

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bureau international



(10) Numéro de publication internationale

WO 2010/012948 A2

(43) Date de la publication internationale
4 février 2010 (04.02.2010)

PCT

- (51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/82 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/60 (2006.01)
A01H 1/04 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/051510
- (22) Date de dépôt international :
27 juillet 2009 (27.07.2009)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0855146 28 juillet 2008 (28.07.2008) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BENDAHDANE, Abdelhafid [FR/FR]; 51, avenue Charles de Gaulle, F-91830 Le Coudray Montceaux (FR).
BOUALEM, Adnane [FR/FR]; 98, avenue de Vichy, F-03300 Cusset (FR).
TROADEC, Christelle [FR/FR]; 59, rue Gabriel Péri, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR).
ANTOINE, Martin [FR/FR]; 9, résidence des Quinconces, F-91190 Gif sur Yvette (FR).
DOGIMONT, Catherine [FR/FR]; 57 Traverse du Canal, F-84810 Aubignan (FR).
- (74) Mandataires : MICHELET, Alain et al.; Cabinet HARLE et PHELIP, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Déclarations en vertu de la règle 4.17 :
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)
— avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a)

(54) Title : COMBINATION OF TWO GENETIC ELEMENTS FOR CONTROLLING THE FLORAL DEVELOPMENT OF A DICOTYLEDONOUS PLANT, AND USE IN DETECTION AND SELECTION METHODS

(54) Titre : COMBINAISON DE DEUX ELEMENTS GENETIQUES POUR LE CONTROLE DU DEVELOPPEMENT DU TYPE FLORAL D'UNE PLANTE DICOTYLEDONE, ET MISE EN OEUVRE DANS DES PROCEDES DE DETECTION ET DE SELECTION

(57) Abstract : The subject matter of the present invention is a combination of two genetic elements for controlling the floral development of a dicotyledonous plant, said combination comprising, respectively: a first genetic control element (A/a) present in a dicotyledonous plant, in the form of a dominant allele (A) and of a recessive allele (a); and a second genetic control element (G/g) present in a dicotyledonous plant, in the form of a dominant allele (G) and of a recessive allele (g), it being understood that at least the second genetic control element has been artificially introduced into said dicotyledonous plant. The above combination makes it possible to control and/or modify the sex of the flowers of dicotyledonous plants.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet une combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral d'une plante dicotylédone, ladite combinaison comprenant, respectivement : un premier élément génétique de contrôle (A/a) présent dans une plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (A), et d'un allèle récessif (a); et un second élément génétique de contrôle (G/g) présent dans une plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (G), et d'un allèle récessif (g), étant entendu qu'au moins le second élément génétique de contrôle a été artificiellement introduit dans ladite plante dicotylédone. La combinaison ci-dessus permet de contrôler, et/ou de modifier le sexe des fleurs de plantes dicotylédones.



WO 2010/012948 A2

Combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral d'une plante dicotylédone, et mise en œuvre dans des procédés de détection et de sélection.

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de la sélection de variétés de plantes, et en particulier à la sélection du type sexuel des plantes. Elle est relative à la détection génotypique du sexe des plantes par analyse du polymorphisme d'un gène A et d'un gène G, ainsi qu'à des moyens de mise en œuvre de cette détection et à des procédés d'obtention de plantes dont le phénotype sexuel est modifié.

ART ANTERIEUR

La réalisation 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 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 ses parents. Cette vigueur hybride est d'autant plus importante que les parents sont éloignés génétiquement.

La création de lignées pures et stables, futurs parents de l'hybride est un passage obligé pour la création de variété hybrides homogènes et reproductibles exprimant le plus d'hétérosis. Il est donc nécessaire de créer des lignées pures et stables, puis de croiser ces lignées pour obtenir des hybrides.

La création de lignées pures implique l'autofécondation d'une plante de sorte à obtenir des plantes présentant un même patrimoine génétique, fixé pour l'ensemble des caractères de productivité, régularité du rendement, ou encore de résistance aux maladies, recherchées.

Pour créer des lignées pures, Il est donc nécessaire d'utiliser des plantes dont le type sexuel permet l'autofécondation, par exemple des plantes hermaphrodites.

Or, beaucoup de plantes dicotylédones, et en particulier les cucurbitaceae peuvent être monoïque, andromonoïque, gynoïques ou hermaphrodites.

Une première technique mise en œuvre, pour l'obtention de lignées pures, consiste à réaliser un traitement chimique des plantes de sorte à obtenir des plantes aptes à s'autoféconder, par exemple des plantes hermaphrodites.

Chez le melon (*cucumis melo*) par exemple, la pulvérisation d'inhibiteurs de la synthèse de l'éthylène tel que le nitrate d'argent ou le thiosulfate d'argent entraîne l'apparition temporaire d'étamines dans les fleurs femelles (Rudich *et al.*, 1969 ; Risser *et al.*, 1979). De cette manière,

la transformation des plantes gynoïques en plantes hermaphrodites est utilisée pour le maintien de lignées pures.

Cependant, la production de lignées pures par cette méthode est limitée par le coût des agents chimiques, leur durée d'action, et leurs effets phytotoxiques. De plus, de tels agents peuvent ne pas être efficaces en ce qui concerne la réalisation d'hybrides à partir de plantes dont la durée de floraison est longue, car de nouvelles fleurs apparues après traitement pourraient ne pas être affectées par le traitement chimique.

Il existe donc un besoin pour un système qui permettrait de contrôler le développement du type floral d'une plante dicotylédone, et d'obtenir une plante d'un type floral déterminé.

De plus, de très nombreux croisements sont nécessaires pour obtenir des hybrides intéressants, à partir de lignées pures, et à chaque croisement, les plants présentant le phénotype le plus prometteur sont retenus.

Lors du croisement des lignées pures entre elles, il est indispensable de pouvoir choisir le sens du croisement effectué, et d'éviter l'auto pollinisation des plantes qui conduirait à des plantes ne présentant pas la vigueur hybride recherchée.

Là encore, du fait de la diversité du type sexuel des plantes dicotylédones, il est nécessaire de séparer les fleurs mâles et les fleurs femelles d'un même plant pour éviter l'autopollinisation.

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

Une autre technique consiste à réaliser une émasculature 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, appelés gamétocides, utilisés pour provoquer une stérilité mâle transitoire présentent plusieurs inconvénients, comme un coût élevé ou une grande toxicité, comme cela a été rappelé ci-dessus.

Les techniques mécaniques ou chimiques de contrôle du type floral décrites ci-dessus s'avèrent donc très coûteuses, d'autant que de très nombreux croisements sont nécessaires pour obtenir des plants hybrides présentant les caractères recherchés et pouvant être commercialisés.

Pour faciliter la création de lignées pures et d'hybrides, Il existe donc également un besoin pour un système qui permettrait de contrôler le développement du type floral d'une plante dicotylédone, et d'obtenir une plante d'un type floral déterminé.

Une autre voie pour obtenir des plants capables d'autopollinisation utiles pour la création de lignées pures, ou non capables d'autopollinisation, pour la création d'hybrides, pourrait

consister respectivement en une sélection d'individus exclusivement hermaphrodites, ou exclusivement femelles, présents dans une espèce. 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 d'en déterminer le type sexuel. Cette technique serait de plus aléatoire, car les mécanismes de détermination du sexe des fleurs dépendent notamment de facteurs environnementaux.

Selon encore une autre voie, on a cherché à identifier et caractériser les déterminants génétiques participant au contrôle du type floral chez le melon. Chez le melon, le contrôle génétique de détermination du sexe est gouverné par deux déterminants génétiques principaux, respectivement (1) le déterminant génétique andromonoïque (« *andromonoecious* » ou « a ») et (2) le déterminant génétique gynoïque (« *gynoecious* » ou « g »), chaque déterminant possédant au moins deux allèles, et dont les combinaisons produisent une grande variété de phénotypes sexuels. La demande internationale PCT publiée sous le n° WO2007/125264 décrit l'identification et la caractérisation du déterminant génétique (a), qui s'est avéré consister en un gène codant une aminocyclopropane carboxylate synthase (ACS). Ainsi, la demande PCT n° WO 2007/125264 fournit les moyens de détection et de contrôle permettant de sélectionner ou de générer des plantes dicotylédones possédant l'allèle (A) dominant ou l'allèle (a) récessif. Le déterminant génétique (g) restait totalement inconnu. Tout au plus, des données préliminaires suggéraient que le déterminant génétique (g), de nature et de structure inconnues, pouvait être localisé dans une large région génomique de plus de 2,4 mégabases délimitée par des marqueurs désignés M8 et M30. Du fait qu'il est communément admis qu'il existe en moyenne 12 cadres ouverts de lecture (« ORFs ») dans 100 kilobases de génome végétal, la région génomique délimitée entre les marqueurs M8 et M30 était susceptible de contenir environ 300 cadres ouverts de lecture.

Toutefois, en l'absence de caractérisation du second déterminant génétique gynoïque (ou « g »), il n'était pas possible de mettre à la disposition du public des moyens de sélection ou de contrôle du développement du type floral permettant, par exemple de discriminer ou de générer une population de plantes strictement femelles, puisque ce phénotype est contrôlé exclusivement par le déterminant génétique (g). Egalement, la sélection ou l'obtention d'une population de plantes exclusivement hermaphrodites ne serait possible qu'après l'identification et la caractérisation du déterminant génétique (g).

Il existe donc également un besoin pour un procédé qui permettrait de sélectionner des plantes dycotylédones par exemple hermaphrodites ou femelles, sans devoir pour autant les cultiver.

Ce procédé devrait permettre de sélectionner des plantes, particulièrement utiles pour la réalisation de lignées pures ou d'hybrides comme cela a été précisé ci-dessus.

RESUME DE L'INVENTION

Selon l'invention, on a identifié et caractérisé le déterminant génétique (g) gynoïque pour le contrôle du développement floral d'une plante dicotylédone qui est un angiosperme, et plus précisément une plante de la famille des *cucurbitaceae*.

L'identification et la caractérisation du déterminant génétique (g) gynoïque a permis pour la première fois la mise au point d'une combinaison des deux déterminants génétiques (a) andromonoïque et (g) gynoïque permettant de contrôler en totalité le développement du type floral d'une plante dicotylédone, quel que soit le phénotype sexuel qui est considéré.

L'invention fournit donc une combinaison des deux éléments génétiques (A/a) et (G/g) qui permet de contrôler le développement du type floral d'une plante dicotylédone, en particulier d'un cucurbitacée comme le melon.

Il avait été déjà montré dans l'état de la technique que, physiologiquement, les deux allèles (A) et (a) se distinguent par des taux d'activité enzymatique différents d'une protéine, la aminocyclopropane carboxylate synthase aussi désignée ACS.

Les inventeurs ont maintenant montré que, physiologiquement, les deux allèles (G) et (g), qui ont été identifiés et caractérisés selon l'invention, se distinguent par des taux différents d'une nouvelle protéine, la protéine CmWIP1.

L'invention a donc pour objet la combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral d'une plante dicotylédone, ladite combinaison comprenant respectivement :

a) un premier élément génétique de contrôle (A/a) présent dans ladite plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (A), et d'un allèle récessif (a), dans lequel :

- l'allèle dominant (A), consiste en un acide nucléique (NA) permettant l'expression la protéine ACS (aminocyclopropane carboxylate synthase),
- l'allèle récessif (a), se distingue de l'allèle dominant par un acide nucléique (NA) non fonctionnel dans ladite plante dicotylédone, et

b) un second élément génétique de contrôle (G/g) présent dans ladite plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (G), et d'un allèle récessif (g), dans lequel :

- l'allèle dominant (G), consiste en un acide nucléique (NG) permettant l'expression de la protéine CmWIP1,
- l'allèle récessif (g), se distingue de l'allèle dominant par un acide nucléique (NG) non fonctionnel dans ladite plante dicotylédone,

étant entendu qu'au moins le second élément génétique de contrôle a été artificiellement introduit dans ladite plante dicotylédone.

Dans certains modes de réalisation de la combinaison selon l'invention, le second élément génétique de contrôle (G/g), les caractéristiques respectives de l'allèle dominant (G) et de l'allèle récessif (g) sont les suivantes :

- l'allèle dominant (G), consiste en un acide nucléique (NG) comprenant :

- (i) un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et
- (ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PG), ledit acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1,

- l'allèle récessif (g), se distingue de l'allèle dominant (G) par :

- (i) un acide nucléique (NG) non présent dans la plante, ou
- (ii) un polynucléotide régulateur (Pg) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou
- (iii) un acide nucléique (Ng) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine CmWIP1 active,

La protéine ACS englobe la protéine de séquence SEQ ID N° 3 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité en acides aminés, préférentiellement au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% d'identité en acide aminés, avec la protéine de séquence SEQ ID N° 3.

La protéine CmWIP1 englobe la protéine de séquence SEQ ID N° 12 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité en acides aminés, préférentiellement au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% d'identité en acide aminés, avec la protéine de séquence SEQ ID N° 12. La protéine CmWIP1 peut aussi englober la protéine de séquence SEQ ID N° 16 ou une protéine ayant au moins 90% d'identité en acides aminés, préférentiellement au moins 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% d'identité en acide aminés, avec la protéine de séquence SEQ ID N° 16.

Dans certains modes de réalisation de la combinaison selon l'invention, le second élément génétique de contrôle (A/a), les caractéristiques respectives de l'allèle dominant (A) et de l'allèle récessif (a) sont les suivantes :

- l'allèle dominant (A), consiste en un acide nucléique (NA) comprenant :

- (i) un polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et
- (ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PA), ledit acide nucléique codant pour la protéine ACS (aminocyclopropane carboxylate synthase),

- l'allèle récessif (a), se distingue de l'allèle dominant (A) par :

- (i) un acide nucléique (NA) non présent dans la plante, ou
 - (ii) un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou
 - (iii) un acide nucléique (Na) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine ACS active,
- L'invention a également pour objet les polynucléotides régulateurs (PG) et (Pg) en tant

que tels

L'invention est également relative à des procédés d'obtention d'une plante transformée dont le phénotype sexuel a été modifié, ainsi que les parties d'une telle plante, notamment ses semences.

L'invention a encore pour objet la protéine CmWIP1 telle que définie plus en détail ci-après, ou un fragment de cette protéine, ainsi que des anticorps dirigés contre la protéine CmWIP1.

L'invention a également trait à des procédés pour détecter la présence des allèles (A), (a), (G), et (g) dans un échantillon.

DESCRIPTION DES FIGURES

La **figure 1** illustre le clonage positionnel du locus g.

La figure **1A** illustre les cartes physiques et génétiques du locus g sur le chromosome 4. Le locus est bordé par deux marqueurs M261 et M335. Les lignes discontinues indiquent la position de ces marqueurs génétiques dans les différents clones BAC.

La figure **1B** illustre la représentation des 8 cadres ouverts de lecture ou ORFs (flèche large) retrouvé dans le BAC 102, avec leur prédiction d'orientation. Le repère triangulaire représente l'insertion du transposon d'ADN nommé Gyno-hAT dont la séquence est décrite dans la SEQ ID N° 14. C'est l'insertion de ce transposon qui a induit la méthylation du promoteur du gène CmWIP1 et a conduit à son inactivation.

La figure **1C** est une cartographie à haute résolution des deux événements critiques de recombinaison à proximité du locus g. Les polymorphismes SNP sont indiqués et les recombinants P63.2 et 87.94 ont déterminé une région finale de 1,4kb.

La **figure 2** illustre les résultats de l'amplification par PCR semi-quantitative sensible à l'endonucléase McrBr sur l'ADN du transposon inséré au locus g.

L'amorce sens est localisée dans la séquence du transposon, et l'amorce antisens est localisée sur la séquence génomique bordant le transposon. L'amplification par PCR sans digestion par l'endonucléase de l'ADN génomique Gynadou a résulté dans une forte amplification, signifiant la présence du transposon à ce locus. L'amplification par PCR à prédigestion par l'endonucléase McrBC ne montre aucune amplification, ce qui indique un très fort taux de méthylation du transposon. Aucune amplification n'a été obtenue pour PI124112 quelque soit le support, du fait que le transposon n'est pas inséré dans le locus G.

La **figure 3** illustre l'analyse de méthylation au locus g.

La figure **3A** illustre l'amplification PCR semi-quantitative sensible à McrBR sur les trois cadres ouverts de lecture ou ORF les plus proches du locus g pour le génotype monoïque (G-) PI124112 et le génotype gynoïque Gynadou (gg). L'absence d'amplification à prédigestion avec McrBC indique la présence de méthylation de l'ADN. Les oligonucléotides ont été dessinés afin de générer un amplicon qui borde le site d'initiation de la transcription prédit pour chaque ORF, incluant une partie du promoteur et une partie du premier exon.

La figure **3B** illustre la méthylation de l'ADN et la structure du gène CmWIP1. Les flèches noires représentent le site d'initiation à la transcription déterminé par la technique « 5'

RACE », les boîtes noires représentent les deux exons, le symbole après le second exon représente la fin de la séquence « 3'UTR », déterminée par la technique de « 3'RACE ».

L'insertion du transposon est symbolisée sur la région sur extrémité 3' du gène. La méthylation de l'ADN dans la séquence complète de CmWIP1 a été déterminée par amplification PCR quantitative sensible à McrBC. Chaque valeur correspond à la moyenne d'au moins trois plantes, chaque réaction PCR ayant été réalisée en triple.

La figure **3C** illustre l'analyse de méthylation des cytosines par séquençage au bisulfite. Deux amplicons correspondant à la partie hautement méthylée du promoteur ont été amplifiés après traitement au bisulfite. Le pourcentage de cytosines méthylées est indiqué par des barres verticales.

La **figure 4** illustre l'analyse de méthylation au locus *g* pour différents fonds génétiques de *C.mélo*. W1998, Bulgarie 14, Paul et Gynadou sont homozygotes pour l'allèle *g*. P1161375, Vedrantaïs et P1124112 sont homozygotes pour l'allèle *G*.

La figure **4A** illustre l'expérience par laquelle l'insertion du transposon au locus *g* a été criblée par amplification par PCR dans les différents fonds génétiques. L'amorce sens était localisée dans la séquence du transposon et l'amorce antisens s'était localisée dans la séquence génomique bordant le transposon, afin de vérifier la présence de l'insertion (ligne supérieure), où les deux amorces bordant le site d'insertion ont été utilisées afin de vérifier l'absence du transposon (ligne inférieure).

Sur la figure 4A sont représentés les résultats d'amplification PCR semi-quantitative sensible à McrBr sur le gène CmWIP1 dans les différents fonds génétiques. L'absence d'amplification après digestion avec McrBc indique la présence de la méthylation de l'ADN.

La **figure 5** illustre l'analyse du profil d'expression de l'ARN messager de CmWIP1. Les niveaux d'expression de CmWIP1 ont été analysés par PCR quantitative. Chaque valeur correspond à la moyenne d'au moins trois plantes. Les niveaux d'expression de CmWIP1 ont été normalisés avec les niveaux d'expression d'un gène ubiquitaire, le gène de l'actine.

La **figure 6** illustre les résultats de l'analyse des niveaux d'expression de CmWIP1 analysés par PCR quantitative dans un pool de bourgeons floraux jusqu'au stade 6. Chaque valeur correspond à la moyenne d'au moins trois plantes. Les niveaux d'expression de CmWIP1 ont été normalisés avec les niveaux d'expression d'un gène ubiquitaire, le gène de l'actine.

La **figure 7** illustre l'observation des phénotypes floraux identifiés par la technique de TILLING. Les fleurs de la tige principale du mutant S306F comme celle du mutant P193L ont été comparées à une fleur mâle et une fleur femelle de type sauvage du parent monoïque). Les fleurs des mutants S306F comme celle du mutant P193L montrent clairement un développement de l'ovaire dans la quatrième spirale. Le mutant L77F est un mutant faible. Ov : ovaire ; St : étamine.

La **Figure 8A** représente un alignement d'un fragment de l'ARN messager du gène *ACS* provenant d'une plante ayant le phénotype (A) [ligne supérieure] et d'une plante ayant le phénotype (a) [ligne inférieure], et illustre une mutation ponctuelle d'un nucléotide différenciant (A) et (a).

La **Figure 8B** représente un alignement des séquences d'acides aminés codées par les acides nucléiques de la Figure 8A, y compris pour une plante ayant le phénotype (A) [ligne supérieure] et d'une plante ayant le phénotype (a) [seconde ligne] et illustre une mutation ponctuelle d'un acide aminé différenciant (A) et (a).

