2006)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/013281 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/001722

(22) Date de dépôt international : 5 juillet 2005 (05.07.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0407447 5 juillet 2004 (05.07.2004) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE** [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cédex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **MAUREL, Christophe** [FR/FR]; 22, rue du Mont Fleuri, F-34980 Saint-Gery du Fesc (FR). **VANDER, Wilinger, Clare** [ZA/ZA]; Molecular and Cell Biology Department, University, of Cape Town, Private Bag, 7701 Rondebosch (ZA). **LUU, Doan-Trung** [FR/FR]; 11, rue du Roc de Pézenas, F-34070 Montpellier (FR).

(74) Mandataires : **DEMACHY, Charles** etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
— *avec rapport de recherche internationale*
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

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.

(54) **Title:** USE OF NUCLEOTIDE SEQUENCES TO OBTAIN SEEDS WITH INCREASED GERMINATING CAPACITY UNDER HYPOXIC CONDITION

(54) **Titre :** UTILISATION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR L'OBTENTION DE SEMENCES DONT LA CAPACITE DE GERMINATION EN SITUATION D'HYPOXIE EST ACCRUE

(57) **Abstract:** The invention concerns the use of nucleotide sequences encoding an aquaporin with pH-dependent permeability in plants, whereof the proton perception site has been activated by mutation, to transform plants for preparing seeds with increased germinating capacity under hypoxic condition.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne l'utilisation de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation, pour la transformation de plantes en vue de la préparation de semences dont la capacité de germination en situation d'hypoxie est accrue.

WO 2006/013281 A1

UTILISATION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR L'OBTENTION DE SEMENCES DONT LA CAPACITE DE GERMINATION EN SITUATION D'HYPOXIE EST ACCRUE

La présente invention concerne l'utilisation de séquences nucléotidiques pour l'obtention de semences dont la capacité de germination en situation d'hypoxie est accrue.

Lors des premières étapes de la germination, les semences peuvent subir des situations d'hypoxie. Dans ces conditions, l'apport en oxygène n'est pas suffisant pour satisfaire la consommation métabolique de semences, et la germination s'en trouve ralentie (Veselova *et al.*, 2003, et références citées).

Ainsi, dans le cadre de cultures irriguées (horticoles ou maraîchères) un arrosage irrégulier peut, localement dans une culture, induire une inondation du substrat, créant en conséquence une hypoxie, et un retard de germination, ce qui aboutit à une germination non coordonnée des semences (Vartapetian et Jackson, 1997 ; Veselova *et al.*, 2003, et références citées).

De plus, dans d'autres cas, si un tassage du sol a lieu, ponctuellement après semis, ce phénomène peut également être un facteur d'hypoxie créant une hétérogénéité de culture (Vartapetian et Jackson, 1997).

Enfin, chez certaines espèces de plantes, le tégument de la graine reste relativement hermétique ce qui peut créer une hypoxie chez les semences en germination à forte activité métabolique et provoquer un défaut de germination, voir même un endommagement des semences (Veselova *et al.*, 2003).

Les aquaporines sont des protéines de la membrane plasmique favorisant la diffusion de l'eau à travers la membrane, que l'on retrouve tant chez les plantes que chez les animaux. L'activité de certaines de ces aquaporines, c'est-à-dire leur perméabilité à l'eau, peut être modulée en fonction du pH intracellulaire. Une partie de la protéine, en général extramembranaire, est responsable de la perception du pH et de l'ouverture ou de la fermeture de l'aquaporine qui en découle. Ainsi dans le cas des Protéines Intrinsèques de la membrane Plasmique (PIP), qui sont des aquaporines de plantes (Maurel *et al.*, 2002), une boucle intracellulaire, nommée boucle D, semble être responsable de la perception du pH intracellulaire, et provoque la fermeture de l'aquaporine lorsque le pH est inférieur à 7 (Tournaire-Roux *et al.*, 2003).

Un objet de l'invention est donc de fournir des semences génétiquement modifiées dont les capacités de germination en situation d'hypoxie sont accrues, ainsi que leur mode d'obtention.

A ce titre, la présente invention concerne l'utilisation de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation, pour la transformation de plantes en vue de la préparation de semences dont la capacité de germination en situation d'hypoxie est accrue.

Le site de perception du pH est défini comme étant une partie de la séquence des aquaporines, pour laquelle certaines mutations provoquent l'arrêt de la fonction de perméabilité dépendante du pH desdites aquaporines, tout en maintenant une perméabilité à l'eau essentiellement constante.

La perméabilité des aquaporines peut être mesurée comme décrit dans Tournaire-Roux *et al.* (2003).

On désigne par « mutation », la suppression, la substitution ou l'insertion d'au moins un acide aminé.

Selon l'invention, l'expression « semences dont la capacité de germination en situation d'hypoxie est accrue » signifie que lesdites semences germent plus rapidement en situation d'hypoxie que les semences correspondantes n'ayant pas été transformées selon l'invention, dans les mêmes conditions. En particulier, les semences génétiquement modifiées selon l'invention germent au moins environ 1 heure, en particulier au moins environ 5 heures, et plus particulièrement au moins environ 12 heures, avant les semences correspondantes non-modifiées, dans le test de germination en situation d'hypoxie décrit en exemple.

En particulier, le test de germination en situation d'hypoxie peut être mis en oeuvre comme suit. Les semences sont placées dans une solution nutritive essentiellement dépourvue d'O_2, puis leur germination est évaluée à intervalles de temps réguliers, notamment à l'oeil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire, comme étant l'émergence apparente d'une radicule à partir de l'enveloppe de la semence.

La solution nutritive peut être par exemple une solution ABIS [5 mM KNO_3, 2 mM $MgSO_4$, 1 mM $Ca(NO_3)_2$, 50 μM Fe-EDTA, micro-éléments tels que décrits par Murashige & Skoog (1962), 10 g L^{-1} saccharose, 7 g L^{-1} agar, 1 mM MES, et 2,5 mM K_2HPO_4+KH_2PO_4, pH 6,1] dans laquelle la concentration d'agar est réduite à 0,1%. L'oxygène dissous est évacué de la solution nutritive, par exemple à l'aide d'un flux d'azote gazeux pendant environ 1 h en conditions stériles, éventuellement après autoclavage et refroidissement sous agitation de la solution nutritive, pour obtenir une solution essentiellement dépourvue d'oxygène, c'est-

à-dire, en particulier, une solution dont la concentration d'O_2 est d'environ 0,5%. La concentration d'O_2 peut être mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène WTW Oxi 330 Bioblock Scientific (Weilheim, Germany, Cell Ox 325). La solution est ensuite immédiatement transférée en tubes, tels que des tubes de micro-centrifugation de 1,5 mL, dans lesquels plusieurs semences sèches, notamment environ 10, sont placées, puis les tubes sont scellés de manière hermétique.

Selon l'invention, dans une plante ou une semence, une situation d'hypoxie entraîne une diminution du pH cytosolique. En temps normal, cette diminution du pH cytosolique entraîne une diminution de la perméabilité à l'eau des aquaporines à perméabilité dépendante du pH. Dans le cas d'une semence, la diminution de la perméabilité à l'eau a pour conséquence de retarder la germination.

Les méthodes de transformation de végétaux sont bien connues de l'homme de l'art, on peut citer à titre d'exemple la méthode dite de trempage d'inflorescence décrite par Clough et Bent (1998).

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine du type protéine intrinsèque de la membrane plasmique (PIP), dont la boucle D comprise entre les domaines transmembranaires 4 et 5, correspondant au site de perception des protons, a été modifiée par la substitution, la délétion ou l'ajout d'au moins un acide aminé, ladite boucle D étant comprise entre les acides aminés 180 à 220 des séquences d'aquaporines PIP et étant délimitée du côté N-terminal par le triplet Ser-Ala-Thr et du côté C-terminal par le triplet Val-Pro-Ile/Val.

La perméabilité des PIP varie avec le pH cytosolique. Lorsque le pH cytosolique diminue, en particulier lorsque il est inférieur à 7, la perméabilité des PIP diminue, jusqu'à devenir essentiellement nulle pour des pH cytosoliques inférieurs à 6.

La boucle D des PIP est notamment décrite par Tournaire-Roux *et al.* (2003). Une représentation de la boucle D est également donnée dans la Figure 2. La modification de cette boucle D entraîne une diminution de la perception des variations du pH des PIP qui portent cette boucle D modifiée, c'est-à-dire que la diminution de la perméabilité des PIP portant une boucle D modifiée est inférieure à ce qu'elle est pour les PIP normales.

