(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
25 juillet 2013 (25.07.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/107632 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A01H 1/04 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
A01H 5/08 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2013/000106

(22) Date de dépôt international :
16 janvier 2013 (16.01.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
12/00149 16 janvier 2012 (16.01.2012) FR

(71) Déposants : **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)** [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR). **VILMORIN ET CIE** [FR/FR]; 4, quai de la Mégisserie, F-75001 Paris (FR).

(72) Inventeurs : **BENDAHMANE, Abdelhafid**; 51, avenue Charles de Gaulle, F-91830 Le Coudray Montceaux (FR). **TROADEC, Christelle**; 59, rue Gabriel Péri, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). **BOUALEM, Adnane**; 41, rue Louise De Keroual, 91000 Evry (FR). **HOSEMANS, Danièle**; 12, rue du Margat, F-49100 Angers (FR). **FAUVE, Julie**; 15, Grand Rue, F-30000 Nimes (FR).

(74) Mandataire : **BARBOT, Willy**; Cabinet Simodoro, Parc Cézanne II, Bat. G, 290, avenue Galilée, F-13857 Aix-en-Provence Cedex 3 (FR).

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

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

WO 2013/107632 A1

(54) Title : ANDROECIOUS CUCURBIT PLANTS, METHODS OF OBTAINING AND USES OF SAID CUCURBIT PLANTS

(54) Titre : CUCURBITACEES ANDROIQUES, PROCEDES D'OBTENTION ET UTILISATIONS DE CES CUCURBITACEES

(57) Abstract : The present invention relates to plants of the Cucurbit family and seeds of such plants having an androecious phenotype even though this sex type is not natural in said plants. The invention further relates to the use of the plants and the seeds of plants of the invention. The invention further relates to the nucleic acid sequence responsible for androecy in the plants of the invention and to the polypeptide encoded by said nucleic acid sequence. Finally, the invention relates to methods of identifying the plants and seeds of the invention.

(57) Abrégé : La présente invention porte sur des plantes de la famille Cucurbitacées et des graines de telles plantes ayant un phénotype androïque alors même que ce type sexuel n'est pas naturel chez lesdites plantes. L'invention porte également sur l'utilisation des plantes et des graines de plantes de l'invention. L'invention porte, en outre, sur la séquence d'acide nucléique responsable de l'androécie chez les plantes de l'invention et sur le polypeptide codé par ladite séquence d'acide nucléique. L'invention porte, finalement, sur des procédés d'identification des plantes et graines de l'invention.

CUCURBITACEES ANDROÏQUES, PROCEDES D'OBTENTION ET UTILISATIONS DE CES CUCURBITACEES

Cette demande de brevet revendique la priorité de la demande de brevet français n°12 00149 déposée le 16 janvier 2012, qui est incorporée ici par référence.

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de l'identification de plantes et en particulier à l'identification du type sexuel de plantes. Elle est relative à des plantes dont le type sexuel est modifié, à l'utilisation de telles plantes ainsi qu'à des procédés d'obtention et de détection desdites plantes.

ART ANTERIEUR

La création de plantes hybrides est d'un grand intérêt en agronomie et en agriculture. En effet, les plantes hybrides, grâce au phénomène d'hétérosis, appelé également vigueur hybride, présentent généralement une supériorité pour de nombreux caractères, par rapport à la moyenne de leurs deux parents. Cette supériorité peut s'illustrer par exemple par une meilleure vigueur, un meilleur rendement, une plus grande adaptation au milieu dans lequel l'hybride est cultivé et une grande uniformité des hybrides par rapport à leurs parents. Cette vigueur hybride est d'autant plus importante que les parents sont éloignés génétiquement.

La création de lignées stables, futurs parents de l'hybride, est un passage obligé pour la création de variétés hybrides homogènes et reproductibles exprimant le plus d'hétérosis. Il est donc nécessaire de créer des lignées présentant le matériel génétique le plus homozygote possible, dites « lignées pures », produites par autofécondation par exemple, et se combinant de la meilleure manière, puis de croiser deux individus de ces lignées pour obtenir un hybride.

COPIE DE CONFIRMATION

Lors du croisement de ces lignées entre elles, il est indispensable de pouvoir choisir le sens du croisement effectué et d'éviter l'autopollinisation des plantes qui conduirait à des plantes ne présentant pas la vigueur hybride recherchée. La création d'hybrides nécessite donc d'obtenir des plantes non capables d'autopollinisation, c'est-à-dire présentant soit uniquement des fleurs femelles, soit uniquement des fleurs mâles.

Les plantes ne présentant que des fleurs femelles sont appelées gynoïques. Les plantes ne présentant que des fleurs mâles sont appelées androïques. L'androécie est un caractère agronomique très recherché, notamment en ce que des fleurs uniquement mâles produisent plus de pollen.

Par ailleurs, les plantes présentant des fleurs mâles et des fleurs femelles séparées mais sur un même pied sont appelées monoïques, les plantes présentant des fleurs bisexuées sont appelées hermaphrodites et les plantes présentant des fleurs bisexuées et mâles sur un même pied sont appelées andromonoïques.

Dans le cas où des plants présentent le type sexuel floral monoïque, andromonoïque ou hermaphrodite, il est nécessaire, par exemple, dans le cadre d'un programme d'amélioration de plantes, voire dans le cas d'une production, notamment de plante hybrides, de séparer les fleurs mâles des fleurs femelles d'un même plant ou d'émasculer manuellement ou chimiquement les plants hermaphrodites pour éviter l'autopollinisation.

Une première technique, mise en œuvre notamment pour le maïs, consiste à utiliser des moyens mécaniques pour réaliser une émasculation des plantes. Cependant, cette technique s'avère extrêmement coûteuse puisqu'elle nécessite l'émasculation de chaque plante dont on veut éviter l'autopollinisation, pour chaque croisement effectué.

Une autre technique consiste à réaliser une émasculation chimique des plantes, bloquant la formation de pollen viable. Ainsi, chez le melon (*Cucumis melo*), le traitement de plantes monoïques par de l'éthrel (précurseur de l'éthylène) entraîne la disparition temporaire des fleurs mâles. De tels agents chimiques, utilisés pour

provoquer une stérilité mâle transitoire, présentent plusieurs inconvénients, comme un coût élevé ou une grande toxicité.

Les techniques mécaniques ou chimiques de contrôle du type floral décrites ci-dessus s'avèrent donc très coûteuses et imparfaites, d'autant que de très nombreux croisements sont nécessaires pour obtenir des plantes hybrides présentant des caractères recherchés et donc un intérêt à être produites et commercialisées.

Pour faciliter la création d'hybrides, il existe donc un besoin pour un système qui permettrait de contrôler le développement du type floral d'une plante de la famille des Cucurbitacées et d'obtenir une plante d'un type floral déterminé.

La famille des cucurbitacées comporte plus de 800 espèces végétales réparties en 120 genres dans les régions tropicales et subtropicales. Cette famille de plantes inclut plusieurs espèces d'intérêt agronomique majeures et qui sont cultivées dans les régions tempérées telles que le concombre (*Cucumis sativus*), le melon (*Cucumis melo*), la pastèque (*Citrullus lanatus*), la courgette et la courge (*Cucurbita spp, cucurbita pepo*) ou encore le potiron (*Cucurbita maxima*) et le potimarron (*Cucurbita moschata*). Parmi les autres espèces d'intérêt agronomique présentes surtout dans les régions tropicales et sub-tropicales, il y a la luffa (*Luffa acutangula*), la margose (*Momordica charentia*) ou encore la gourde (*Lagenaria siceraria*).

Une autre voie pour obtenir des plants non capables d'autopollinisation pour la création d'hybrides pourrait consister en une sélection d'individus exclusivement femelles ou exclusivement mâles, s'ils existent dans la ou les espèce(s) d'intérêt. Cependant, une telle technique s'avèrerait extrêmement coûteuse elle aussi puisqu'elle nécessiterait la culture d'un nombre très important de plantes, jusqu'au moment où il est possible de déterminer le type sexuel.

La sélection d'individus exclusivement mâles notamment présente un intérêt en ce qu'elle permet de ne produire que du pollen et en grande quantité. Le pollen ainsi produit peut être utilisé pour la pollinisation de plantes aux fleurs femelles. De plus, chez certains membres de la famille des Cucurbitacées, de telles plantes n'existent pas, comme par exemple pour certaines des plantes des genres *Cucumis*,

Cucurbita, *Citrullus*, *Luffa*, *Lagenaria* et *Momordica*. En particulier, des plantes de melon (*Cucumis melo, notamment spmelo, sspmelo*), de courgette et de citrouille (*Cucurbita pepo*), de pastèque (*Citrullus lanatus*) ou encore de luffa (*Luffa acutangula*), de margose (*Momordica charentia*), de gourde (*Lagenaria siceraria*), de potiron (*Cucurbita maxima*) ou de potimarron (*Cucurbita moschata*) androïques n'ont jamais été identifiées.

Il existe donc un besoin pour un procédé qui permettrait de créer des plantes androïques de la famille des Cucurbitacées n'existant pas à l'état naturel. Ce procédé devrait permettre d'identifier les plantes androïques sans avoir à attendre la floraison desdites plantes. En outre, ce procédé devrait permettre d'identifier des plantes particulièrement utiles, pour la réalisation d'hybrides notamment, comme cela a été précisé ci-dessus.

SOMMAIRE DE L'INVENTION

Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont identifié et caractérisé pour la première fois le gène responsable du phénotype sexuel androïque chez le concombre (*Cucumis sativus*), espèce pour laquelle l'androécie se retrouve à l'état naturel. Le gène identifié code pour la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase8 (ACS8), notée par la suite *Cucumis sativus ACS8, CsACS8.*

Par la suite, les inventeurs ont identifié la mutation dans le gène *CsACS8* responsable de l'androécie chez le concombre.

Chez le melon, l'androécie n'existe pas à l'état naturel. Les inventeurs ont induit des mutations dans le gène orthologue de *CsACS8* chez le melon et ont ainsi créé des plants de melon androïques.

Les cucurbitacées ont servi de modèle pour l'étude du dimorphisme sexuel pendant des décennies. Chez le concombre (*Cucumis sativus L.*), une plante monoïque, le déterminisme sexuel est génétiquement contrôlé par trois loci, F(Female), A (Androecious) et M (Monoecious). Le locus semi-dominant F (Female) contrôle le

degré de féminité. L'allèle F entraine la précocité d'apparition de la phase femelle et par conséquent les plantes FF sont gynoïques (totalement femelles). Le locus Androecious (a) accroît la masculinité et les plantes de génotype aaff sont androïques (totalement males). Le locus M (Monoecious) est requis pour l'avortement sélectif des organes reproducteurs mâles dans les bourgeons floraux déterminés à développer un carpelle. La combinaison des allèles M-ff permet le développement de plantes monoïques, type sexuel le plus répandue chez les cucurbitacées, partant des fleurs males et femelles. Les plantes gynoïques, hermaphrodites et andromonoïques (fleurs males et hermaphrodites) présentent, respectivement, les génotypes M-F-, mmF- et MMff. A l'aide d'une approche gène candidat, il a été montré qu'une ACC synthase, CsACS1, co-ségrégait avec le locus F (Trebitsh et al., 1997) et que les plantes monoïques possèdent une seule copie de ce gène tandis que les plantes gynoïques possèdent une copie supplémentaire, le gène CsACS1G. Grace à une combinaison d'approche gène candidat, clonage positionnel et génétique d'association, Boualem et al., (2009) et Li et al., (2009) ont démontré que le locus M correspondait à l'ACC synthase CsACS2 et que la perte de d'activité de cette enzyme entrainait la transition de la monœcie à l'andromonoécie.

Chez le melon, une autre cucurbitacée modèle, le déterminisme sexuel est contrôlé par deux loci, le locus A (andromonoecious) et le locus G (gynoecious). Les melons de génotype A-G- sont de type monoïques (fleurs males et femelles) tandis que les plantes andromonoïques (fleurs males et hermaphrodites) portent les allèles aaG-. Les plantes gynoïques (fleurs uniquement femelles) sont AAgg et les hermaphrodites (fleurs uniquement hermaphrodites) sont de génotype aagg. Contrairement au concombre, chez le melon, il n'a jamais été décrit de plante androïque ne portant que des fleurs males. La nature du locus A, responsable de la transition du type sexuel monoïque vers andromonoïque, a récemment été révélée par les travaux de Boualem et al, 2008. Ces travaux ont démontré que le gène A codait pour une ACC synthase, CmACS-7, et que la perte de fonction de cette enzyme était la cause de l'apparition de l'andromonoécie. Ces résultats ont fait l'objet du brevet WO/2007/125264. L'allèle récessif g, en combinaison avec l'allèle A, entraine le

développement de fleurs unisexuées femelles, ou de fleurs hermaphrodites, lorsqu'il est combiné à l'allèle a. Récemment, les travaux de Martin et al., 2009 ont mis en évidence que l'allèle g était dû à l'insertion d'un transposon de type hAT à proximité du facteur de transcription à doigt de zinc C2H2, nommé CmWIP1. L'insertion de cet élément transposable inhibe, via des mécanismes épigénétiques, l'expression du facteur de transcription CmWIP1. L'identification de mutations induites à l'EMS dans ce facteur de transcription, mutations qui convertissent des plantes monoïques en plantes gynoïques, confirme que le gène G est CmWIP1. Ces travaux ont fait l'objet du brevet WO/2010/012948.

D'après les résultats décrits ci-dessus, les mécanismes de détermination sexuelle chez le concombre et le melon présentent plusieurs différences.

Premièrement, chez le concombre les différents types sexuels sont déterminés par les combinaisons alléliques des 3 gènes F, M et A, tandis que chez le melon les différents types sexuels sont contrôlés par seulement 2 gènes, A et G. Pour information, le gène A, CmACS-7, du melon est l'orthologue du gène M, CsACS2, du concombre.

Deuxièmement, le caractère gynoïque est contrôlé, chez le concombre, par le gène F, une ACC synthase, alors que chez le melon, ce caractère est contrôlé par CmWIP1, un facteur de transcription à doigt de zinc de type C2H2.

Troisièmement, l'androécie décrite chez le concombre est contrôle par le gène A du concombre (différent du gène A du melon) tandis que chez le melon, ce type sexuel n'a jamais été décrit ou rapporté comme existant dans des populations de melon.

Les inventeurs ont donc identifié, pour la première fois, chez les plantes appartenant à la famille des Cucurbitacées, un gène responsable de l'androécie.

Ledit gène est caractérisé par un allèle dominant non muté induisant la synthèse de la protéine 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthase (ACS8 active, enzyme limitante de la voie de la biosynthèse de l'éthylène), et par un allèle récessif

muté induisant la synthèse d'une protéine ACS8 inactive ou ayant une activité enzymatique réduite.

Les Cucurbitacées selon la présente invention présentant deux allèles récessifs pour le gène de l'androécie *ACS8* sont androïques.

Les inventeurs ont en outre démontré que deux allèles récessifs présentant tous deux une activité enzymatique réduite d'au moins 50% par rapport à une ACS8 sauvage était suffisante pour entraîner ce phénotype androïque.