La **Figure 9** représente des clichés de plantes transgéniques de *Arabidopsis thaliana* portant l'allèle de melon A ou a. Sur les figures 9A et 9B, on montre que les siliques des plantes transformées avec l'allèle A (Fig 9A-Cm-A et Fig. 9B) sont plus courtes que les siliques des plantes sauvages (Col-0) et des plantes transformées avec l'allèle (a).

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Selon la présente invention, on a identifié et caractérisé le déterminant génétique (G/g) qui contrôle, en combinaison avec le déterminant génétique (A/a) précédemment décrit dans l'état de la technique, le développement du type floral chez les cucurbitacées.

L'identification et la caractérisation du déterminant génétique (G/g) fournit pour la première fois à l'homme du métier la possibilité de sélectionner ou de générer des plantes dicotylédones ayant le phénotype sexuel désiré, en particulier des cucurbitacées comme le melon ayant le phénotype sexuel désiré.

On rappelle que l'allèle (A) contrôle le caractère andromonoïque des plantes, et l'allèle (G) contrôle le caractère gynoïque des plantes, comme cela est illustré dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Phénotype	génotype	Type de fleurs
Monoïque	A-G-	Mâles et femelles
Andromonoïque	aaG-	Mâles et hermaphrodites
Hermaphrodite	aagg	Hermaphrodites
Gynoïque	A-gg	Femelles

Le tableau 1 illustre la correspondance entre le génotype et le phénotype sexuel de fleurs de plantes dicotylédones.

Les inventeurs ont maintenant montré que, physiologiquement, les deux allèles (G) et (g), qui ont été identifiés et caractérisés selon l'invention, se distinguent par des taux différents d'une nouvelle protéine, la protéine CmWIP1 .

En réalisant des comparaisons de séquences avec des protéines connues, les inventeurs ont montré que la nouvelle protéine CmWIP1 pouvait être classée dans la famille des protéines à doigts de zinc de type WIP qui sont retrouvées dans une grande variété de plantes, y compris les dicotylédones, les monocotylédones, les gymnospermes et les mousses.

Du point de vue génétique, les inventeurs ont montré que l'allèle (g) se distingue de l'allèle (G) par un taux de protéine CmWIP1 faible dans la plante, comparé à celui d'une plante portant un allèle (G) ou bien par la production d'une protéine CmWIP1 mutée par rapport à la protéine CmWIP1 produite par une plante portant un allèle (G).

Les inventeurs ont aussi montré que l'allèle (G) est dominant sur l'allèle (g).

Comme cela a déjà été précisé précédemment, il avait été déjà montré dans l'état de la technique que, physiologiquement, les deux allèles (A) et (a) se distinguent par des taux différents de l'activité enzymatique d'une protéine, la aminocyclopropane carboxylate synthase aussi désignée ACS, qui est une protéine impliquée dans la synthèse de l'éthylène.

Or, différentes études ont montré que les gènes de la biologie florale des cucurbitacées codent pour des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse ou de régulation de l'éthylène (Kamachi *et al.*, 1997 ; Kahana *et al.*, 2000).

Il avait été aussi montré antérieurement que l'allèle (a) se distingue physiologiquement de l'allèle (A) par un taux d'activité enzymatique de protéine ACS faible dans la plante, comparé à celui d'une plante portant un allèle (A).

Il avait été aussi montré que l'allèle (A) s'exprime dans les promordia des carpels et c'est cette expression qui bloque le développement des étamines. L'absence d'expression de l'allèle A ou l'expression d'une forme mutée de la protéine issue des criblages TILLING par exemple ou de la protéine issue de l'allèle a portant la mutation A57V ne bloque pas le développement des étamines. Enfin, il avait été également montré que l'allèle (A) est dominant sur l'allèle (a).

Sans vouloir être liés par une quelconque théorie, les inventeurs pensent que le système de contrôle du développement du type floral par une combinaison d'allèles du gène (G/g) et (A/a) peut être généralisé à la famille des dicotylédones, y compris à la famille des *cucurbitaceae*.

L'invention a donc pour objet une combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral d'une plante dicotylédone, ladite combinaison comprenant respectivement :

- a) un premier élément génétique de contrôle (A/a) présent dans ladite plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (A), et d'un allèle récessif (a), dans lequel :
 - l'allèle dominant (A), consiste en un acide nucléique (NA) permettant l'expression de la protéine ACS (aminocyclopropane carboxylate synthase), préférentiellement la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3,

- l'allèle récessif (a), se distingue de l'allèle dominant par un acide nucléique (NA) non fonctionnel dans ladite plante dicotylédone, et
- b) un second élément génétique de contrôle (G/g) présent dans ladite plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (G), et d'un allèle récessif (g), dans lequel :
 - l'allèle dominant (G), consiste en un acide nucléique (NG) permettant l'expression de la protéine CmWIP1, préférentiellement la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12,
 - l'allèle récessif (g), se distingue de l'allèle dominant par un acide nucléique (NG) non fonctionnel dans ladite plante dicotylédone,étant entendu qu'au moins le second élément génétique de contrôle a été artificiellement introduit dans ladite plante dicotylédone.

L'acide nucléique (NA) non fonctionnel qui caractérise l'allèle (a) englobe (i) un acide nucléique codant pour une protéine distincte de la protéine de SEQ ID N° 3, y compris la protéine mutée A57V, (ii) ou toute autre forme de protéine mutée par rapport à la protéine de séquence SEQ ID N° 3 et conduisant à une enzyme inactive, (ii) ou encore d'autres ACS non fonctionnelles (iv) ou encore un allèle non exprimé.

La combinaison des deux éléments génétiques qui est décrite ci-dessus permet de contrôler, et/ou de modifier le sexe des fleurs de plantes dicotylédones, et est donc très avantageuse, par rapport aux systèmes de contrôle mécaniques, souvent coûteux, ou chimiques, souvent toxiques, utilisés dans l'art antérieur.

Par « allèle », on entend au sens de la présente invention, l'une des formes d'un gène occupant un site ou locus sur une paire de chromosomes homologues. Les allèles d'un gène se rapportent au même trait génétique mais peuvent déterminer des phénotypes différents.

Un allèle dominant est un allèle dont le niveau d'expression phénotypique est beaucoup plus important que celui de l'allèle homologue (dit récessif). La dominance peut être complète ou partielle.

Un allèle récessif est un allèle ne s'exprimant dans le phénotype que lorsque la plante reçoit les allèles identiques de chacun de ses deux parents. En revanche, l'expression de l'allèle récessif est masquée si l'allèle homologue dominant est présent.

Ainsi, la combinaison définie ci-dessus existe sous la forme de différents états correspondant chacun à un phénotype.

Lorsque le premier élément génétique de contrôle (A/a) présent dans une plante dicotylédone est sous forme d'allèle (A), la plante est de phénotype monoïque ou gynoïque.

Lorsque le premier élément génétique de contrôle (A/a) présent dans une plante est sous forme d'allèle (aa), la plante est de phénotype hermaphrodite ou andromonoïque.

Lorsque le second élément génétique de contrôle (G/g) présent dans une plante dicotylédone est sous forme d'allèle (G), la plante est de phénotype monoïque ou andromonoïque.

Lorsque le second élément génétique de contrôle (G/g) présent dans une plante est sous forme d'allèle (gg), la plante est de phénotype hermaphrodite ou gynodioïque.

La correspondance entre allèles et phénotypes est résumée dans le tableau 1.

Dans certains modes de réalisation de la combinaison selon l'invention, pour le second élément génétique de contrôle (G/g), les caractéristiques respectives de l'allèle dominant (G) et de l'allèle récessif (g) sont les suivantes :

- l'allèle dominant (G), consiste en un acide nucléique (NG) comprenant :
 - (i) un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et
 - (ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PG), ledit acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1 (« *C. melo* Zinc Finger Protein ») de séquence SEQ ID N°12,
- l'allèle récessif (g), se distingue de l'allèle dominant (G) par :
 - (i) un acide nucléique (NG) non présent dans la plante, ou
 - (ii) un polynucléotide régulateur (Pg) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou
 - (iii) un acide nucléique (Ng) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine CmWIP1 active.

Dans certains modes de réalisation de la combinaison selon l'invention, pour le premier élément génétique de contrôle (A/a), les caractéristiques respectives de l'allèle dominant (A) et de l'allèle récessif (a) sont les suivantes :

- l'allèle dominant (A), consiste en un acide nucléique (NA) comprenant :
 - (i) un polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et
 - (ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PA), ledit acide nucléique codant pour la protéine ACS (aminocyclopropane carboxylate synthase) de séquence SEQ ID N°3,
- l'allèle récessif (a), se distingue de l'allèle dominant (A) par :
 - (i) un acide nucléique (NA) non présent dans la plante, ou
 - (ii) un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou
 - (iii) un acide nucléique (Na) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine ACS active.

La suite de la description expose des variantes, ou modes de réalisation préférés des premier et second éléments génétiques de contrôle faisant partie du système de contrôle objet de l'invention.

Elément génétique de contrôle G/g, sous forme d'allèle dominant (G), dans la combinaison de deux éléments génétiques selon l'invention.

De manière générale, l'élément génétique de contrôle G/g, présent dans une plante sous la forme de l'allèle dominant (G), permet d'obtenir un taux plus élevé de protéine CmWIP1, par rapport au taux observé lorsque l'allèle (G) n'est pas présent dans ladite plante.

Dans la suite de la description, on considère qu'un « taux élevé » de protéine CmWIP1 correspond au taux moyen de la protéine CmWIP1 mesuré dans une plante comprenant l'allèle dominant (G) dans son génome, et qu'un « taux faible » de protéine CmWIP1 correspond au taux moyen de protéine CmWIP1 observé dans une plante ne comprenant pas l'allèle dominant (G) dans son génome.

L'allèle dominant (G), consiste en un acide nucléique (NG) comprenant :

- (i) un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et
- (ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PG), ledit acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12.

- polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel

Un polynucléotide régulateur ou promoteur (PG) fonctionnel selon l'invention consiste en un acide nucléique qui permet l'expression de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12 chez les plantes dicotylédones.

A titre d'exemple un tel promoteur comprend, ou consiste en, l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 13, qui est localisé du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2999 de l'acide nucléique du gène CmWIP1 de séquence SEQ ID N° 10.

Ainsi, dans les modes de réalisation de la combinaison des deux éléments génétiques de l'invention dans lesquels le second élément génétique consiste en l'allèle G, le polynucléotide régulateur (PG) peut consister en un polynucléotide qui comprend, ou qui consiste en, (i) une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 2999 de la séquence SEQ ID N°10 ou (ii) une séquence ayant au moins 90% d'identité en nucléotides avec la séquence 1-2999 de SEQ ID N° 10 et qui est fonctionnelle ou (iii) un fragment des séquences (i) et (ii) précédentes et qui est fonctionnelle.

L'invention a également pour objet le polynucléotide régulateur (PG) en tant que tel, défini ci-dessus, ainsi que des fragments de cet acide nucléique, comme cela sera décrit plus en détails dans la partie intitulée « Acides nucléiques selon l'invention »

Un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel selon l'invention peut également consister en un promoteur connu pour diriger l'expression de la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1 de façon constitutive ou de façon tissu spécifique.

Un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel selon l'invention peut ainsi être choisi parmi des promoteurs tissu spécifiques tels que ceux des gènes de la famille des « MADS box » de la classe A B C D et E, tels que décrits par Theißen et al., 2001 ou tout autre promoteur de gènes homéotiques.

Un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel selon l'invention peut ainsi être choisi parmi :

- le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou le promoteur 19S ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (pd35S), décrits dans l'article de Kay et al., 1987 ;
- le promoteur actine du ri3 suivi de l'intron actine de ri3 (pAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., 1991 ;
- le promoteur constitutif EF-1 α du gène codant pour le facteur d'élongation végétale décrit dans la demande PCT n°WO 90/02172 ou encore dans l'article de AXELOS et al. (1989) ;
- le superpromoteur chimérique PSP (NI et al., 1995) constitué de la fusion de trois copies de l'élément d'activité transcriptionnelle du promoteur du gène de la octopin synthase de *Agrobacterium tumefaciens* et de l'élément d'activation de la transcription du promoteur du gène de la mannopin synthase de *Agrobacterium tumefaciens* ; et
- le promoteur ubiquitine du tournesol (BINET et al., 1991) ;
- le promoteur de l'ubiquitine 1 de maïs (CHRISTENSEN et al., 1996).

le promoteur de l'ubiquitine 1 de maïs (Christensen et al., 1996)

Un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel selon l'invention peut également consister en un promoteur inducible.

Ainsi, l'invention a pour objet une combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du type floral d'une plante dicotylédone, tel que défini précédemment, dans lequel le polynucléotide régulateur (PG) est sensible à l'action d'un signal inducteur, et de préférence, dans lequel le polynucléotide régulateur (PG) est un polynucléotide activateur inducible de la transcription ou de la traduction.

Lorsque le polynucléotide régulateur activateur de la transcription ou de la traduction est sensible, directement ou indirectement, à l'action d'un signal inducteur activateur, il s'agit d'un polynucléotide « activateur inducible » au sens de l'invention.

Selon l'invention, un polynucléotide régulateur du type « activateur inducible » est une séquence régulatrice qui n'est activée qu'en présence d'un signal externe. Un tel signal externe peut être la fixation d'un facteur de transcription, la fixation d'un facteur de transcription pouvant être induite sous l'effet du signal inducteur activateur auquel le polynucléotide régulateur est directement ou indirectement sensible.

Lorsqu'une telle construction d'acides nucléiques est utilisée dans un hôte cellulaire, l'expression du polynucléotide codant pour la protéine CmWIP1 selon l'invention peut être induite en mettant en contact l'hôte cellulaire transformé avec le signal inducteur activateur auquel le polynucléotide régulateur activateur est, directement ou indirectement, sensible.

Lorsque l'on recherche l'absence d'expression du polynucléotide codant pour un polypeptide CmWIP1 chez cet hôte cellulaire transformé, il suffit alors d'éliminer ou supprimer la présence du signal inducteur activateur auquel le polynucléotide régulateur de la transcription ou de la traduction est sensible.

L'homme du métier aura recours à ses connaissances générales techniques dans le domaine des polynucléotides régulateurs, en particulier ceux actifs chez les végétaux, pour définir les constructions répondant à la définition du mode de réalisation ci-dessus.

La séquence régulatrice capable de contrôler l'acide nucléique codant pour une protéine CmWIP1 peut être une séquence régulatrice inductible par un métabolite particulier, tel que :

- une séquence régulatrice inductible par les glucocorticoïdes telle que décrite par AOYAMA et al. (1997) ou telle que décrit par McNELLYS et al. (1998);
- une séquence régulatrice inductible par l'éthanol, telle que celle décrite par SALTER et al. (1998) ou encore telle que décrite par CADDICK et al. (1998);
- une séquence régulatrice inductible par la tétracycline telle que celle commercialisée par la Société CLONTECH.
- une séquence de promoteur inductible par un pathogène ou par un métabolite produit par un pathogène.
- une séquence régulatrice de gènes de type PR, inductible par l'acide salicylique ou le BTH ou l'aliète (Gorlach et al., 1996, Molina et al., 1998) ;
- une séquence régulatrice de type récepteur Ecdysone (Martinez et al., 1999) inductible par le tebufeno3ide (référence produit RH5992, commercialisé par ROHM & HAAS) par exemple, appartenant à la famille des diben3oylhydra3ines.

-Acides nucléiques codant pour la protéine CmWIP1

De préférence, l'acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1 comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au moins :

- (i) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 3000 au nucléotide 3617 de la séquence SEQ ID N°10, et
- (ii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 5458 au nucléotide 5901 de la séquence SEQ ID N°10.

Dans d'autres modes de réalisation, l'acide nucléique codant la protéine CmWIP1 comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N° 11.

Elément génétique de contrôle G/g, sous forme d'allèle récessif (g) du système selon l'invention

De manière générale, l'élément génétique de contrôle (G/g) sous la forme de l'allèle récessif (g), lorsqu'il est présent dans une plante qui ne possède pas l'allèle dominant (G) dans son génome, ne permet pas d'obtenir un taux de protéine CmWIP1, aussi élevé que celui obtenu lorsque l'allèle (G) est présent.

On peut donc définir l'allèle (g) comme toute altération du génotype correspondant à l'allèle (G), ne permettant pas d'obtenir un taux de CmWIP1 aussi élevé que l'allèle (G).

L'allèle récessif (g), se distingue de l'allèle dominant (G) par :

- (i) un acide nucléique (NG) non présent dans la plante, ou
- (ii) un polynucléotide régulateur (Pg) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou
- (iii) un acide nucléique (Ng) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine CmWIP1 non active.

A titre d'exemple, un mode de réalisation d'un élément de contrôle G/g sous la forme d'allèle récessif (g) est illustré par l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 15, qui est un allèle de la séquence codant CmWIP1 dans lequel est présent un acide nucléique transposon désigné « Gyno-hAT ». Dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 15, le transposon Gyno-hAT est localisé du nucléotide en position 7167 jusqu'au nucléotide en position 15412 de la séquence SEQ ID N° 15.

Dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 14, le transposon Gyno-hAT est localisé du nucléotide en position 10 jusqu'au nucléotide en position 8246 de la séquence SEQ ID N° 14.

- Polynucléotide régulateur (Pg) non fonctionnel

Un polynucléotide régulateur (Pg), ou promoteur non fonctionnel selon l'invention est un acide nucléique qui :

- (i) ne permet pas l'expression de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12 dans une cellule hôte, ou
- (ii) permet l'expression de cette protéine à un taux faible en comparaison du taux observé avec le polynucléotide régulateur (PG), ou
- (iii) permet l'expression de la protéine CmWIP1 au cours de la vie de la plante, pendant une durée inférieure, en comparaison de celle observée avec le polynucléotide régulateur (PG).

Dans certains modes de réalisation du polynucléotide régulateur (Pg) non fonctionnel, ledit polynucléotide (Pg) est méthylé. Par exemple, le polynucléotide régulateur (Pg) peut consister en un polynucléotide régulateur (PG) qui se présente sous la forme d'un acide nucléique méthylé.

Par « acide nucléique méthylé » ou « polynucléotide régulateur méthylé », on entend selon l'invention l'acide nucléique correspondant dont le rapport (nombre de bases méthylées)/(nombre de bases non méthylées) est d'au moins 5/1. Ainsi, selon l'invention, un acide nucléique méthylé englobe un acide nucléique possédant un rapport (nombre de bases méthylées)/(nombre de bases non méthylées) d'au moins, 6/1, 7/1, 8/1, 9/1, 10/1, 11/1, 12/1, 13/1, 14/1, 15/1, 16/1, 17/1, 18/1 et 20/1.

La détermination du rapport (nombre de bases méthylées)/(nombre de bases non méthylées) peut être réalisée aisément par l'homme du métier par toute technique connue. L'homme du métier peut notamment utiliser la méthode de séquençage au bisulfite, comme décrit dans les exemples de la présente description.

Pour comparer le niveau d'expression de plusieurs promoteurs, une technique simple, connue de l'homme du métier consiste à placer un gène marqueur de sélection sous le contrôle des promoteurs à tester. Un gène marqueur de sélection peut être par exemple le gène de résistance à l'herbicide BASTA, bien connu de l'homme du métier.

Une autre technique peut consister à mesurer le taux de la protéine CmWIP1 obtenue lorsque la séquence codant pour cette protéine est sous le contrôle de différents promoteurs, en utilisant des anticorps dirigés à l'encontre cette protéine, et les procédés décrits dans la partie « polypeptides selon l'invention ».

Comme cela est montré dans les exemples, une illustration d'un promoteur (Pg) non fonctionnel consiste en un promoteur ayant une séquence nucléotidique identique à la séquence nucléotidique d'un promoteur fonctionnel (PG) mais qui se présente *in cellulo* ou *in vivo* sous une forme méthylée non fonctionnelle. Dans le mode de réalisation spécifique illustré dans les exemples, l'état méthylé du promoteur (Pg) est provoqué par la présence d'un élément transposable (TE) localisé à une distance inférieure à 1 kilobases de l'extrémité 3' du gène *CmWIP1*.

Un polynucléotide (Pg) non fonctionnel peut également être tout polynucléotide dérivé du polynucléotide (PG) tel que défini ci-dessus dont la séquence nucléotidique comprend une insertion, une substitution ou une délétion d'un ou plusieurs nucléotides, par rapport à la séquence nucléotidique du polynucléotide régulateur.

Ainsi, l'invention a également pour objet un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique portant au moins une altération choisie parmi une mutation, une insertion ou une délétion, par rapport à l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 2999 de la séquence SEQ ID N°10, ledit acide nucléique altéré conduisant à une expression réduite de la protéine CmWIP1, lorsqu'il contrôle l'expression de ladite protéine, par rapport à l'expression de la protéine CmWIP1 contrôlée par l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 2999 de la séquence SEQ ID N°10.