En règle générale, cette boucle se situe entre les acides aminés 180 à 220 dans la séquence peptidique des aquaporines PIP. Cette boucle est extrêmement bien conservée chez les plantes comme le montre l'alignement de séquence présenté dans la Figure 3. Il est donc aisé pour l'homme de l'art de l'identifier dans une séquence d'aquaporine. De plus, de

manière constante, elle est encadrée par un triplet Ser-Ala-Thr du côté N-teminal et Val-Pro-Ile/Val du côté C-terminal. Ile/Val signifie que le troisième acide aminé de ce triplet peut être soit une isoleucine, soit une valine.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP dont la boucle D est homologue à la séquence s'étendant des acide aminés 185 à 200 de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO : 5).

Il est aisé pour l'homme de l'art d'identifier une séquence d'aquaporine PIP homologue à la séquence s'étendant des acides aminés 185 à 200 de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, ladite séquence d'aquaporine PIP est dite homologue à la séquence s'étendant des acides aminés 185 à 200 de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, si elle s'aligne avec celle-ci lorsqu'on réalise un alignement de séquence selon les méthodes de l'art. En particulier, un tel alignement peut être réalisé à l'aide d'un logiciel du type Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), bien connu de l'homme de l'art.

Un exemple d'une telle identification de séquences homologues à la séquence s'étendant des acide aminés 185 à 200 de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* est donné dans la Figure 3 (les séquences homologues y sont encadrées).

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont l'acide aminé His de la boucle D est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg, et plus particulièrement par Asp.

La boucle D des aquaporines PIP ne comprend qu'une seule His, il est donc aisé de l'identifier. La modification de cet unique acide aminé conduit à l'obtention d'aquaporines PIP essentiellement insensibles au pH cytosolique et à l'obtention de semences dont la germination est moins affectée que la normale par des conditions d'hypoxie.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont l'acide aminé His de la boucle D, correspondant à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg et plus particulièrement par Asp.

Un alignement de séquence tel que décrit ci-dessus permet d'identifier facilement l'His correspondant à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*.

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés du dipeptide Arg-Asp de la boucle D, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala, Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala, à chacune des deux positions.

La boucle D des PIP ne porte qu'un seul doublet Arg-Asp, il est donc facile de l'identifier. Les modifications décrites ci-dessus de ces deux acides aminés permettent d'obtenir des protéines PIP dont la sensibilité au pH est diminuée, et donc des semences dont la capacité de germination en conditions d'hypoxie est accrue.

Selon un autre mode de réalisation préféré, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala, Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala, à chacune des deux positions.

L'identification du doublet Arg-Asp correspondant au doublet Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* peut être identifié aisément par un alignement de séquence.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont :

- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Arg d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, ou
- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Asp d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment

au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala.

Avantageusement, les doubles mutations décrites ci-dessus renforcent l'insensibilité au pH des aquaporines PIP double mutées par rapport aux aquaporines possédant une simple mutation d'un des deux acides aminés du couple Arg-Asp.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant au moins une des modifications suivantes :

- substitution de la Ser correspondant à la Ser_{185} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel qu'une Pro ;
- substitution de l'Asp correspondant à l'Asp_{188} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Lys ou Arg ;
- substitution de la Lys correspondant à la Lys_{190} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu ;
- substitution de l'Arg correspondant à l'Arg_{191} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu.

Les modifications des acides aminés décrits ci-dessus permettent d'obtenir des protéines PIP dont la sensibilité au pH est diminuée, et donc des semences dont la capacité de germination en conditions d'hypoxie est accrue. L'identification des acides aminés correspondant aux acides aminés de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* peut être réalisée aisément par un alignement de séquence, comme cela est décrit précédemment.

La présente invention concerne également, l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant la séquence suivante :

$$LVYTVFX_1ATX_2X_3X_4X_5X_6AX_7X_8X_9X_{10}VPX_{11}LAPL \qquad (1)\ (SEQ\ ID\ NO : 1)$$

dans laquelle : - X_1 représente un acide aminé quelconque,
- X_2 représente un acide aminé quelconque,
- X_3 représente P ou A,
- X_4 représente un acide aminé quelconque,
- X_5 représente un acide aminé quelconque,

- X_6 représente I, S ou N,
- X_7 représente un acide aminé quelconque,
- X_8 représente un acide aminé quelconque,
- X_9 représente P ou S,
- X_{10} représente un acide aminé quelconque,
- X_{11} représente V ou I,

sous réserve qu'au moins une des conditions suivantes soit remplie :

- X_1 représente un acide aminé différent de S, en particulier l'acide aminé P ;
- X_2 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K ;
- X_4 représente un acide aminé différent de K, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D ;
- X_5 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D
- X_7 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D, et plus particulièrement A ;
- X_8 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K, et plus particulièrement A ;
- X_{10} représente un acide aminé différent de H, en particulier un acide aminé choisi parmi K, R, A, E, ou D, et plus particulièrement D.

La position de la séquence (1) dans la séquence globale d'aquaporines PIP quelconques peut être identifiée de manière non équivoque grâce à la séquence LVYTVF qui est unique. L'ensemble de la séquence (1) recouvre la boucle D des aquaporines PIP qui est délimitée par les triplets X_1AT et VPX_{11}.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant la séquence (1), dans laquelle X_{10} représente D.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant la séquence (1), dans laquelle :

- X_{10} représente A, et
- X_7 représente A, et/ou
- X_8 représente A.

En particulier, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant l'une des séquences suivantes :

$LVYTVFSATDX_3KRX_6ARDX_9DVPX_{11}LAPL$ (SEQ ID NO : 2)

$LVYTVFSATDX_3KRX_6AADX_9AVPX_{11}LAPL$ (SEQ ID NO : 3)

$LVYTVFSATDX_3KRX_6ARAX_9AVPX_{11}LAPL$ (SEQ ID NO : 4)

dans lesquelles X_3, X_6, X_9 et X_{11} sont tels que définis ci-dessus, et notamment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7.

SEQ ID NO : 7 correspond à la séquence nucléotidique codant la protéine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* dans laquelle l'acide aminé H_{197} a été remplacé par un acide aminé D.

Avantageusement, SEQ ID NO : 7 peut être utilisée pour transformer des plants d'*Arabidopsis thaliana* ou de toute autre espèce végétale.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les plantes transformées sont choisies parmi les espèces suivantes : *Actinidia arguta, Actinidia deliciosa, Allium sativum, Apium graveolens, Arabidopsis thaliana, Avena sativa, Beta vulgaris, Brassica campestris, Brassica napus, Brassica rapa, Cicer arietinum, Cichorium endivia, Citrus limon, Citrus medica, Citrus paradisi, Coffea arabica, Cucumis sativus, Daucus carota, Glycine max, Gossypium hirsutum, Helianthus annuus, Hordeum vulgare, Lactuca spp, Linum usitatissimum, Lycopersicon esculentum, Malus sp., Medicago sativa, Nicotiana tabacum, Oriza sativa, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Prunus armeniaca, Prunus persica,, Raphanus sativus, Solanum melongena, Solanum tuberosum, Triticosecale species, Triticum aestivum, Vigna radiata, Zea mays.*

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention concerne l'utilisation telle que définie ci-dessus, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine, pour la transformation de plantes en vue de la préparation de semences dont :

- la capacité de germination en situation d'hypoxie est accrue, afin d'obtenir une germination essentiellement synchrone desdites semences d'une plante donnée lorsqu'elles sont mises en culture simultanément, notamment dans le cadre d'une germination sous irrigation et/ou en sol compact, et/ou
- la vitesse de germination est plus élevée que celle des semences correspondantes non transformées.

La présente invention concerne également, des plantes ou des semences génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence

nucléotidique codant pour une aquaporine à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation.

Ladite séquence nucléotidique codant pour une aquaporine à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation peut se trouver chez lesdites plantes ou semences, soit de manière épisomale, soit intégrée dans un des chromosomes du génome de la plante, en une ou plusieurs copies. La copie sauvage, c'est-à-dire non mutée, de ladite séquence nucléotidique codant pour une aquaporine à perméabilité dépendante du pH chez les plantes peut être présente dans le génome desdites plantes ou semences, ou bien absente.