De telles plantes androïques, ne présentant donc que des fleurs mâles peuvent être utilisées pour la création d'hybrides ainsi que pour l'amélioration des espèces de Cucurbitacées.

Les Cucurbitacées selon la présente invention présentant un allèle ACS8 récessif muté présentent un intérêt en ce qu'elles peuvent être à tendance androïque, c'est-à-dire avoir plus de fleurs mâles que la plante sauvage.

Les plantes selon la présente invention, qu'elles soient androïques ou à tendance androïques peuvent être utilisées comme pollinisateur.

Un premier objet de l'invention concerne une plante, de la famille des Cucurbitacées, laquelle plante est :

- sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita*, *Luffa*, *Momordica* et *Lagenaria*, à l'exclusion de l'espèce *Cucumis sativus* ; et
- caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un polypeptide correspondant à un variant de l'ACS8 de référence pour ladite plante, laquelle 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence présente une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au

moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

Un autre objet de l'invention concerne une plante, selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle est homozygote pour l'allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un variant de l'ACS8 de référence et androïque.

Un autre objet de l'invention concerne une graine dont la germination conduit à une plante telle que définie selon l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne une utilisation d'une plante selon l'invention en tant que pollinisateur.

Un autre objet de l'invention concerne un polypeptide isolé correspondant à un variant d'une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de référence, de plante de la famille des Cucurbitacées, laquelle 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 présente une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50%, de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

Un autre objet de l'invention concerne un polynucléotide codant pour le polypeptide selon l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne une cellule issue d'une plante telle que définie dans la présente invention.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'une plante androïque de la famille des cucurbitacées, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) Obtention d'une plante de la famille des cucurbitacées, préférentiellement sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis, Citrullus, Cucurbita, Luffa, Momordica* et *Lagenaria*,

b) Inhibition de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de ladite plante.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'une plante androïque ou à tendance androïque de la famille des Cucurbitacées, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) Obtention d'une plante de la famille des Cucurbitacées, laquelle plante est sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis, Citrullus, Cucurbita, Luffa, Momordica* et *Lagenaria,*

b) Mise en évidence de la présence d'au moins un allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un polypeptide correspondant à un variant de l'ACS8 de référence pour ladite plante,

c) Etude de l'activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 codée par ledit allèle,

d) Sélection d'une plante présentant une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

Un autre objet de l'invention concerne par ailleurs un procédé de propagation d'une plante homozygote androïque de l'invention, comprenant les étapes de :

a) Traitement de plantes androïques homozygotes pour l'allèle muté ACS8 de l'invention, avec un composé permettant d'induire une augmentation de la concentration intracellulaire en éthylène, pour générer des fleurs femelles,
b) Autopollinisation des plants obtenues à l'étape a), et
c) Récolte des graines.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé d'identification d'une plante possédant une séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide selon l'invention et comprenant les étapes de :

a) Analyse d'un échantillon comprenant des cellules d'une plante de la famille des Cucurbitacées ou des extraits de celle-ci de sorte à identifier si ladite plante comprend une séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide selon l'invention ; et
b) Identification d'une plante comprenant une telle séquence d'acide nucléique.

Maintenant, un autre objet de l'invention concerne également un procédé de sélection d'une plante androïque, ledit procédé comprenant les étapes de:

a) analyse d'un échantillon comprenant des cellules d'une plante de la famille des Cucurbitacées ou des extraits de celle-ci de sorte à identifier si ladite plante comprend une séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide selon l'invention,
b) identification d'une plante comprenant une telle séquence d'acide nucléique,

c) croisement de plantes présentant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention identifiées à l'étape b), et

d) sélection d'une plante homozygote pour ladite séquence d'acide nucléique.

L'invention concerne aussi un procédé de sélection d'une plante présentant au moins deux caractères d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) analyse d'un échantillon comprenant des cellules d'une plante de la famille des Cucurbitacées présentant un premier caractère d'intérêt ou des extraits de celle-ci de sorte à identifier si ladite plante comprend une séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide selon l'invention, et

b) identification d'une plante comprenant une telle séquence d'acide nucléique et présentant toujours ledit premier caractère d'intérêt,

c) croisement de plantes présentant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention et présentant toujours ledit premier caractère d'intérêt identifiées à l'étape b),

d) sélection d'une plante et présentant toujours ledit premier caractère d'intérêt et homozygote pour ladite séquence d'acide nucléique,

e) croisement d'une plante présentant au moins un premier caractère d'intérêt obtenue à l'étape d) avec une plante de la famille des Cucurbitacées présentant au moins un second caractère d'intérêt ; et

f) sélection d'une plante présentant lesdits au moins premier et second caractères d'intérêts.

Un autre objet de l'invention concerne également un procédé de production d'une graine de plante, préférentiellement hybride, diploïde ou triploïde, comprenant les étapes de :

a. planter un champ alternativement avec les plantes androïques et/ou à tendance androïque de l'invention comprenant un premier caractère d'intérêt et des plantes gynoïques et/ou mâles stériles telles que définies dans la présente invention comprenant un deuxième caractère d'intérêt,
b. récolter les fruits des plantes obtenus après pollinisation, et
c. extraire les graines desdits fruits.

Un autre objet de l'invention concerne une graine, préférentiellement hybride, de plante obtenue par l'un quelconque des procédés de l'invention. De préférence, la germination de cette graine conduit à une plante présentant lesdits au moins premier et second caractères d'intérêts décrits précédemment.

Un autre objet de l'invention concerne une plante, de la famille des cucurbitacées, sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita, Luffa, Momordica* et *Lagenaria,* à l'exclusion de l'espèce *Cucumis sativus,* et caractérisée en ce qu'elle est androïque.

Un autre objet de l'invention concerne une utilisation, pour l'identification de plantes androïques de la famille des Cucurbitacées, de sondes ou d'amorces permettant la détection du polynucléotide selon l'invention dans un échantillon comprenant des cellules d'une telle plante ou des extraits de celles-ci.

Un dernier objet de l'invention concerne une utilisation, pour l'identification de plantes androïques de la famille des Cucurbitacées, d'anticorps permettant la détection du polypeptide selon l'invention dans un échantillon comprenant des cellules d'une telle plante ou des extraits de celles-ci.

DESCRIPTION DES DESSINS

La **Figure 1** représente le schéma des croisements réalisés pour obtenir la population de concombre (*Cucumis sativus*) androïques utilisés pour déterminer le gène responsable de l'androécie.

La **Figure 2** représente la carte génétique du locus de l'androécie chez le concombre réalisée à partir d'une population de 230 individus.

La **Figure 3** représente la structure génique des deux allèles du gène de l'androécie chez le concombre, à savoir l'allèle dominant dont la séquence d'acide nucléique code pour une séquence polypeptidique d'ACS8 sauvage et l'allèle récessif muté dont la séquence d'acide nucléique code pour une séquence polypeptidique d'ACS8 tronquée.

La **Figure 4** représente la cinétique d'apparition des fleurs males, en lien avec les expérimentations réalisées à l'exemple 9.

La **Figure 5** représente la cinétique d'apparition des fleurs femelles, en lien avec les expérimentations réalisées à l'exemple 9.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Un premier objet de l'invention concerne une plante, de la famille des Cucurbitacées, laquelle plante est :

- sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita*, *Luffa*, *Momordica* et *Lagenaria*, à l'exclusion de l'espèce *Cucumis sativus* ; et
- caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un polypeptide correspondant à un variant de l'ACS8 de référence pour ladite plante, laquelle 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence présente une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane

carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

Avantageusement, ladite activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate correspond à une Vmax inférieure ou égale à 400 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$, de préférence inférieure ou égale à 300 et de manière particulièrement préférée inférieure ou égale à 275 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ en présence d'une concentration de 5 µM de pyridoxal5'-phosphate (PLP).

Un autre objet de l'invention concerne une plante, selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle est homozygote pour l'allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un variant de l'ACS8 de référence et androïque.

Par « plante », on entend une plante dans son ensemble mais aussi un fragment ou une partie de plante isolé(e) tel qu'une racine issue de ladite plante, une feuille, une tige, une fleur, un fruit, etc.

Par "plantes de la famille des Cucurbitacées", on entend, au sens de la présente invention, les plantes dicotylédones de la famille des Cucurbitacées et comprenant notamment les genres *Cucumis, Cucurbita, Citrullus, Lagenaria, Luffa, Momordica, Cyclanthera, Echinocystis, Thladiantha, Bryona, Trichosanthes, Melothria, Ibervillea, Ecballium, Sechium, Benincasa, Sicyos, Coccinia.*

De manière préférée, ladite plante est choisie dans le groupe consistant en les genres *Cucumis, Citrullus, Cucurbita, Luffa, Lagenaria* et *Momordica.*

De manière encore préférée, ladite plante est choisie dans le groupe consistant en les espèces *Cucumis melo, Citrullus lanatus, Cucurbita pepo, Luffa acutangula, Lagenaria siceraria, Momordica charentia, Cucurbita maxima* et *Cucurbita moschata*

Les Cucurbitacées *Cucumis melo, Citrullus lanatus, Cucurbita pepo, Luffa acutangula, Lagenaria siceraria, Momordica charentia, Cucurbita maxima* et *Cucurbita moschata* avec le phénotype androïque n'ont jamais été identifiées à l'état sauvage. Les seuls phénotypes qui ont été identifiés sont, pour *Cucumis melo,* les phénotypes andromonoïque, gynoïque, monoïque et hermaphrodite; pour *Citrullus lanatus,* les phénotypes andromonoïque et monoïque pour *Cucurbita pepo*, le phénotype monoïque, pour *Luffa acutangula*, les phénotypes monoïque, andromonoïque, gynoïque et hermaphrodite ; pour *Lagenaria siceraria*, les phénotypes monoïque et andromonoïque et pour *Momordica charentia*, les phénotypes monoïque et gynoïque. Chez *Cucumis sativus*, les phénotypes présents sont les phénotypes monoïque, andromonoïque, androïque, gynoïque et hermaphrodite. Chez *Cucurbita maxima* et *Cucurbita moschata,* le phénotype présent est le phénotype monoïque.

Une telle plante est susceptible d'être obtenue par le procédé de sélection d'une plante androïque décrit par la suite.

Les termes "polypeptide" ou "protéine", au sens de la présente invention, font référence à toute chaîne d'acides aminés, quelque soit leur longueur ou leurs éventuelles modifications post-traductionnelles (telles que la glycosylation, la phosphorylation, l'alkylation, etc).

La séquence polypeptidique aminocyclopropane carboxylate synthase 8 (ACS8) au sens de la présente invention fait référence à l'enzyme aminocyclopropane carboxylate synthase 8 transformant la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate.

Cette enzyme ACS8 est également connue sous d'autres dénominations, à savoir 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8, 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 8, ACC synthase 8, S-adenosyl-L-methionine methylthioadenosine-lyase 8 ou encore ACS8.

Par allèle "sauvage", on entend, au sens de la présente invention, tout allèle naturel codant pour une protéine qui présente une activité enzymatique semblable ou identique à celle de l'ACS8 de référence. Les allèles sauvages au sens de la présente

invention correspondent aux séquences génomiques SEQ ID N°1, SEQ ID N°10, SEQ ID N°19, SEQ ID N°22, SEQ ID N°25, SEQ ID N°28, SEQ ID N°31, SEQ ID N°34 et aux séquences codantes SEQ ID N°2, SEQ ID N°11, SEQ ID N°20, SEQ ID N°23, SEQ ID N°26, SEQ ID N°29, SEQ ID N°32 et SEQ ID N°35. Par "séquence de référence" au sens de la présente invention, on entend pour une espèce déterminée de plante de la famille des Cucurbitacées, la protéine 1-aminocyclopropane-1-carboxylique synthase 8 codée par un allèle sauvage qui présente 100% d'activité de l'ACS8. Cette séquence de référence est caractérisée en ce qu'elle est codée par une séquence d'acide nucléique correspondant à un allèle dominant présent dans les plantes monoïques, andromonoïques, gynoïques et hermaphrodites.

A titre d'exemple, des séquences ACS8 de référence pour les espèces *Cucumis sativus, Cucumis melo, Citrullus lanatus, Luffa acutangula, Lagenaria siceraria, Momordica charentia* et *Cucurbita pepo* correspondent aux séquences SEQ ID N°3, SEQ ID N°12, SEQ ID N°21, SEQ ID N°24, SEQ ID N°27, SEQ ID N°30, SEQ ID N°33 et SEQ ID N°36 respectivement. Par "variant" d'une séquence polypeptidique selon l'invention, on entend une séquence polypeptidique qui diffère de la séquence polypeptidique de référence par au moins une mutation ponctuelle ou qui correspond à un fragment de celle-ci.

Par "fragment" d'une séquence polypeptidique de référence, on entend une séquence polypeptidique d'une longueur réduite par rapport à la séquence polypeptidique de préférence, de préférence d'une longueur inférieure d'au moins 10%, à titre d'exemple d'au moins 25 ou 33%, et de manière particulièrement préférée d'au moins 50%.

Un variant d'une séquence polypeptidique selon l'invention peut être d'origine naturelle, tel qu'un variant issu d'une variation allélique préexistant à l'état sauvage. Un tel variant peut être également une séquence polypeptidique non préexistante naturellement et obtenue, par exemple, par des techniques de mutagenèse. De préférence, un tel variant est obtenu à l'issue d'une étape de mutagénèse.

L'activité de l'enzyme ACS8 peut être déterminée simplement par l'homme du métier au regard de ses connaissances générales. A titre d'exemple, cette activité pourra être déterminée par la méthode incorporée ici par référence décrite dans BOUALEM *et al.* (2008, *Science*, Vol. 321 : p.836-838, *A conserved mutation in an ethylene biosynthesis enzyme leads to andromonoecy in melons*)

A titre d'exemple de tels variants, on peut citer les variants présentant les séquences SEQ ID n° 6 et SEQ ID N°9 de *Cucumis sativus*, les variants présentant les séquences SEQ ID n° 15 et SEQ ID N°18 de *Cucumis melo*.

Par "plante androïque", on entend, au sens de la présente invention, une plante portant uniquement des fleurs mâles. Lesdites fleurs mâles (staminées) présentent uniquement les organes reproducteurs mâles et ne produisent donc que du pollen contrairement aux fleurs femelles (pistillées) produisant uniquement des ovocytes qui deviendront des graines s'ils sont fécondés. Le fait, pour une plante, d'être androïque s'appelle l'androécie.

Par "plante à tendance androïque", on entend, au sens de la présente invention, une plante hétérozygote pour l'allèle muté selon l'invention, portant plus de fleurs mâles que la même plante sauvage monoïque ou andromonoïque, n'ayant pas l'allèle muté selon l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, la plante selon l'invention présente, en outre, au moins un premier caractère d'intérêt tel qu'un rendement plus élevé, une moindre consommation d'eau ou encore une floraison plus précoce.

Par "caractère d'intérêt" on entend, au sens de la présente invention, un caractère exprimé par une plante et qui lui confère des propriétés spécifiques par rapport aux autres plantes qui n'expriment pas ce caractère. Préférentiellement, pour les besoins de la présente invention, un caractère d'intérêt est un caractère d'intérêt agronomique qui peut être qualitatif ou quantitatif.