L'invention a également pour objet le polynucléotide régulateur (Pg) en tant que tel, tel que défini ci-dessus.

L'invention a également pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide régulateur (Pg) et un acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12.

L'invention a également pour objet une combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral d'une plante dicotylédone telle que définie de manière générale dans la présente description, dans laquelle le polynucléotide régulateur (Pg) est sensible à l'action d'un signal inducteur, et de préférence, dans lequel le polynucléotide régulateur (Pg) est un polynucléotide répresseur inductible de la transcription ou de la traduction.

Par polynucléotide régulateur « répresseur », on entend selon l'invention une séquence régulatrice dont l'activité constitutive peut être bloquée par un signal externe. Un tel signal externe peut être l'absence de fixation d'un facteur de transcription reconnu par le polynucléotide régulateur répresseur. L'absence de fixation du facteur de transcription peut être induite sous l'effet du signal inducteur répresseur auquel le polynucléotide régulateur répresseur est sensible.

Selon ce premier mode de réalisation particulier, l'expression de la séquence codant pour une protéine CmWIP1 est constitutive dans l'hôte cellulaire choisi, en l'absence du signal inducteur répresseur auquel le polynucléotide régulateur répresseur est directement ou indirectement sensible.

La mise en contact de l'hôte cellulaire avec le signal inducteur répresseur a pour effet, grâce à une action directe ou indirecte sur le polynucléotide régulateur répresseur, d'inhiber et/ou de bloquer l'expression du polynucléotide codant pour la protéine CmWIP1.

Pour réaliser les constructions d'ADN selon l'invention comprenant un polynucléotide régulateur répresseur, l'homme du métier aura recours à ses connaissances générales techniques dans le domaine de l'expression de gènes chez les végétaux.

Un procédé d'obtention d'une plante transformée, mettant en œuvre ce type de polynucléotide régulateur est décrit dans la partie intitulée « procédés d'obtention d'une plante transformée selon l'invention ».

- acide nucléique (Ng) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine CmWIP1 active

Un acide nucléique (Ng) englobe les acides nucléiques comprenant au moins une partie d'une séquence codant une protéine CmWIP1 active mais qui ne permettent pas, lorsqu'ils sont placés sous le contrôle d'un polynucléotide régulateur fonctionnel dans des cellules de plantes dicotylédones, la production dans lesdites plantes d'une protéine CmWIP1 active.

Un acide nucléique (Ng) englobe essentiellement les acides nucléiques (NG) dans lesquels sont présentes une ou plusieurs mutations dans au moins un intron ou un exon, chaque mutation étant choisie parmi (i) la substitution d'un nucléotide ou plus d'un nucléotide, (ii) la délétion d'un nucléotide ou d'au moins deux nucléotides consécutifs et (iii) la délétion d'un nucléotide ou d'au moins deux nucléotides consécutifs, par rapport à l'acide nucléique (NG) de référence. Un acide nucléique (Ng) englobe notamment les acides nucléiques codant pour une protéine CmWIP1 non active.

Par acide nucléique codant pour une protéine CmWIP1 non active, on entend au sens de la présente invention, un acide nucléique qui code pour une protéine qui diffère de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12, par la substitution, la délétion, ou l'insertion d'un ou plusieurs acides aminés, et qui ne possède pas l'activité biologique de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12.

Est englobé également un acide nucléique qui code pour une protéine qui diffère de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°16, par la substitution, la délétion, ou l'insertion d'un ou plusieurs acides aminés, et qui ne possède pas l'activité biologique de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°16.

En particulier, une telle protéine CmWIP1 non active, lorsqu'elle est exprimée dans une plante qui n'exprime pas de protéine CmWIP1 active, en particulier pas de protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N° 12, ou de protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N° 16, induit respectivement :

- un phénotype de plante hermaphrodite en combinaison avec la présence sous forme homozygote des allèles (a/a) dans ladite plante,
- un phénotype de plante femelle en combinaison avec (i) la présence sous forme homozygote des allèles (A/A) dans ladite plante ou en combinaison avec (ii) la présence sous forme hétérozygote des allèles (A/a) dans ladite plante.

On a montré dans les exemples que des plantes possédant l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g) étaient obtenues avec des acides nucléiques codant une protéine CmWIP1 inactive. Notamment, on a montré dans les exemples que des plantes possédant l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g) étaient obtenues avec des acides nucléiques codant une protéine CmWIP1 possédant une substitution d'un seul nucléotide par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID N° 11 codant la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N° 12.

A titre illustratif, on a montré dans les exemples des plantes possédant l'allèle (g) et dont l'acide nucléique correspondant code une protéine CmWIP1 mutée possédant une substitution d'un acide aminé choisie parmi L77F, P193L et S306F, selon la numérotation d'acides aminés utilisée pour la séquence SEQ ID N° 12.

L'élément génétique de contrôle A/a, sous forme d'allèle dominant (A) ou sous forme d'allèle dominant (a) a déjà été décrit dans la demande de brevet français n° FR 2 900 415 et dans la demande PCT n° WO 2007/125264.

Toutefois, du fait que l'élément génétique de contrôle (A/a) est un élément important de la combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral selon l'invention, ses caractéristiques principales sont à nouveau décrites ci-dessous.

Élément génétique de contrôle A/a, sous forme d'allèle dominant (A) de la combinaison selon l'invention

De manière générale, l'élément génétique de contrôle A/a, présent dans une plante sous la forme de l'allèle dominant (A), permet d'obtenir un taux plus élevé de protéine ACS active, par rapport au taux observé lorsque l'allèle (A) n'est pas présent dans ladite plante.

Dans la suite de la description, on considère qu'un « taux élevé » de protéine ACS correspond au taux moyen de la protéine ACS mesuré dans une plante comprenant l'allèle dominant (A) dans son génome, et qu'un « taux faible » de protéine ACS correspond au taux

moyen de protéine ACS active observé dans une plante ne comprenant pas l'allèle dominant (A) dans son génome. Un taux faible de la protéine ACS englobe un taux nul de protéine ACS active, par exemple dans le cas d'une expression d'ACS non active, y compris le produit de l'allèle a portant la mutation A57V.

L'allèle dominant (A), consiste en un acide nucléique (NA) comprenant :

- (i) un polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et
- (ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PA), ledit acide nucléique codant pour la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3.

- polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel

Un polynucléotide régulateur ou promoteur (PA) fonctionnel selon l'invention consiste en un acide nucléique qui permet l'expression de la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3 chez les plantes dicotylédones.

A titre d'exemple un tel promoteur comprend une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5906 de la séquence SEQ ID N°1.

Ainsi, dans les modes de réalisation de la combinaison des deux éléments génétiques de l'invention dans lesquels le premier élément génétique consiste en l'allèle A, le polynucléotide régulateur (PA) peut consister en un polynucléotide qui comprend, ou qui consiste en, (i) une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5906 de la séquence SEQ ID N°1 ou (ii) une séquence ayant au moins 90% d'identité en nucléotides avec la séquence 1-5906 de SEQ ID N° 1 et qui est fonctionnelle ou (iii) un fragment des séquences (i) et (ii) précédentes et qui est fonctionnelle.

Ainsi, dans certains modes de réalisation de la combinaison de deux éléments génétiques de l'invention, le polynucléotide régulateur (PA) comprend ou consiste en une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5906 de la séquence SEQ ID N°1.

Un polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel qui est inclus dans une combinaison de deux éléments génétiques selon l'invention peut également consister en un promoteur connu pour diriger l'expression de la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine ACS de façon constitutive ou de façon tissu spécifique.

Un polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel inclus dans une combinaison de deux éléments génétiques selon l'invention peut ainsi être choisi parmi l'un quelconque des promoteurs constitutifs ou spécifiques de tissu décrit précédemment pour certains modes des réalisation du polynucléotide régulateur (PG).

Un polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel selon l'invention peut également consister en un promoteur inductible.

Ainsi, l'invention a pour objet une combinaison de deux éléments génétiques telle que définie ci-dessus, dans laquelle le polynucléotide régulateur (PA) est sensible à l'action d'un signal inducteur, et de préférence, dans lequel le polynucléotide régulateur (PA) est un

polynucléotide activateur inductible de la transcription ou de la traduction, qui peut être choisi parmi l'un quelconque des polynucléotides activateurs inductibles décrits dans certains modes de réalisation du polynucléotide régulateur (PG).

Lorsqu'une telle construction d'acides nucléiques est utilisée dans un hôte cellulaire, l'expression du polynucléotide codant pour la protéine ACS selon l'invention peut être induite en mettant en contact l'hôte cellulaire transformé avec le signal inducteur activateur auquel le polynucléotide régulateur activateur est, directement ou indirectement, sensible.

Lorsque l'on recherche l'absence d'expression du polynucléotide codant pour un polypeptide ACS chez cet hôte cellulaire transformé, il suffit alors d'éliminer ou supprimer la présence du signal inducteur activateur auquel le polynucléotide régulateur de la transcription ou de la traduction est sensible.

L'homme du métier aura recours à ses connaissances générales techniques dans le domaine des polynucléotides régulateurs, en particulier ceux actifs chez les végétaux, pour définir les constructions répondant à la définition du mode de réalisation ci-dessus, et en particulier ceux décrits pour le polynucléotide régulateur (PG).

-Acides nucléiques codant pour la protéine ACS

De préférence, l'acide nucléique codant pour la protéine ACS comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au moins :

- (i) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 5907 au nucléotide 6086 de la séquence SEQ ID N°1,
- (ii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 6181 au nucléotide 6467 de la séquence SEQ ID N°1, et
- (iii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 7046 au nucléotide 7915 de la séquence SEQ ID N°1.

Élément génétique de contrôle A/a, sous forme d'allèle récessif (a) de la combinaison selon l'invention

De manière générale, l'élément génétique de contrôle (A/a) sous la forme de l'allèle récessif (a), lorsqu'il est présent dans une plante qui ne possède pas l'allèle dominant (A) dans son génome, permet d'obtenir un taux de protéine ACS, aussi élevé que celui obtenu lorsque l'allèle (A) est présent.

On peut donc définir l'allèle (a) comme toute altération du génotype correspondant à l'allèle (A), ne permettant pas d'obtenir un taux d'ACS active.

L'allèle récessif (a), se distingue de l'allèle dominant (A) par :

- (i) un acide nucléique (NA) non présent dans la plante, ou
- (ii) un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou
- (iii) un acide nucléique codant pour une protéine ACS non active, ou

(iv) un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, et un acide nucléique codant pour une protéine ACS non active.

- Polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel

Un polynucléotide régulateur (Pa), ou promoteur non fonctionnel selon l'invention est un acide nucléique qui :

- (i) ne permet pas l'expression de la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3 dans une cellule hôte, ou
- (ii) permet l'expression de cette protéine à un taux faible en comparaison du taux observé avec le polynucléotide régulateur (PA), ou
- (iii) permet l'expression de la protéine ACS au cours de la vie de la plante, pendant une durée inférieure, en comparaison de celle observée avec le polynucléotide régulateur (PA).

Dans certains modes de réalisation du polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel, ledit polynucléotide (Pa) est méthylé. Par exemple, le polynucléotide régulateur (Pa) peut consister en un polynucléotide régulateur (PA) qui se présente sous la forme d'un acide nucléique méthylé.

Par « acide nucléique méthylé » ou « polynucléotide régulateur méthylé », on entend selon l'invention l'acide nucléique correspondant dont le rapport (nombre de bases méthylées)/(nombre de bases non méthylées) est d'au moins 5/1. Ainsi, selon l'invention, un acide nucléique méthylé englobe un acide nucléique possédant un rapport (nombre de bases méthylées)/(nombre de bases non méthylées) d'au moins, 6/1, 7/1, 8/1, 9/1, 10/1, 11/1, 12/1, 13/1, 14/1, 15/1, 16/1, 17/1, 18/1 et 20/1.

La détermination du rapport (nombre de bases méthylées)/(nombre de bases non méthylées) peut être réalisée aisément par l'homme du métier par toute technique connue. L'homme du métier peut notamment utiliser la méthode de séquençage au bisulfite, comme décrit dans les exemples de la présente description.

Pour comparer le niveau d'expression de plusieurs promoteurs, une technique simple, connue de l'homme du métier consiste à placer un gène marqueur de sélection sous le contrôle des promoteurs à tester. Un gène marqueur de sélection peut être par exemple le gène de résistance à l'herbicide BASTA, bien connu de l'homme du métier.

Une autre technique peut consister à mesurer le taux de la protéine ACS obtenue lorsque la séquence codant pour cette protéine est sous le contrôle de différents promoteurs, en utilisant des anticorps dirigés à l'encontre cette protéine, et les procédés décrits dans la partie « polypeptides selon l'invention ».

A titre d'exemple, un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel comprend une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 3650 de la séquence SEQ ID N°2.

Egalement à titre d'exemple, un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel comprend certaines séquences nucléotidiques comprenant une ou plusieurs substitutions,

délétions ou additions de bases, par rapport à la séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 3650 de la séquence SEQ ID N°1.

Ainsi, dans la combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral objet de l'invention, un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel peut comprendre une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 3650 de la séquence SEQ ID N°2 altéré par l'une des méthodes de l'homme de l'art

L'invention a également pour objet une combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral telle que définie dans la présente description, et dans laquelle l'allèle (a) est un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID N°2. Un tel acide nucléique de séquence SEQ ID N° 2 comprend un polynucléotide régulateur (Pa) et un acide nucléique codant pour la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3.

Un polynucléotide (Pa) non fonctionnel peut également être tout polynucléotide dérivé du polynucléotide (PA) tel que défini ci-dessus dont la séquence nucléotidique comprend une insertion, une substitution ou une délétion d'un ou plusieurs nucléotides, par rapport à la séquence nucléotidique du polynucléotide régulateur.

Ainsi, dans certains modes de réalisation de la combinaison selon l'invention, un polynucléotide (Pa) consiste en un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique portant au moins une altération choisie parmi une mutation, une insertion ou une délétion, par rapport à l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5907 de la séquence SEQ ID N°1, ledit acide nucléique altéré conduisant à une expression réduite de la protéine ACS, lorsqu'il contrôle l'expression de ladite protéine, par rapport à l'expression de la protéine ACS contrôlée par l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5907 de la séquence SEQ ID N°1.

L'invention a également pour objet une combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral telle que définie ci-dessus, dans laquelle le polynucléotide régulateur (Pa) est sensible à l'action d'un signal inducteur, et de préférence, dans lequel le polynucléotide régulateur (Pa) est un polynucléotide répresseur inductible de la transcription ou de la traduction.

Selon ce premier mode de réalisation particulier, l'expression de la séquence codant pour une protéine ACS est constitutive dans l'hôte cellulaire choisi, en l'absence du signal inducteur répresseur auquel le polynucléotide régulateur répresseur est directement ou indirectement sensible.

La mise en contact de l'hôte cellulaire avec le signal inducteur répresseur a pour effet, grâce à une action directe ou indirecte sur le polynucléotide régulateur répresseur, d'inhiber et/ou de bloquer l'expression du polynucléotide codant pour la protéine ACS.

Pour réaliser les constructions d'ADN selon l'invention comprenant un polynucléotide régulateur répresseur, l'homme du métier aura recours à ses connaissances générales techniques dans le domaine de l'expression de gènes chez les végétaux.

Un procédé d'obtention d'une plante transformée, mettant en œuvre ce type de polynucléotide régulateur est décrit dans la partie intitulée « procédés d'obtention d'une plante transformée selon l'invention ».

- acide nucléique (Na) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine ACS active

Un acide nucléique (Na) englobe les acides nucléiques comprenant au moins une partie d'une séquence codant une protéine ACS active mais qui ne permettent pas, lorsqu'ils sont placés sous le contrôle d'un polynucléotide régulateur fonctionnel dans des cellules de plantes dicotylédones, la production dans lesdites plantes d'une protéine CmWIP1 active.

Un acide nucléique (Na) englobe essentiellement les acides nucléiques (NA) dans lesquels sont présentes une ou plusieurs mutations dans au moins un intron ou un exon, chaque mutation étant choisie parmi (i) la substitution d'un nucléotide ou plus d'un nucléotide, (ii) la délétion d'un nucléotide ou d'au moins deux nucléotides consécutifs et (iii) la délétion d'un nucléotide ou d'au moins deux nucléotides consécutifs, par rapport à l'acide nucléique (NA) de référence. Un acide nucléique (Na) englobe notamment les acides nucléiques codant pour une protéine ACS non active.

Par acide nucléique codant pour une protéine ACS non active, on entend au sens de la présente invention, un acide nucléique qui code pour une protéine qui diffère de la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3, par la substitution, la délétion, ou l'insertion d'un ou plusieurs acides aminés, et qui ne possède pas l'activité biologique de la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3. Un exemple illustratif d'un tel acide nucléique est présenté dans la figure 8.

En particulier, une telle protéine ACS non active ne permet pas de transformer la S- adénosyl méthionine en ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate).

Acides nucléiques selon l'invention

Comme indiqué ci-dessus, il a été caractérisé deux variants alléliques (G) et (g) du second élément génétique de contrôle (G/g) inclus dans une combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement floral de l'invention.

Les inventeurs ont identifié l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°10 comme étant un acide nucléique correspondant au variant allélique dominant (G) et sa forme méthylée *in planta*, comme correspondant au variant allélique récessif (g), du second élément génétique de contrôle sous forme d'un gène (G/g).

Dans la combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement floral de l'invention, au moins le second des deux éléments génétiques de contrôle a été introduit artificiellement dans une plante.

Comme cela a été exposé ci-dessus, une telle introduction provoque un changement du sexe de la fleur de la plante, ce qui est un des buts recherchés selon l'invention.

En conséquence l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°10 fait partie des objets de l'invention.

La présente invention a donc pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 95% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°10, ou avec un fragment de la séquence SEQ ID N°10, à condition qu'un tel acide nucléique possède les caractéristiques fonctionnelles de l'allèle (G) tel que défini ci-dessus.

Fait également partie de l'invention un acide nucléique de séquence complémentaire à l'acide nucléique tel que défini ci-dessus.

Un autre objet de l'invention est un acide nucléique consistant en un polynucléotide possédant au moins 95% d'identité en nucléotides avec la séquence SEQ ID N°10, ou avec un fragment de la séquence SEQ ID N°10, ou un acide nucléique de séquence complémentaire, à condition qu'un tel acide nucléique possède les caractéristiques fonctionnelles de l'allèle (G) tel que défini ci-dessus.

L'invention est aussi relative à un acide nucléique comprenant au moins 12, de préférence au moins 15 et de manière tout à fait préférée au moins 20 nucléotides consécutifs de l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°10, étant entendu qu'un tel acide nucléique englobe dans sa définition les « fragments » d'un acide nucléique selon l'invention tel que défini dans la présente description.

L'invention est également relative à l'acide nucléique comprenant ou consistant en la séquence SEQ ID N°10.

L'invention est aussi relative à un acide nucléique comprenant au moins 12, de préférence au moins 15 et de manière tout à fait préférée au moins 20 nucléotides consécutifs de l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°10, étant entendu qu'un tel acide nucléique englobe dans sa définition les « fragments » d'un acide nucléique selon l'invention tel que défini dans la présente description.

L'allèle (G) défini par la séquence SEQ ID N°10 comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', respectivement :

a) une séquence non codante portant des éléments régulateurs de la transcription et/ou de la traduction de ce gène, localisée en amont du premier exon, du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2999 de la séquence SEQ ID N°10;

b) une région dite « codante » qui comprend les deux exons et l'intron du gène (G/g), cette région codante étant localisée du nucléotide en position 3000 jusqu'au nucléotide en position 5901 de la séquence SEQ ID N°10; et

c) une région non codante localisée en aval de la région codante, du nucléotide en position 5902 jusqu'au nucléotide en position 7621 de la séquence SEQ ID N°10.

Les caractéristiques structurales des deux exons et de l'intron du gène G/g sont détaillées dans le tableau 2 ci-après. Les caractéristiques structurales des deux exons et de

l'intron des allèles (G) et (g) du gène (G/g) sont très proches, de sorte que les exons des allèles (G) et (g) peuvent, dans certains modes de réalisation, coder pour une même protéine de séquence SEQ ID N°12. Comme cela a été rappelé ci-dessus, la différence majeure entre les séquences nucléotidiques correspondant aux allèles (G) et (g) peut se trouver :

- (i) soit dans les séquences régulatrices amont correspondant à ces deux allèles, qui sont non méthylées *in planta* pour l'allèle (G) et qui sont méthylées *in planta* pour l'allèle (g),
- (ii) soit dans la séquence des exons, puisque une seule substitution de nucléotide provoquant la substitution d'un acide aminé dans la séquence de la protéine CmWIP1 est suffisante pour l'obtention de l'allèle (g).