Avantageusement, le site d'insertion de ladite séquence mutée dans le génome desdites plantes ou semences n'a pas d'effet sur la capacité desdites semences à germer dans des conditions d'hypoxie.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine du type protéine intrinsèque de la membrane plasmique (PIP), dont la boucle D comprise entre les domaines transmembranaires 4 et 5, correspondant au site de perception des protons, a été modifiée par la substitution, la délétion ou l'ajout d'au moins un acide aminé, ladite boucle D étant comprise entre les acides aminés 180 à 220 des séquences d'aquaporines PIP et étant délimité du côté N-terminal par le triplet Ser-Ala-Thr et du côté C-terminal par le triplet Val-Pro-Ile/Val.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP dont la boucle D est homologue à la séquence s'étendant des acide aminés 185 à 200 de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont l'acide aminé His de la boucle D est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg, et plus particulièrement par Asp.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont

l'acide aminé His de la boucle D, correspondant à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg, et plus particulièrement par Asp.

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés du dipeptide Arg-Asp de la boucle D, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala, Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala, à chacune des deux positions.

Selon un autre mode de réalisation préféré, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala, Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala à chacune des deux positions.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont :

- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Arg d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, ou
- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Asp d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP comprenant au moins une des modifications suivantes :

- substitution de la Ser correspondant à la Ser_{185} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel qu'une Pro ;
- substitution de l'Asp correspondant à l'Asp_{188} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Lys ou Arg ;
- substitution de la Lys correspondant à la Lys_{190} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu ;
- substitution de l'Arg correspondant à l'Arg_{191} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu.

La présente invention concerne également des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend la séquence suivante :

$$LVYTVFX_1ATX_2X_3X_4X_5X_6AX_7X_8X_9X_{10}VPX_{11}LAPL \qquad (1)\ (SEQ\ ID\ NO : 1)$$

dans laquelle : - X_1 représente un acide aminé quelconque,
- X_2 représente un acide aminé quelconque,
- X_3 représente P ou A,
- X_4 représente un acide aminé quelconque,
- X_5 représente un acide aminé quelconque,
- X_6 représente I, S ou N,
- X_7 représente un acide aminé quelconque,
- X_8 représente un acide aminé quelconque,
- X_9 représente P ou S,
- X_{10} représente un acide aminé quelconque,
- X_{11} représente V ou I,

sous réserve qu'au moins une des conditions suivantes soit remplie :

- X_1 représente un acide aminé différent de S, en particulier l'acide aminé P ;
- X_2 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K ;
- X_4 représente un acide aminé différent de K, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D ;
- X_5 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D
- X_7 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D, et plus particulièrement A ;
- X_8 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K, et plus particulièrement A ;
- X_{10} représente un acide aminé différent de H, en particulier un acide aminé choisi parmi K, R, A, E, ou D, et plus particulièrement D.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend la séquence (1), dans laquelle X_{10} représente D.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend la séquence (1), dans laquelle :

- X_{10} représente A, et
- X_7 représente A, et/ou
- X_8 représente A.

En particulier, l'invention concerne des plantes ou des semences génétiquement modifiées telles que définies ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend l'une des séquences suivantes :

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$ARDX$_9$DVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 2)

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$AADX$_9$AVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 3)

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$ARAX$_9$AVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 4)

dans lesquelles X_3, X_6, X_9 et X_{11} sont tels que définis ci-dessus, et notamment la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les plantes ou les semences génétiquement modifiées sont choisies parmi les espèces suivantes : *Actinidia arguta, Actinidia deliciosa, Allium sativum, Apium graveolens, Arabidopsis thaliana, Avena sativa, Beta vulgaris, Brassica campestris, Brassica napus, Brassica rapa, Cicer arietinum, Cichorium endivia, Citrus limon, Citrus medica, Citrus paradisi, Coffea arabica, Cucumis sativus, Daucus carota, Glycine max, Gossypium hirsutum, Helianthus annuus, Hordeum vulgare, Lactuca spp, Linum usitatissimum, Lycopersicon esculentum, Malus sp., Medicago sativa, Nicotiana tabacum, Oriza sativa, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Prunus armeniaca, Prunus persica,, Raphanus sativus, Solanum melongena, Solanum tuberosum, Triticosecale species, Triticum aestivum, Vigna radiata, Zea mays.*

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention concerne une méthode pour obtenir une germination essentiellement synchrone de semences de plantes d'une espèce donnée mises en culture simultanément, notamment dans le cadre d'une germination sous irrigation et/ou en sol compact, caractérisée en ce que sont mises en culture des semences telles que définies ci-dessus.

La présente invention concerne également les aquaporines à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation, telles que définies ci-dessus.

La présente invention concerne aussi les acides nucléiques codant pour les aquaporines à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation, telles que définies ci-dessus.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne également des vecteurs comprenant les acides nucléiques définis ci-dessus ainsi qu'éventuellement les éléments nécessaires à leur expression dans des cellules procaryotes et/ou eucaryotes, et notamment végétales.

Dans encore un autre mode de réalisation, la présente invention concerne les cellules procaryotes ou eucaryotes, notamment végétales, comprenant les vecteurs décrits ci-dessus.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1

La Figure 1 représente les effets d'un traitement anoxique sur la germination de semences transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant une aquaporine insensible aux protons cytosoliques.

Des plantes sauvages (WT) ou dont le gène originel *pip2;2* a été inactivé (KO) ont été transformées par un transgène sur-exprimant l'aquaporine sauvage PIP2;2 ou une forme mutante insensible au pH (PIP2;2pi). Pour chaque génotype, la germination des semences a été caractérisée en conditions normales et en conditions d'hypoxie, et le temps nécessaire pour observer 50% de germination des graines viables (t_{50RE}) a été mesuré dans chacune de ces conditions. Le graphe représente le retard de germination (axe des ordonnées, en jours), relatif à la condition contrôle, induit par un traitement anoxique des graines. Les barres représentent les déviations standard et les lettres (A, B) indiquent des valeurs statistiquement différentes.

Figure 2

La Figure 2 représente un schéma de la topologie membranaire des aquaporines de type Protéine Intrinsèque de la membrane Plasmique (PIP) chez les plantes. Le schéma représente les résidus His conservés chez les aquaporines PIP. Les numéros se rapportent à la position des résidus dans la séquence de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*. En comparaison des aquaporines du sous-groupe PIP2, les aquaporines PIP1 possèdent deux His supplémentaires (correspondant aux positions 160 et 240 de PIP2;2 et figurées en italique sur la figure). Les domaines transmembranaires (1-6) et les boucles extra- et intra-cytoplasmiques (*A-E*) sont dessinées par, respectivement, des rectangles gris et des lignes pleines.

Figure 3

Les séquences d'aquaporines PIP de blé (*Triticum aestivum ;* AAM00369, AAM00368), de riz (*Oryza sativa ;* CAA11896, AAC16545), de maïs (*Zea mays ;* CAC33802), et de *Samanea saman* (AAC17529, AAC17528) ont été alignées avec, pour référence, la séquence de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* (P43287). La figure montre la très grande conservation de la boucle D (encadrée), avec en particulier un résidu His (H ; en gras), ainsi que sa localisation, entre les acides aminés Ser_{185} et Val_{220} (pour *Arabidopsis thaliana*). Les étoiles représentent des positions pour lesquelles les résidus sont identiques pour chaque séquence, et les points les positions pour lesquelles les acides aminés possèdent des propriétés semblables.