Les caractères d'intérêt au sens de la présente invention peuvent être par exemple des fruits plus gros et/ou plus nombreux, un rendement plus élevé, une moindre consommation d'eau, une floraison plus précoce, une résistance à certains

pathogènes, qu'ils soient de nature virale, bactérienne ou fongique ou encore une résistance à un stress hydrique.

A titre d'exemples de caractères d'intérêt, on peut citer en tant qu'allèles impliqués dans la résistance à certains pathogènes, qu'ils soient de nature virale, bactérienne ou fongique, l'allèle *Vat*, qui confère la résistance au puceron *Aphis gossypii,* l'allèle *Pm-W*, qui confère la résistance à l'oïdium *Podosphaera xanthi,* l'allèle récessif *nsv*, qui correspond à une mutation unique dans le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, l'allèle *Cys* qui confère une résistance au *cucurbit yellow stuning virus* , les allèles *Fom1, Fom 2* et *Fom 1.2* qui confèrent la résistance à *fusarium oxysporum*, ou encore les allèles *gf, Or*, et *wf* qui participent respectivement à la couleur de la chair du melon, vert, orange et blanc, tels que cités dans la publication *Cucurbit Genetics Cooperative Report 28-29: 142-163 (2005-2006).*

Les notions de "résistance", "immunité" et "sensibilité" sont définies par l'ISF (International Seed Federation).

Ainsi, par "Résistance", on entend la capacité d'une plante ou d'une variété à restreindre la croissance et le développement d'un pathogène ou d'un ravageur déterminé et/ou les dommages qu'ils occasionnent, en comparaison avec des variétés sensibles et dans des conditions similaires, environnementales et de pression de ce pathogène ou de ce ravageur. Les plantes ou variétés résistantes peuvent exprimer quelques symptômes de la maladie ou quelques dommages en cas de forte pression du pathogène ou du ravageur.

L'ISF distingue deux niveaux de résistance, à savoir la résistance standard ou haute (HR*) et la résistance intermédiaire ou modérée (IR*).

Par "résistance standard ou haute (HR*)", on entend la capacité d'une plante ou d'une variété à restreindre fortement la croissance et le développement d'un pathogène ou d'un ravageur déterminé dans des conditions de pression normales de ceux-ci, en comparaison avec des variétés sensibles. Ces plantes ou variétés peuvent, cependant, exprimer des symptômes ou des dommages en cas de forte pression de ce pathogène ou de ce ravageur.

Par "résistance intermédiaire ou modérée (IR*)" ou encore par "résistance partielle", on entend la capacité d'une plante ou d'une variété à restreindre la croissance et le développement d'un pathogène ou d'un ravageur déterminé mais pouvant exprimer plus de symptômes ou de dommages en comparaison avec des variétés de résistance haute/standard. Les plantes ou variétés de résistance intermédiaire montreront des symptômes ou des dommages moins sévères que ceux observés sur des variétés sensibles, en conditions similaires, environnementales et/ou de pression du pathogène ou du ravageur.

Par "Immunité", on entend le fait de ne pas être sujet à l'attaque ou à l'infection par un ravageur ou un pathogène donné.

Par "Sensibilité", on entend l'incapacité d'une plante ou d'une variété à restreindre la croissance et le développement d'un pathogène ou d'un ravageur déterminé.

Selon un mode de réalisation préféré, la plante selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle est obtenue par des techniques de génie génétique.

Par "génie génétique", on entend, au sens de la présente invention, l'ensemble des techniques de manipulation du génome d'un être vivant afin de modifier son génotype et par conséquent son phénotype.

De manière préférée, la plante androïque selon l'invention est caractérisée en ce que la méthode d'obtention de ladite plante est une mutagénèse induisant une ou plusieurs mutations dans la séquence nucléotidique de l'allèle sauvage, entrainant une diminution de l'activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate, cette diminution d'activité étant inférieure d'au moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 sauvage et de manière particulièrement préférée, l'activité devenant nulle.

Un autre objet de l'invention concerne une graine dont la germination conduit à une plante selon l'invention.

Par "graine", on entend, au sens de la présente invention, un organe, obtenu par le développement et la maturation de l'ovule après fécondation, ledit organe renferme l'embryon et des réserves nutritives nécessaires pour son développement lors de la germination.

Par "germination", on entend, au sens de la présente invention, le phénomène de passage de l'embryon de la graine mûre d'un état de vie ralentie à un état de croissance active, en utilisant les réserves contenues dans la graine, jusqu'à ce que la plantule obtenue soit autotrophe.

L'homme du métier sera à même, au regard de ses connaissances générales, de déterminer les conditions optimales pour la germination desdites graines et la culture des plantules obtenues.

Un autre objet de l'invention concerne une utilisation d'une plante selon l'invention en tant que pollinisateur.

Le terme "pollinisateur(s)", au sens de la présente invention, fait référence à une plante utilisée comme donneur de pollen, lequel pollen est utilisé pour polliniser des fleurs femelles. Le terme "pollinisateur" au sens de la présente invention est synonyme du terme "plante pollinisatrice". L'utilisation en tant que pollinisateur de la plante homozygote pour l'allèle muté tel que défini dans la présente invention et donc androïque permet la production de graines et plantes hybrides ou encore triploïdes. En outre, l'absence d'organes reproducteurs femelles facilite les expérimentations pour la sélection et l'amélioration des plantes.

L'utilisation des plantes hétérozygotes pour l'allèle muté tel que défini dans la présente invention, lesquelles plante étant à tendance androïque permet la production de graines et plantes hybrides ou encore triploïdes.

En outre, les plantes androïques produisant plus de fleurs mâles pendant une période plus longue, et ces fleurs mâles produisant plus de pollen, l'utilisation de plantes androïques permet d'atténuer les effets de la désynchronisation des floraisons mâles et femelles.

Par ailleurs, l'allèle muté selon l'invention peut être utilisé en association avec des gènes régissant l'architecture de la plante et notamment le positionnement des fleurs dans le but d'optimiser leur disposition sur la plante et donc la dispersion et du pollen et la qualité de la pollinisation.

Enfin, l'utilisation de plantes selon l'invention permet d'augmenter le rendement des fruits produits sur une parcelle de production. En effet, les plantes selon l'invention produisant plus de pollen que des plantes polinisatrices habituelles, le producteur pourra diminuer le nombre de plantes males polinisatrices, augmenter le nombre de plantes femelles et donc augmenter le nombre de fruits récoltés sur la parcelle de production.

De manière préférée, l'utilisation d'une plante, telle que définie dans la présente invention, en tant que pollinisateur vise à l'obtention de graines de plantes hybrides et de plantes hybrides, de graines de plante triploïdes et des plantes produisant des fruits sans graines qui en sont issues, par exemple dans la production de pastèques triploïdes.

Dans ce dernier cas, les plantes polinisatrices selon l'invention peuvent être utilisées par exemple pour polliniser des plantes de pastèques tétraploïdes, produisant ainsi des graines triploïdes. Ces graines triploïdes seront plantées pour donner des plantes triploïdes, dont les fleurs devront être pollinisées, par exemple par des plantes polinisatrices selon l'invention, afin de produire des fruits sans pépins, appréciés des consommateurs.

Par "hybrides", on entend, au sens de la présente invention, toute plante appartenant à la famille des Cucurbitacées issue du croisement de deux plantes génétiquement différentes, préférentiellement, les deux plantes sont deux plantes de lignées génétiquement différentes.

Un autre objet de l'invention concerne un polypeptide isolé correspondant à un variant d'une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de référence, de plante de la famille des Cucurbitacées, laquelle 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 présente une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50% , de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

Le terme "isolé" au sens de la présente invention désigne un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement). Par exemple, un polypeptide présent à l'état naturel dans une plante n'est pas isolé. Le même polypeptide séparé des autres polypeptides adjacents au sein de la cellule dans laquelle il est naturellement présent est isolé.

De manière préférée, le polypeptide de l'invention présente au moins 80% d'identité avec la séquence du polypeptide de référence ou un fragment de celui-ci, de préférence au moins 85% ou 90% d'identité, et de manière particulièrement préférée au moins 95% d'identité avec cette séquence.

Autrement, le polypeptide de l'invention peut être un fragment du polypeptide de référence. Ledit fragment peut être obtenu par une mutation non-sens sur la séquence nucléotidique entrainant l'apparition d'un codon STOP dans cette séquence nucléotidique ou par une mutation décalante, laquelle peut notamment entrainer un décalage du cadre de lecture faisant apparaître un codon STOP dans la séquence d'acide nucléique.

Par "pourcentage d'identité entre deux séquences polypeptidiques", on entend le pourcentage d'acides aminés identiques, entre deux séquences devant être comparées, obtenu avec le meilleur alignement possible desdites séquences. Ce

pourcentage est purement statistique et les différences entre les deux séquences sont réparties aléatoirement sur toute la longueur des séquences d'acides aminés.

Par "meilleur alignement possible ou alignement optimal", on entend l'alignement permettant d'obtenir le pourcentage d'identité le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides aminés sont habituellement réalisées en comparant lesdites séquences après que celles-ci aient été alignées selon le meilleur alignement possible ; la comparaison est alors réalisée sur des segments de comparaison de façon à identifier et comparer des régions de similarité.

Le meilleur alignement possible pour effectuer une comparaison peut être réalisé en utilisant l'algorithme d'homologie globale développé par Smith et Waterman (Ad. App. Math., vol.2, p:482, 1981), en utilisant l'algorithme d'homologie locale développé par Neddleman et Wunsch (J. Mol. Biol., vol.48, p:443, 1970), en utilisant la méthode de similarité développé par Pearson et Lipman (Proc. Natl. Acd. Sci. USA, vol.85, p:2444, 1988), en utilisant des programmes d'ordinateur basés sur de tels algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI USA), en utilisant les algorithmes d'alignement multiples MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, p:1792, 2004). Pour obtenir le meilleur alignement possible, on utilisera de préférence le programme BLAST avec la matrice BLOSUM 62 ou la matrice PAM 30. Le pourcentage d'identité est déterminé en comparant les deux séquences alignées de façon optimale, lesdites séquences pourront comprendre des additions ou des délétions au regard de la séquence de référence de sorte d'obtenir le meilleur alignement possible entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques entre les deux séquences, en divisant le nombre obtenu par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Les termes "acide aminé" et "acides aminés" au sens de la présente invention correspondent à tout acide aminé présent naturellement ou à leurs résidus. Les acides aminés peuvent être identifiés soit par leur abréviation à une seule lettre, soit par leur

abréviation à trois lettres. (Asp D acide aspartique; Ile I isoleucine; Thr T thréonine; Leu L leucine ; Ser S serine ; Tyr Y tyrosine; Glu E acide glutamique; Phe F phénylalanine; Pro P proline; His H histidine; Gly G glycine; Lys K lysine; Ala A alanine; Arg R arginine; Cys C cystéine; Trp W tryptophane; Val V valine; Gln Q glutamine; Met M méthionine; Asn N asparagine). Selon la présente invention, les acides aminés naturels peuvent être remplacés par des acides aminés chimiquement modifiés.

Le terme "mutation", au sens de la présente invention, fait référence à un changement permanent dans la séquence du matériel génétique d'une cellule de plante appartenant à la famille des Cucurbitacées. Une telle mutation peut correspondre notamment à une substitution, une délétion ou encore à une insertion. Par "mutation non-sens", on entend, au sens de la présente invention, la substitution, dans une séquence d'un gène, d'un nucléotide par un autre nucléotide entrainant l'apparition d'un codon STOP.

Par "mutation décalante", on entend, au sens de la présente invention, l'insertion ou la délétion, dans la séquence génomique d'un gène, d'un ou plusieurs nucléotides entrainant un décalage du cadre de lecture, lequel pouvant notamment conduire à l'apparition d'un codon STOP.

De manière préférée, pour l'espèce *Cucumis sativus*, le polypeptide isolé correspondant à un variant d'une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de référence, présentant une activité inférieure d'au moins 50% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence, comprend une séquence ayant au moins 90%, de manière préférée 95% et de manière encore préférée 98% d'identité avec :

- la séquence SEQ ID N°6 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle l'acide aminé à la position 152 et les suivants sont délétés, par rapport à la séquence SEQ ID N°3,

  ou

- la séquence SEQ ID N°9 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle l'acide aminé à la position 58 et les suivants sont délétés, par rapport à la séquence SEQ ID N°3.

De manière préférée, pour l'espèce *Cucumis melo*, le polypeptide isolé correspondant à un variant d'une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de référence, présentant une activité inférieure d'au moins 50% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence, comprend une séquence ayant au moins 90%, de manière préférée 95% et de manière encore préférée 98% d'identité avec :

- la séquence SEQ ID N°15 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle l'acide aminé en position 45 est une phénylalanine par rapport à la séquence SEQ ID N°12,
  ou
- la séquence SEQ ID N°18 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle l'acide aminé en position 295 est une phénylalanine, par rapport à la séquence SEQ ID N°12.

Un autre objet de l'invention concerne un polynucléotide codant pour le polypeptide selon l'invention.

Le polynucléotide selon l'invention peut être non codant s'il comprend une mutation entrainant la disparition du codon d'initiation du polynucléotide de référence.

Une plante, de la famille des Cucurbitacées, homozygote pour un allèle d'*ACS8* correspondant audit polynucléotide est androïque, à savoir qu'elle présente uniquement des fleurs mâles.

Par "plante homozygote", on entend, au sens de la présente invention une plante possédant deux polynucléotides codant pour l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un polypeptide

correspondant à un variant de l'ACS8 de référence, à raison d'une copie dudit polynucléotide par chromosome de la paire de chromosomes.

Une plante, de la famille des cucurbitacées, hétérozygote pour l'allèle muté selon l'invention présente un retard d'apparition des fleurs femelles par rapport aux fleurs mâles comparé aux plantes sauvages ayant des fleurs mâles. Par conséquent, les plantes hétérozygotes pour l'allèle muté selon l'invention présentent plus de fleurs mâles que les plantes sauvages.

Par "plante hétérozygote", on entend, au sens de la présente invention, une plante possédant un seul polynucléotide codant pour le polypeptide de la présente invention.

Par "polynucléotide", on entend, au sens de la présente invention, une chaine nucléotidique simple brin ou son complémentaire ou une chaine nucléotidique double brin pouvant être de type ADN ou ARN. De préférence, les polynucléotides de l'invention sont de type ADN, notamment d'ADN double brin.

Aux fins de la présente description, l'expression "séquence d'acide nucléique" peut être employée pour désigner indifféremment un polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression "séquence d'acide nucléique" englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

Le terme "séquence d'acide nucléique" se réfère à une séquence d'ADN (par exemple un ADNc (ADN complémentaire) ou de l'ADN génomique ou synthétique) ou à une séquence d'ARN (par exemple un ARN messager ou encore de l'ARN synthétique), aussi bien qu'à des analogues d'ADN ou ARN contenant des analogues de nucléotides non naturels, des liens internucléotidiques non naturels ou encore les deux. De manière préférée, ladite séquence nucléotidique est une séquence ADN. Les séquences nucléotidiques peuvent présenter toute conformation topologique, telle que linéaire ou circulaire.