TABLEAU 2

Séquences des exons du gène G/g

Exon n°	Position du nucléotide en 5' sur SEQ ID N°10 (allèle G)	Position du nucléotide en 3' sur SEQ ID N°10 (Allèle G)
1	3000	3617
2	5458	5901

L'invention est également relative à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide exonique du gène *G/g*, tel que les polynucléotides 1 et 2 décrits dans le tableau 2 ci-dessus, qui sont inclus dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°10

Un tel acide nucléique code pour au moins une partie de la protéine CmWIP1 et peut notamment être inséré dans un vecteur recombinant destiné à l'expression du produit de traduction correspondant dans une cellule hôte ou dans une plante transformée avec ce vecteur recombinant, en vue de d'obtenir une plante de génotype (G).

Un tel acide nucléique peut aussi être utilisé pour la synthèse de sondes et d'amorces nucléotidiques destinées à la détection ou à l'amplification de séquences nucléotidiques comprises dans le gène (G/g) dans un échantillon.

Le cas échéant les séquences décrites ci-dessus peuvent porter une ou plusieurs mutations, préférentiellement une ou plusieurs mutations de nature à induire la synthèse d'une protéine CmWIP1 non active, et à modifier le type sexuel d'une plante portant un tel gène (G/g) muté. De telles séquences répondent à la définition d'acides nucléiques codant pour une protéine CmWIP1 non active, définis de manière générale ci-dessus.

TABLEAU 3
Séquence de l'intron du gène (G/g)

Intron n°	Position du nucléotide en 5' sur SEQ ID N°10 (allèle G)	Position du nucléotide en 3' sur SEQ ID N°10 (allèle G)
1	3618	5457

L'invention est également relative à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide intronique du gène (G/g), décrit dans le tableau 3 ci-dessus, qui sont inclus dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°10.

Un tel acide nucléique peut être utilisé comme sonde ou amorce oligonucléotidique pour détecter la présence d'au moins une copie du gène (G/g) dans un échantillon, ou encore pour amplifier une séquence cible déterminée au sein du gène (A/a).

Un tel acide nucléique peut aussi être utilisé pour amplifier une séquence cible déterminée au sein du gène (G/g) ou l'inhiber par une approche sens ou co-suppression, ou par l'utilisation d'ARN double brin (Wassenegger et al. 1996 ; Kooter et al. 1999) pour interférence. Un tel acide nucléique peut également être utilisé pour rechercher des variants alléliques fonctionnels du gène (G/g), qui pourront être utilisés dans une méthode de sélection de plantes possédant un type sexuel déterminé.

Autres acides nucléiques selon l'invention, codant pour la protéine CmWIP1

L'invention a également pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 95% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 3000 et se terminant au nucléotide en position 5901 de la séquence SEQ ID N°10 ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention concerne aussi un acide nucléique possédant au moins 95% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 3000 et se terminant au nucléotide en position 5901 de la séquence SEQ ID N°10, ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 3000 et se terminant au nucléotide en position 5901 de la séquence SEQ ID N°10 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention a également trait à un acide nucléique consistant en la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 3000 et se terminant au nucléotide en position 5901 de la séquence SEQ ID N°10 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique comprenant, au moins :

- (i) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 3000 au nucléotide 3617 de la séquence SEQ ID N°10,
- (ii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 5458 au nucléotide 5901 de la séquence SEQ ID N°10, et

L'invention a encore pour objet un acide nucléique comprenant, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' :

- (i) une séquence allant du nucléotide 3000 au nucléotide 3617 de la séquence SEQ ID N°10, et
- (ii) une séquence allant du nucléotide 5458 au nucléotide 5901 de la séquence SEQ ID N°10.

Un acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1, peut comprendre en outre des séquences leader et terminateur, classiques pour l'homme du métier.

Produits de transcription et de traduction du gène (G/g) et polypeptides selon l'invention.

L'expression de l'acide nucléique génomique codant la protéine CmWIP1 conduit à la synthèse d'un ARN messager dont l'ADNc est l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 11, qui est aussi l'un des objets de la présente invention.

L'invention a donc encore pour objet le polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°12, également nommé « protéine CmWIP1 » dans la présente description, ainsi qu'un polypeptide possédant au moins 95% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°12, ou un fragment ou un variant de celui-ci.

Une illustration selon l'invention d'une protéine CmWIP1 possédant au moins 95% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N° 12 consiste en la protéine de séquence SEQ ID N° 16, qui diffère de la protéine de séquence SEQ ID N° 12 par la délétion d'un résidu Sérine..

Un fragment d'une protéine CmWIP1 selon l'invention comprend au moins 10, 50, 100, 200, 300, 320, 330, 340, 345 ou 353 acides aminés consécutifs d'un polypeptide de séquence SEQ ID N°12.

L'invention est également relative à un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés ayant au moins 95% d'identité en acides aminés avec la séquence d'une protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12.

Avantageusement, fait aussi partie de l'invention un polypeptide ayant au moins 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ou 99,9% d'identité en acides aminés avec la séquence d'un polypeptide de séquence SEQ ID N°12, ou un fragment peptidique de ce dernier.

De manière générale, les polypeptides selon la présente invention se présentent sous une forme isolée ou purifiée.

Un polypeptide selon l'invention peut être obtenu par recombinaison génétique selon des techniques bien connues de l'homme du métier, par exemple des techniques décrites dans AUSUBEL et al. (1989).

Un polypeptide selon l'invention peut être également préparé par des techniques classiques de synthèse chimique, indifféremment en solution homogène ou en phase solide.

A titre illustratif, un polypeptide selon l'invention pourra être préparé par la technique en solution homogène décrite par HOUBEN WEIL (1974) ou encore par la technique de synthèse en phase solide décrite par MERRIFIELD (1965a; 1965b).

De préférence, les polypeptides variants d'un polypeptide selon l'invention conservent leur capacité à être reconnus par des anticorps dirigés contre les polypeptides de séquences SEQ ID N°12.

Un polypeptide codé par le gène (G/g) selon l'invention, tel qu'un polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N°12, ou encore un variant ou un fragment peptidique de ce dernier est utile notamment pour la préparation d'anticorps destinés à la détection de la présence et/ou de l'expression d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°12 ou d'un fragment peptidique de ce dernier dans un échantillon.

Outre la détection de la présence d'un polypeptide codé par le gène (G/g) ou encore d'un fragment peptidique d'un tel polypeptide dans un échantillon, des anticorps dirigés contre ces polypeptides sont utilisés pour quantifier la synthèse d'un polypeptide de séquences SEQ ID N°12, par exemple dans des cellules d'une plante, et déterminer ainsi le sexe de la plante, sans pour autant devoir la cultiver.

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

Des anticorps monoclaux peuvent être préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par KOHLER et MILSTEIN (1975)

La présente invention concerne également des anticorps dirigés contre un polypeptide tel que décrit ci-dessus ou un fragment ou un variant de ce dernier, tel que produit dans la technique du trioma ou encore la technique d'hybridome décrite par KOZBOR et al. (1983).

L'invention a également trait à des fragments d'anticorps simple chaîne Fv (ScFv) tels que décrits dans le brevet US N°4,946,778 ou encore par MARTINEAU et al. (1998).

Les anticorps selon l'invention comprennent également des fragments d'anticorps obtenus à l'aide de banques de phages telles que décrites par RIDDER et al. (1995) ou encore des anticorps humanisés tels que décrits par REINMANN et al. (1997) et LEGER et al. (1997). Les préparations d'anticorps selon l'invention sont utiles dans des tests de détection immunologiques destinés à l'identification de la présence et/ou de la quantité d'un polypeptide

de séquences SEQ ID N°3, ou d'un fragment peptidique de celui-ci, présent dans un échantillon.

Un anticorps selon l'invention pourra comprendre en outre un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, par exemple fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

Ainsi, l'invention a en outre pour objet un procédé pour détecter la présence d'un polypeptide conforme à l'invention dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes de:

- a) mettre en contact l'échantillon à tester avec un anticorps tel que décrit ci-dessus;
- b) détecter le complexe antigène/anticorps formé.

L'invention est également relative à un nécessaire ou kit de diagnostic pour la détection de la présence d'un polypeptide conforme à l'invention dans un échantillon, ledit nécessaire comprenant:

- a) un anticorps tel que défini ci-dessus;
- b) le cas échéant, un ou plusieurs réactifs nécessaires à la détection du complexe antigène/anticorps formé.

Un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation d'un acide nucléique ou d'un variant allélique d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus dans des programmes de sélection de plantes pour l'obtention de plantes dont le type floral a été modifié.

Acides nucléiques comprenant un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel

Un polynucléotide régulateur ou promoteur (PG) fonctionnel selon l'invention consiste en un acide nucléique qui permet l'expression de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12 chez les plantes dicotylédones.

Un tel polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel permet ainsi, lorsqu'il est introduit artificiellement dans une plante, de modifier le sexe des fleurs d'une telle plante, et en particulier permet d'obtenir des plantes mâles et femelles ou mâles et hermaphrodites, capables d'autopollinisation

L'invention a donc également pour objet un acide nucléique comprenant un polynucléotide possédant au moins 95% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 1 et se terminant au nucléotide en position 2999 de la séquence SEQ ID N°10 ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention concerne aussi un acide nucléique possédant au moins 95% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 1 et se terminant au nucléotide en position 2999 de la séquence SEQ ID N°10, ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 1 et se terminant au nucléotide en position 2999 de la séquence SEQ ID N°10 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention a également trait à un acide nucléique consistant en la séquence nucléotidique débutant au nucléotide en position 1 et se terminant au nucléotide en position 2999 de la séquence SEQ ID N°10 ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Le polynucléotide régulateur allant du nucléotide en position 1 jusqu'au nucléotide en position 2999 de la séquence SEQ ID N° 10 est également référencé comme l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 13 dans la présente description.

L'invention a également trait à un acide nucléique comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide régulateur, tel que défini ci-dessus.

Un tel acide nucléique peut être utilisé comme sonde ou amorce oligonucléotidique pour détecter la présence d'au moins une copie de l'allèle (G) du gène (G/g) dans un échantillon, pour amplifier une séquence cible déterminée au sein du gène (G/g). Un tel acide nucléique peut également être utilisé pour rechercher des variants alléliques fonctionnels du gène (G/g), ou pourront être utilisés dans une méthode de sélection de plantes possédant un type sexuel déterminé.

Des procédés de détection mettant en œuvre des acides nucléiques tels que décrits ci-dessus sont décrits dans la partie intitulée « Procédés de sélection selon l'invention »

Un tel acide nucléique peut aussi être utilisé pour inhiber une séquence cible déterminée au sein du gène (G/g) par une approche antisens ou co-suppression, ou par l'utilisation d'ARN double brin (Wassenegger et al. 1996 ; Kooter et al. 1999) pour interférence.

Acides nucléiques comprenant un polynucléotide régulateur Pg non fonctionnel

Un polynucléotide régulateur (Pa), ou promoteur non fonctionnel selon l'invention est un acide nucléique qui :

- (i) ne permet pas l'expression de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12 dans une cellule hôte, ou
- (ii) permet l'expression de cette protéine à un niveau très faible en comparaison du niveau observé avec le polynucléotide régulateur (PG), ou
- (iii) permet l'expression de la protéine CmWIP1 au cours de la vie de la plante, pendant une durée inférieure, en comparaison de celle observée avec le polynucléotide régulateur (PG).

Un tel polynucléotide régulateur (Pg) non fonctionnel permet ainsi, lorsqu'il est introduit artificiellement dans une plante, par exemple en remplacement d'un polynucléotide (G) de modifier le sexe des fleurs d'une telle plante, et en particulier permet d'obtenir des plantes hermaphrodites, capables d'autopollinisation, ou bien des plantes femelles.

Un tel acide nucléique peut être utilisé comme sonde ou amorce oligonucléotidique pour détecter la présence d'au moins une copie de l'allèle (a) du gène (G/g) dans un échantillon, ou encore pour amplifier une séquence cible déterminée au sein du gène (G/g).

L'invention concerne enfin des acides nucléiques comprenant l'association un ou plusieurs acides nucléiques tels que définis ci-dessus, par exemple un acide nucléique codant pour une protéine CmWIP1 fonctionnelle sous le contrôle d'un promoteur de type (PG) ou (Pg).

Définitions générales

Selon l'invention, toute technique classique de biologie moléculaire, de microbiologie et d'ADN recombinant connue de l'homme du métier peut être utilisée. De telles techniques sont décrites par exemple par SAMBROOK et al. (1989), GLOVER (1985), GAIT (1984), HAMES et HIGGINS (1984), BERBAL (1984) et AUSUBEL et al. (1994) .

De manière préférée, tout acide nucléique et tout polypeptide selon l'invention se présente sous une forme isolée ou purifiée.

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 polynucléotide présent à l'état naturel dans une plante n'est pas isolé. Le même polynucléotide séparé des acides nucléiques adjacents au sein desquels il est naturellement inséré dans le génome de la plante est isolé. Un tel polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeurer néanmoins à l'état isolé du fait que le vecteur ou la composition ne constitue pas son environnement naturel.

Le terme " purifié " ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusive de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative.

Un polynucléotide ou un polypeptide est à l'état purifié après purification du matériel de départ ou du matériel naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement quatre ou cinq ordres de grandeur.

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

Les termes " acide nucléique ", " polynucléotide ", " oligonucléotide " ou encore " séquence nucléotidique " englobent des séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN de plus d'un nucléotide, indifféremment sous la forme simple brin ou sous la forme de duplex.

Le terme " nucléotide " désigne à la fois les nucléotides naturels (A, T, G, 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.

Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est considéré comme étant "complémentaire" d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

Selon l'invention, un premier acide nucléique ayant au moins 95% d'identité avec un second acide nucléique de référence, possédera au moins 95%, de préférence au moins 96%, 97%, 98%, 98,5%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% ou 99,9% d'identité en nucléotides avec ce second polynucléotide de référence, le pourcentage d'identité entre deux séquences étant déterminé comme décrit ci-dessous.

Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques, au sens de la présente invention, est déterminé en comparant les deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal entre les deux séquences.

Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique identique est observée pour les deux séquences comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux bases nucléiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité en nucléotides des deux séquences entre elles.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

De manière tout à fait préférée, le pourcentage d'identité de séquence est déterminé à l'aide du logiciel CLUSTAL W (version 1.82) les paramètres étant fixés comme suit : (1) CPU MODE = ClustalW mp ; (2) ALIGNMENT = « full » ; (3) OUTPUT FORMAT = « aln w/numbers » ; (4) OUTPUT ORDER = « aligned » ; (5) COLOR ALIGNMENT = « no » ; (6) KTUP (word size) = « default » ; (7) WINDOW LENGTH = « default » ; (8) SCORE TYPE = « percent » ; (9) TOPDIAG = « default » ; (10) PAIRGAP = « default » ; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = « none » ; (12) MATRIX = « default » ; (13) GAP OPEN = « default » ; (14) END GAPS = « default » ; (15) GAP EXTENSION = « default » ; (16) GAP DISTANCES = « default » ; (17) TREE TYPE = « cladogram » et (18) TREE GRAP DISTANCES = « hide ».

Un acide nucléique possédant au moins 95% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique selon l'invention englobe les "variants" d'un acide nucléique selon l'invention.

Par "variant" d'un acide nucléique selon l'invention, on entend un acide nucléique qui diffère de l'acide nucléique de référence par une ou plusieurs substitutions, additions ou délétions d'un nucléotide, par rapport à l'acide nucléique de référence. Un variant d'un acide nucléique selon l'invention peut être d'origine naturelle, tel qu'un variant allélique qui existe

naturellement. Un tel acide nucléique variant peut être également un acide nucléique non naturel obtenu, par exemple, par des techniques de mutagenèse.

En général, les différences entre l'acide nucléique de référence et l'acide nucléique "variant" sont réduites de telle sorte que l'acide nucléique de référence et l'acide nucléique variant ont des séquences nucléotidiques très similaires et, dans de nombreuses régions, identiques. Les modifications nucléotidiques présentes dans un acide nucléique variant peuvent être silencieuses, ce qui signifie qu'elles n'affectent pas la séquence d'acides aminés qui peut être codée par cet acide nucléique variant.

Les modifications de nucléotides dans l'acide nucléique variant peuvent aussi résulter en des substitutions, additions ou délétions d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence du polypeptide qui peut être codé par cet acide nucléique variant.

De manière tout à fait préférée, un acide nucléique variant selon l'invention comportant une phase de lecture ouverte, code pour un polypeptide qui conserve la même fonction ou la même activité biologique que le polypeptide codé par l'acide nucléique de référence.

De manière tout à fait préférée, un acide nucléique variant selon l'invention et qui comporte une phase de lecture ouverte, code pour un polypeptide qui conserve la capacité d'être reconnu par des anticorps dirigés contre le polypeptide codé par l'acide nucléique de référence.

Font partie des « variants » d'un acide nucléique codant la protéine ACS les acides nucléiques des gènes orthologues à la protéine CmWIP1 inclus dans le génome de plantes, et possédant une identité en nucléotides d'au moins 95% avec un acide nucléique codant la protéine CmWIP1.

Par "fragment" d'un acide nucléique selon l'invention, on entend une séquence nucléotidique d'une longueur réduite par rapport à l'acide nucléique de référence, le fragment d'acide nucléique possédant une séquence nucléotidique identique à la séquence nucléotidique de l'acide nucléique de référence sur la partie commune. De tels fragments d'un acide nucléique selon l'invention possèdent au moins 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 ou 3000 nucléotides consécutifs de l'acide nucléique de référence, la longueur maximale en nucléotides d'un fragment d'un acide nucléique selon l'invention étant bien entendu limitée par la longueur maximale en nucléotides de l'acide nucléique de référence.

Sondes et amorces

Les acides nucléiques selon l'invention, et en particulier les séquences nucléotidiques SEQ ID N°10 et SEQ ID N°11, leurs fragments d'au moins 12 nucléotides, les polynucléotides régulateurs (PG) et (Pg), ainsi que les acides nucléiques de séquence complémentaire, sont utiles pour la détection de la présence d'au moins une copie d'une séquence nucléotidique du

gène (G/g) ou encore d'un fragment ou d'un variant allélique de cette dernière dans un échantillon.

En particulier, les sondes et amorces ci-dessus dérivés des séquences SEQ ID N°10, et en particulier dérivées du polynucléotide régulateur (PG) peuvent être utilisées pour détecter la présence de l'allèle (G) dans une plante dicotylédone.

Font également partie de l'invention les sondes et amorces nucléotidiques hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique choisi parmi les séquences SEQ ID N°10 et SEQ ID N°11, ou avec un polynucléotide régulateur (PG) ou (Pg).

L'invention a donc également pour objet un acide nucléique, utilisable en tant que sonde ou amorce, hybridant spécifiquement avec un acide nucléique tel que défini ci-dessus.

Les conditions d'hybridation ci-dessous sont mises en œuvre pour l'hybridation d'un acide nucléique, sonde ou amorce, de 20 bases de longueur.

Le niveau et la spécificité d'hybridation dépend de différents paramètres, tels que :

- a) la pureté de la préparation de l'acide nucléique sur lequel la sonde ou l'amorce doit s'hybrider ;
- b) la composition en bases de la sonde ou de l'amorce, les paires de base G-C possédant une plus grande stabilité thermique que les paires de bases A-T ou A-U ;
- c) la longueur de la séquence de bases homologues entre la sonde ou l'amorce et l'acide nucléique ;
- d) la force ionique : le taux d'hybridation augmente avec l'accroissement de la force ionique et la durée du temps d'incubation ;
- e) la température d'incubation ;
- f) la concentration de l'acide nucléique sur lequel la sonde ou l'amorce doit s'hybrider ;
- g) la présence d'agents dénaturants tels que des agents favorisant la rupture des liaisons hydrogène, comme le formamide ou l'urée, qui accroissent la stringence de l'hybridation ;
- h) le temps d'incubation, le taux d'hybridation augmentant avec la durée de l'incubation ;
- i) la présence d'agents d'exclusion de volume, tels que le dextran ou le sulfate de dextran, qui augmentent le taux d'hybridation du fait qu'ils accroissent les concentrations effectives de la sonde ou l'amorce et de l'acide nucléique qui doit s'hybrider, au sein de la préparation.

Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 360 bases, T_m est définie par la relation:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%G+C) + 16,6 \text{ Log}(\text{concentration en cations}) - 0,63 (\% \text{ formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$$

(SAMBROOK et al., (1989), pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

Dans des conditions de stringence appropriées, dans lesquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 10°C en-dessous de T_m.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » selon l'invention, on entend des conditions d'hybridation telles que l'on se place à une température d'hybridation de 5°C au-dessous du T_m.

Les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur et de la composition en bases de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon les techniques connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985) ou encore dans l'ouvrage de AUSUBEL et al. (1989).

A titre illustratif, les conditions d'hybridation utilisées pour un acide nucléique de 200 bases de longueur sont les suivantes :

Préhybridation:

mêmes conditions que pour l'hybridation
durée: 1 nuit.

Hybridation:

5 x SSPE (0.9 M NaCl, 50 mM phosphate de sodium pH 7.7, 5 mM EDTA)
5 x Denhardt's (0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 0.2% SAB)
100 µg/ml ADN de sperme de saumon
0.1% SDS
durée: 1 nuit.

Lavages:

2 x SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C
1 x SSC, 0.1 % SDS 10 min 65°C
0.5 x SSC, 0.1 % SDS 10 min 65°C
0.1 x SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C.

Les sondes ou les amorces nucléotidiques selon l'invention comprennent au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier d'un acide nucléique de séquences SEQ ID N°10 ou SEQ ID N°11 ou de sa séquence complémentaire, d'un acide nucléique ayant 95% d'identité en nucléotides avec une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°10 ou SEQ ID N° 11 ou de sa séquence complémentaire ou encore d'un acide nucléique hybridant dans des conditions d'hybridation de forte stringence avec une

séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°10 ou SEQ ID N° 11 ou de sa séquence complémentaire.

De préférence, des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention auront une longueur d'au moins 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 ou 3000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention.

Alternativement, une sonde ou une amorce nucléotidique selon l'invention consistera et/ou comprendra les fragments d'une longueur de 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 ou 3000 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention.

Une amorce ou une sonde nucléotidique selon l'invention peut être préparée par toute méthode adaptée bien connue de l'homme du métier, y compris par clonage et action d'enzymes de restriction ou encore par synthèse chimique directe selon des techniques telles que la méthode au phosphodiester de NARANG et al. (1979) ou de BROWN et al. (1979), la méthode au diéthylphosphoramidites de BEAUCAGE et al. (1980) ou encore la technique sur support solide décrite dans le brevet européen n°EP 0 707 592. Chacun des acides nucléiques selon l'invention, y compris les sondes et amorces oligonucléotidiques décrites ci-dessus, peut être marqué, si désiré, en incorporant une molécule détectable, c'est-à-dire un marqueur détectable, par des moyens spectroscopiques, photochimiques, biochimiques, immunochimiques ou encore chimiques.

Par exemple, de tels marqueurs peuvent consister en des isotopes radioactifs (^{32}P , ^3H , ^{35}S), des molécules fluorescentes (5-bromodéoxyuridine, fluorescéine, acétylaminofluorène) ou encore des ligands tels que la biotine.

Le marquage des sondes est fait de préférence par incorporation de molécules marquées au sein des polynucléotides par extension d'amorces, ou bien par rajout sur les extrémités 5' ou 3'.

Des exemples de marquage non radioactif de fragments d'acides nucléiques sont décrits notamment dans le brevet français n°FR 78 10 975 ou encore dans les articles de URDEA et al. (1988) ou SANCHEZ PESCADOR et al. (1988).

De manière avantageuse, les sondes selon l'invention peuvent avoir des caractéristiques structurales de nature à permettre une amplification du signal, telles que les sondes décrites par URDEA et al; (1991) ou encore dans le brevet européen n°EP 0 225 807 (Chiron).

Les sondes oligonucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées notamment dans des hybridations de type Southern à tout acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1, en particulier les acides nucléiques de séquences SEQ ID N°10 ou SEQ ID N° 11, ou encore dans des hybridations à l'ARN lorsque l'expression du transcrit correspondant est recherchée dans un échantillon.

Les sondes selon l'invention peuvent aussi être utilisées pour la détection de produits d'amplification PCR ou encore pour la détection de mésappariements.

Des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention peuvent être immobilisées sur un support solide. De tels supports solides sont bien connus de l'homme du métier et comprennent des surfaces des puits de plaques de micro-titration, des billes de polystyrène, des billes magnétiques, des bandes de nitrocellulose ou encore des microparticules telles que des particules de latex.

En conséquence, l'invention a encore pour objet un acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus, en particulier d'un acide nucléique de séquences nucléotidiques SEQ ID N°10 et SEQ ID N°11.

L'invention est également relative à un acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce nucléotidique caractérisé en ce qu'il consiste en un polynucléotide d'au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, de manière tout à fait préférée d'un acide nucléique de séquences choisies parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°10 et SEQ ID N°11.

Comme décrit ci-dessus, un tel acide nucléique peut en outre être caractérisé en ce qu'il est marqué par une molécule détectable.

Un acide nucléique utilisable en tant que sonde ou amorce nucléotidique pour la détection ou l'amplification d'une séquence génomique, de l'ARNm ou de l'ADNc du gène (G/g) peut en outre être caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences suivantes :

- a) les séquences nucléotidiques hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°10 ou SEQ ID N°11; et
- b) les séquences comprenant au moins 12 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°10 ou SEQ ID N°11.

Vecteurs, cellules et plantes selon l'invention

Dans la combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral d'une plante dicotylédone objet de l'invention, pour permettre qu'au moins un des éléments génétiques de contrôle soit artificiellement introduit dans la plante dicotylédone, les acides nucléiques, et les polynucléotides régulateurs définis ci-dessus doivent être introduits dans des vecteurs, puis dans des cellules.

Ainsi, l'invention a également pour objet des vecteurs, des cellules et des plantes transformées, qui comprennent les polynucléotides régulateurs (PG) et (Pg), les acides nucléiques codant pour des protéines CmWIP1 actives ou non actives, ainsi que les acides nucléiques correspondant aux allèles (G) et (g) tels que décrits ci-dessus, et les amorces définies ci-dessus.

Vecteurs

Un acide nucléique tel que défini ci-dessus, nommé ci-après acide nucléique d'intérêt, peut être inséré dans un vecteur approprié.

Par "vecteur" au sens de la présente invention, on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme simple brin ou double brin.

Un vecteur recombinant selon l'invention est de préférence un vecteur d'expression, ou plus spécifiquement un vecteur d'insertion, un vecteur de transformation ou un vecteur d'intégration.

Il peut s'agir notamment d'un vecteur d'origine bactérienne ou virale.

Dans tous les cas, l'acide nucléique d'intérêt est placé sous le contrôle d'une ou plusieurs séquences contenant des signaux de régulation de son expression dans la plante considérée, soit que les signaux de régulation soient tous contenus dans l'acide nucléique d'intérêt, comme c'est le cas dans les constructions d'acides nucléiques décrites dans la section précédente, soit que l'un, plusieurs d'entre eux, ou encore tous les signaux de régulation soient contenus dans le vecteur receveur dans lequel l'acide nucléique d'intérêt a été inséré.

Un vecteur recombinant selon l'invention comprend avantageusement des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention peuvent inclure une ou plusieurs origines de réplication fonctionnelles dans les cellules hôtes dans lesquelles leur expression est recherchée, ainsi que, le cas échéant, des séquences nucléotidiques marqueurs de sélection.

Les vecteurs recombinants selon l'invention peuvent aussi inclure un ou plusieurs des signaux de régulation de l'expression tels que définis ci-dessus dans la description.

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs pBR322 (ATCC n°37 017) ou encore les vecteurs tels que pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, Etats-Unis).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs pQE70, pQE60, pQE9 (Quiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pMH16A, pMH18A, pMH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI et pSG (Stratagene).

Il peut s'agir également de vecteurs du type *Baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (Pharmingen) utilisé pour transférer les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivée de *Spodoptera frugiperda*.

De manière préférée, et pour l'application principale des vecteurs de l'invention consistant à obtenir une expression stable, et préférentiellement inductible, d'une séquence codant pour une protéine CmWIP1 dans une plante, on aura recours à des vecteurs spécialement adaptés pour l'expression de séquences d'intérêt dans des cellules de plantes, tels que les vecteurs suivants:

- vecteur pBIN19 (BEVAN et al.), commercialisé par la Société CLONTECH (Palo Alto, Californie, USA);
- vecteur pBI 101 (JEFFERSON, 1987), commercialisé par la Société CLONTECH ;
- vecteur pBI121 (JEFFERSON, 1987), commercialisé par la Société CLONTECH;
- vecteur pEGFP; Yang et al. (1996), commercialisé par la Société CLONTECH;
- vecteur pCAMBIA 1302 (HAJDUKIEWICZ et al., 1994)
- vecteurs intermédiaires et superbinaires dérivés des vecteurs pSB12 et pSB1 décrits par Japan Tobacco (EP 672 752 et Ishida et al., 1996).

Cellules

Les méthodes les plus répandues pour introduire des acides nucléiques dans des cellules bactériennes peuvent être utilisées dans le cadre de cette invention. Ce peut être la fusion de cellules réceptrices avec des protoplastes bactériens contenant l'ADN, l'électroporation, le bombardement par projectiles, l'infection par des vecteurs viraux, etc. Les cellules bactériennes sont souvent utilisées pour amplifier le nombre de plasmides contenant le construit comprenant la séquence nucléotidique, objet de l'invention. Les bactéries sont mises en culture et les plasmides sont ensuite isolés selon des méthodes bien connus de l'homme du métier (se reporter aux manuels de protocoles déjà cités), incluant les kits de purification de plasmides vendus dans le commerce comme par exemple EasyPrep de Pharmacia Biotech ou QIAexpress Expression System de Qiagen. Les plasmides ainsi isolés et purifiés sont ensuite manipulés pour produire d'autres plasmides qui seront utilisés pour transfecter les cellules végétales.

Pour permettre l'expression d'un acide nucléique d'intérêt selon l'invention placé sous le contrôle d'une séquence régulatrice appropriée, les acides nucléiques ou les vecteurs recombinants définis dans la présente description doivent être introduits dans une cellule hôte. L'introduction des polynucléotides selon l'invention dans une cellule hôte peut être réalisée *in vitro*, selon les techniques bien connues de l'homme du métier.

L'invention a en outre pour objet une cellule hôte transformée par un acide nucléique selon l'invention ou par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

Une telle cellule hôte transformée est préférentiellement d'origine bactérienne, fongique ou végétale.

Ainsi, peuvent être notamment utilisées des cellules bactériennes de différentes souches de *Escherichia coli* ou encore d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Avantageusement, la cellule hôte transformée est une cellule de plante ou encore un protoplaste de plante.

Parmi les cellules susceptibles d'être transformées selon le procédé de l'invention, on peut citer à titre d'exemples des cellules de plantes dicotylédones, de préférence appartenant à

la famille des *cucurbitaceae*, dont les membres sont détaillées ci-après dans la partie intitulée « plantes selon l'invention ».

Les plantes hybrides obtenues par le croisement de plantes selon l'invention, font aussi partie de l'invention.

Préférentiellement, il s'agit d'une cellule ou d'un protoplaste d'une plante appartenant à l'espèce *cucumis melo*.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un acide nucléique d'intérêt, pour fabriquer une plante transformée dont le phénotype sexuel est modifié.

L'invention est également relative à l'utilisation d'un vecteur recombinant tel que défini dans la présente description pour fabriquer une plante transformée dont le phénotype sexuel est modifié.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un hôte cellulaire transformé par un acide nucléique d'intérêt, pour fabriquer une plante transformée dont le phénotype sexuel est modifié.

L'invention concerne aussi une plante transformée comprenant une pluralité de cellules hôtes telles que définies ci-dessus.

Plantes transformées selon l'invention

L'invention concerne aussi un organisme multicellulaire végétal transformé, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule hôte transformée ou une pluralité de cellules hôtes transformées par au moins l'un des acides nucléiques tels que définis ci-dessus, ou encore par un vecteur recombinant comprenant un tel acide nucléique.

La plante transformée peut contenir une pluralité de copies d'un acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1, dans les situations dans lesquelles une surexpression de la protéine CmWIP1 est recherchée. Une surexpression de la protéine CmWIP1 est recherchée notamment lorsque l'on souhaite obtenir des plantes produisant des fleurs mâles et femelles ou bien des plantes produisant des fleurs mâles et hermaphrodites.

Une plante surexprimant la protéine CmWIP1 produit des fleurs mâles et femelles dans les modes de réalisation de la combinaison de deux éléments génétiques de l'invention dans lesquels la protéine ACS est également surexprimée (allèle A présent à l'état homozygote ou hétérozygote).

Une plante surexprimant la protéine CmWIP1 produit des fleurs mâles et hermaphrodites dans les modes de réalisation de la combinaison de deux éléments génétiques de l'invention dans il y a absence d'expression d'une protéine ACS active.

L'invention est donc également relative à une plante transformée telle que définie ci-dessus dont les fleurs sont mâles et femelles et à une plante transformée telle que définie ci-dessus dont les fleurs sont mâles et hermaphrodites.

La plante transformée peut contenir une pluralité de copies d'un acide nucléique codant pour la protéine ACS, dans les situations dans lesquelles une surexpression de la protéine ACS

est recherchée. Une surexpression de la protéine ACS est recherchée notamment lorsque l'on souhaite obtenir des plantes produisant des fleurs femelles, non capables d'auto-pollinisation.

Une plante surexprimant la protéine ACS produit des fleurs mâles et femelles dans les modes de réalisation de la combinaison de deux éléments génétiques de l'invention dans lesquels la protéine CmWIP1 est également surexprimée (allèle G présent à l'état homozygote).

Une plante surexprimant la protéine ACS produit des fleurs femelles dans les modes de réalisation de la combinaison de deux éléments génétiques de l'invention dans il y a absence d'expression d'une protéine CmWIP1 active.

L'invention est donc également relative à une plante transformée telle que définie ci-dessus dont les fleurs sont mâles et femelles et à une plante transformée telle que définie ci-dessus dont les fleurs sont exclusivement femelles.

Les plantes transformées selon l'invention, comprennent toutes au moins le second élément génétique de la combinaison selon l'invention, choisi parmi les acides nucléiques, et les polynucléotides régulateurs définis ci-dessus sous une forme artificiellement introduit dans leur génome.

Les plantes hybrides obtenues par le croisement de plantes transformées selon l'invention font également partie de l'invention.

L'invention concerne aussi toute partie d'une plante transformée telle que définie dans la présente description, telle que la racine, mais aussi les parties aériennes comme la tige, la feuille, la fleur et surtout la graine ou le fruit.

L'invention a encore pour objet une semence ou une graine de plante produit par une plante transformée telle que définie ci-dessus.

Typiquement, une telle semence transformée ou un tel grain transformé comprend une ou plusieurs cellules comprenant dans leur génome une ou plusieurs copies des premiers et seconds éléments génétiques de contrôle tels que définis ci-dessus, artificiellement introduits dans ladite plante dicotylédone permettant la synthèse de la protéine CmWIP1 à un taux élevé ou à un taux faible, le cas échéant de manière contrôlée et inductible.

Selon un mode de réalisation préférentiel d'une plante transformée selon l'invention, on cherche à exprimer de manière contrôlée la protéine CmWIP1, ce qui implique que la plante transformée ne contient, en tant que copie fonctionnelle d'un polynucléotide codant pour la protéine CmWIP1, uniquement la ou les copies qui ont été artificiellement introduites dans leurs cellules, et préférentiellement dans leur génome, alors que les séquences du gène (G/g) codant pour CmWIP1, retrouvées naturellement dans la plante sauvage portent au moins une mutation provoquant un défaut dans l'expression du gène (G/g).

Les plantes transformées selon l'invention sont des dicotylédones, de préférence appartenant à la famille *cucurbitaceae*, et en particulier aux genres choisis parmi :

Abobra, *Acanthosicyos*, *Actinostemma*, *Alsomitra*, *Ampelosicyos*, *Anacaona*, *Apat3ingania*, *Apodanthera*, *Bambekea*, *Benincasa*, *Biswarea*, *Bolbostemma*, *Brandegea*, *bryonia*,

Calycophysum, Cayaponia, Cephalopentandra, Ceratosanthes, Chalema, Cionosicyos, Citrullus, Coccinia, Cogniauxia, Corallocarpus, Cremastopus, Ctenolepis, Cucumella, Cucumeropsis, Cucumis, Cucurbita,, Cucurbitella, Cyclanthera, Cyclantheropsis, Dactyliandra, Dendrosicyos, Dicoelospermum, Dieterlea, Diplocyclos, Doyerea, Ecballium, Echinocystis, Echinopepon, Edgaria, Elateriopsis, Eureiandra, Fevillea, Gerrardanthus, Gomphogyne, Gurania, Guraniopsis, Gymnopetalum, Gynostemma, Halosicyos, Hanburia, Helmontia, Hemsleya, Herpetospermum, Hodgsonia, Ibervillea, Indofevillea, Kedrostis, Lagenaria,, Lemurosicyos, Luffa, Marah, Melancium, Melothria, Melothrianthus, Microsechium, Momordica, Muellerargia, Mukia, Myrmecosicyos, Neoalsomitra, Nothoalsomitra, Odosicyos, Oreosyce, Parasicyos, Penelopeia, Peponium, Peponopsis, Polyclathra, Posadaea, Praecitrullus, Pseudocyclanthera, Pseudosicydium, Psiguria, Pteropepon, Pterosicyos, Raphidiocystis, Ruthalicia, Rytidostylis, Schi3ocarpum, Schi3opepon, Sechiopsis, Sechium,, Selysia, Seyrigia, Sicana, Sicydium, Sicyos, Sicyosperma, Siolmatra, Siraitia, Solena, Tecunumania, Telfairia, Thladiantha, Trichosanthes, Tricyclandra, Trochomeria, Trochomeriopsis, Tumamoca, Vaseyanthus, Wilbrandia, Xerosicyos, 3anonia, 3ehneria, 3ombitsia, ou 3ygosicyos.

De préférence, les plantes transformées appartiennent au genre *cucumis*, et à l'espèce *Cucumis Melo*.

Procédés de détection selon l'invention

L'identification du système de contrôle du développement du type floral par les inventeurs, a permis de mettre au point des procédés de détection du phénotype sexuel des plantes extrêmement simples, dont les principales caractéristiques sont détaillées ci-après.

L'invention concerne aussi un procédé de détection de la présence d'un allèle (G) ou (g), ladite méthode comprenant les étapes de :

- 1) mettre en contact une sonde ou une pluralité de sondes nucléotidiques telles que définies ci-dessus avec l'échantillon à tester ; et
- 2) détecter le complexe éventuellement formé entre la ou les sondes et l'acide nucléique présent dans l'échantillon.

Le procédé de détection ci-dessus peut-être mis en oeuvre conjointement avec le procédé de détection de la présence d'un allèle (A) ou (a) décrit dans la demande PCT n° WO 2007/125264, qui comprend les étapes de :

- 1) mettre en contact une sonde ou une pluralité de sondes nucléotidiques telles que définies ci-dessus avec l'échantillon à tester ; et
- 2) détecter le complexe éventuellement formé entre la ou les sondes et l'acide nucléique présent dans l'échantillon.

Ces deux procédés de détection permettent de sélectionner des plantes dont les phénotypes et génotypes ont été résumés dans le tableau 1.

La détection du complexe entre un acide nucléique et une sonde peut se faire par toute technique connue de l'homme du métier, et en particulier en utilisant des sondes ou amorces marquées, telles que décrites dans la partie « Sondes et amorces selon l'invention ».

Ces procédés sont particulièrement avantageux car ils évitent de devoir cultiver une plante dicotylédone, pour connaître son phénotype sexuel. Il est ainsi possible de réaliser la détection du phénotype sexuel d'un très grand échantillon de plantes, à moindre coût.

Procédés de sélection selon l'invention

Les procédés de détection ci-dessus peuvent être mis en œuvre dans les procédés de sélection détaillés ci-après.

L'invention a également pour objet un procédé de sélection du type floral d'une plante appartenant au genre *cucurbitaceae*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) déterminer la présence des allèles (G) et (g), dans une plante d'intérêt appartenant à la famille des *cucurbitaceae*, par exemple en utilisant les acides nucléiques tels que définis ci-dessus, et
- b) sélectionner positivement la plante qui possède l'allèle (G) ou l'allèle (g) dans son génome.