EXEMPLE

Obtention de semences génétiquement modifiées exprimant une aquaporine PIP2;2 dont le site de perception des protons est non fonctionnel

1. Transformation des plantes

Le gène codant pour l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO : 5) sous sa forme sauvage ou mutante (PIP2;2pi) (SEQ ID NO :7), portant la mutation His en Asp en position 197 (H197D) (Tournaire-Roux *et al.*, 2003), a été exprimé de manière ectopique dans *Arabidopsis thaliana,* écotype Wassilewskija. Les ADNc de PIP2;2 et de PIP2;2pi ont été clonés dans un plasmide pGreenII 179 (Hellens *et al.*, 2000) sous le contrôle du promoteur *35S* dupliqués du virus de la mosaïque du chou-fleur, en amont de la région non traduite de l'ADNc *rbcS-E9* du pois. Des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) transformées avec la construction pGreenII 179 ont été utilisées pour la transformation de plants d'*Arabidopsis* par trempage d'inflorescence en présence de Silwet L-77 0,05% (Lehle Seeds, USA), essentiellement comme décrit par Clough et Bent (1998). Des plants d'*A. thaliana* soit de type sauvage (WT) soit portant une insertion d'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* dans le gène *pip2;2* (lignée *pip2;2-1* désignée dans la suite KO; Javot *et al.* 2003) ont été utilisés pour ces transformations. Les transformants primaires (T1) ont été sélectionnés en présence d'hygromycine 50 mg L^{-1} puis ont été croisés entre-eux pour identifier les plants donnant une descendance ayant une résistance aux herbicides de type mendélien à locus unique (3 : 1). Les transformants vraisemblablement homozygotes, c'est à dire les plants de T2 dont la descendance était complètement résistante à l'hygromycine, ont été sélectionnés pour une amplification de semences. L'expression ectopique de PIP2;2 ou de PIP2;2pi a été confirmée par analyse en marquage de Western sur des extraits bruts de feuilles. Les lignées WT ou KO d'origine, ou les mêmes lignées mais exprimant PIP2;2 (désignées WT(PIP2;2) ou KO(PIP2;2), respectivement, dans la suite) ou PIP2;2pi (désignées WT(PIP2;2pi) ou KO(PIP2;2pi), respectivement, dans la suite) ont été utilisées dans cette étude. Dans toutes les expériences, et pour chaque génotype étudié, les semences provenant d'au moins trois lignées transformées indépendantes ont été utilisées. Les semences utilisées pour la plupart des expériences, en particulier celles pour lesquelles la vitesse de germination a été comparée entre les lignées, ont été obtenues à partir de plantes cultivées en parallèle sous des conditions environnementales identiques.

2. Tests de germinations

Les semences ont été stérilisées en surface dans une solution 86% éthanol, 3,4 g L^{-1} Bayroclore (Bayrol, France), 0,0002% Clean N (Colgate-Palmolive) pendant 6 min, rincées abondamment avec de l'eau stérile puis déposées dans des boites de polystyrène transparentes (12 x 12 cm) sur un milieu nutritif standard [ABIS: 5 mM KNO_3, 2 mM $MgSO_4$, 1 mM $Ca(NO_3)_2$, 50 μM Fe-EDTA, micro-éléments tels que décrits par Murashige & Skoog (1962), 10 g L^{-1} saccharose, 7 g L^{-1} agar, 1 mM MES, et 2,5 mM K_2HPO_4+KH_2PO_4, pH 6,1]. Les boites, contenant 4 lignes de semences en rangs avec >80 semences par lignes, ont été scellées à l'aide d'un film imperméable à l'air, laissées à 4°C à l'obscurité pendant 48 h, puis transférées en pièce de culture à 25 ± 2°C sous un cycle 16-h-lumière-(100-120 μmol m^{-2} s^{-1})/8-h-obscurité

La germination des semences a été évaluée à intervalles de temps réguliers, soit à l'oeil nu soit à l'aide d'une loupe binoculaire, comme étant l'émergence apparente d'une radicule à partir de l'enveloppe de la semence, jusqu'à ce que plus aucune semence d'une même boite ne germe sur une période de 24 h. Les courbes de germination, représentant le pourcentage cumulé de radicules ayant émergé au cours du temps pour plus de 80 semences, ont été ajustée par une fonction sigmoïde de Weibull (Brown et Mayer, 1989) à l'aide du logiciel Sigma Plot (SPSS Science). Les courbes ajustées ont été utilisées pour estimer t_{50RE}, le temps nécessaire à l'émergence des radicules pour la moitié des semences viables, c'est à dire pour les semences qui ont finalement germé. Les lots de semences ayant un pourcentage final de germination inférieur à 90% ont été évacués.

Les germinations en conditions hypoxiques ont été réalisées dans une solution ABIS dans laquelle la concentration d'agar a été réduite à 0,1%. Brièvement, la solution autoclavée a été refroidie sous agitation puis mise sous flux d'azote gazeux pendant environ 1 h en conditions stériles. La concentration d'O_2, mesurée à l'aide d'une electrode à oxygène WTW Oxi 330 Bioblock Scientific (Weilheim, Germany, Cell Ox 325), a été évaluée à 0.5%. La solution a été immédiatement transférée en tubes de micro-centrifugation de 1,5 mL, dans lesquels environ 10 semences sèches ont été placées, puis les tubes ont été scellés de manière hermétique. Pour chaque lot de semences et chaque expérience d'hypoxie, trois tubes de micro-centrifugation ont été pris en considération.

3. Résultats

Les résultats obtenus sont portés dans la **Figure 1**. Dans les conditions testées, l'hypoxie retarde d'environ 36 heures la germination de graines d'*Arabidopsis thaliana.* L'expression de l'aquaporine PIP2;2pi avance d'au moins 12 heures la réponse de germination. Cet effet est observé pour des plantes transgéniques exprimant PIP2;2pi dans un fond génétique sauvage (WT) ou dans des plantes dont le gène *pip2;2* a été inactivé par insertion d'un transgène (KO). Par contre, des plantes transgéniques, exprimant dans les mêmes fonds génétiques, l'aquaporine PIP2;2 non mutée, ne voient pas leur capacité de germination modifiée. Ce résultat établit la spécificité du procédé de l'invention et démontre donc l'intérêt d'utiliser une aquaporine mutée sur son site de perception du pH intracellulaire.

REFERENCES

Brown RF, Mayer DG (1988) Representing cumulative germination. 2. The use of Weibull function and other empirically derived curves. *Annals Bot.* 61: 127-138

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-43

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol.* 42: 819-832.

Javot H, V Lauvergeat, V Santoni, F Martin-Laurent, J Güçlü, J Vinh, J Heyes, KI Franck, AR Schäffner, D Bouchez, C Maurel (2003) Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* 15: 509-522.

Maurel C, H Javot, V Lauvergeat, P Gerbeau, C Tournaire, V Santoni, J Heyes (2002) Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int. Rev. Cytol.*, 215: 105-148.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Tournaire-Roux C, M Sutka, H Javot, E Gout, P Gerbeau, D-T Luu, R Bligny, C Maurel (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425: 393-397.

Vartapetian, B. B. & Jackson, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress. *Ann. Bot.* 79 (Suppl. A): 3-20 (1997)

Veselova TV, Veselovskii VA, Usmanov PD, Usmanova OV, Kozar VI (2003) Hypoxia and inhibition injuries in aging seeds. *Russ. J. Plant Physiol.* 50: 835-842

REVENDICATIONS

1. Utilisation de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation, pour la transformation de plantes en vue de la préparation de semences dont la capacité de germination en situation d'hypoxie est accrue.

2. Utilisation selon la revendication 1, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine du type protéine intrinsèque de la membrane plasmique (PIP), dont la boucle D comprise entre les domaines transmembranaires 4 et 5, correspondant au site de perception des protons, a été modifiée par la substitution, la délétion ou l'ajout d'au moins un acide aminé, ladite boucle D étant comprise entre les acides aminés 180 à 220 des séquences d'aquaporines PIP et étant délimitée du côté N-terminal par le triplet Ser-Ala-Thr et du côté C-terminal par le triplet Val-Pro-Ile/Val.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP dont la boucle D est homologue à la séquence s'étendant des acide aminés 185 à 200 de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO : 5)

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont l'acide aminé His de la boucle D est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg, et plus particulièrement par Asp.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont l'acide aminé His de la boucle D, correspondant à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg et plus particulièrement par Asp.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés du dipeptide Arg-Asp de la boucle D, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala,

Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala, à chacune des deux positions.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala, Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala, à chacune des deux positions.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, dont :
- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Arg d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, ou
- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Asp d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala.

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant au moins une des modifications suivantes :
- substitution de la Ser correspondant à la Ser_{185} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel qu'une Pro ;
- substitution de l'Asp correspondant à l'Asp_{188} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Lys ou Arg ;
- substitution de la Lys correspondant à la Lys_{190} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu ;

substitution de l'Arg correspondant à l'Arg_{191} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu.