Le terme "nucléotide" désigne à la fois les nucléotides naturels (Adénine : A, Thymine : T, Guanine : G, Cytosine : C) ainsi que des nucléotides modifiés qui comprennent au moins une modification telle que (i) un analogue d'une purine, (ii) un

analogue d'une pyrimidine, ou (iii) un sucre analogue, de tels nucléotides modifiés étant décrits par exemple dans la demande PCT N° WO 95/04064.

De manière préférée, pour l'espèce *Cucumis sativus*, le polynucléotide codant pour le polypeptide de l'invention comprend une séquence ayant au moins 90%, de manière préférée 95% et de manière encore préférée 98% d'identité avec

- la séquence SEQ ID N°5 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle le nucléotide en position 394 est délété par rapport à la séquence SEQ ID N°2,

  ou

- avec la séquence SEQ ID N°8 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle le nucléotide à la position 173 est une adénine, par rapport à la séquence SEQ ID N°2.

De manière préférée, pour l'espèce *Cucumis melo*, le polynucléotide codant pour le polypeptide de l'invention comprend une séquence ayant au moins 90%, de manière préférée 95% et de manière encore préférée 98% d'identité avec

- la séquence SEQ ID N°14 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle le nucléotide en position 133 est une thymine par rapport à la séquence SEQ ID N°11,

  ou

- avec la séquence SEQ ID N°17 ou des variants ou fragments de celle-ci, dans laquelle le nucléotide à la position 884 est une thymine, par rapport à la séquence SEQ ID N°11.

Un autre objet de l'invention concerne une cellule issue d'une plante telle que définie dans la présente invention.

Ladite cellule de plante comprend le polypeptide de l'invention ou le polynucléotide codant pour ledit polypeptide.

Par "cellule de plante", on entend, au sens de la présente invention, les protoplastes, les gamètes produisant des cellules et les cellules régénérant des plantes complètes. Le terme "cellule de plante" fait également référence, sans limitations, aux cellules obtenues ou isolées de : graines, cultures en suspension, embryons, méristèmes, feuilles, racines, pousses, gamétophytes, sporophytes, pollen et microspores. Une "cellule de plante" peut faire référence à une seule cellule ou une population de cellules. Une population de cellules de plantes peut être pure, c'est-à-dire composée d'un seul type de cellule, ou bien composée de différents types de cellules. Une cellule de plante au sens de la présente invention peut être isolée ou comprise dans un tissu de plante, un organe de plante ou une plante quelque soit son stade de développement.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé d'identification d'une plante possédant une séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide selon l'invention et comprenant les étapes de :

a) Analyse d'un échantillon comprenant des cellules d'une plante de la famille des Cucurbitacées ou des extraits de celle-ci de sorte à identifier si ladite plante comprend une séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide selon l'invention ; et
b) Identification d'une plante comprenant une telle séquence d'acide nucléique.

L'étape a) d'analyse peut se faire par des méthodes qui sont bien connues de l'homme du métier.

Ces méthodes peuvent être des méthodes directes de détection de la séquence d'acide nucléique choisie dans le groupe comprenant, mais non limité à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), l'hybridation *In situ*, le Northern blot, le Southern blot, le séquençage, la technique KEYPOINT™ ou encore le TILLING.

Le procédé de TILLING est bien connu de l'homme du métier ; il est décrit notamment par Mc CALLUM *et al.* (2000, *Plant Physiology*, Vol. 123 : 439-442).

Ces méthodes peuvent également être des méthodes indirectes basées sur la détection du polypeptide codé par ladite séquence d'acide nucléique et choisies dans le groupe comprenant, mais non limité à, l'évaluation de l'activité dudit polypeptide, le western blot, la spectrométrie de masse protéomique ou la méthode iTRAQ.

L'étape b) d'identification peut être réalisée simplement par l'homme du métier au regard de ses connaissances générales.

Cette étape peut comprendre notamment une étape de culture des plantes identifiées à l'étape a) comme comprenant la séquence d'acide nucléique de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé d'identification selon l'invention est caractérisé en ce que ladite plante de la famille des Cucurbitacées présente en outre au moins un premier caractère d'intérêt et en ce qu'il comprend en outre, éventuellement, une étape b') de sélection d'une plante présentant toujours ledit au moins premier caractère d'intérêt. Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape préalable de mutagénèse d'une plante ou d'une graine de plante de la famille des Cucurbitacées. Cette étape peut notamment permettre d'obtenir une collection de plantes mutantes.

Les techniques de mutagenèse utilisées pour les besoins de la présente invention doivent permettre d'induire des mutations dans le génome des cellules de plantes. De telles techniques de mutagenèse sont bien connues de l'homme du métier et incluent notamment la mutagenèse par UV, par rayons X ou gamma, la mutagénèse ciblée par la technique KEYBASE™ ou encore la mutagenèse chimique, par exemple l'éthylméthanesulfonate (EMS ; voir notamment la méthode décrite par KOORNBEEF *et al.*, *Mutat.Res.*, Vol. 93 : 109-123, 1982), les méganucléases (endodésoxyribonucléases), les nucléases à doigts de zinc, les ribozymes.

A titre d'exemple, l'identification de plantes androïques peut se faire de la façon suivante : des graines de la famille des Cucurbitacées sont exposées à un agent

mutagène. Les plantes issues de ces graines mutées sont ensuite autofécondées afin d'obtenir une collection de plantes mutantes.

Puis, l'ADN de chaque plante de la collection précédemment générée est extrait et la séquence d'acide nucléique de l'allèle codant pour l'ACS8 est amplifiée pour rechercher la présence de mutation(s) par rapport à la séquence de l'allèle codant pour l'ACS8 non muté. Les plantes mutées dans la séquence de l'allèle codant pour l'ACS8 sont sélectionnées.

Des "pool" d'ADN sont ensuite réalisés par mélange de l'ADN extrait de plusieurs plantes de la collection générée précédemment, ce qui permet de réduire le nombre d'étapes de détection de mutations. Les séquences cibles sont amplifiées par PCR en utilisant les amorces nucléiques appropriées. Les amplicons ainsi obtenus sont chauffés puis refroidis afin de générer des hétéroduplexes d'ADN entre l'ADN d'une plante non mutée sur la séquence d'acide nucléique de l'allèle codant pour l'ACS8 et l'ADN d'une plante mutée sur la séquence d'acide nucléique de l'allèle codant pour l'ACS8. Les hétéroduplexes sont incubés en présence d'une endonucléase coupant au niveau des mésappariements, avant d'être dénaturés et séparés. Les brins d'ADN séparés ainsi obtenus sont soumis à l'étape de détection de mutation(s), par électrophorèse ou encore par HPLC en conditions dénaturantes (DHPLC) décrite par exemple par MC CALLUM *et al.* (2000, *Plant Physiol.*, Vol. 123 : 439-442).

Enfin, les plantes mutées dans la séquence de l'allèle codant pour l'ACS8 et qui sont androïques sont sélectionnées.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention est caractérisé en ce qu'il vise en outre à la sélection d'une plante androïque et en ce qu'il comprend en outre les étapes de :

c) croisement de plantes présentant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention identifiées à l'étape b) ; et

d) sélection d'une plantes homozygote pour ladite séquence d'acide nucléique.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend en outre les étapes de :

e) croisement d'une plante présentant au moins un premier caractère d'intérêt obtenue à l'étape d) avec une plante de la famille des Cucurbitacées présentant au moins un second caractère d'intérêt ; et

f) sélection d'une plante présentant lesdits au moins premier et second caractères d'intérêts.

Dans le détail, l'étape e) de croisement inclut une étape de récolte du pollen de la plante présentant au moins un premier caractère d'intérêt, une étape de mise en contact de ce pollen avec les organes femelles des fleurs femelles ou hermaphrodites préalablement émasculées manuellement, chimiquement ou génétiquement, mâles stériles ou toute plante présentant des organes femelles fonctionnels et des organes mâles non fonctionnels, de plantes possédant au moins un second caractère d'intérêt, pour l'obtention de graines et, enfin, une étape de culture des graines de plantes précédemment obtenues.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que la plante de la famille des Cucurbitacées présentant au moins un second caractère d'intérêt est gynoïque ou mâle stérile.

Une méthode d'obtention de plantes gynoïques peut être celle décrite par exemple dans la demande PCT N° WO 2010/012948. Une méthode d'obtention de plantes hermaphrodites peut être celle décrite par exemple dans la demande PCT N°WO 2007/125264.

Par "plante gynoïque", on entend, au sens de la présente invention, une plante portant uniquement des fleurs femelles. Lesdites fleurs femelles (pistillées) présentent uniquement les organes reproducteurs femelles et ne produisent donc que des ovocytes qui deviendront des graines s'il y a fécondation contrairement aux fleurs mâles (staminées) produisent uniquement du pollen. Le fait, pour une plante, d'être gynoïque s'appelle la gynoécie.

Par "plante hermaphrodite", on entend, au sens de la présente invention, des plantes dont les fleurs portent à la fois les organes reproducteurs mâles et les organes reproducteurs femelles.

Par "plante mâle stérile", on entend, au sens de la présente invention, une plante hermaphrodite dépourvue d'organes reproducteurs mâles ou dépourvue d'organes reproducteurs mâles capables de produire du pollen et/ou du pollen viable par une émasculation manuelle, chimique ou génétique.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'il vise en outre à la production d'une graine de plante, de préférence hybride, diploïde ou triploïde, et en ce qu'il comprend en outre les étapes de :

e) Planter un champ alternativement avec les plantes androïques de l'invention et/ou à tendance androïque et des plantes gynoïques et/ou mâles stériles telles que définies précédemment ;
f) Récolter les fruits des plantes gynoïques et/ou mâles stériles obtenus après pollinisation ; et
g) Extraire les graines desdits fruits.

Un autre objet de l'invention concerne une graine, de préférence hybride, diploïde ou triploïde, de plante obtenue selon le procédé de production d'une graine de plante, de préférence hybride, diploïde ou triploïde, selon l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'une plante androïque de la famille des cucurbitacées, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) Obtention d'une plante de la famille des cucurbitacées, préférentiellement sélectionnée dans le groupe comprenant

les genres *Cucumis, Citrullus, Cucurbita, Luffa, Momordica* et *Lagenaria*,

b) Inhibition de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de ladite plante.

Selon l'invention, la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de ladite plante est caractérisée par une séquence d'acides nucléiques possédant au moins 75%, particulièrement au moins 80%, plus particulièrement au moins 90%, préférentiellement au moins 95%, plus préférentiellement au moins 98%, encore plus préférentiellement au moins 99% d'identité avec l'une quelconque des séquences SEQ ID 10, 19, 22, 25, 28 et 31.

Dans un mode de réalisation de l'invention, l'étape b) d'inhibition de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) permet d'obtenir une activité inférieure d'au moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de ladite plante avant inhibition.

L'inhibition de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) doit être prise au sens large, et comprend l'inhibition de l'expression, par utilisation d'inhibiteurs de l'expression, de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) ou l'inhibition de l'activité, par utilisation d'inhibiteurs de l'activité, de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8). L'utilisation d'inhibiteurs de l'expression ou de l'activité de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8).

On entend par inhibiteur de l'expression un composé naturel ou synthétique ayant la capacité d'inhiber, ou de diminuer de manière significative, l'expression d'un gène, aux différents niveaux d'expression de celui-ci, notamment la transcription et la traduction.

Des exemples d'inhibiteur de l'expression comprennent notamment des ARN interférents (siRNA, miRNA, shRNA) et des oligonucléotides anti-sens (comprenant des ADN et ARN anti-sens), agissant en en se liant au gène d'intérêt, et empêchant ainsi l'expression du gène par blocage de la traduction ou par une augmentation de la dégradation des ARN messagers. Les oligonucléotides anti-sens mesurent

générallement environ 15 bases et sont complémentaires à l'ARN ou l'ADN du gène d'intérêt. Ils peuvent être synthétisés et utilisés par des méthodes bien connues de l'homme du métier. Les ARN interférents sont aussi sélectionnés et utilisés par des méthodes bien connues de l'homme du métier.

Les ribozymes peuvent aussi être utilisés pour inhiber l'expression d'un gène d'intérêt. Les ribozymes sont en effet des molécules d'ARN enzymatiques capables de catalyser le clivage de l'ARN. Le mécanisme d'action du ribozyme implique une hybridation séquence-spécifique de la molécule de ribozyme à la séquence cible d'ARN qui lui est complémentaire, suivie d'un clivage endonucléolitique. Les techniques d'obtention et d'utilisation de tels ribozymes sont bien connues de l'homme du métier. Les sites de clivages spécifiques aux ribozymes dans n'importe quelle cible ARN potentielle sont initialement identifiés par étude de l'ARN cible, les sites comprenant typiquement les séquences GUA, GUU et GUC. Une fois identifiées, les petites séquences d'ARN, mesurant généralement 15 à 20 ribonucléotides et correspondant à la région de l'ARN cible comprenant le site de clivage, peuvent être évaluées en termes de prédiction de leurs caractéristiques structurales (équivalentes à une structure secondaire) qui peuvent rendre l'oligonucléotide inadapté.

Les oligonucléotides anti-sens, les ARN interférents et les ribozymes utilisables dans le cadre de l'invention peuvent être préparés par des méthodes connues de l'homme du métier. Elles incluent les techniques de synthèse chimique. Alternativement, les molécules d'ARN anti-sens et les ARN interférents peuvent etre générés par une transcription in vitro ou in vivo de séquences d'ADN codant pour de tels molécules d'ARN. Ces séquences d'ADN peuvent être incorporées dans un grand nombre de vecteurs qui comprennent ou peuvent comprendre des promoteurs d'ARN polymérase adaptés tels que les promoteurs de polymérase T7 ou SP6. De nombreuses modifications bien connues de l'homme du métier peuvent être apportées aux oligonucléotides de l'invention, pour augmenter leur stabilité cellulaire et leur demi-vie.

Les oligonucléotides anti-sens, les ARN interférents et les ribozymes de l'invention peuvent être délivrés *in vivo* seuls ou en association à un vecteur.

On entend par inhibiteur de l'activité un composé, naturel ou non, ayant la capacité de réduire ou de supprimer l'activité d'une protéine.

Les inhibiteurs d'activité de l'invention peuvent être des composés chimiques, naturels ou de synthèse, mais aussi des composés biologiques, inhibant ou réduisant de manière significative l'activité d'une protéine d'intérêt. De tels composés peuvent être des molécules se liant à ladite protéine (par exemple, mais pas nécessairement, sur son site actif), et bloquant ainsi son activité. Les composés peuvent aussi inhiber l'activité de la protéine en agissant sur un acteur de la voie de signalisation de ladite protéine d'intérêt.

L'inhibiteur d'activité de l'invention peut aussi être un aptamère. Les aptamères sont des molécules qui représentent une alternative aux anticorps en termes de reconnaissance moléculaire. Ce sont des séquences d'oligonucléotides ou d'oligopeptides ayant la capacité de reconnaitre virtuellement n'importe quelle classe de molécules cibles avec une haute affinité et spécificité. De tels ligands peuvent être isolés et modifiés par des techniques bien connues de l'homme du métier.

Naturellement, un autre objet de l'invention porte également sur une plante ou une graine obtenue par ce procédé selon l'invention.