Le procédé de sélection ci-dessus peut être mis en œuvre conjointement avec le procédé de sélection du type floral d'une plante appartenant au genre *cucurbitaceae* qui est décrit dans la demande PCT n° WO 2007/125264, et qui est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) déterminer la présence des allèles (A) et (a), dans une plante d'intérêt appartenant à la famille des *cucurbitaceae*, par exemple en utilisant les acides nucléiques tels que définis ci-dessus, ou un anticorps dirigé contre la protéine ACS et
- b) sélectionner positivement la plante qui possède l'allèle (A) ou l'allèle (a) dans son génome.

La détermination de la présence des allèles (A), (a), (G) et (g) peut donc être avantageusement effectuée en mettant en œuvre les procédés de détection ci-dessus.

L'homme du métier peut aisément combiner les procédés de sélection définis ci-dessus, en se référant au tableau 1, donnant la correspondance entre génotype et phénotype, pour obtenir des plantes de phénotype uniquement femelle ou hermaphrodites, par exemple.

Procédés d'obtention d'une plante transformée selon l'invention

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être obtenues grâce à l'un quelconque des nombreux procédés qui font aujourd'hui partie des connaissances générales de l'homme du métier.

Des procédés d'obtention de plantes transformées selon l'invention sont décrits ci-après.

Procédé d'obtention de plantes transformées par « TILLING »

Le « TILLING » (pour « Targeted Induced Local Lesions IN Genomes ») est une méthode de génétique inverse qui est basée sur la capacité d'une endonucléase à détecter les mésappariements dans un double brin d'ADN et à réaliser une coupure de l'ADN au niveau des bases non appariées. Cette technique permet de détecter des points de mutation uniques générés par l'exposition des plantes à un composé chimique mutagène. La technique de TILLING permet ainsi l'identification d'une série d'allèles d'un gène donné et est particulièrement bien adaptée à la mise en oeuvre de procédés de criblages à haut débit permettant la sélection, dans des gènes cibles d'intérêt, de mutations induites par mutagenèse chimique.

Le procédé de Tilling est bien connu de l'homme du métier ; elle est décrite notamment par Mc Callum et al. (2000, Plant Physiology, Vol. 123 : 439-442).

Pour les besoins de la présente invention, la technique de Tilling est particulièrement bien adaptée à l'obtention et à la sélection des plantes dans lesquelles on a artificiellement introduit l'allèle (g) du second élément de contrôle génétique (G/g).

Selon l'invention, la technique de Tilling peut être aussi utilisée avec succès pour l'obtention et la sélection de plantes dans lesquelles on a artificiellement introduit l'allèle (a) du premier élément génétique (A/a).

Par définition, au vu de ce qui précède, la technique de Tilling est adaptée à l'obtention et à la sélection des plantes dans lesquelles on a artificiellement introduit à la fois l'allèle (g) du second élément de contrôle génétique (G/g) et l'allèle (a) du premier élément génétique (A/a).

L'obtention de plantes dicotylédones artificiellement mutées dans le gène codant la protéine CmWIP1 peut être réalisée en utilisant la technique de Tilling, par exemple selon un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) générer une collection de plantes dicotylédones mutantes par mutagenèse chimique ;
- b) sélectionner dans la collection de plantes mutantes générée à l'étape a), les plantes possédant une mutation ou plus d'une mutation dans le gène codant la protéine CmWIP1,
- c) sélectionner, parmi les plantes mutantes sélectionnées à l'étape b), les plantes qui expriment le phénotype (g).

Dans certains modes de réalisation du procédé ci-dessus, l'étape a) est réalisée par mutagenèse chimique des semences des plantes dicotylédone d'intérêt, par exposition des semences à un agent mutagène, par exemple à de l'éthyl méthanesulfonate, par exemple en utilisant la méthode décrite par Koornbeef et al. (1982, Mutat Res, Vol. 93 : 109-123).

Puis, on génère une collection de plantes M1 à partir des semences préalablement exposées à l'agent mutagène. Les plantes M1 sont ensuite auto-fécondées afin de générer une collection de plantes M2 qui est la collection de plantes mutantes générée à l'étape a) du procédé.

Puis, à l'étape b), on extrait l'ADN de chaque plante de la collection de plantes générée à l'étape a) et on réalise une amplification de l'acide nucléique du gène cible, ici le gène codant la protéine CmWIP1, et on recherche la présence de mutation(s) dans la séquence du gène cible, par comparaison avec la séquence du gène cible non muté. Puis, on sélectionne les plantes mutées dans la séquence du gène codant le gène cible, ici le gène codant la protéine CmWIP1.

Dans certains modes de réalisation de l'étape b), l'ADN extrait à partir de plusieurs plantes M2, par exemple 20 plantes M2, est mélangé dans un premier temps et la détection de mutations dans la séquence du gène cible est réalisée sur le mélange (« pool ») d'ADN extrait afin de réduire le nombre d'étapes de détection de mutations qui doit être effectué.

Puis, on réalise une étape d'amplification des séquences cibles par PCR, en utilisant des amorces nucléiques appropriées et les amplicons qui sont générés sont chauffés, puis refroidis afin de générer des hétéroduplexes d'ADN entre l'ADN originaire d'une plante non mutée sur l'acide nucléique cible et l'ADN originaire d'une plante mutée sur l'acide nucléique cible.

Puis, les hétéroduplexes d'ADN sont incubés en présence d'une endonucléase coupant au niveau des mésappariements. Puis les hétéroduplexes clivés sont dénaturés et séparés. Puis les brins d'ADN séparés sont soumis à l'étape de détection de mutation(s) proprement dites, par exemple par électrophorèse ou bien par HPLC en conditions dénaturantes (DHPLC).

Dans certains modes de réalisation de l'étape b), la détection de mutation(s) dans le gène cible est réalisée par la technique de HPLC en conditions dénaturantes (« DHPLC »), comme décrit par exemple par Mc Callum et al. (2000, *Plant Physiol.*, Vol. 123 : 439-442).

Puis, à l'étape c), on sélectionne, parmi les plantes mutées sur le gène cible, ici les plantes mutées dans le gène codant la protéine CmWIP1, les plantes qui expriment le phénotype associé à l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g).

Comme déjà mentionné ci-dessus, la technique de Tilling peut-être mise en oeuvre, selon la présente invention, pour l'obtention de plantes transformées comprenant l'une quelconque des combinaisons d'allèles (G/g) et (A/a) décrites dans la présente description.

En conséquence, dans certains modes de réalisation du procédé ci-dessus, on peut sélectionner, à l'étape b), les plantes (i) possédant une mutation ou plus d'une mutation dans le gène codant la protéine CmWIP1 et (ii) possédant une mutation ou plus d'une mutation dans le gène codant la protéine ACS.

Dans ces modes de réalisation particuliers on sélectionne alors à l'étape c), parmi les plantes mutées sur les deux gènes cibles, c'est-à-dire les plantes mutées dans le gène codant la protéine CmWIP1 et dans le gène codant la protéine ACS, les plantes qui expriment à la fois le phénotype associé à l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g) et le phénotype associé à l'allèle (a) de l'élément génétique (A/a).

La présente invention a également pour objet des plantes dicotylédones à type floral modifié dans le génome desquelles a été introduite au moins une mutation dans le gène codant la protéine CmWIP1.

La présente invention est aussi relative à des plantes dicotylédones à type floral modifié qui ont été artificiellement mutées dans la séquence du gène codant la protéine CmWIP1, lesdites plantes exprimant le phénotype associé à l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g).

La présente invention a également pour objet des plantes dicotylédones à type floral modifié dans le génome desquelles a été introduite (i) au moins une mutation dans le gène codant la protéine CmWIP1 et (ii) au moins une mutation dans le gène codant la protéine ACS.

La présente invention est aussi relative à des plantes dicotylédones à type floral modifié qui ont été artificiellement mutées (i) dans la séquence du gène codant la protéine CmWIP1 et (ii) dans la séquence du gène codant la protéine ACS, lesdites plantes exprimant à la fois (i) le phénotype associé à l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g) et le phénotype associé à l'allèle (a) de l'élément génétique (G/g).

Autres procédés d'obtention de plantes transformées

L'invention concerne tout d'abord un procédé pour l'obtention d'une plante transformée visant à insérer l'allèle (G) dans une plante ne comprenant pas cet allèle.

L'invention a ainsi pour objet un procédé pour l'obtention d'une plante transformée, appartenant à la famille *cucurbitaceae*, portant des fleurs femelles, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) transformation d'au moins une cellule végétale d'une plante d'intérêt ne portant pas l'allèle (G), dans son génome, par une séquence nucléotidique (NG); ou un vecteur recombinant comprenant un tel acide nucléique ;

b) sélection des cellules transformées obtenues à l'étape a) ayant intégré dans leur génome, l'acide nucléique (NG) ;

c) Régénération d'une plante transformée à partir des cellules transformées obtenues à l'étape b).

Ce type de procédé est particulièrement utile en ce qu'il permet de d'insérer l'allèle (G) dans le génome d'une plante, qui présentera ainsi un phénotype monoïque ou andromonoïque.

L'invention a également pour objet un procédé de transformation de plantes visant à supprimer l'allèle (G) dans une plante, ou à remplacer l'allèle (G) par un allèle (g) de sorte à obtenir une plante de phénotype hermaphrodite ou une plante de type femelle.

L'invention a donc pour objet un procédé pour l'obtention d'une plante transformée, appartenant à la famille *cucurbitaceae*, portant des fleurs hermaphrodites ou des fleurs femelles, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) le remplacement dans une plante, de l'allèle (G), par un allèle (g),

b) sélection des cellules transformées obtenues à l'étape a) ayant intégré dans leur génome l'allèle (g).

c) Régénération d'une plante transformée à partir des cellules transformées obtenues à l'étape b),

d) croisement de plantes obtenues à l'étape c) pour l'obtention d'une ne portant plus d'allèle (G).

Dans un premier mode de réalisation, du procédé ci-dessus, l'étape a) consiste à transformer une plante comportant l'allèle (G) dans son génome, par un acide nucléique de type « antisens » tel que défini ci-dessus, et en sélectionnant les plantes ne comportant plus l'allèle (G).

Un résultat identique peut être obtenu en mettant en œuvre des phénomènes de recombinaison homologue visant à remplacer tout ou partie de l'acide nucléique (NG) par un acide nucléique de structure altérée, qui ne permet pas d'obtenir un phénotype correspondant à l'allèle (G).

Un tel acide nucléique de structure altérée, peut consister en un polynucléotide régulateur (Pg), ou un acide nucléique codant pour une protéine CmWIP1 altérée dans sa séquence.

L'invention a ainsi pour objet un procédé pour l'obtention d'une plante transformée, appartenant à la famille *cucurbitaceae*, portant des fleurs hermaphrodites, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) transformation d'au moins une cellule végétale d'une plante d'intérêt comportant un allèle (G) par un polynucléotide régulateur (Pg) ou par un acide nucléique codant pour une protéine CmWIP1 altérée; ou un vecteur recombinant comprenant un tel acide nucléique ;

b) sélection des cellules transformées obtenues à l'étape a) ayant intégré dans leur génome au moins une copie d'un polynucléotide régulateur (Pg) ou un acide nucléique codant pour une protéine CmWIP1 altérée.

c) Régénération d'une plante transformée à partir des cellules transformées obtenues à l'étape b),

d) croisement de plantes obtenues à l'étape c) pour l'obtention d'une ne portant plus d'allèle (G).

Ce type de procédé est particulièrement utile en ce qu'il permet d'obtenir des plantes ne comprenant plus d'allèle (G), et qui sont de type hermaphrodite ou gynodioïque.

Le procédé ci-dessus peut être mis en œuvre avec le procédé de transformation de plantes visant à insérer l'allèle (A) qui est décrit dans la demande PCT n° WO 2007/125364.

Ce procédé antérieur pour l'obtention d'une plante transformée, appartenant à la famille *cucurbitaceae*, portant des fleurs femelles, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) transformation d'au moins une cellule végétale d'une plante d'intérêt ne comprenant pas l'allèle (A), dans son génome, par une séquence nucléotidique (NA); ou un vecteur recombinant comprenant un tel acide nucléique ;

b) sélection des cellules transformées obtenues à l'étape a) ayant intégré dans leur l'acide nucléique (NA) ;

c) Régénération d'une plante transformée à partir des cellules transformées obtenues à l'étape b).

L'invention concerne également un procédé de transformation de plantes visant à remplacer l'allèle (A) par l'allèle (A).

Le procédé ci-dessus peut être mis en oeuvre avec le procédé de transformation de plantes visant à insérer l'allèle (A) qui est décrit dans la demande PCT n° WO 2007/125364.

Ce procédé antérieur pour l'obtention d'une plante transformée, appartenant à la famille *cucurbitaceae*, portant des fleurs hermaphrodites, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

a) le remplacement dans une plante, de l'allèle (A), par un allèle (a),

b) sélection des cellules transformées obtenues à l'étape a) ayant intégré dans leur génome l'allèle (a).

c) Régénération d'une plante transformée à partir des cellules transformées obtenues à l'étape b),

d) croisement de plantes obtenues à l'étape c) pour l'obtention d'une ne portant plus d'allèle (A).

Les procédés ci-dessus peuvent donc être combinés entre eux en se fondant sur le tableau 1, de sorte à obtenir des plantes exclusivement femelles ou exclusivement hermaphrodites, dont l'intérêt industriel a été discuté ci-dessus.

Pour simplifier les procédés pour l'obtention d'une plante transformée exclusivement femelle ou exclusivement hermaphrodite, il est possible de réaliser une étape préalable dans les procédés définis ci-dessus, au cours de laquelle des mutations des gènes (A/a) et (G/g) présents naturellement dans la plante sont effectuées, par exemple par insertion au hasard du transposon *Mutator* dans une population de plantes de phénotype sauvage, puis en détectant chez les mutants obtenus, ceux d'entre ces mutants qui sont de génotype (aagg), par exemple à l'aide des sondes ou des amorces nucléotidiques décrites dans les exemples.

Selon ce mode de réalisation préférentiel, la plante transformée selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle possède un génotype (aagg) et présente des fleurs exclusivement hermaphrodites.

Dans un mode de réalisation des procédés d'obtention d'une plante transformée définis ci-dessus, le polynucléotide (NG) lorsqu'il est utilisé comprend un polynucléotide régulateur (PG) activateur inductible.

L'invention a donc également pour objet un procédé pour l'obtention de graines de plantes dont le développement produit des plantes portant des fleurs femelles, comportant les étapes suivantes :

a) cultiver une plante d'intérêt ne portant pas dans son génome l'allèle (G) tel que défini dans la présente description, transformée par une séquence nucléotidique (NG) comprend un polynucléotide régulateur (PG) activateur inductible ; ou par un vecteur recombinant comprenant cet acide nucléique ; en l'absence d'un signal inducteur auquel le polynucléotide activateur inductible est sensible.

b) mettre en contact la plante transformée définie en a) avec le signal activateur inductible auquel le polynucléotide activateur inductible est sensible,

c) récupérer les graines matures, dont le développement produit exclusivement des plantes portant des fleurs femelles.

Dans un autre mode de réalisation, un polynucléotide régulateur (Pg) répresseur inductible est utilisé pour remplacer le polynucléotide régulateur naturellement présent dans la plante, et permettre de faire baisser le taux de protéine CmWIP1 à un moment déterminé.

-Procédés préférés d'obtention d'une plante portant exclusivement des fleurs femelles

De manière tout à fait préférée, l'invention concerne un procédé d'obtention d'une plante portant exclusivement des fleurs femelles, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- détecter les allèles (A), (a), (G) et (g) en mettant en œuvre les procédés de détection ci-dessus, et
- obtenir une plante comprenant au moins une copie de l'allèle (A) et aucune copie de l'allèle (G), en mettant en œuvre les procédés de sélection ou les procédés d'obtention d'une plante transformée tels que définis ci-dessus.

Les plantes obtenues selon le procédé ci-dessus portent exclusivement des fleurs femelles, et sont donc particulièrement intéressantes d'un point de vue industriel, puisqu'elles ne sont pas capables d'auto pollinisation. Ces plantes peuvent donc être utilisées dans des procédés de sélection en vue d'obtenir des plantes hybrides.

-Procédés préférés d'obtention d'une plante portant exclusivement des fleurs hermaphrodites

De manière tout à fait préférée, l'invention concerne un procédé d'obtention d'une plante portant exclusivement des fleurs hermaphrodites, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- détecter les allèles (A), (a), (G) et (g) en mettant en œuvre les procédés de détection définis ci-dessus, et
- obtenir une plante ne comprenant aucune copie de l'allèle (A) et aucune copie de l'allèle (G), en mettant en œuvre les procédés de sélection ou les procédés d'obtention d'une plante transformée tels que définis ci-dessus.

Les plantes obtenues selon le procédé ci-dessus portent exclusivement des fleurs hermaphrodites, et sont donc particulièrement intéressantes d'un point de vue industriel, puisqu'elles ne sont capables d'auto pollinisation. Ces plantes peuvent donc être utilisées dans des procédés de création de lignées pures.

Procédés de transformation des plantes selon l'invention

Les méthodes les plus répandues pour introduire des acides nucléiques dans des cellules végétales peuvent être utilisées dans le cadre de cette invention.

La transformation de cellules végétales peut être réalisée par diverses méthodes telles que, par exemple, le transfert des vecteurs susmentionnés dans les protoplastes végétaux après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylène glycol en présence de cations divalents (Ca²⁺), l'électroporation (Fromm et al. 1985), l'utilisation d'un canon à particules, ou la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire (Neuhaus et al, 1987).

Une des méthodes de transformation de cellules végétales pouvant être utilisée dans le cadre de l'invention est l'infection des cellules végétales par un hôte cellulaire bactérien comprenant le vecteur contenant la séquence d'intérêt. L'hôte cellulaire peut être *Agrobacterium tumefaciens* (An et al. 1986), ou *A. rhizogenes* (Guerche et al. 1987).

De manière préférentielle, la transformation des cellules végétales est réalisée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extrachromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*A. tumefaciens*, en utilisant un système binaire (Watson et al., 1994). Pour ce faire, deux vecteurs sont construits. Dans un de ces vecteurs, la région d'ADN-T a été éliminée par délétion, à l'exception des bords droit et gauche, un gène marqueur étant inséré entre eux pour permettre la sélection dans les cellules de plantes. L'autre partenaire du système binaire est un plasmide Ti auxiliaire, plasmide modifié qui n'a plus d'ADN-T mais contient toujours les gènes de virulence *vir* nécessaires à la transformation de la cellule végétale. Ce plasmide est maintenu dans *Agrobacterium*.

Selon un mode préféré, la méthode décrite par Ishida et al. (1996) peut être appliquée pour la transformation des dicotylédones. Selon un autre protocole, la transformation est réalisée selon la méthode décrite par Finer et al. (1992) utilisant le canon à particules de tungstène ou d'or.

La présente invention est également illustrée, sans pour autant y être limitée, par les exemples suivants.

Exemples

Exemple 1 : Identification de l'élément génétique de contrôle (G/g)

Le clonage du locus g basé sur la cartographie a été réalisé par criblage des éléments de recombinaison dans une population de 12 660 plantes ségrégeant pour l'allèle g. Une plante de génération F1 issue du croisement de PI124112 (génotype monoïque A-G-) x Gynadou

(génotype gynoïques A-gg) a été rétrocroisée avec Gynadou afin de générer une population de génération F2, aux fins d'analyses.

Le locus *g* a été localisé dans un intervalle entre les marqueurs M261 et M365 sur le chromosome 4 (voir figure 1A).

Les marqueurs M261 et M365 sont ancrés dans quatre clones BAC différents provenant d'une librairie génomique de génotype monoïque, afin de générer une carte physique du locus.

Une analyse des SNP dans cet intervalle a révélé deux recombinaisons très critiques, ce qui a permis de réduire de manière ultime le locus *g* à une région de 1,4kb dans le clone BAC monoïque 102 (voir figure 1C). L'annotation de ce clone a permis d'identifier 8 cadres ouverts de lecture (ORFs) dans cette région (voir figure 1B). Aucun polymorphisme significatif n'a été retrouvé dans les 8 cadres ouverts de lecture entourant cet intervalle, lorsque la région correspondante a été séquencée dans le génotype gynoïque portant l'allèle récessif.

Cependant, une insertion de 8kb a été trouvée à l'intérieur de la région de 1,4kb délimitée par le clonage positionnel (figure 1B). Cette insertion correspond au transposon ADN de la famille *hAT*, nommé Gyno-hAT (Séquence N° 14) un groupe très répandu d'éléments transposables (TEs).

Du fait que ce transposon ADN a été retrouvé par clonage positionnel dans l'intervalle le plus court, et du fait que ce transposon correspond au seul polymorphisme significatif entre les génotypes monoïques et gynoïques à ce locus, cet élément transposable (TE) a une très forte probabilité d'être responsable du phénotype de détermination du sexe.