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant la séquence suivante :

$LVYTVFX_1ATX_2X_3X_4X_5X_6AX_7X_8X_9X_{10}VPX_{11}LAPL$ (1) (SEQ ID NO : 1)

dans laquelle : - X_1 représente un acide aminé quelconque,
- X_2 représente un acide aminé quelconque,
- X_3 représente P ou A,
- X_4 représente un acide aminé quelconque,
- X_5 représente un acide aminé quelconque,
- X_6 représente I, S ou N,
- X_7 représente un acide aminé quelconque,
- X_8 représente un acide aminé quelconque,
- X_9 représente P ou S,
- X_{10} représente un acide aminé quelconque,
- X_{11} représente V ou I,

sous réserve qu'au moins une des conditions suivantes soit remplie :

- X_1 représente un acide aminé différent de S, en particulier l'acide aminé P ;
- X_2 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K ;
- X_4 représente un acide aminé différent de K, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D ;
- X_5 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D
- X_7 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D, et plus particulièrement A ;
- X_8 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K, et plus particulièrement A ;
- X_{10} représente un acide aminé différent de H, en particulier un acide aminé choisi parmi K, R, A, E, ou D, et plus particulièrement D.

11. Utilisation selon la revendication 10, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant la séquence (1), dans laquelle X_{10} représente D.

12. Utilisation selon la revendication 10, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant la séquence (1), dans laquelle :
- X_{10} représente A, et
- X_7 représente A, et/ou
- X_8 représente A.

13. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 12, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine PIP, comprenant l'une des séquences suivantes :

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$ARDX$_9$DVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 2)

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$AADX$_9$AVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 3)

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$ARAX$_9$AVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 4)

dans lesquelles X_3, X_6, X_9 et X_{11} sont tels que définis dans la revendication 10, et notamment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7.

14. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 13, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine, pour la transformation de plantes choisies parmi les espèces suivantes : *Actinidia arguta, Actinidia deliciosa, Allium sativum, Apium graveolens, Arabidopsis thaliana, Avena sativa, Beta vulgaris, Brassica campestris, Brassica napus, Brassica rapa, Cicer arietinum, Cichorium endivia, Citrus limon, Citrus medica, Citrus paradisi, Coffea arabica, Cucumis sativus, Daucus carota, Glycine max, Gossypium hirsutum, Helianthus annuus, Hordeum vulgare, Lactuca spp, Linum usitatissimum, Lycopersicon esculentum, Malus sp., Medicago sativa, Nicotiana tabacum, Oriza sativa, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Prunus armeniaca, Prunus persica,, Raphanus sativus, Solanum melongena, Solanum tuberosum, Triticosecale species, Triticum aestivum, Vigna radiata, Zea mays.*

15. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 14, de séquences nucléotidiques codant pour une aquaporine, pour la transformation de plantes en vue de la préparation de semences dont :

- la capacité de germination en situation d'hypoxie est accrue, afin d'obtenir une germination essentiellement synchrone desdites semences d'une plante donnée lorsqu'elles sont mises en culture simultanément, notamment dans le cadre d'une germination sous irrigation et/ou en sol compact, et/ou

- la vitesse de germination est plus élevée que celle des semences correspondantes non transformées.

16. Plantes ou semences génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine à perméabilité dépendante du pH chez les plantes, dont le site de perception des protons a été inactivé par mutation.

17. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon la revendication 16, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine du type protéine intrinsèque de la membrane plasmique (PIP), dont la boucle D comprise entre les domaines transmembranaires 4 et 5, correspondant au site de perception des protons, a été modifiée par la substitution, la délétion ou l'ajout d'au moins un acide aminé, ladite boucle D étant comprise entre les acides aminés 180 à 220 des séquences d'aquaporines PIP et étant délimité du côté N-terminal par le triplet Ser-Ala-Thr et du côté C-terminal par le triplet Val-Pro-Ile/Val.

18. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon la revendication 16 ou 17, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP dont la boucle D est homologue à la séquence s'étendant des acide aminés 185 à 200 de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana.*

19. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont l'acide aminé His de la boucle D est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg, et plus particulièrement par Asp.

20. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 19, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont l'acide aminé His de la boucle D, correspondant à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Asp, Glu, Ala, Lys, Arg, et plus particulièrement par Asp.

21. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 20, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés du dipeptide Arg-Asp de la boucle D, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala, Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala à chacune des deux positions.

22. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 21, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont au moins un des acides aminés d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un autre acide aminé, en particulier par un acide aminé choisi parmi Ala, Asp, Glu pour l'acide aminé Arg, et parmi Ala, Arg, Lys pour l'acide aminé Asp, et plus particulièrement par l'acide aminé Ala à chacune des deux positions.

23. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 22, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, dont :

- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Arg d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, ou
- un acide aminé His de la boucle D, correspondant notamment à l'His_{197} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala, et l'acide aminé Asp d'un dipeptide Arg-Asp de la boucle D, correspondant notamment au dipeptide Arg_{194}-Asp_{195} de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana*, est substitué par un acide aminé Ala.

24. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 23, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP comprenant au moins une des modifications suivantes :

- substitution de la Ser correspondant à la Ser_{185} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel qu'une Pro ;

- substitution de l'Asp correspondant à l'Asp_{188} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Lys ou Arg ;
- substitution de la Lys correspondant à la Lys_{190} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu ;
- substitution de l'Arg correspondant à l'Arg_{191} de la séquence peptidique de l'aquaporine PIP2;2 d'*Arabidopsis thaliana* par un autre acide aminé, tel que Ala, Asp ou Glu.

25. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend la séquence suivante :

$LVYTVFX_1ATX_2X_3X_4X_5X_6AX_7X_8X_9X_{10}VPX_{11}LAPL$ (1) (SEQ ID NO : 1)

dans laquelle : - X_1 représente un acide aminé quelconque,
- X_2 représente un acide aminé quelconque,
- X_3 représente P ou A,
- X_4 représente un acide aminé quelconque,
- X_5 représente un acide aminé quelconque,
- X_6 représente I, S ou N,
- X_7 représente un acide aminé quelconque,
- X_8 représente un acide aminé quelconque,
- X_9 représente P ou S,
- X_{10} représente un acide aminé quelconque,
- X_{11} représente V ou I,

sous réserve qu'au moins une des conditions suivantes soit remplie :

- X_1 représente un acide aminé différent de S, en particulier l'acide aminé P ;
- X_2 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K ;
- X_4 représente un acide aminé différent de K, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D ;

- X_5 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D
- X_7 représente un acide aminé différent de R, en particulier un acide aminé choisi parmi A, E, ou D, et plus particulièrement A ;
- X_8 représente un acide aminé différent de D, en particulier un acide aminé choisi parmi A, R ou K, et plus particulièrement A ;
- X_{10} représente un acide aminé différent de H, en particulier un acide aminé choisi parmi K, R, A, E, ou D, et plus particulièrement D.

26. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon la revendication 25, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend la séquence (1), dans laquelle X_{10} représente D.

27. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon la revendication 25, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend la séquence (1), dans laquelle :
- X_{10} représente A, et
- X_7 représente A, et/ou
- X_8 représente A.

28. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 25 à 27, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une séquence nucléotidique codant pour une aquaporine PIP, laquelle aquaporine comprend l'une des séquences suivantes :

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$ARDX$_9$DVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 2)

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$AADX$_9$AVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 3)

LVYTVFSATDX$_3$KRX$_6$ARAX$_9$AVPX$_{11}$LAPL (SEQ ID NO : 4)

dans lesquelles X_3, X_6, X_9 et X_{11} sont tels que définis dans la revendication 10, et notamment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 7.

29. Plantes ou semences génétiquement modifiées selon l'une des revendications 16 à 28, caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les espèces suivantes : *Actinidia arguta, Actinidia deliciosa, Allium sativum, Apium graveolens, Arabidopsis thaliana, Avena sativa, Beta vulgaris, Brassica campestris, Brassica napus, Brassica rapa, Cicer arietinum, Cichorium endivia, Citrus limon, Citrus medica, Citrus paradisi, Coffea arabica, Cucumis*

sativus, Daucus carota, Glycine max, Gossypium hirsutum, Helianthus annuus, Hordeum vulgare, Lactuca spp, Linum usitatissimum, Lycopersicon esculentum, Malus sp., Medicago sativa, Nicotiana tabacum, Oriza sativa, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Prunus armeniaca, Prunus persica,, Raphanus sativus, Solanum melongena, Solanum tuberosum, Triticosecale species, Triticum aestivum, Vigna radiata, Zea mays.

30. Méthode pour obtenir une germination essentiellement synchrone de semences de plantes d'une espèce donnée mises en culture simultanément, notamment dans le cadre d'une germination sous irrigation et/ou en sol compact, caractérisée en ce que sont mises en culture des semences selon l'une des revendications 16 à 29.