De préférence, ladite plante androïque de la famille des cucurbitacées n'est pas issue de l'espèce *Cucumis sativus.*

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'une plante androïque ou à tendance androïque de la famille des Cucurbitacées, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) Obtention d'une plante de la famille des Cucurbitacées, laquelle plante est sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis,Citrullus, Cucurbita, Luffa, Momordica etLagenaria*,

b) Mise en évidence de la présence d'au moins un allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non

codant ou codant pour un polypeptide correspondant à un variant de l'ACS8 de référence pour ladite plante,

c) Etude de l'activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 codée par ledit allèle,

d) Sélection d'une plante présentant une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

Selon l'invention, ledit variant de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de référence mis en évidence à l'étape b) est caractérisé par une séquence d'acides nucléiques possédant au moins 75%, particulièrement au moins 80%, plus particulièrement au moins 90%, préférentiellement au moins 95%, plus préférentiellement au moins 98%, encore plus préférentiellement au moins 99% d'identité avec l'une quelconque des séquences SEQ ID 10, 19, 22, 25, 28, 31 et 33, mais non parfaitement identique à celle-ci.

Naturellement, un autre objet de l'invention porte également sur une plante ou une graine obtenue par ce procédé selon l'invention.

De préférence, ladite plante androïque de la famille des cucurbitacées n'est pas issue de l'espèce *Cucumis sativus*.

Un autre objet de l'invention porte sur un procédé de sélection d'une plante présentant au moins deux caractères d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) analyse d'un échantillon comprenant des cellules d'une plante de la famille des Cucurbitacées présentant un premier caractère d'intérêt ou des extraits de celle-ci de sorte à identifier si ladite plante comprend une séquence d'acide nucléique codant pour le polypeptide selon l'invention ; et

b) identification d'une plante comprenant une telle séquence d'acide nucléique et présentant toujours ledit premier caractère d'intérêt,

c) croisement de plantes présentant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention et présentant toujours ledit premier caractère d'intérêt identifiées à l'étape b),

d) sélection d'une plante et présentant toujours ledit premier caractère d'intérêt et homozygote pour ladite séquence d'acide nucléique,

e) croisement d'une plante présentant au moins un premier caractère d'intérêt obtenue à l'étape d) avec une plante de la famille des Cucurbitacées présentant au moins un second caractère d'intérêt ; et

f) sélection d'une plante présentant lesdits au moins premier et second caractères d'intérêts.

Naturellement, un autre objet de l'invention porte également sur une plante ou une graine obtenue par ce procédé selon l'invention.

De préférence, lesdite plante de la famille des cucurbitacées de l'étape d) n'est pas issue de l'espèce *Cucumis sativus*.

Un autre objet de l'invention concerne par ailleurs un procédé de propagation d'une plante homozygote androïque de l'invention, comprenant les étapes de :

a) traitement de plantes androïques homozygotes pour l'allèle muté ACS8 de l'invention, avec un composé permettant d'induire une augmentation de la concentration intracellulaire en éthylène, pour générer des fleurs femelles,
b) Autopollinisation des plants obtenues à l'étape a), et
c) récolte des graines.

L'homme du métier est à même d'identifier simplement, et au regard de ses connaissances générales, des composés permettant d'induire une augmentation de la concentration intracellulaire en éthylène. A titre d'exemple de tels composés, on peut citer l'éthéphon et l'ACC.

L'éthéphon, ou ethrel, est un facteur de croissance végétal bien connu de l'homme du métier.

L'ACC ou acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique joue un rôle important dans la biosynthèse de l'éthylène et est synthétisée par l'enzyme ACC synthétase à partir de la méthionine, puis converti en éthylène par l'ACC oxydase.

Les plantes androïques homozygotes pour l'allèle muté ACS8 de l'invention comprennent un polypeptide ou polynucléotide de l'invention.

Les graines obtenues par un tel procédé sont de facto androïques, et comprennent un polypeptide ou polynucléotide de l'invention.

Naturellement, un autre objet de l'invention porte également sur une plante ou une graine obtenue par ce procédé selon l'invention.

De préférence, ladite plante androïque de la famille des cucurbitacées n'est pas issue de l'espèce *Cucumis sativus.*

Un autre objet de l'invention concerne également un procédé de production d'une graine de plante, de préférence hybride, diploïde ou triploïde, comprenant les étapes de :

a. planter un champ alternativement avec les plantes androïques et/ou à tendance androïque de l'invention comprenant un premier caractère d'intérêt et des plantes gynoïques et/ou mâles stériles telles que définies dans la présente invention comprenant un deuxième caractère d'intérêt ;
b. récolter les fruits des plantes obtenus après pollinisation, et
c. extraire les graines desdits fruits.

Selon l'invention, une plante androïque ou à tendance androïque de l'invention porte un allèle muté ACS8 de l'invention ou est hétérozygote pour l'allèle muté de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un variant de l'ACS8 de référence. Ladite plante à tendance androïque porte plus de fleurs mâles que la même plante sauvage monoïque ou andromonoïque n'ayant pas ledit allèle muté.

De préférence, ladite graine est homozygote pour l'allèle muté ACS8 de l'invention, et comprend ainsi un polypeptide et/ou un polynucléotide de l'invention.

De préférence, ladite graine de la famille des cucurbitacées n'est pas issue de l'espèce *Cucumis sativus*.

Un autre objet de l'invention concerne une plante, de la famille des cucurbitacées, sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita*, *Luffa*, *Momordica* et *Lagenaria*, à l'exclusion de l'espèce *Cucumis sativus*, et caractérisée en ce qu'elle est androïque.

Un autre objet de l'invention concerne une utilisation, pour la sélection de plantes androïques de la famille des Cucurbitacées, de sondes ou d'amorces permettant la détection du polynucléotide selon l'invention dans un échantillon comprenant des cellules d'une telle plante ou des extraits de celles-ci.

Par "sonde" on entend, au sens de la présente invention, une séquence d'acide nucléique possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec une séquence d'acide nucléique cible et émettant un signal lors de l'hybridation de la sonde sur la séquence d'acide nucléique cible.

Par "amorce" on entend, au sens de la présente invention une séquence d'acide nucléique qui est capable d'être un point d'initiation de la synthèse d'une séquence d'acide nucléique, le long d'un brin d'acide nucléique complémentaire, dans des conditions catalysant ladite synthèse. De telles conditions incluent la présence des quatre bases nucléotidiques et d'un agent de polymérisation tel qu'une DNA polymérase, dans une solution tampon et avec une température appropriés.

L'homme du métier sera à même d'identifier simplement de telles sondes ou amorces au regard de ses connaissances générales. De telles sondes ou amorces correspondent avantageusement à des polynucléotides d'au moins 15 acides nucléiques, de préférence d'au moins 20 acides nucléiques.

Avantageusement encore, ces sondes ou amorces présentent une séquence identique ou complémentaire à une séquence codant pour une ACS8 d'une plante appartenant à la famille des Cucurbitacées. A titre d'exemple de telles séquences, on peut citer les séquences SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 7 de *Cucumis sativus* et SEQ ID N°13 et SEQ ID N°16 de *Cucumis melo*.

Un autre objet de l'invention concerne une utilisation, pour la sélection de plantes androïques de la famille des Cucurbitacées, d'anticorps permettant la détection du polypeptide selon l'invention dans un échantillon comprenant des cellules d'une telle plante ou des extraits de celles-ci.

Par "anticorps" on entend, au sens de la présente invention, notamment des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ou des fragments (par exemple les fragments $F(ab)'_2$, F(ab)) ou reconnaissant le polypeptide ou le fragment de polypeptide cible selon l'invention.

Tableau des séquences

SEQ ID N°	Type	Désignation
1	Polynucléotide	Séquence génomique d'ACS8 sauvage de *Cucumis sativus*
2	Polynucléotide	Séquence codante d'ACS8 sauvage de *Cucumis sativus*
3	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 sauvage de *Cucumis sativus*
4	Polynucléotide	Séquence génomique du variant délété d'ACS8 de *Cucumis sativus*
5	Polynucléotide	Séquence codante du variant délété d'ACS8 de *Cucumis sativus*
6	Polypeptide	Séquence protéique du variant délété d'ACS8 de *Cucumis sativus*
7	Polynucléotide	Séquence génomique du variant W58→STOP d'ACS8 de *Cucumis sativus*
8	Polynucléotide	Séquence codante du variant W58→STOP d'ACS8 de *Cucumis sativus*
9	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 du variant W58→STOP de de *Cucumi ssativus*
10	Polynucléotide	Séquence génomique d'ACS8 sauvage de *Cucumis melo*
11	Polynucléotide	Séquence codante d'ACS8 sauvage de *Cucumis melo*
12	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 sauvage de *Cucumis melo*
13	Polynucléotide	Séquence génomique du variant L45→F d'ACS8 de *Cucumis melo*
14	Polynucléotide	Séquence codante du variant L45→F d'ACS8 de *Cucumis melo*
15	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 du variant L45→F de de *Cucumis melo*
16	Polynucléotide	Séquence génomique du variant S295→F d'ACS8 de *Cucumis melo*
17	Polynucléotide	Séquence codante du variant S295→F d'ACS8 de *Cucumis melo*
18	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 du variant S295→F de de *Cucumis melo*
19	Polynucléotide	Séquence génomique d'ACS8 sauvage de *Citrullus lanatus*
20	Polynucléotide	Séquence codante d'ACS8 sauvage de *Citrullus lanatus*

21	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 sauvage de *Citrullus lanatus*
22	Polynucléotide	Séquence génomique d'ACS8 sauvage de *Luffa acutangula*
23	Polynucléotide	Séquence codante d'ACS8 sauvage de *Luffa acutangula*
24	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 sauvage de *Luffa acutangula*
25	Polynucléotide	Séquence génomique d'ACS8 sauvage de *Lagenaria siceraria*
26	Polynucléotide	Séquence codante d'ACS8 sauvage de *Lagenaria siceraria*
27	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 sauvage de *Lagenaria siceraria*
28	Polynucléotide	Séquence génomique d'ACS8 sauvage de *Momordica charentia*
29	Polynucléotide	Séquence codante d'ACS8 sauvage de *Momordica charentia*
30	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 sauvage de *Momordica charentia*
31	Polynucléotide	Séquence génomique incomplète d'ACS8 sauvage de *Cucurbita pepo*
32	Polynucléotide	Séquence codante incomplète d'ACS8 sauvage de *Cucurbita pepo*
33	Polypeptide	Séquence protéique incomplète d'ACS8 sauvage de *Cuurbita pepo*
34	Polynucléotide	Séquence génomique d'ACS8 sauvage de *Citrullus lanatus*
35	Polynucléotide	Séquence codante d'ACS8 sauvage de *Citrullus lanatus*
36	Polypeptide	Séquence protéique d'ACS8 sauvage de *Citrullus lanatus*

Les exemples qui suivent sont fournis à titre d'illustration et ne sauraient limiter la portée de la présente invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : population de cartographie

Pour cartographier génétiquement le gène A responsable de l'androécie chez le concombre (*Cucumis sativus*), espèce pour laquelle l'androécie existe à l'état naturel, nous avons exploité une population en ségrégation pour ce phénotype. Le gène étant

un gène récessif nous avons exploité une population backcross (BC). Pour cela des plantes de concombre monoïques (fleur mâles et fleurs femelles sur la même plante) ont été croisées avec des plantes androïques (uniquement fleurs mâles). La descendance F1 a été recroisée avec le parent androïque pour produire la descendance backcross 1 (BC1) (**Figure 1**). La descendance BC1 sera pour 50% monoïque et 50% androïque. 260 plantes issues du BC1 ont été phénotypées et ont servi à l'extraction d'ADN génomique.

Exemple 2 : Localisation primaire de la région contenant le gène de l'androécie

Le but de cette étape est l'identification de marqueurs moléculaires qui ségrégent spécifiquement avec l'androécie. Pour identifier ces marqueurs, l'idée est de regrouper l'ADN des individus BC1 monoïques et l'ADN des individus BC1 androïques. Cette technique est appelée BSA, Bulk Segregant Analysis, (Michelmore, R.W. et al. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 9828-9832, 1991) ou analyse de ségrégation en mélange. Suivant cette stratégie, nous avons produit 4 bulks de 7 individus différents (2 bulks d'ADN de plantes androïques et 2 bulks d'ADN de plantes monoïques). Les bulks d'ADN issus de plantes de même type sexuel ont donné les même résultats et par conséquent la recherche de marqueur moléculaire AFLP (Vos, P. et al. AFLP: *a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research.Vo121, 21: 4407-4414,1995) a été réalisé avec seulement 2 bulks d'ADN (1 bulk androïque, 1 bulk monoïque).

Suite au criblage de l'intégralité des 1024 combinaisons AFLP possibles nous avons obtenu 52 combinaisons AFLP polymorphes entre les deux bulks (monoïque et androïque). Les 52 AFLP ont été utilisées pour génotyper 50 plantes individuelles. A l'issue de ce travail, nous avons identifié 7 marqueurs AFLP qui co-ségrégent ou qui sont très fortement liés au phénotype androécie. Les 7 marqueurs AFLP ont été utilisés pour construire la carte génétique de première intention du locus Androecy (**Figure 2**).

Exemple 3 : Ancrage des marqueurs AFLP sur la séquence du génome du concombre et développement de la carte génétique fine de la région du gène de l'androécie

L'ancrage des marqueurs AFLP a été facilité par la disponibilité de la séquence du génome de concombre. Le positionnement des marqueurs AFLP nous a permis de mesurer la distance physique entre les deux marqueurs AFLP (Pst65xMse52 et Pst74xMse17) encadrant le locus Androecy. Cette distance est de 781kilobases (kb) est contient 62 gènes.

Afin de réduire au maximum l'intervalle physique, nous avons développé de nouveaux marqueurs moléculaires tous les 50 kb dans une région de 1 Mégabase (Mb) centrée sur le locus Androecy. Tous ces marqueurs sont développés dans des régions intergéniques. Grâce à cette approche, nous avons identifié les marqueurs génétiques A82xA87 et A48xA50 qui nous ont permis de cribler une population BC1 de 1717 individus dans le but de trouver de nouveaux recombinants génétiques dans la région du locus Androecy.

Suite à l'identification des nouveaux marqueurs génétiques et de la recherche de recombinants, nous avons développé la carte génétique fine du locus Androecy.

Cette approche ne nous a pas permis d'identifier directement le gène responsable de l'androécie. Cependant, les recombinants délimitent l'intervalle génétique responsable de l'androécie à 53.5 kb contenant 7 gènes prédits.

Exemple 4 : Identification du gène candidat du polymorphisme responsable de l'androécie et génétique d'association

Parmi les 7 gènes dans l'intervalle génétique de confiance, le gène *CsACS8* code pour une ACC synthase, enzyme clef de la voie de biosynthèse de l'éthylène. Du point de vue génétique, la distance physique entre ce gène *CsACS8* et les autres marqueurs AFLP (**Figure 2**) est compatible avec la relation distance physique / distance génétique décrite pour le concombre. De plus chez les Cucurbitacées comme le concombre et le melon, l'éthylène a été décrit comme l'hormone végétale à effet majeure sur la

détermination du type sexuel floral. Au vue de ces différents points, le gène *CsACS8* est considéré comme un très bon gène candidat.