Exemple 2 : Caractérisation de l'élément génétique de contrôle (G/g)

Du fait que les éléments transposables (TEs) sont sujets à une inhibition (« silencing ») épigénétique induisant une suppression de la transposition et du réarrangement génomique illégitime, on a examiné le statut de méthylation de l'ADN du transposon au locus *g*, par amplification PCR sensible à l'endonucléase McrBC.

On a observé que le transposon est hautement méthylé (voir figure 2).

On a analysé l'extension potentielle de la méthylation de l'ADN aux gènes environnant le locus *g* en réalisant une amplification PCR sensible à l'endonucléase McrBC sur les trois cadres ouverts de lecture (ORFs) les plus proches du transposon.

Cette analyse a révélé que seul le cadre ouvert de lecture référencé ORF3, qui est localisé à une distance inférieure à 1kb du locus *g*, était spécifiquement méthylé dans le génotype gynoïque portant le transposon (figure 3A). Le cadre ouvert de lecture ORF3 code un facteur de transcription à doigts de zinc C2H2 et est homologue aux membres de la sous famille WIP spécifique des plantes (Sagasser et al., 2002).

En vue d'obtenir une information plus précise sur les profils de méthylation de l'ADN de la séquence génomique *CmWIP1*, on a criblé la totalité du gène *CmWIP1* par PCR quantitative sensible à l'endonucléase McrBC dans les plantes PI124112 (G-) et Gynadou (gg) (voir figure

3B). On a montré que l'ADN génomique de Gynadou était hautement méthylé dans la région promotrice à proximité du site d'initiation de la transcription, en comparaison au génotype monoïque (figure 3B).

La méthylation de l'ADN était aussi plus forte dans le premier exon, l'intron et à proximité de la séquence 3'UTR du génotype gynoïque, mais de manière moindre.

Afin de poursuivre l'étude des profils de méthylation de l'ADN de *CmWIP1*, on a réalisé un séquençage au bisulfite sur la région hautement méthylée du promoteur *CmWIP1*. Le séquençage au bisulfite a confirmé le phénotype d'hyperméthylation des plantes gynoïques.

Bien entendu, la méthylation était toujours plus grande dans le promoteur des plantes portant le transposon au locus *g*, et on a aussi observé la méthylation dans les résidus cytosine qui étaient complètement non méthylés dans le génotype monoïque (voir figure 3C).

Cependant, de manière intéressante, on a noté une méthylation significative de l'ADN dans le promoteur de PI124112.

Le fait qu'une méthylation significative de l'ADN ait été détectée dans le promoteur *CmWIP1* pourrait expliquer l'extension importante de l'inhibition d'expression (« silencing ») lorsqu'un élément transposable (TE) était inséré à proximité. L'hyperméthylation de *CmWIP1* a été confirmée dans différents fonds génétiques récessifs pour l'allèle *g*, ce qui renforce la corrélation entre la présence de l'ADN de transposon et l'état de méthylation plus élevé de ce gène (figure 4).

Ces résultats suggèrent fortement que l'hyperméthylation de *CmWIP1*, qui est due à une extension de l'inhibition due au transposon (« silencing »), pourraient être la cause de la détermination du sexe chez les plantes portant l'allèle *g*.

On a associé la méthylation excessive des résidus cytosine dans la région promotrice à une expression génique réduite, ce qui pourrait conduire à une diminution des niveaux de production de transcrits de *CmWIP1*.

Exemple 3 : Profils de régulation d'expression de l'élément de contrôle (G/g)

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'hyperméthylation de la région promotrice du gène *CmWIP1* pourrait induire une diminution de l'expression de ce gène, on a analysé les profils de régulation de l'ARNm de *CmWIP1*. Les niveaux d'expression de *CmWIP1* ont été déterminés par PCR quantitative durant la détermination du sexe et le développement floral.

Les niveaux relatifs de transcrits ont été comparés chez les fleurs mâles de PI124112 (G-) et chez les fleurs femelles de Gynadou (gg).

De manière générale la détermination du sexe et du développement floral chez les cucurbitacées ont été divisés en 12 stades, allant de l'initiation du méristème floral à l'anthesis (Bai et al., 2004). Les processus du détermination du sexe, c'est-à-dire l'arrêt de l'organe sexuel inapproprié dans le bouton floral bisexuel initial, a lieu aux environs des stades 7 et 8.

Dans le cas présent, on a montré que le gène *CmWIP1* était exprimé fortement dans les bourgeons floraux mâles au stade 6, et que son expression décroît rapidement aux stades ultérieurs (figure 5). Au contraire, dans les bourgeons floraux femelles, l'ARNm de *CmWIP1* a été détecté à un niveau très bas, quelque soit le stade de développement floral. De manière remarquable, l'expression haute et transitoire de *CmWIP1* dans les bourgeons floraux mâles au stade précoce du développement reproductif coïncide avec l'arrêt du développement des carpelles qui a été décrit dans des travaux récents chez les cucurbitacées (Hao et al., 2003 ; Bai et al., 2004).

Afin de déterminer le profil de l'expression spatio-temporelle de l'ARNm de *CmWIP1*, on a réalisé des hybridations *in situ* des fleurs mâles de PI124112 (G-) et des fleurs femelles de Gynadou (gg). L'ARNm de *CmWIP1* a été détecté de manière précoce pendant le développement floral autour du stade 6 chez les bourgeons floraux mâles, ce qui est en accord avec les résultats d'analyse par PCR quantitative.

On a trouvé que la localisation d'ARNm de *CmWIP1* était fortement confinée dans la quatrième spirale des bourgeons floraux mâles. Cette localisation correspond au carpelle primaire qui s'arrêtera de se développer au stade immédiatement ultérieur, chez les fleurs mâles.

L'ARNm de *CmWIP1* n'était pas détectable dans les bourgeons floraux femelles, à aucun des stades de développement. Ces résultats confirment la très faible expression qui était déjà révélée par l'analyse par PCT quantitative chez les fleurs femelles de Gynadou (voir figure 7).

Les niveaux d'expression de *CmWIP1* étaient également très faibles durant les stades de développement liés à la détermination du sexe (jusqu'au stade 6) dans les bourgeons floraux hermaphrodites (aagg) et dans les bourgeons floraux femelles de génotype monoïque (figure 6). En d'autres termes, l'expression de *CmWIP1* au stade précoce du développement floral était toujours faible dans les fleurs qui se développeront en structure femelle mature, dans tous les génotypes. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que *CmWIP1* a un rôle dans la détermination du sexe chez le melon, en particulier dans l'arrêt du développement des carpelles chez les bourgeons floraux mâles.

Exemple 4 : Détermination du type floral sous le contrôle de l'élément (G/g)

Afin d'approfondir l'étude du rôle de *CmWIP1* dans la détermination du sexe et du développement floral chez le melon, on a développé une approche de génétique inverse afin d'identifier la fonction de cette protéine.

On a utilisé une stratégie utilisant la technique de TILLING (pour « Targeted Induced Local-scale Lesions in Genome ») afin de cribler une population de génotype monoïque (A-G-) mutagénéisé avec l'éthylméthanesulfonate (EMS).

Le criblage de la population a ciblé les deux exons de *CmWIP1*. Selon l'alignement avec les homologues proches, la protéine *CmWIP1* est composée de deux différents domaines, respectivement un domaine N-terminal spécifique et un domaine C-terminal conservé au sein des protéines WIP à doigts de zinc.

Trois mutants dans la séquence codante de *CmWIP1* ayant une substitution unique de base ont été identifiés. Les substitutions nucléotidiques résultent en les modifications d'acides aminés suivants : L77F, P193L, et S306F. Les substitutions d'acides aminés étaient localisées soit dans la partie spécifique N-terminal de *CmWIP1*, ou dans le domaine C-terminal hautement conservé de la protéine.

On a observé les phénotypes floraux dans les plantes mutantes homozygotes M2, en comparaison avec les plantes homozygotes de type sauvage de la même famille EMS.

Les trois allèles mutants ont montré un redéveloppement des carpelles, en comparaison des fleurs mâles de type sauvage (figure 7).

Les mutants P193L, et S306F sont devenus complètement gynoiques, ce qui confirme que *CmWIP1* est le gène de la gynocécie. Le mutant L77F est un mutant faible.

Les résultats des exemples montrent que l'épi-allèle de *CmWIP1* qui a été trouvé dans les plantes gynoiques est clairement transmissible, et co-ségrège avec le phénotype, puisque ont été observées des relations génotypes-phénotypes dans différents fonds génétiques (voir figure 4) et dans plus de douze mille gamètes par des expériences de clonage positionnel.

De manière intéressante, et en accord avec la régulation épigénétique, on a observé occasionnellement des phénotypes révertants durant le développement somatique, qui étaient corrélés avec la déméthylation de la séquence d'ADN de *CmWIP1*.

Les résultats des exemples, qui démontrent l'implication de la régulation du gène *CmWIP1* dans la détermination du sexe floral, sont d'autant plus intéressants que des gènes codant des protéines à doigts de zinc de type WIP sont retrouvés dans une large variété de plantes, y compris les monocotylédones, les gymnospermes et les mousses. De plus, on rappelle que la conservation des domaines C-terminaux des protéines à doigts de zinc de type WIP est très grande.

En conséquence, la réalisation d'un contrôle de régulation de *CmWIP1*, ou de gènes de la même famille dans les génomes de plantes dicotylédones, monocotylédones, gymnospermes et mousses, au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel durant le développement floral précoce, est de nature à orienter de manière contrôlée le développement du type floral chez les plantes.

Exemple 5 : Expression spatiale et temporelle de l'élément génétique de contrôle (A/a)

Pour étudier l'expression de l'élément génétique de contrôle *A/a* sous la forme de l'allèle *A*, des hybridations *in situ* ont été effectuées en utilisant des sondes spécifiques de l'allèle *A* sur des plantes, et plus précisément sur des méristèmes floraux de plantes mâles,

femelles et hermaphrodites, de génotype *AA GG*, *aa GG*, *AA gg* et *aa gg*. Dans les méristèmes floraux *A* l'expression est localement forte et le signal d'hybridation est détecté de manière spécifique dans les primordia des carpelles des fleurs femelles et hermaphrodites des plantes monoïques, andromonoïques, gynoiques et hermaphrodites. En se référant aux différents stades de développement de la fleur décrit pour le concombre (Bai et al., 2004), il apparaît que chez le melon le gène (*A/a*) est exprimé à un stade précoce du développement des méristèmes floraux avant qu'une distinction morphologique puisse être effectuée entre les fleurs mâles et les fleurs femelles.

Dans les fleurs mâles et hermaphrodites, aucune expression n'est détectée dans les anthères. Ces données indiquent que l'expression de l'allèle (*A*) dans les carpelles des fleurs femelles empêche le développement des étamines. Du fait que, dans les fleurs hermaphrodites, l'allèle récessif (*a*) présente le même profil d'expression que l'allèle *A* dans les fleurs femelles, on peut conclure que la fonction du gène *A* dépend de sa tissu-spécificité d'expression ainsi que de la nature de la protéine ACS synthétisée.

Exemple 6 : Transgénèse chez *Arabidopsis thaliana*

Les effets potentiels du gène *A/a*, et de la protéine ACS sur le phénotype sexuel floral et l'architecture de la fleur de plantes n'appartenant pas aux cucurbitacées ont été étudiés par transformation d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium*. Les plantes transgéniques d'*Arabidopsis* portant l'allèle de melon *A* ou *a* présentent un phénotype au niveau de l'architecture florale et des siliques. (figures 9A et 9B). En effet les siliques des transformants d'*Arabidopsis* sont plus courtes que celles d'une plante *Arabidopsis* sauvage et l'architecture des fleurs des transformants d'*Arabidopsis* est très affectée. Ces résultats permettent d'étendre l'utilisation du gène de melon (*A/a*) à des plantes dicotylédones n'appartenant pas à la famille des cucurbitacées.

En résumé, grâce au clonage du gène *A* (nommé CmACS-7) et du gène *G* (nommé CmWIP1) on a démontré que l'expression de la protéine CmWIP1 dans le carpelle inhibe le développement du carpelle et l'expression de CmACS-7 ou toute autre enzyme capable de produire de l'éthylène dans le carpelle inhibe le développement des étamines. Un homme de l'art peut donc exprimer la protéine CmWIP1 dans le carpelle d'une plante, préférablement une cucurbitacée, pour bloquer le développement du carpelle ou au contraire inhiber l'expression de la protéine CmWIP1 dans le carpelle pour favoriser le développement du carpelle.

Un homme de l'art peut aussi exprimer la protéine CmACS-7 dans le carpelle d'une plante, préférablement une cucurbitacée pour bloquer le développement des étamines ou au contraire inhiber l'expression de la protéine CmACS-7 dans le carpelle pour favoriser le développement des étamines. Ainsi la combinaison de l'expression des protéines active ou

mutantes de CmACS-7 et CmWIP1 va permettre de générer les différents types floraux décrits dans le TABLEAU 1.

Les auteurs ont aussi identifié les orthologues de CmACS-7 et CmWIP1 chez d'autres espèces. Chez le concombre (*Cucumis sativa*) le locus M code pour l'orthologue de CmACS-7.

Tableau des Séquences

SEQ ID	Type	Désignation
1	Acide Nucléique	Séquence génomique codant ACS
2	Acide Nucléique	Séquence génomique « a » avec polynucléotide régulateur
3	Peptide	Protéine ACS
4	Acide Nucléique	Amorce-marqueur M8
5	Acide Nucléique	Amorce-marqueur M30
6	Acide Nucléique	Sonde pour amplicon M8/M30
7	Acide Nucléique	Sonde pour SED ID N° 1
8	Acide Nucléique	Sonde pour SEQ ID N° 2
9	Acide Nucléique	Vecteur PEC2 avec gène A
10	Acide Nucléique	Séquence génomique codant CmWIP1
11	Acide Nucléique	ADNc codant CmWIP1
12	peptide	Protéine CmWIP1
13	Acide Nucléique	Promoteur de CmWIP1
14	Acide Nucléique	Transposon Gyno-hAT
15	Acide Nucléique	Gène CmWIP1 et le transposon Gyno-hAT inséré acoté
16	Peptide	Protéine homologue à CmWIP1 fonctionnelle

Références

- An et al., (1986) *Plant Physiol.* 81, 86-91
- Aoyama T et al., (1997) *The Plant Journal*, vol.11 (3):605-612.
- Ausubel et al., (1997) *Current protocols in molecular biology*
- Beaucage et al. (1981), *Tetrahedron Lett.*, 22:1859-1862.
- Berbal, 1984 .
- Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, vol.12:8711-8721.
- Brown et al. (1979), *Methods Enzymol.*, 68:109-151.
- Causse et al. (1995) *Molecular Breeding* 1: 259-272.
- Christensen et al. (1996), *Transgenic. Res.*, 5:213
- Finer et al. (1992) *Plant Cell Report*, 11, 323-328
- FROMM M. et al. (1990), *Biotechnology*, 8:833-839
- GAIT (ed.), (1984). *Nucleic Acid Hybridization*.
- GORLACH J, VOLRATH S, KNAUF-BEITER G, HENGY G, BECKHOVE U, KOGEL KH, OOSTENDORP M, STAUB T, WARD E, KESSMANN H, RYALS J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-43
- GLOVER (ed.), 1985. *DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II Oligonucleotide Synthesis*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K.
- Guerche et al. (1987), *Mol Gen. Genet* 206, 382
- HAMES and HIGGINS, 1985. *Nucleic Acid Hybridization: a practical approach*, Hames & Higgins Ed. IRL Press, Oxford.
- HAJDUKIEWICZ, P. SVAB. Z. AND MALIGA P. *Plant Mol. Biol.* 25 (6), 989-994 (1994).
- Ishida et al. (1996) *Nature biotechnology* 14, 745-750
- JEFFERSON, 1987, *Plant Molecular Biology Reporter*, vol.5:387-405.
- Kay et al., (1987) *Science* 236, 4805
- Kahana, A., Silberstein, L., Kessler, N., Goldstein, R. S. and Perl-Treves, R. (2000) expression of ACC oxidase genes differs among sex genotypes and sex phases in cucumber. *Plant Mol Biol. Nov* ; 41 (4): 517-528.
- Kamachi, S., Sekimoto, H., Kondo, N. & Sakai, S., (1997). Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L. *The Plant Cell Physiol.*, 38:1197-206.
- Kohler G and Milstein C; (1975), *Nature*, volume 256:495
- KOOTER, JM., MATZKE, MA., AND MEYER, P. (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* 4, 430-437
- Kozbor et al., (1983), *Hybridoma*, vol.2 (1):7-16.
- Leger OJ et al., (1997), *Hum Antibodies*, vol.8 (1):3-16

- Martineau P et al., (1998), *J. Mol. Biol.* vol.280(1):117-127.
- Martinez, A., Sparks, C., Hart, CA., Tompson, J., and Jepson, I. (1999) Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 19:97-106
- McNELLIS T W, 1998, *The Plant Journal*, vol.14 (2): 247-257
- Molina A, Hunt MD, Ryals JA (1998) Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. *Plant Cell* 10:1903-14 NARANG et al. (1979), *Methods Enzymol.*, 68: 90-98.
- Neuhaus et al., (1987). *Theor. Appl. Genet.* 75(1), 30-36
- Reinmann KA et al. (1997), *Aids Res. Hum retroviruses*, vol.13 (11):933-943.
- Ridder R. et al., (1995), *Biotechnology (NY)*, vol.13 (3):255-260.
- SALTER MG et al., 1998, vol.16 (1): 127-132
- Risser, G. and Rode, J.C., 1979. Induction par le nitrate d'argent de fleurs staminées chez des plantes gynoïques de melon (*Cucumis melo L.*). *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 29:349-352.
- Rudich, J., Halevy, A.H. and Kedar, N., 1969. Increase of femaleness of three cucurbits by treatment with Ethrel, an ethylene-releasing compound. *Planta*, 86:69-76.
- Sambrook et al., (2001), *Molecular Cloning A-laboratory manual*
- Sanchez Pescador, (1988), *J. Clin. Microbiol.*, 26 (10):1934-1938.
- Urdea et al. (1988), *Nucleic Acids Research*, 11:4937-4957.
- WASSENEGGER, M., AND PÉLISSIER, T. (1998) A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants *Plant Mol. Biol.* 37, 349-362
- Watson et al. (1994) *ADN recombinant*, Ed. De Boek Université, 273-292
- YANG F. MOSS LG, PHILIPS GN JR. *Nat. Biotechnol.* 1996 Oct. 14(10):1246-51.
- YANG TT, CHENG L. KAIN SR, *Nucleic acids Res.* 1996, Novembre 15; 24(22):4592-3.

Revendications

1. Combinaison de deux éléments génétiques pour le contrôle du développement du type floral d'une plante dicotylédone, ladite combinaison comprenant respectivement :

a) un premier élément génétique de contrôle (A/a) présent dans ladite plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (A), et d'un allèle récessif (a), dans lequel :

- l'allèle dominant (A), consiste en un acide nucléique (NA) permettant l'expression de la protéine ACS (aminocyclopropane carboxylate synthase) de séquence SEQ ID N°3,
- l'allèle récessif (a), se distingue de l'allèle dominant par un acide nucléique (NA) non fonctionnel dans ladite plante dicotylédone, et

b) un second élément génétique de contrôle (G/g) présent dans ladite plante dicotylédone, sous la forme d'un allèle dominant (G), et d'un allèle récessif (g), dans lequel :

- l'allèle dominant (G), consiste en un acide nucléique (NG) permettant l'expression de la protéine CmWIPI ("*C. melo Zinc Finger Protein*") de séquence SEQ ID N°12,
- l'allèle récessif (g), se distingue de l'allèle dominant par un acide nucléique (NG) non fonctionnel dans ladite plante dicotylédone, étant entendu qu'au moins le second élément génétique de contrôle a été artificiellement introduit dans ladite plante dicotylédone.

2. Combinaison selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour le premier élément génétique de contrôle (A/a), les caractéristiques respectives de l'allèle dominant (A) et de l'allèle récessif (a) sont les suivantes :

- l'allèle dominant (A), consiste en un acide nucléique (NA) comprenant :
 - (i) un polynucléotide régulateur (PA) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et
 - (ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PA), ledit acide nucléique codant pour la protéine ACS (aminocyclopropane carboxylate synthase) de séquence SEQ ID N°3,
- l'allèle récessif (a), se distingue de l'allèle dominant (A) par :
 - (i) un acide nucléique (NA) non présent dans la plante, ou
 - (ii) un polynucléotide régulateur (Pa) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou
 - (iii) un acide nucléique (Na) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine ACS active.