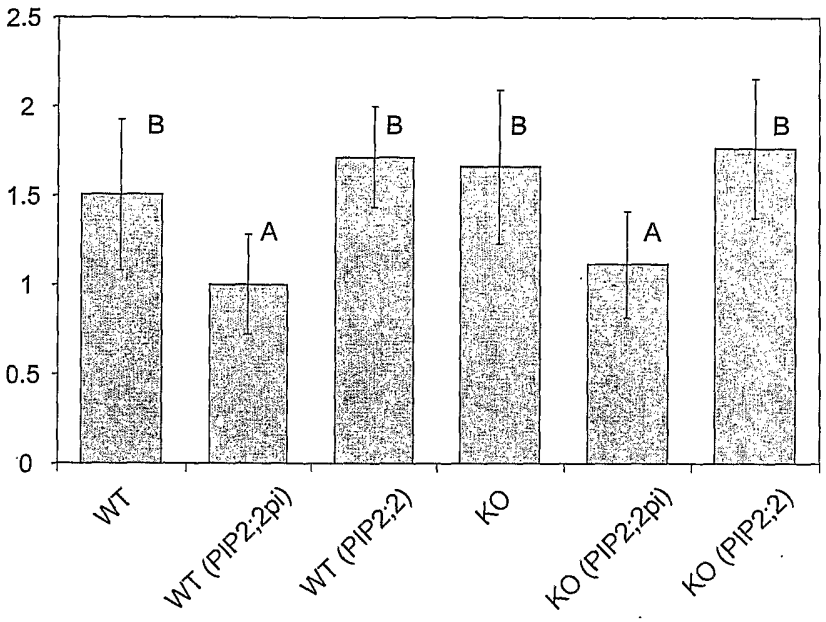


Figure 1

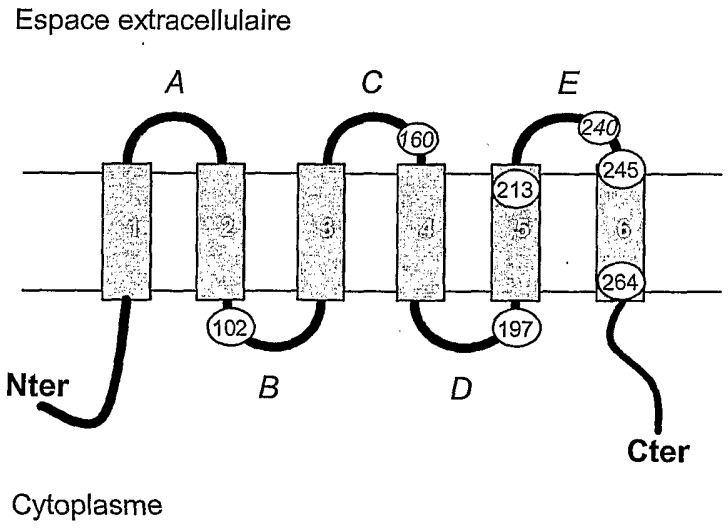


Figure 2

```
CAA11896        MEGKEEDVRLGANRYSERQPIGTAAQGAGDD-KDYKEPPPAPLFEPGELKSWSFYRAGIA
CAC33802        MEGKEEDVRLGANRYSERQPIGTAAQGTEE--KDYKEPPPAPLFEAEELTSWSFYRAGIA
AAM00368        MEGKEEDVRLGANRYSEHQPIGTAAQGGGADKKDYKEPPPAPFFEAGELTSWSFYRAGIA
AAC17528        MEGKEQDVSLGANKFSERQPIGTAAQSQDDG-KDYQEPPPAPLFEPSELTSWSFYRAGIA
AAC17529        -----------------MAKDVEVAERGSYSAKDYHDPPPAPLIDAEELGKWSFYRALIA
AAC16545        --------------MGKDEVMESGGAAGEFAAKDYTDPPPAPLIDAAELGSWSLYRAVIA
AAM00369        ---------------------MDNEVISNGSAKDYLDPPPAPLVDAGDLGKWSLYRAVIA
P43287          -----------------MAKDVEGPE--GFQTRDYEDPPPTPFFDADELTKWSLYRAVIA
                                            :** :***:*:.:. :* .**:*** **

CAA11896        EFVATFLFLYITILTVMGVS--------KSSSKCATVGIQGIAWSFGGMIFALVYCTAGI
CAC33802        EFVATFLFLYISILTVMGVS--------KSSSKCATVGIQGIAWSFGGMIFALVYCTAGI
AAM00368        EFLATFLFLYISVLTVMGVVG------NPSGSKCGTVGIQGIAWSFGGMIFVLVYCTAGI
AAC17528        EFVATFLFLYITILTVMGVS--------RSDSKCKTVGIQGIAWAFGGMIFALVYCTAGI
AAC17529        EFIATLLFLYITVLTVIGYKSQSDTKAG--GDVCGGVGILGIAWAFGGMIFILVYCTAGI
AAC16545        EFIATLLFLYITVATVIGYKHQTDASASGADAACGGVGVLGISWAFGGMIFILVYCTAGI
AAM00369        EFTATLLFVYVAVATVVGHKRQTDAQACS------GAGVLGIAWAFGGMIAVLVYCTAGI
P43287          EFVATLLFLYITVLTVIGYKIQSDTKAG--GVDCGGVGILGIAWAFGGMIFILVYCTAGI
                ** **:**:*::: **:*                  .*: **:*:*****  ********

CAA11896        SGGHINPAVTFGLFLARKLSLTRAIFYIVMQCLGAICGAGVVKGFQQG-LYMGNGGGANV
CAC33802        SGGHINPAVTFGLFLARKLSLTRALFYMVMQCLGAICGAGVVKGFQEG-LYMGAGGGANA
AAM00368        SGGHINPAVTFGLFLARKLSLTRAVFYIVMQCLGAICGAGVVKGFQTT-LYQGNGGGANS
AAC17528        SGGHINPAVTFGLFLGRKLSLTRTIFYIVMQCLGAICGAGVVKGFEGKKLYGDNGGGVNY
AAC17529        SGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAILYMVAQCLGAICGVGLVKAFQK-AYYSRYGGGANT
AAC16545        SGGHINPAVTFGLFLARKVSLVRAILYIVAQCLGAICGVGLVNAFPN-AYFNRYGGGANT
AAM00369        SGGHINPAVTFGLLLARKVSLPRAFLYMVAQCVGAICGAALVRAVHGGHQYVLYGGGANE
P43287          SGGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMVAQCLGAICGVGFVKAFQS-SYYDRYGGGANS
                **************:*.**:** *:.:*:* **:*****...*...     :   ***.*

CAA11896        VASGYTKGDGLGAEIVGTFILVYTVFSATDAKRNARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATI
CAC33802        VNPGYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATI
AAM00368        VAPGYTKGDGLGAEIVGTFVLVYTVFSATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATI
AAC17528        VHSGYTKGDGLGAEIVGTFILVYTVFSATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLVHLATI
AAC17529        LSDGYSTGTGLGAEIIGTFVLVYTVFSATDPKRSARDSHVPVLAPLPIGFAVFMVHLATI
AAC16545        LAAGYSKGTGLAAEIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDSHVPVLAPLPIGFAVFMVHLATI
AAM00369        LAPGYSRTAGLIAEIAGTFVLVYTVFSATDPKRIARDPHVPVLAPLLIGFAVLMAHLATI
P43287          LADGYNTGTGLAAEIIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDSHVPVLAPLPIGFAVFMVHLATI
                :  **.   ** *** ***:**********.** ***.***:**** *****::.*****
                                        185  Boucle D  220

CAA11896        PITGTGINPARSLGAAIIYNKDHAWNDHWIFWVGPFVGAALAAIYHQVIIRAIPFKSRS-
CAC33802        PITGTGINPARSLGAAIVYNRSHAWNDHWIFWVGPFIGAALAAIYHVVIIRALPFKSRD-
AAM00368        PITGTGINPARSLGAAIIYNKKQAWDDHWIFWVGPFIGAALAAIYHVVVIRAIPFKSRD-
AAC17528        PITGTGINPARSLGAAIIFNKHLGWHEHWVFWVGPFIGAALAALYHVVVIRAIPFKSK--
AAC17529        PVTGTGINPARSLGAAVIFNQQKAWDDHWIFWVGPFIGAAIAAFYHQFILRAGAAKALGS
AAC16545        PITGTGINPARSIGAAVIFNNEKAWHNHWIFWVGPFVGAAIAAFYHQYILRAGAIKALGS
AAM00369        PVTGTGINPARSFGAAVVYNGGKAWDDQWIFWVGPFIGAAVATVYHQYILRNSAIFRSNY
P43287          PITGTGINPARSFGAAVIYNKSKPWDDHWIFWVGPFIGAAIAAFYHQFVLRASGSKSLGS
                *:**********:***:::*    *.::*:******:***:*:.**  ::*

CAA11896        -------
CAC33802        -------
AAM00368        -------
AAC17528        -------
AAC17529        FRSNPSV
AAC16545        FRSNA--
AAM00369        DASV---
P43287          FRSAANV
```