Afin de vérifier si le gène *CsACS8* peut être le gène responsable de l'Androécie, nous avons séquencé ce gène chez les parents de la population de cartographie, le parent androïque et le parent monoïque. Chez le parent monoïque portant l'allèle dominant A, le gène CsACS8, composé de 4 exons et 3 introns, code pour une protéine de 441 acides aminés. Chez le parent androïque, le gène CsACS8 présente une délétion d'une base dans le 3ème exon du gène. Cette délétion change le cadre de lecture protéique et entraine l'apparition du codon STOP 20 acides aminés après la délétion aboutissant ainsi à une protéine de 151 acides aminés (**Figure 3**).

Pour consolider les données de cartographie génétique, nous avons réalisé une étude de génétique d'association entre le phénotype androïque et la délétion d'1 paire de bases dans le gène *CsACS8* sur 28 accessions de concombre (2 androïques, 2 gynoïques, 6 andromonoïques, 9 monoïques et 9 hermaphrodites). Le séquençage de *CsACS8* chez ces 28 accessions a mis en évidence une association parfaite entre la délétion d'1 paire de bases et l'androécie, autrement dit les 2 accessions androïques portent la délétion alors que toutes les autres accessions quelques soit le type sexuel ne présentent pas la délétion.

Exemple 5 : Validation fonctionnelle du gène CsACS8

Au laboratoire, nous disposons d'une population TILLING (mutants EMS) concombre de 3360 familles réalisée à partir de la variété Beit alpha. Cette variété de concombre est monoïque et porte donc des fleurs males et femelles. Sur cette population TILLING, nous avons recherché des mutations induites par l'EMS sur la totalité de la séquence codante du gène *CsACS8*.

Dans la population TILLING Beit Alpha, nous avons identifié 9 mutations: 7 silencieuses et 1 changement d'acide aminé P437L et 1 mutant STOP. Les plantes homozygotes mutantes pour la mutation STOP ne développent que des fleurs mâles et sont donc devenues androïques. Les mutants P437L sont en cours de phénotypage.

Afin d'étudier si le gène *CsACS8* contrôle aussi l'androécie chez d'autres Cucurbitacées, nous avons étudié son rôle dans le déterminisme sexuel chez le melon, une cucurbitacée pour laquelle l'existence de l'androécie à l'état naturel n'a jamais été reportée. Pour ce faire, nous avons identifié la séquence de l'homologue du gène *CsACS8* chez le melon : *CmACS8*.

En exploitant notre population TILLING melon, nous avons identifié 12 familles mutées dans le gène *CmACS8*. Parmi ces 12 mutations, 5 sont introniques, 4 silencieuses, et 3 entrainent un changement d'acide aminé (L45F, G72E et S295F). La mutation G72E affecte un acide aminé située dans une région protéique variable alors que les mutations L45F et S295F affectent des acides amines dans des régions protéiques hautement conservées chez toutes les plantes.

Sachant que l'accession de melon utilisée comme parent de la population TILLING est monoïque (fleur male et fleur femelle sur la même plante), les trois familles de melon portant des mutations changement d'acide aminé dans le gène *CmACS8* ont été phenotypées pour leur type sexuel. Les plantes homozygotes pour la mutation G72E portent des fleurs males et femelles (plante monoïque) et par conséquent n'ont pas été affectées dans leur déterminisme sexuel. Au contraire, les plantes homozygotes mutantes L45F et S295F ne produisent que des fleurs mâles et sont donc devenues androïques. Grace à ces mutants, nous avons pu créer un type sexuel, l'androécie, qui n'a jamais été décrit chez le melon.

Ces résultats valident le fait que le gène de l'androécie identifié chez le concombre contrôle aussi l'androécie chez le melon, une autre cucurbitacée.

Exemple 6 : Validation fonctionnelle du gène CsACS8 chez la courgette (*Cucurbita pepo*)

Afin d'étudier si le gène *ACS8* contrôle aussi l'androécie chez d'autres Cucurbitacées que le concombre et le melon, nous étudions son rôle dans le déterminisme sexuel chez la courgette, une cucurbitacée pour laquelle l'existence de l'androécie à l'état naturel n'a jamais été reportée. Pour ce faire, nous cherchons à

identifier la séquence de l'homologue du gène *CsACS8* du concombre et *CmACS8* du melon chez la courgette : *CpACS8.*

En exploitant notre population TILLING courgette, nous cherchons à identifier des plantes mutées dans le gène *CpACS8*présentant la caractéristique d'être androïques. Des analyses plus fines sont en cours pour déterminer la nature de la mutation responsable de l'androécie chez les courgettes.

Exemple 7 : Validation fonctionnelle du gène CsACS8 chez la pastèque (*Citrullus lanatus*)

Afin d'étudier si le gène *ACS8* contrôle aussi l'androécie chez d'autres Cucurbitacées que le concombre et le melon, nous étudions son rôle dans le déterminisme sexuel chez la pastèque, une cucurbitacée pour laquelle l'existence de l'androécie à l'état naturel n'a jamais été reportée. Pour ce faire, nous cherchons à identifier la séquence de l'homologue du gène *CsACS8* du concombre et *CmACS8* du melon chez la pastèque : *ClACS8.*

En exploitant notre population TILLING pastèque, nous cherchons à identifier des plantes mutées dans le gène *ClACS8* présentant la caractéristique d'être androïques. Des analyses plus fines sont en cours pour déterminer la nature de la mutation responsable de l'androécie chez les pastèques.

Exemple 8 : Dosage de l'activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate par l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8)

L'activité enzymatique de l'ACS8 est mesurée *in vitro* en suivant, par spectrophotométrie à 265 nm, la formation de 5'-methylthioadenosine (MTA) après la mise en présence de S-adénosyl méthionine, de déaminase et de différentes concentrations de PLP (pyridoxal5'-phosphate).

Souches bactériennes, plasmides et produits de réaction :

La souche bactérienne Escherichia coli BL21(DE3)pLYSS est utilisée pour l'expression de l'enzyme. Le vecteur de clonage utilisé est le plasmide pET15b

(NOVAGEN) qui porte le promoteur T7 et comprend la résistance à l'ampicilline. La S-adénosyl Methionine (SAM), le Pyridoxal 5'phosphate (PLP) et la 5'Adenylic Acid Deaminase d'Aspergillus (déaminase) peuvent être obtenus auprès de de la société SIGMA.

Expression de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) dans E.coli

Les ACS8 de référence issues de SEQ ID N° 3 et N°12 ou recombinantes et issues de SEQ ID N°6, N°9, N°15 et N°18 ont été clonées dans le vecteur Pet15b, lequel vecteur a été utilisé pour transformer les bactéries Escherichia coli BL21(DE3)pLYSS selon les conditions fournis par le fabricant.

Ces bactéries Escherichia coli BL21(DE3)pLYSS transformée avec le construit portant la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) sont incubées dans 25 ml de milieu LURIA-BERTANI (tryptone 10g/L, extrait de levure 5g/L, NaCl 10g/L) additionné d'ampicilline et de chloramphénicol (50 µg/ml chacun) durant une nuit à 37°C. Cette pré-culture est utilisée pour inoculer 2 litres du même milieu additionné d'ampicilline (50 µg/ml) et les cellules sont cultivées à 37°C dans un incubateur sous agitation (180 t/mn) jusqu'à une Densité Optique (DO=600nm) de 0.6. De l'IPTG est additionné (0.5mM) afin d'induire l'expression protéique durant une nouvelle phase de culture de 5 heures à 25°C. Les cellules sont centrifugée et gardée durant la nuit à -45°C. Les cellules sont alors re-suspendues dans 15 ml de TrisNaCl (50mM, pH7.9, 500mM, respectivement) puis soumises à sonication sur glace en présence inhibiteur de protéase (phenylmethanesulfonyl fluoride), leupeptine, pepstatine et aprotinine, 10µg/ml chacune). Les débris cellulaires sont enlevés lors d'une nouvelle étape de centrifugation à 13.000 g durant 15 minutes et le surnageant est immédiatement utilisé pour la purification enzymatique.

Purification des ACS8

Du fait de la présence d'une étiquette Histidine associée à chacune des ACS8, celles-ci sont purifiées en utilisant une colonne au nickel (Ni-IDA 15 ml) préalablement équilibrée avec du TRIS à PH8 (50mM) et du NaCl (500mM). Après passage de la

solution contenant de l'ACS8 recombinante à purifier, la colonne est ensuite lavée avec du TRIS à PH8 (50mM) et du NaCl (500mM) additionnés d'imidazole (10mM) jusqu'à ce qu'aucune protéine ne soit plus détectable en sortie. Les ACS8 sont alors éluées avec la même solution tampon additionnée d'imidazole à 100mM, puis dialysés (KPhos 50mM à PH8.5) avant d'être concentrées (MILLIPORE AMICON ULTRA DEVICE, 5000MWCO). La fraction concentrée (20mg/ml) de ACS8 est aliquotée et stockée avec du glycerol à -45°C. La purification de la protéine est suivie d'une électrophorèse capillaire (EXPERION DEVICE – BIO RAD) avec une puce PRO260.

Purification de l'Adenosine deaminase :

5 g de poudre de déaminase lyophilisée (SIGMA) sont resuspendus dans un bécher avec 90ml d'eau froide auxquels sont ajoutés 47 ml d'acétone. La solution est agitée 5 minutes à 4°C puis centrifugée 1 minute à 2000g. Le culot est mixé à 33 ml d'eau, agité 5 minutes et de nouveau centrifugé, 5 minutes à 2000g. Le culot est jeté et le surnageant est additionné de 10 ml d'éthanol. La solution est agitée 5 minutes à 4°C puis centrifugée. Le surnageant est additionné de 20 ml d'éthanol. La solution est doucement agitée durant 3 heures à 4°C. La solution est centrifugée 5 minutes à 7000g et le culot est resuspendu avec 6ml d'eau. La solution est dialysée (solution d'acétate de sodium, 5mM, pH5.3) durant au moins 24 heures puis concentrée (MILLIPORE AMICON ULTRA DEVICE, 5000MWCO) et enfin aliquotée dans du glycérol (5mg/ml) afin d'être stockée à -45°C.

Activité enzymatique :

L'activité enzymatique des différentes ACS 8 est déterminée en suivant la formation de 5'-methylthioadenosine (MTA) à 265 nm en spectroscopie différentielle sur un spectrophotomètre Uvikon 940 (BIOTEK-KONTRON) : les mesures sont réalisées lors de l'incubation de S-adénosyl méthionine (60 µg) dans 100mM de tampon KPhos (0.2ml, PH8.5) et de déaminase (8 µg) en présence ou en absence de pyridoxal5'-phosphate (0 à 300 µM). Les mesures sont faites dans les cuvettes de quartz du spectrophotomètre durant 3 minutes à 25°C après l'addition d'enzyme purifiée (1 à 2 µg). La conversion de MTA en dérivé inosine est suivie à 265 nm. Et l'activité

spécifique est exprimée en nanomoles de MTA formée par minute et par mg de protéine. Plus particulièrement, l'activité des séquences SEQ ID N°6, N°9 (*Cucumis sativus*), N°15 et N°18 (*Cucumis melo*) est exprimée en pourcentage d'activité par rapport aux séquences SEQ ID N°3 (*Cucumis sativus*) et SEQ ID N°12 (*Cucumis melo*). Un protocole identique est utilisé pour déterminer les Vm et Km.

Exemple 9 : Etude de la cinétique d'apparition des fleurs mâles et femelles pour des plantes portant la mutation de l'invention

Les inventeurs ont étudié les cinétiques d'apparition des fleurs males pour le mutant S295F (10 plantes homozygotes et 10 plantes hétérozygotes pour la mutation) et pour le mutant L45F (10 plantes homozygotes et 10 plantes hétérozygotes pour la mutation). Une plante est utilisée comme contrôle (10 plantes):

Les plantes sont transplantées en champs, puis, chaque matin, elles sont examinées afin de compter le nombre de nouvelles fleurs mâles :

	Mutant S295F	Mutant S295F	Mutant L45F	Mutant L45F	Contrôle
	Homozygote	Hétérozygote	Homozygote	Hétérozygote	
Jour 1	0,2	0,4	0	0,1	0
Jour 2	0	0,3	0,8	0,3	0,9
Jour 3	1,0	0,3	0,8	1,0	0,7
Jour 4	0,7	1,2	1,3	1,6	0,9
Jour 5	1,9	1,6	0,9	0,9	1,6
Jour 6	2,2	2,6	1,8	1,3	1,4
Jour 7	0,7	0,7	1,4	0,9	0,7
Jour 8	0,9	0,5	0,9	0,6	0,4
Jour 9	1,9	1,1	1,6	1,6	1,6
Jour 10	1,6	1,6	1,6	1,7	1,0
Jour 11	1,4	1,9	1,6	1,7	0,7
Jour 12	1,9	0,8	1,0	1,7	1,1
Jour 13	1,6	1,4	0,7	1,3	1,9
Jour 14	0,9	0,9	0,8	1,2	0,6
Jour 15	1,1	1,5	2,1	2,3	1,1
Jour 16	5,3	3,3	5,2	4,8	3,3
Jour 17	3,3	4,7	3,8	4,4	2,1
Jour 18	4,7	4,4	4,2	4,1	3,0

Jour 19	5,0	4,5	6,1	4,6	4,0
Jour 20	7,9	6,5	7,7	7,1	3,3
Jour 21	12,0	7,7	10,0	9,6	3,9
Jour 22	6,4	4,4	9,5	9,4	4,0
Jour 23	11,1	8,0	9,5	10,5	3,1
Jour 24	14,3	10,9	11,8	11,9	4,6
Jour 25	13,8	7,5	12,4	13,8	4,6
Jour 26	14,1	8,9	22,8	13,5	6,0
Jour 27	19,4	10,5	18,5	13,4	7,0
Jour 28	30,0	19,3	25,6	24,0	12,7
Jour 29	41,1	22,3	34,6	28,8	11,7
Jour 30	35,4	25,5	31,5	29,9	14,3
Jour 31	45,6	25,8	45,0	30,3	15,9
Jour 32	43,2	25,6	41,3	35,4	17,0
Jour 33	57,2	27,4	46,4	34,6	17,3
Jour 34	70,4	34,2	54,7	41,8	25,1
Jour 35	64,7	33,6	52,2	37,9	19,4
Jour 36	71,8	31,2	60,6	39,7	18,6

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.

Les deux mutations S295F et L45F, quand présentes de manière homozygotes et hétérozygotes dans les plantes favorisent l'apparition de fleurs mâles.