Figure 3

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

<120> UTILISATION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR L'OBTENTION DE SEMENCES DONT LA CAPACITE DE GERMINATION EN SITUATION D'HYPOXIE EST ACCRUE

<130> WOB 04 BX INR AQUA

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 26
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence consensus d'aquaporines PIP mutées

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Acide aminé quelconque

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Acide aminé quelconque

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Pro ou Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Acide aminé quelconque

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Acide aminé quelconque

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Ile, Ser, ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Acide aminé quelconque

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)
<223> Acide aminé quelconque

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Pro ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Acide aminé quelconque

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Val ou Ile

<400> 1

Leu Val Tyr Thr Val Phe Xaa Ala Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Val Pro Xaa Leu Ala Pro Leu
20 25

<210> 2
<211> 26
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence consensus d'aquaporines PIP portant une mutation H D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Pro ou Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Ile, Ser, ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Pro ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Val ou Ile

<400> 2

Leu Val Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Xaa Lys Arg Xaa Ala Arg
1 5 10 15

Asp Xaa Asp Val Pro Xaa Leu Ala Pro Leu
20 25

<210> 3
<211> 26
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence consensus d'aquaporines PIP portant des mutations R A et H A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Pro ou Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Ile, Ser, ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Pro ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Val ou Ile

<400> 3

Leu Val Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Xaa Lys Arg Xaa Ala Ala
1 5 10 15

Asp Xaa Ala Val Pro Xaa Leu Ala Pro Leu
20 25

<210> 4
<211> 26
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence consensus d'aquaporines PIP portant des mutations D A et H A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Pro ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Ile, Ser, ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Pro ou Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Val ou Ile

<400> 4

Leu Val Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Xaa Lys Arg Xaa Ala Arg
1 5 10 15

Ala Xaa Ala Val Pro Xaa Leu Ala Pro Leu
20 25

<210> 5
<211> 855
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(855)
<223>

<400> 5
atg gcc aaa gac gtg gaa gga cct gag gga ttt cag aca aga gac tac 48
Met Ala Lys Asp Val Glu Gly Pro Glu Gly Phe Gln Thr Arg Asp Tyr
1 5 10 15

gaa gat ccg cca cca act ccg ttt ttc gat gcg gac gag ctt acc aag 96
Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Phe Phe Asp Ala Asp Glu Leu Thr Lys
20 25 30

tgg tct tta tac aga gcc gtc att gcc gag ttc gta gcc act ctc ctc 144
Trp Ser Leu Tyr Arg Ala Val Ile Ala Glu Phe Val Ala Thr Leu Leu
35 40 45

ttc ttg tac atc acc gtt ttg act gtt atc ggt tac aag att cag tcc 192
Phe Leu Tyr Ile Thr Val Leu Thr Val Ile Gly Tyr Lys Ile Gln Ser
50 55 60

gac aca aaa gtt ggt gga gtt gac tgt ggc ggt gtc gga atc ctt ggc 240
Asp Thr Lys Val Gly Gly Val Asp Cys Gly Gly Val Gly Ile Leu Gly
65 70 75 80

atc gcg tgg gct ttt ggt ggc atg atc ttc att ctt gtc tac tgc acc 288
Ile Ala Trp Ala Phe Gly Gly Met Ile Phe Ile Leu Val Tyr Cys Thr
85 90 95

```
gcc ggt atc tca ggt ggt cac ata aac ccg gcg gtg aca ttt ggt ttg      336
Ala Gly Ile Ser Gly Gly His Ile Asn Pro Ala Val Thr Phe Gly Leu
            100                 105                 110

ttc tta gcc cgg aag gtg tcg ctg att agg gcg gtg ctt tac atg gtg      384
Phe Leu Ala Arg Lys Val Ser Leu Ile Arg Ala Val Leu Tyr Met Val
        115                 120                 125

gct cag tgt ttg ggt gct att tgt gga gtt ggt ttc gtc aaa gcc ttt      432
Ala Gln Cys Leu Gly Ala Ile Cys Gly Val Gly Phe Val Lys Ala Phe
    130                 135                 140

caa agc tct tac tat gat cgt tac ggt gga gga gcc aac tct cta gca      480
Gln Ser Ser Tyr Tyr Asp Arg Tyr Gly Gly Gly Ala Asn Ser Leu Ala
145                 150                 155                 160

gac ggc tac aac aca ggc acc gga cta gcc gca gag atc att gga aca      528
Asp Gly Tyr Asn Thr Gly Thr Gly Leu Ala Ala Glu Ile Ile Gly Thr
                165                 170                 175

ttc gtt ctc gtc tac aca gtc ttc tcc gct act gat ccc aaa cgt aac      576
Phe Val Leu Val Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Pro Lys Arg Asn
            180                 185                 190

gct aga gac tcc cac gtt ccg gtt ttg gcg cca ctt ccg att ggg ttt      624
Ala Arg Asp Ser His Val Pro Val Leu Ala Pro Leu Pro Ile Gly Phe
        195                 200                 205

gcg gtg ttt atg gta cat ttg gcc act att ccg atc acc gga acc ggc      672
Ala Val Phe Met Val His Leu Ala Thr Ile Pro Ile Thr Gly Thr Gly
    210                 215                 220

atc aac ccg gct agg agt ttc gga gct gcc gta atc tat aac aag agc      720
Ile Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Ala Ala Val Ile Tyr Asn Lys Ser
225                 230                 235                 240

aag cca tgg gat gac cac tgg ata ttc tgg gtg gga cca ttc att gga      768
Lys Pro Trp Asp Asp His Trp Ile Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly
                245                 250                 255

gct gcg ata gct gca ttt tat cac caa ttt gtc cta agg gct tca ggt      816
Ala Ala Ile Ala Ala Phe Tyr His Gln Phe Val Leu Arg Ala Ser Gly
            260                 265                 270

tcc aag tca ctt gga tcc ttc aga agt gca gcc aac gtt                  855
Ser Lys Ser Leu Gly Ser Phe Arg Ser Ala Ala Asn Val
        275                 280                 285
```

<210> 6
<211> 285
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

```
Met Ala Lys Asp Val Glu Gly Pro Glu Gly Phe Gln Thr Arg Asp Tyr
1               5                   10                  15

Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Phe Phe Asp Ala Asp Glu Leu Thr Lys
            20                  25                  30

Trp Ser Leu Tyr Arg Ala Val Ile Ala Glu Phe Val Ala Thr Leu Leu
```

```
        35                  40                  45

Phe Leu Tyr Ile Thr Val Leu Thr Val Ile Gly Tyr Lys Ile Gln Ser
    50                  55                  60

Asp Thr Lys Val Gly Gly Val Asp Cys Gly Gly Val Gly Ile Leu Gly
65                  70                  75                  80

Ile Ala Trp Ala Phe Gly Gly Met Ile Phe Ile Leu Val Tyr Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Gly Ile Ser Gly Gly His Ile Asn Pro Ala Val Thr Phe Gly Leu
            100                 105                 110

Phe Leu Ala Arg Lys Val Ser Leu Ile Arg Ala Val Leu Tyr Met Val
        115                 120                 125

Ala Gln Cys Leu Gly Ala Ile Cys Gly Val Gly Phe Val Lys Ala Phe
    130                 135                 140

Gln Ser Ser Tyr Tyr Asp Arg Tyr Gly Gly Gly Ala Asn Ser Leu Ala
145                 150                 155                 160

Asp Gly Tyr Asn Thr Gly Thr Gly Leu Ala Ala Glu Ile Ile Gly Thr
                165                 170                 175

Phe Val Leu Val Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Pro Lys Arg Asn
            180                 185                 190

Ala Arg Asp Ser His Val Pro Val Leu Ala Pro Leu Pro Ile Gly Phe
        195                 200                 205

Ala Val Phe Met Val His Leu Ala Thr Ile Pro Ile Thr Gly Thr Gly
    210                 215                 220

Ile Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Ala Ala Val Ile Tyr Asn Lys Ser
225                 230                 235                 240

Lys Pro Trp Asp Asp His Trp Ile Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly
                245                 250                 255

Ala Ala Ile Ala Ala Phe Tyr His Gln Phe Val Leu Arg Ala Ser Gly
            260                 265                 270

Ser Lys Ser Leu Gly Ser Phe Arg Ser Ala Ala Asn Val
        275                 280                 285
```

<210> 7
<211> 855

<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence codant pour la protéine PIP2;2 d'Arabidopsis thaliana po
rtant une mutation H197D

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(855)
<223>

<400> 7

```
atg gcc aaa gac gtg gaa gga cct gag gga ttt cag aca aga gac tac       48
Met Ala Lys Asp Val Glu Gly Pro Glu Gly Phe Gln Thr Arg Asp Tyr
1               5                   10                  15

gaa gat ccg cca cca act ccg ttt ttc gat gcg gac gag ctt acc aag       96
Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Phe Phe Asp Ala Asp Glu Leu Thr Lys
            20                  25                  30

tgg tct tta tac aga gcc gtc att gcc gag ttc gta gcc act ctc ctc      144
Trp Ser Leu Tyr Arg Ala Val Ile Ala Glu Phe Val Ala Thr Leu Leu
        35                  40                  45

ttc ttg tac atc acc gtt ttg act gtt atc ggt tac aag att cag tcc      192
Phe Leu Tyr Ile Thr Val Leu Thr Val Ile Gly Tyr Lys Ile Gln Ser
    50                  55                  60

gac aca aaa gtt ggt gga gtt gac tgt ggc ggt gtc gga atc ctt ggc      240
Asp Thr Lys Val Gly Gly Val Asp Cys Gly Gly Val Gly Ile Leu Gly
65                  70                  75                  80

atc gcg tgg gct ttt ggt ggc atg atc ttc att ctt gtc tac tgc acc      288
Ile Ala Trp Ala Phe Gly Gly Met Ile Phe Ile Leu Val Tyr Cys Thr
                85                  90                  95

gcc ggt atc tca ggt ggt cac ata aac ccg gcg gtg aca ttt ggt ttg      336
Ala Gly Ile Ser Gly Gly His Ile Asn Pro Ala Val Thr Phe Gly Leu
            100                 105                 110

ttc tta gcc cgg aag gtg tcg ctg att agg gcg gtg ctt tac atg gtg      384
Phe Leu Ala Arg Lys Val Ser Leu Ile Arg Ala Val Leu Tyr Met Val
        115                 120                 125

gct cag tgt ttg ggt gct att tgt gga gtt ggt ttc gtc aaa gcc ttt      432
Ala Gln Cys Leu Gly Ala Ile Cys Gly Val Gly Phe Val Lys Ala Phe
    130                 135                 140

caa agc tct tac tat gat cgt tac ggt gga gga gcc aac tct cta gca      480
Gln Ser Ser Tyr Tyr Asp Arg Tyr Gly Gly Gly Ala Asn Ser Leu Ala
145                 150                 155                 160

gac ggc tac aac aca ggc acc gga cta gcc gca gag atc att gga aca      528
Asp Gly Tyr Asn Thr Gly Thr Gly Leu Ala Ala Glu Ile Ile Gly Thr
                165                 170                 175

ttc gtt ctc gtc tac aca gtc ttc tcc gct act gat ccc aaa cgt aac      576
Phe Val Leu Val Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Pro Lys Arg Asn
            180                 185                 190

gct aga gac tcc gac gtt ccg gtt ttg gcg cca ctt ccg att ggg ttt      624
Ala Arg Asp Ser Asp Val Pro Val Leu Ala Pro Leu Pro Ile Gly Phe
        195                 200                 205
```

```
gcg gtg ttt atg gta cat ttg gcc act att ccg atc acc gga acc ggc      672
Ala Val Phe Met Val His Leu Ala Thr Ile Pro Ile Thr Gly Thr Gly
    210                 215                 220

atc aac ccg gct agg agt ttc gga gct gcc gta atc tat aac aag agc      720
Ile Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Ala Ala Val Ile Tyr Asn Lys Ser
225                 230                 235                 240

aag cca tgg gat gac cac tgg ata ttc tgg gtg gga cca ttc att gga      768
Lys Pro Trp Asp Asp His Trp Ile Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly
                245                 250                 255

gct gcg ata gct gca ttt tat cac caa ttt gtc cta agg gct tca ggt      816
Ala Ala Ile Ala Ala Phe Tyr His Gln Phe Val Leu Arg Ala Ser Gly
            260                 265                 270

tcc aag tca ctt gga tcc ttc aga agt gca gcc aac gtt                  855
Ser Lys Ser Leu Gly Ser Phe Arg Ser Ala Ala Asn Val
        275                 280                 285
```

<210> 8
<211> 285
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence codant pour la protéine PIP2;2 d'Arabidopsis thaliana portant une mutation H197D

<400> 8

```
Met Ala Lys Asp Val Glu Gly Pro Glu Gly Phe Gln Thr Arg Asp Tyr
1               5                   10                  15

Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Phe Phe Asp Ala Asp Glu Leu Thr Lys
            20                  25                  30

Trp Ser Leu Tyr Arg Ala Val Ile Ala Glu Phe Val Ala Thr Leu Leu
        35                  40                  45

Phe Leu Tyr Ile Thr Val Leu Thr Val Ile Gly Tyr Lys Ile Gln Ser
    50                  55                  60

Asp Thr Lys Val Gly Gly Val Asp Cys Gly Gly Val Gly Ile Leu Gly
65                  70                  75                  80

Ile Ala Trp Ala Phe Gly Gly Met Ile Phe Ile Leu Val Tyr Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Gly Ile Ser Gly Gly His Ile Asn Pro Ala Val Thr Phe Gly Leu
            100                 105                 110

Phe Leu Ala Arg Lys Val Ser Leu Ile Arg Ala Val Leu Tyr Met Val
        115                 120                 125

Ala Gln Cys Leu Gly Ala Ile Cys Gly Val Gly Phe Val Lys Ala Phe
```

130 135 140

Gln Ser Ser Tyr Tyr Asp Arg Tyr Gly Gly Gly Ala Asn Ser Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Tyr Asn Thr Gly Thr Gly Leu Ala Ala Glu Ile Ile Gly Thr
165 170 175

Phe Val Leu Val Tyr Thr Val Phe Ser Ala Thr Asp Pro Lys Arg Asn
180 185 190

Ala Arg Asp Ser Asp Val Pro Val Leu Ala Pro Leu Pro Ile Gly Phe
195 200 205

Ala Val Phe Met Val His Leu Ala Thr Ile Pro Ile Thr Gly Thr Gly
210 215 220

Ile Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Ala Ala Val Ile Tyr Asn Lys Ser
225 230 235 240

Lys Pro Trp Asp Asp His Trp Ile Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly
245 250 255

Ala Ala Ile Ala Ala Phe Tyr His Gln Phe Val Leu Arg Ala Ser Gly
260 265 270

Ser Lys Ser Leu Gly Ser Phe Arg Ser Ala Ala Asn Val
275 280 285

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/82 A01H5/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOURNAIRE-ROUX COLETTE ET AL: "Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins." NATURE (LONDON), vol. 425, no. 6956, 25 September 2003 (2003-09-25), pages 393-397, XP002317611 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ----- -/--	16-23, 28,29

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[ ] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 December 2005	29/12/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001722

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GAO YONG-PING ET AL: "Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of Brassica napus during germination under stress conditions" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 40, no. 4, July 1999 (1999-07), pages 635-644, XP002317612 ISSN: 0167-4412 abstract	1-30

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/001722

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
C12N15/82 A01H5/00

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
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 réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TOURNAIRE-ROUX COLETTE ET AL: "Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins." NATURE (LONDON), vol. 425, no. 6956, 25 septembre 2003 (2003-09-25), pages 393-397, XP002317611 ISSN: 0028-0836 cité dans la demande le document en entier	16-23, 28,29

-/--

[X] 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'appartenenant 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	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
14 décembre 2005	29/12/2005

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

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (Janvier 2004)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/001722

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	GAO YONG-PING ET AL: "Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of Brassica napus during germination under stress conditions" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 40, no. 4, juillet 1999 (1999-07), pages 635-644, XP002317612 ISSN: 0167-4412 abrégé	1-30