Les inventeurs ont par ailleurs étudié les cinétiques d'apparition des fleurs femelles pour le mutant S295F (10 plantes homozygotes pour la mutation) et pour le mutant L45F (10 plantes homozygotes et 10 plantes hétérozygotes pour la mutation). Une plante est utilisée comme contrôle (10 plantes):

	Mutant S295F Homozygote	Mutant L45F Homozygote	Contrôle		Mutant S295F Homozygote	Mutant L45F Homozygote	Contrôle
Jour 1	0	0	0	Jour 19	0	0	0
Jour 2	0	0	0	Jour 20	0	0	0
Jour 3	0	0	0	Jour 21	0	0	0
Jour 4	0	0	0	Jour 22	0	0	0
Jour 5	0	0	0	Jour 23	0	0	0
Jour 6	0	0	0	Jour 24	0	0	0,1
Jour 7	0	0	0	Jour 25	0	0	0,2
Jour 8	0	0	0	Jour 26	0	0	0,1
Jour 9	0	0	0	Jour 27	0	0	0

Jour 10	0	0	0	Jour 28	0	0	0,7
Jour 11	0	0	0	Jour 29	0	0	0,4
Jour 12	0	0	0	Jour 30	0	0	0,4
Jour 13	0	0	0	Jour 31	0	0	0,4
Jour 14	0	0	0	Jour 32	0	0	0
Jour 15	0	0	0	Jour 33	0	0	1,4
Jour 16	0	0	0	Jour 34	0	0	4
Jour 17	0	0	0,2	Jour 35	0	0,1	2,4
Jour 18	0	0	0,2	Jour 36	0	0,1	1

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 5.

Les deux mutations S295F et L45F, quand présentes de manière homozygotes dans les plantes empêchent l'apparition de fleurs femelles.

Exemple 10 : Héritabilité du trait

Les inventeurs ont souhaité étudier la transmission du phénotype androïque d'une génération à l'autre. Toutefois, de par la nature même des plantes, il est bien évidemment impossible de réaliser la fécondation d'une plante androïque par elle-même ou par une autre plante androïque.

Les inventeurs ont alors traité les plantes avec de l'éthrel, un régulateur de croissance connu pour induire des fleurs femelles chez les cucurbitacées. Les plantes ainsi traitées ont brièvement produit des fleurs femelles, suffisamment pour que qu'elles puissent être fécondées et produire des fruits. Les graines issues de ces fruits ont été plantées pour produire des plantes dont le phénotype est androïque : le phénotype androïque de la présente invention est donc héritable.

Exemple 11 : détermination de l'activité enzymatique des différentes isoformes de l'enzyme ACS8

Les inventeurs ont déterminés les caractéristiques biochimiques des différentes isoformes de l'enzyme ACS8 en présence de 5 ou de 100µm de PLP. Il convient de noter que la concentration de PLP présente dans la cellule serait de l'ordre de 5µm.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau qui suit.

SEQ ID N°	Enzyme	PLP 100µm		PLP 5µm	
		Km (µM)	Vmax (nmol.min^{-1}.mg^{-1})	Km (µM)	Vmax (nmol.min^{-1}.mg^{-1})
3	CsACS8	25 ±6	576 ± 35	20 ±6	500 ± 35
6	Csacs8	ND	ND	ND	ND
9	Csacs8_W58STOP	ND	ND	ND	ND
12	CmACS8	20 ± 5	607 ± 55	20 ± 5	587 ± 51
15	Cmacs8_L45F	25 ± 4	60 ± 20	23 ± 4	75 ± 20
Pas listé	Cmacs8_G72E	15 ± 5	600 ± 50	17 ± 5	575 ± 50
18	Cmacs8_S295F	15 ± 5	400 ± 100	16 ± 5	275 ± 100

Les résultats montrent que l'activité de l'isoforme sauvage d'ACS8 chez le concombre (SEQ ID n°3) et chez le melon (SEQ ID n°12) ont une activité enzymatique comparable quel que soit les concentrations en substrat.

Les isoformes mutantes du concombre, présentant toutes deux un décalage du cadre de lecture aboutissant à l'expression d'une protéine de 151 (SEQ ID n°6) ou de 57 acides aminés (SEQ ID n°9) au lieu de 440, ne montrent elles aucune activité enzymatique.

Les isoformes mutantes du melon, mis à part l'isoforme G72E, présentent par contre une activité réduite par rapport à l'activité de l'isoforme sauvage. Plus spécifiquement, les isoformes L45F et S295F montrent une réduction de l'ordre de 90 et 50% respectivement de l'activité enzymatique par rapport à celle de l'isoforme sauvage.

Finalement, ces résultats démontrent qu'un isoforme présentant une activité enzymatique réduite d'au moins 50% par rapport à l'isoforme sauvage présente un phénotype androïque.

REVENDICATIONS

1. Une plante, de la famille des Cucurbitacées, laquelle plante est :
   - sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis*, *Citrullus*, *Cucurbita*, *Luffa*, *Momordica* et *Lagenaria*, à l'exclusion de l'espèce *Cucumis sativus* ; et
   - caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un polypeptide correspondant à un variant de l'ACS8 de référence pour ladite plante, laquelle 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence est codée par une séquence d'acide nucléique correspondant à un allèle dominant d'ACS8 et présente une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

2. La plante, selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est homozygote pour l'allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un variant de l'ACS8 de référence et en ce qu'elle est, androïque.

3. La plante, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente, en outre, au moins un premier caractère d'intérêt exprimé par ladite plante et qui lui confère des propriétés spécifiques par rapport aux autres plantes qui n'expriment pas ce caractère, tel qu'un rendement plus élevé, une moindre consommation d'eau ou encore une floraison plus précoce.

4. La plante, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par des techniques de génie génétique.

5. Une graine dont la germination conduit à une plante telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 4.

6. Un polypeptide isolé correspondant à un variant d'une 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de référence, de plante de la famille des Cucurbitacées, laquelle 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence présente une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50%, de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

7. Un polynucléotide codant pour un polypeptide tel que défini à la revendication 6.

8. Une cellule issue d'une plante telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide selon la revendication 6 ou un polynucléotide selon la revendication 7.

9. Un procédé d'identification d'une plante possédant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini à la revendication 6 et comprenant les étapes de :

   a) Analyse d'un échantillon comprenant des cellules d'une plante de la famille des Cucurbitacées ou des extraits de celle-ci de sorte à identifier si ladite plante comprend une

séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini à la revendication 7 ; et

b) Identification d'une plante comprenant une telle séquence d'acide nucléique.

10. Le procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite plante de la famille des Cucurbitacées présente en outre au moins un premier caractère d'intérêt et en ce qu'il comprend en outre, éventuellement, une étape b') de sélection d'une plante présentant toujours ledit au moins premier caractère d'intérêt.

11. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape préalable de mutagénèse d'une plante ou d'une graine de plante de la famille des Cucurbitacées.

12. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il vise à la sélection d'une plante androïque et en ce qu'il comprend en plus des étapes :

a) Analyse d'un échantillon comprenant des cellules d'une plante de la famille des Cucurbitacées ou des extraits de celle-ci de sorte à identifier si ladite plante comprend une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini à la revendication 6 ; et

b) Identification d'une plante comprenant une telle séquence d'acide nucléique,

les étapes de :

c) croisement de plantes présentant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini à la revendication 6, et

d) sélection d'une plante homozygote pour ladite séquence d'acide nucléique.

13. Un procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes de :

e) croisement d'une plante présentant au moins un premier caractère d'intérêt obtenue à l'étape d) avec une plante de la famille des Cucurbitacées présentant au moins un second caractère d'intérêt ; et

f) sélection d'une plante présentant lesdits au moins premier et second caractères d'intérêts.

14. Un procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la plante de la famille des Cucurbitacées présentant au moins un second caractère d'intérêt est gynoïque ou mâle stérile.

15. Un procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que ledit procédé d'identification d'une plante telle que définie à la revendication 9 et de sélection d'une plante androïque et vise en outre à la production d'une graine de plante hybride et en ce qu'il comprend, outre les étapes a), b), c), d), e) et f), les étapes de :

g) Planter un champ alternativement avec les plantes androïques telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou à tendance androïque, laquelle plante à tendance androïque est hétérozygote pour l'allèle muté de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un variant de l'ACS8 de référence et laquelle plante à tendance androïque porte plus de fleurs mâles que la même plante sauvage monoïque ou andromonoïque n'ayant pas ledit allèle muté, et des

plantes gynoïques et/ou mâles stériles telles que définies à la revendication 14 ;

h) Récolter les fruits des plantes gynoïques et/ou mâles stériles obtenus après pollinisation ; et

i) Extraire les graines desdits fruits.

16. Une graine, de préférence hybride, de plante obtenue selon le procédé de la revendication 15 dont la germination conduit à une plante telle que définie à l'étape f) de la revendication 13 et caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide selon la revendication 6 ou un polynucléotide selon la revendication 7.

17. Une plante, de la famille des cucurbitacées, sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis, Citrullus, Cucurbita, Luffa, Momordica* et *Lagenaria,* à l'exclusion de l'espèce *Cucumis sativus,* susceptible d'être obtenue par un procédé selon la revendication 15, et caractérisée en ce qu'elle est androïque.

18. Utilisation, pour la sélection de plantes androïques de la famille des Cucurbitacées, de sondes ou d'amorces permettant la détection d'un polynucléotide tel que défini à la revendication 7 dans un échantillon comprenant des cellules d'une telle plante ou des extraits de celles-ci.

19. Utilisation, pour la sélection de plantes androïques de la famille des Cucurbitacées, d'anticorps permettant la détection d'un polypeptide tel que défini à la revendication 6 dans un échantillon comprenant des cellules d'une telle plante ou des extraits de celles-ci.

20. Un procédé de production d'une plante androïque de la famille des cucurbitacées, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) Obtention d'une plante de la famille des cucurbitacées, préférentiellement sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis,Citrullus, Cucurbita, Luffa, Momordica* et *Lagenaria*,

b) Inhibition de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) de ladite plante.

21. Un procédé de production d'une plante androïque ou à tendance androïque de la famille des Cucurbitacées, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) Obtention d'une plante de la famille des Cucurbitacées, laquelle plante est sélectionnée dans le groupe comprenant les genres *Cucumis,Citrullus, Cucurbita, Luffa, Momordica* et *Lagenaria*,

b) Mise en évidence de la présence d'au moins un allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un polypeptide selon la revendication 6,

c) Etude de l'activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 codée par ledit allèle,

d) Sélection d'une plante présentant une activité de transformation de la S-adénosyl méthionine en aminocyclopropane carboxylate et lequel variant présente une activité inférieure d'au moins 50% de préférence d'au moins 75% ou 90%, de manière encore préférée d'au moins 95% ou 99% par rapport à ladite 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 de référence et de manière particulièrement préférée, ledit variant présente une activité nulle.

22. Un procédé de propagation d'une plante homozygote androïque, comprenant les étapes de :

a) traitement de plantes androïques homozygotes pour un allèle de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un polypeptide selon la revendication 6, avec de l'éthéphon pour générer des fleurs femelles,

b) Autopollinisation des plants obtenues à l'étape a), et

c) récolte des graines.

23. Un procédé de production d'une graine de plante hybride, diploïde ou triploïde, comprenant les étapes de :

a. planter un champ alternativement avec les plantes androïques et/ou à tendance androïque , laquelle plante à tendance androïque est hétérozygote pour l'allèle muté de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8 (ACS8) non codant ou codant pour un variant de l'ACS8 de référence et laquelle plante à tendance androïque porte plus de fleurs mâles que la même plante sauvage monoïque ou andromonoïque n'ayant pas ledit allèle muté, comprenant un premier caractère d'intérêt et des plantes gynoïques et/ou mâles stériles comprenant un deuxième caractère d'intérêt ;

b. récolter les fruits des plantes obtenus après pollinisation, et

c. extraire les graines desdits fruits.

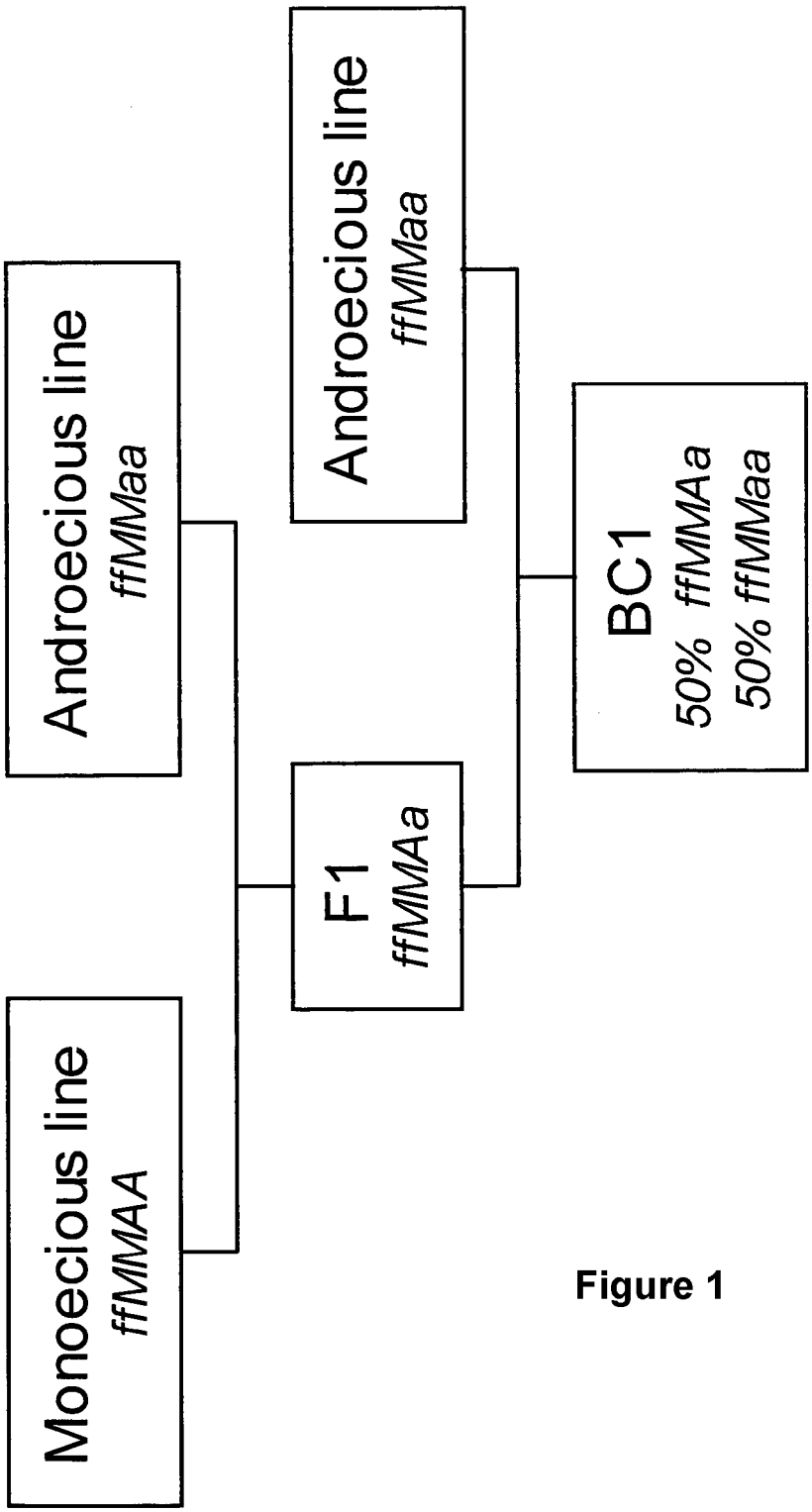

Androecious line
ffMMaa
Androecious line
ffMMaa
BC1
50% ffMMAa
50% ffMMaa
F1
ffMMAa
Monoecious line
ffMMAA

Figure 1

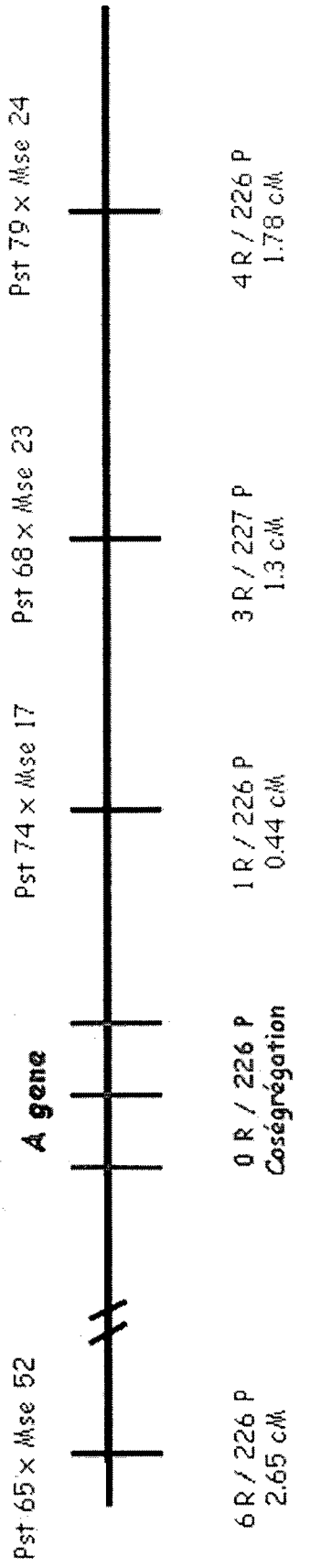

Pst 80 × Mse 24
Pst 79 × Mse 24
Pst 68 × Mse 23
Pst 74 × Mse 17
Pst 74 × Mse 14
Pst 73 × Mse 53
Pst 65 × Mse 52
A gene
4 R / 226 P
1.78 cM
3 R / 227 P
1.3 cM
1 R / 226 P
0.44 cM
0 R / 226 P
Coségrégation
6 R / 226 P
2.65 cM

Figure 2

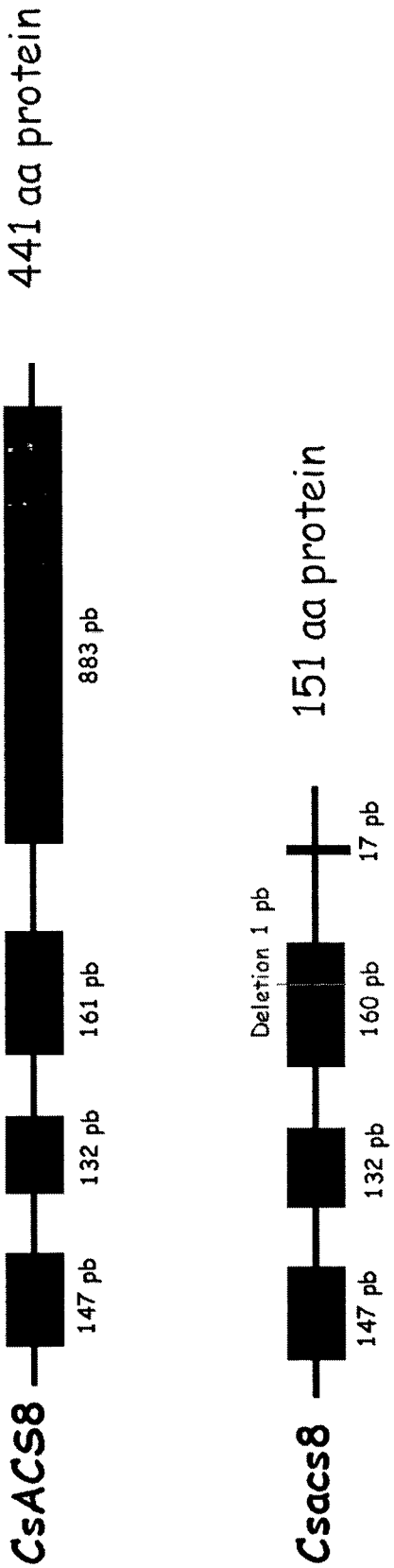

441 aa protein
883 pb
161 pb
132 pb
147 pb
CsACS8
151 aa protein
17 pb
Deletion 1 pb
160 pb
132 pb
147 pb
Csacs8

Figure 3

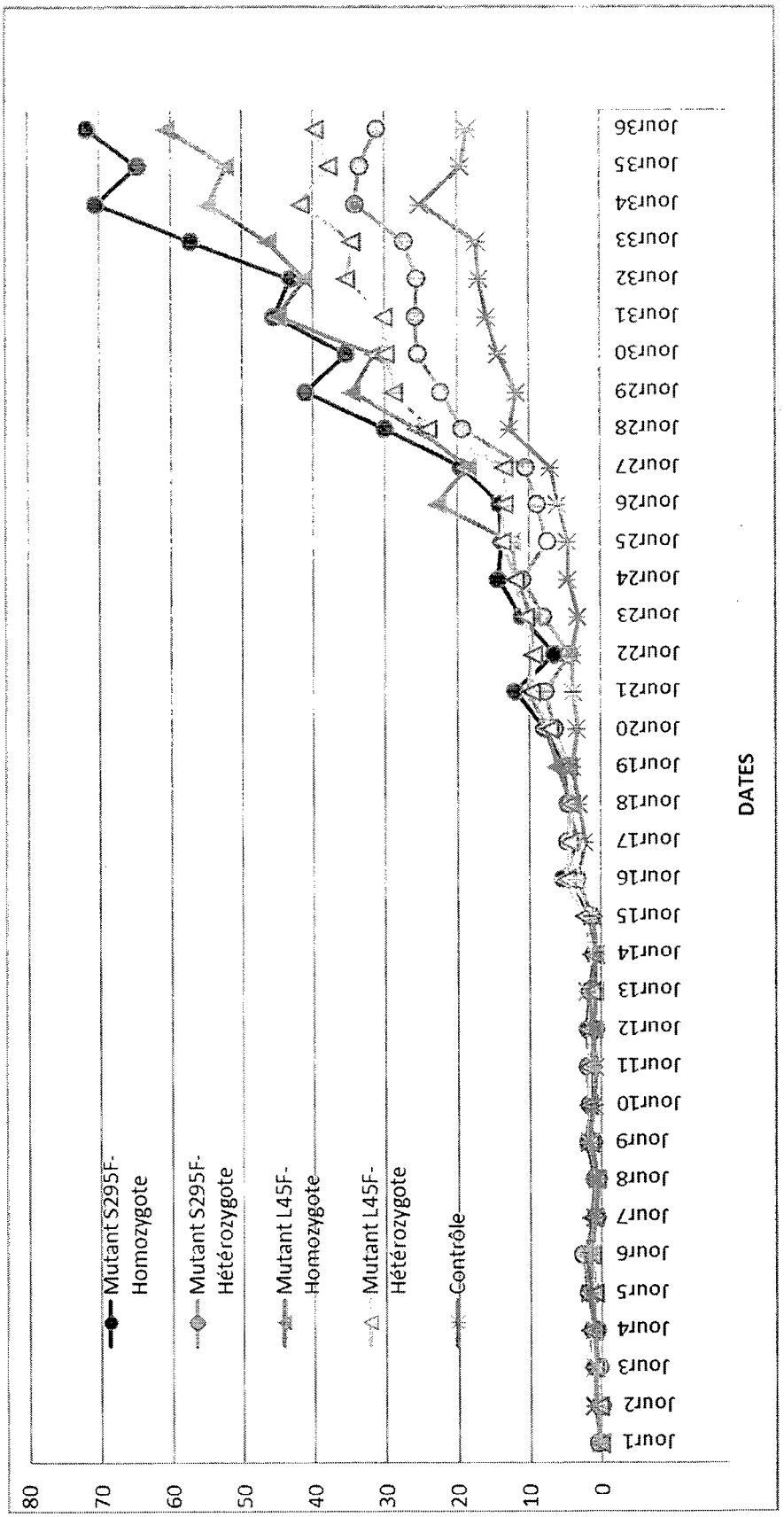

80
70
60
50
40
30
20
10
0
Mutant S295F-Homozygote
Mutant S295F-Hétérozygote
Mutant L45F-Homozygote
Mutant L45F-Hétérozygote
Contrôle
DATES
jour1
jour2
jour3
jour4
jour5
jour6
jour7
jour8
jour9
jour10
jour11
jour12
jour13
jour14
jour15
jour16
jour17
jour18
jour19
jour20
jour21
jour22
jour23
jour24
jour25
jour26
jour27
jour28
jour29
jour30
jour31
jour32
jour33
jour34
jour35
jour36

Figure 4

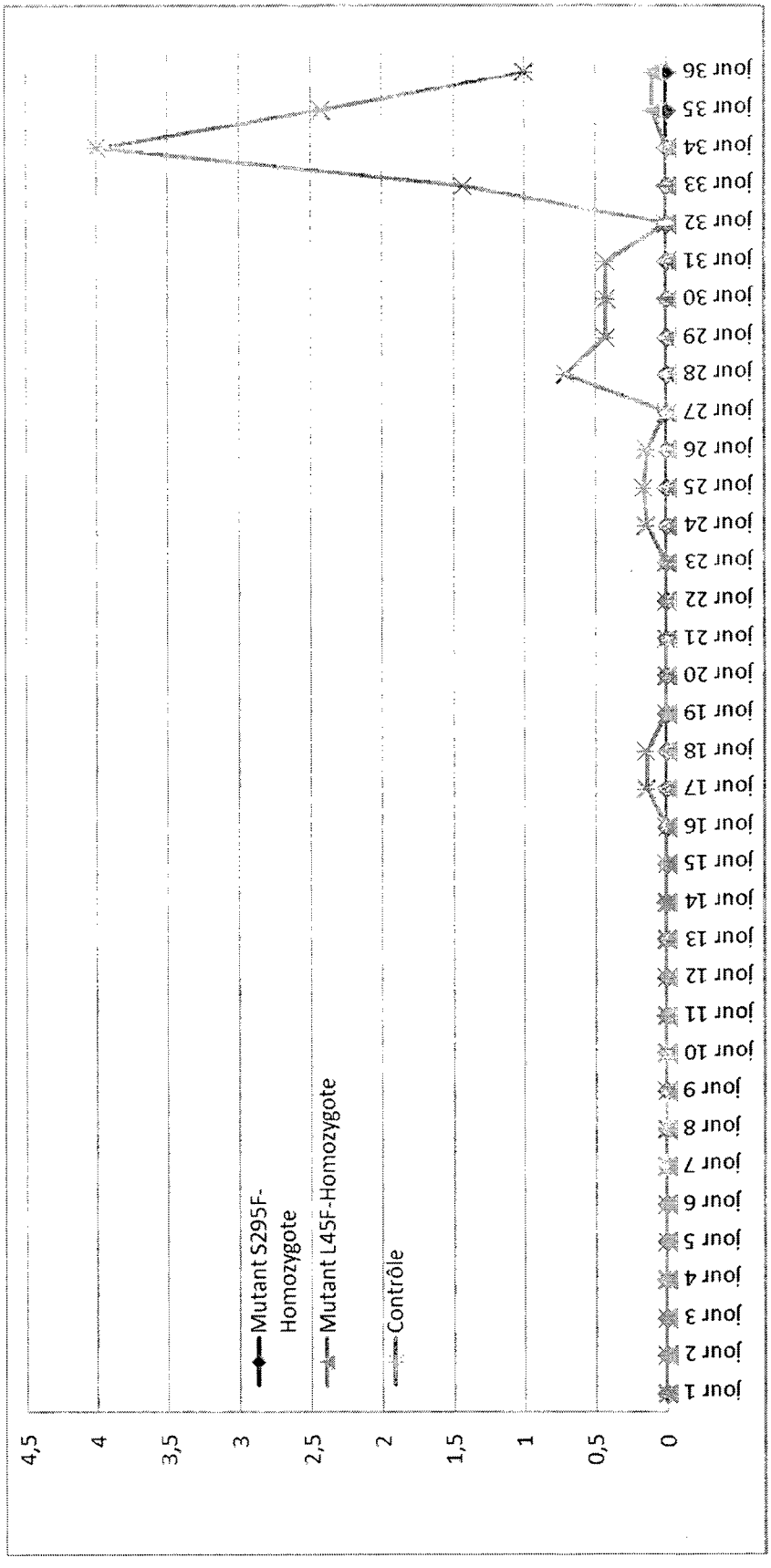

4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Mutant S295F-Homozygote
Mutant L45F-Homozygote
Contrôle
jour 1
jour 2
jour 3
jour 4
jour 5
jour 6
jour 7
jour 8
jour 9
jour 10
jour 11
jour 12
jour 13
jour 14
jour 15
jour 16
jour 17
jour 18
jour 19
jour 20
jour 21
jour 22
jour 23
jour 24
jour 25
jour 26
jour 27
jour 28
jour 29
jour 30
jour 31
jour 32
jour 33
jour 34
jour 35
jour 36

Figure 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/000106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01H1/04 A01H5/08 C12N15/82
ADD.

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)
A01H C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 934 277 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 29 January 2010 (2010-01-29) the whole document	1-20
A	FR 2 900 415 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 2 November 2007 (2007-11-02) the whole document	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 March 2013	20/03/2013

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/000106

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2934277 A1	29-01-2010	CN 102165067 A	24-08-2011
		EP 2318536 A2	11-05-2011
		FR 2934277 A1	29-01-2010
		US 2011314569 A1	22-12-2011
		WO 2010012948 A2	04-02-2010
FR 2900415 A1	02-11-2007	CA 2650768 A1	08-11-2007
		CN 101478869 A	08-07-2009
		EP 2012579 A2	14-01-2009
		FR 2900415 A1	02-11-2007
		MA 30946 B1	01-12-2009
		US 2009288214 A1	19-11-2009
		WO 2007125264 A2	08-11-2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2013/000106

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A01H1/04 A01H5/08 C12N15/82
ADD.

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A01H C12N

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 934 277 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 29 janvier 2010 (2010-01-29) le document en entier	1-20
A	FR 2 900 415 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 2 novembre 2007 (2007-11-02) le document en entier	1-20

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

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
13 mars 2013	20/03/2013

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

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2013/000106

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2934277 A1	29-01-2010	CN 102165067 A	24-08-2011
		EP 2318536 A2	11-05-2011
		FR 2934277 A1	29-01-2010
		US 2011314569 A1	22-12-2011
		WO 2010012948 A2	04-02-2010
FR 2900415 A1	02-11-2007	CA 2650768 A1	08-11-2007
		CN 101478869 A	08-07-2009
		EP 2012579 A2	14-01-2009
		FR 2900415 A1	02-11-2007
		MA 30946 B1	01-12-2009
		US 2009288214 A1	19-11-2009
		WO 2007125264 A2	08-11-2007