3. Combinaison selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant pour la protéine ACS comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au moins :

- (i) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 5907 au nucléotide 6086 de la séquence SEQ ID N°1,

(ii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 6181 au nucléotide 6467 de la séquence SEQ ID N°1,

et

(iii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 7046 au nucléotide 7915 de la séquence SEQ ID N°1.

4. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (PA) comprend une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5906 de la séquence SEQ ID N°1.

5. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (Pa) comprend une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 3650 de la séquence SEQ ID N°2.

6. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (PA) et/ou polynucléotide régulateur (Pa) est(sont) sensibles à l'action d'un signal inducteur.

7. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (PA) est un polynucléotide activateur inductible de la transcription ou de la traduction.

8. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (Pa) est un polynucléotide répresseur inductible de la transcription ou de la traduction.

9. Combinaison selon la revendication 1, caractérisé en ce que le second élément génétique de contrôle (G/g), les caractéristiques respectives de l'allèle dominant (G) et de l'allèle récessif (g) sont les suivantes :

- l'allèle dominant (G), consiste en un acide nucléique (NG) comprenant:

(i) un polynucléotide régulateur (PG) fonctionnel dans une plante dicotylédone, et

(ii) un acide nucléique dont l'expression est régulée par le polynucléotide régulateur (PG), ledit acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1 ("*C. melo Zinc Finger Protein*") de séquence SEQ ID N°12,

- l'allèle récessif (g), se distingue de l'allèle dominant (G) par :

(i) un acide nucléique (NG) non présent dans la plante, ou

(ii) un polynucléotide régulateur (Pg) non fonctionnel dans une plante dicotylédone, ou

(iii) un acide nucléique (Ng) non fonctionnel pour l'expression d'une protéine CmWIP1 active.

10. Combinaison selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant pour la protéine CmWIP1 comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au moins :

- (i) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 3000 au nucléotide 3617 de la séquence SEQ ID N°10, et
- (ii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 5458 au nucléotide 5901 de la séquence SEQ ID N°10.

11. Combinaison selon l'une des revendications 9 à 10, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (PG) comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°11.

12. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (PG) et/ou le polynucléotide régulateur (Pg) est(sont) sensibles à l'action d'un signal inducteur.

13. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (PG) est un polynucléotide activateur inductible de la transcription ou de la traduction.

14. Combinaison selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisée en ce que le polynucléotide régulateur (Pg) est un polynucléotide répresseur inductible de la transcription ou de la traduction.

15. Acide nucléique comprenant, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au moins:

- (i) une séquence ayant au moins 98,5% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 3000 au nucléotide 3617 de la séquence SEQ ID N°10, et
- (ii) une séquence ayant au moins 99,5% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 5458 au nucléotide 5901 de la séquence SEQ ID N°10.

16. Acide nucléique sous forme d'allèle (G), tel que défini dans la revendication 9, de séquence SEQ ID N°10.

17. Acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique allant du nucléotide 3000 au nucléotide 5901 de la séquence SEQ ID N°10.

18. Acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique portant au moins une altération choisie parmi une mutation, une insertion ou une délétion, par rapport à l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 2999 de la séquence SEQ ID N°10, ledit acide nucléique altéré conduisant à une expression altérée de la protéine CmWIP1 de séquence SEQ ID N°12, lorsqu'il contrôle l'expression de ladite protéine, par rapport à l'expression de la protéine CmWIP1 contrôlée par l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 2999 de la séquence SEQ ID N°10.

19. Vecteur recombinant comprenant un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 9 à 14 ou un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 15 à 18.

20. Cellule hôte transformée par un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 9 à 14 ou par un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 15 à 18 ou par un vecteur recombinant selon la revendication 19.

21. Cellule hôte selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de plante appartenant à la famille *cucurbitaceae*, et de préférence à l'espèce *cucumis melo*.

22. Plante appartenant à la famille *cucurbitaceae* transformée par un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 9 à 14 ou un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 15 à 18 ou par un vecteur recombinant selon la revendication 19.

23. Plante transformée selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un allèle (G) tel que défini dans la revendication 1.

24. Plante transformée comprenant une pluralité de cellules hôtes selon la revendication 20 ou 21.

25. Cellule hôte transformée par deux acides nucléiques, respectivement :

(i) par un acide nucléique choisi parmi :

- un acide nucléique déterminant un allèle A ou a tel que défini dans l'une des revendications 1 à 8.

- un acide nucléique comprenant, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au moins:

(i) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 5907 au nucléotide 6086 de la séquence SEQ ID N°1,

(ii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 6181 au nucléotide 6467 de la séquence SEQ ID N°1, et

(iii) une séquence ayant au moins 95% d'identité avec le polynucléotide allant du nucléotide 7046 au nucléotide 7915 de la séquence SEQ ID N°1,

- un acide nucléique sous forme d'allèle (A), tel que défini dans la revendication 2, de séquence SEQ ID N°1,

- un acide nucléique sous forme d'allèle (a), tel que défini dans la revendication 2, de séquence SEQ ID N°2,

- un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5906 de la séquence SEQ ID N°1,

- un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique portant au moins une altération choisie parmi une mutation, une insertion ou une délétion, par rapport à l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5907 de la séquence SEQ ID N°1, ledit acide nucléique altéré conduisant à une expression altérée de la protéine ACS de séquence SEQ ID N°3, lorsqu'il contrôle l'expression de ladite protéine, par rapport à l'expression de la protéine ACS contrôlée par l'acide nucléique allant du nucléotide 1 au nucléotide 5907 de la séquence SEQ ID N°1, et

- un acide nucléique comprenant une séquence allant du nucléotide 1 au nucléotide 3650 de la séquence SEQ ID N°2, et

(ii) par un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 9 à 14 ou par un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 15 à 18 ou par un vecteur recombinant selon la revendication 19.

26. Cellule hôte selon la revendication 25, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de plante appartenant à la famille *cucurbitaceae*, et de préférence à l'espèce *cucumis melo*.

27. Plante transformée comprenant une pluralité de cellules hôtes selon la revendication 25 ou 26.

28. Acide nucléique, utilisable en tant que sonde ou amorce, hybridant spécifiquement avec un acide nucléique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 10 à 14 ou un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 15 à 18.

29 Procédé de détection de la présence d'un allèle (G) ou (g) tel que défini dans la revendication 1, ladite méthode comprenant les étapes de :

- 1) mettre en contact une sonde ou une pluralité de sondes nucléotidiques selon la revendication 28 avec l'échantillon à tester;

2) détecter le complexe éventuellement formé entre la ou les sondes et l'acide nucléique présent dans l'échantillon.

30. Procédé d'obtention de plantes artificiellement mutées dans le gène codant la protéine CmWIP1 comprenant les étapes suivantes :

- a) générer une collection de plantes dicotylédones mutantes par mutagenèse chimique ;
- b) sélectionner dans la collection de plantes mutantes générée à l'étape a), les plantes possédant une mutation ou plus d'une mutation dans le gène codant la protéine CmWIP1,
- c) sélectionner, parmi les plantes mutantes sélectionnées à l'étape b), les plantes qui expriment le phénotype (g).

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que les plantes sont en outre mutées dans le gène codant la protéine ACSS et en ce que :

- on sélectionne à l'étape b) les plantes (i) possédant une mutation ou plus d'une mutation dans le gène codant la protéine CmWIP1 et (ii) possédant une mutation ou plus d'une mutation dans le gène codant la protéine ACS,
- on sélectionne à l'étape c), parmi les plantes mutées dans le gène codant la protéine CmWIP1 et dans le gène codant la protéine ACS, les plantes qui expriment à la fois le phénotype associé à l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g) et le phénotype associé à l'allèle (a) de l'élément génétique (A/a).

32. Plante dicotylédone à type floral modifié qui a été artificiellement mutée dans la séquence du gène codant la protéine GmWIP1, ladite plante exprimant le phénotype associé à l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g).

33. Plante dicotylédone à type floral modifié qui a été artificiellement mutée

- (i) dans la séquence du gène codant la protéine CmWIP1 et (ii) dans la séquence du gène codant la protéine ACS, ladite plante exprimant à la fois
- (i) le phénotype associé à l'allèle (g) de l'élément génétique (G/g) et le phénotype associé à l'allèle (a) de l'élément génétique (A/a).

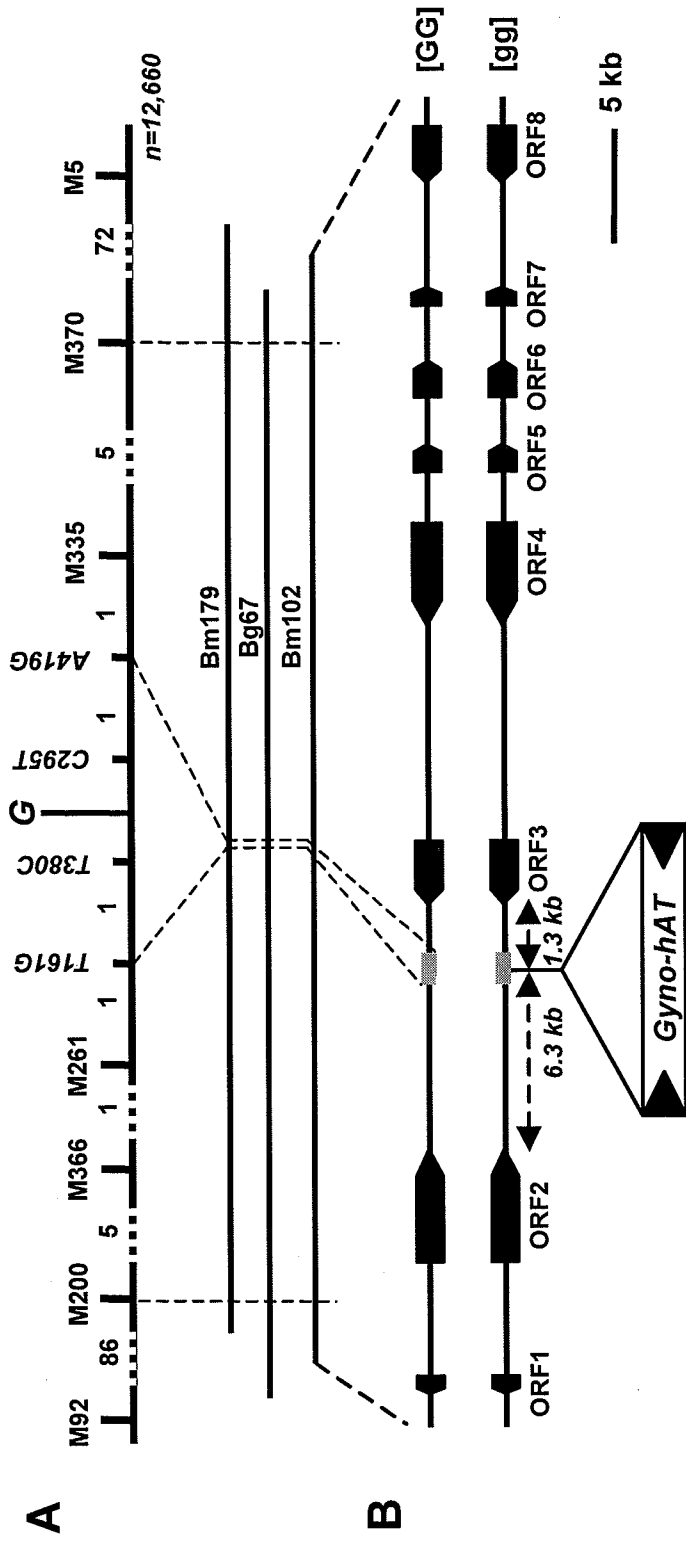
34. Procédé pour l'obtention d'une plante transformée, appartenant à la famille *cucurbitaceae*, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- a) transformation d'au moins une cellule végétale d'une plante d'intérêt ne comprenant pas l'allèle (G) tel que défini dans la revendication 1, dans son génome, par une séquence nucléotidique (NG) que définit dans la revendication 1, ou un vecteur recombinant comprenant un tel acide nucléique;

- b) sélection des cellules transformées obtenues à l'étape a) ayant intégré dans leur l'acide nucléique (NG) ;
- c) Régénération d'une plante transformée à partir des cellules transformées obtenues à l'étape b).

35. Procédé pour l'obtention d'une plante transformée, appartenant à la famille *cucurbitaceae*, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- a) le remplacement dans une plante, de l'allèle (G) tel que défini dans la revendication 1, par un allèle (g) tel que défini dans la revendication 1,
- b) sélection des cellules transformées issues d'une plante obtenue à l'étape a) et ayant intégré dans leur génome l'allèle (g).
- c) régénération d'une plante transformée à partir des cellules transformées obtenues à l'étape b),
- d) croisement de plantes obtenues à l'étape c) pour l'obtention d'une plante ne portant plus d'allèle (G) tel que défini dans la revendication 1.



Figures 1A et 1B

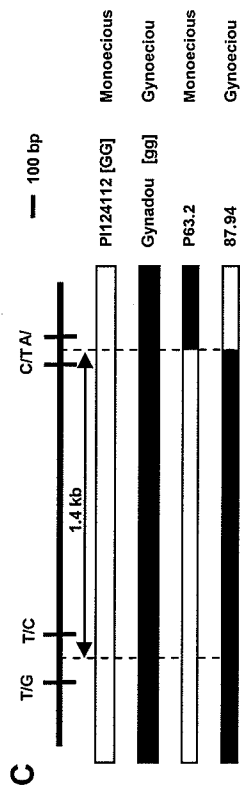


Figure 1C

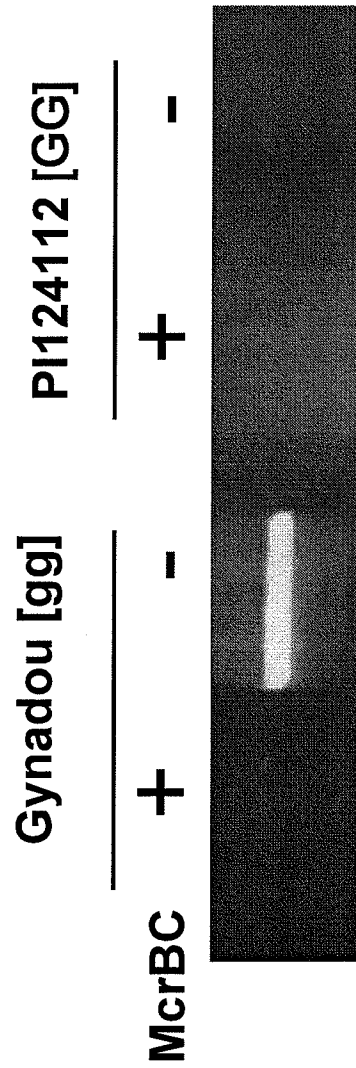


Figure 2

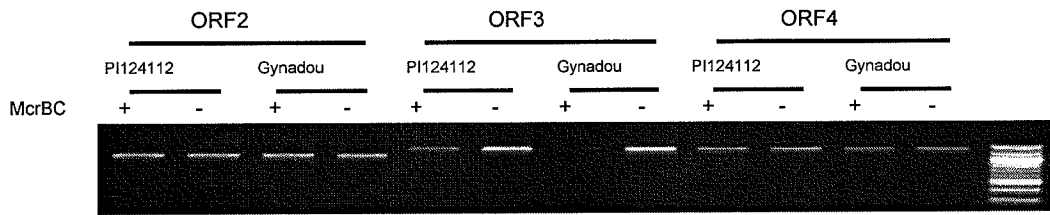


Figure 3A

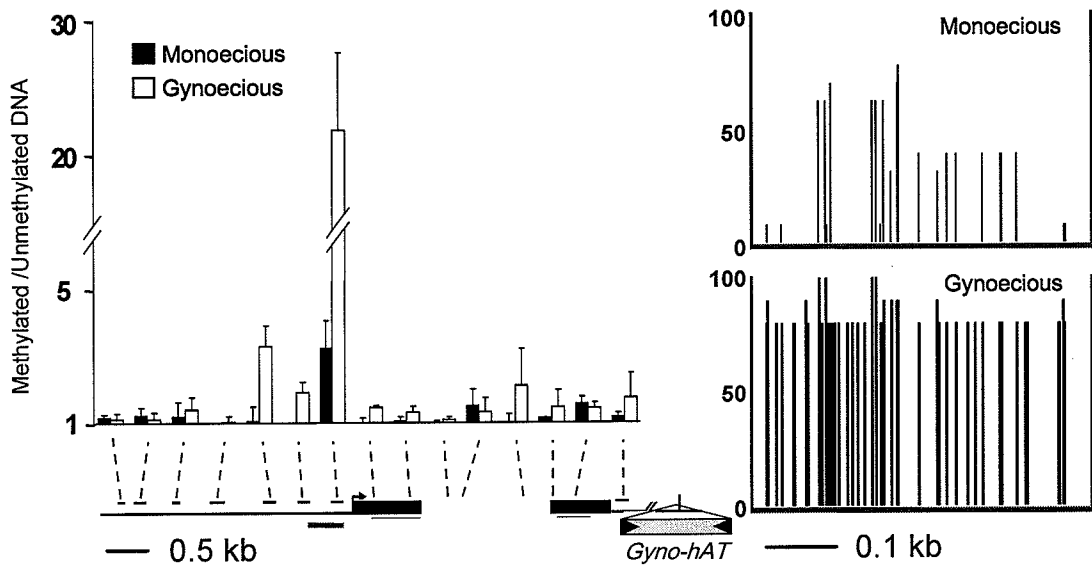


Figure 3B

Figure 3C

Figures 3A, 3B, 3C

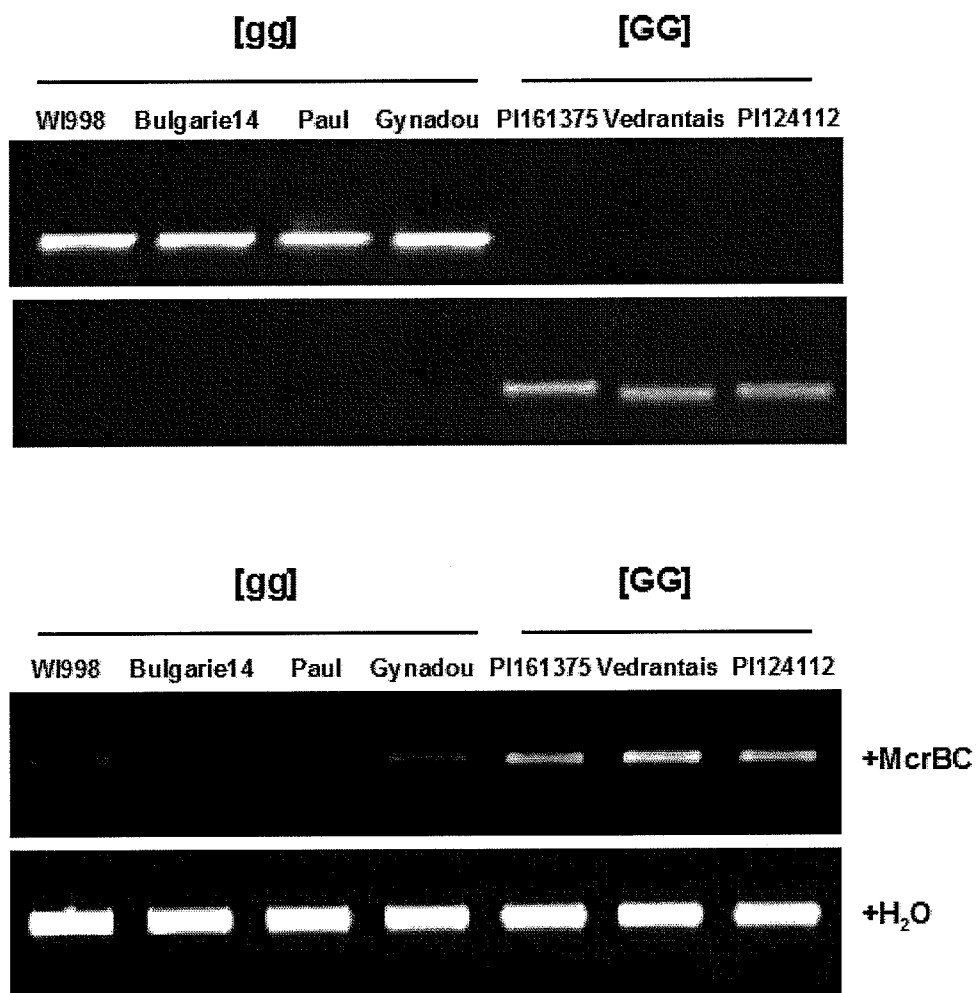


Figure 4

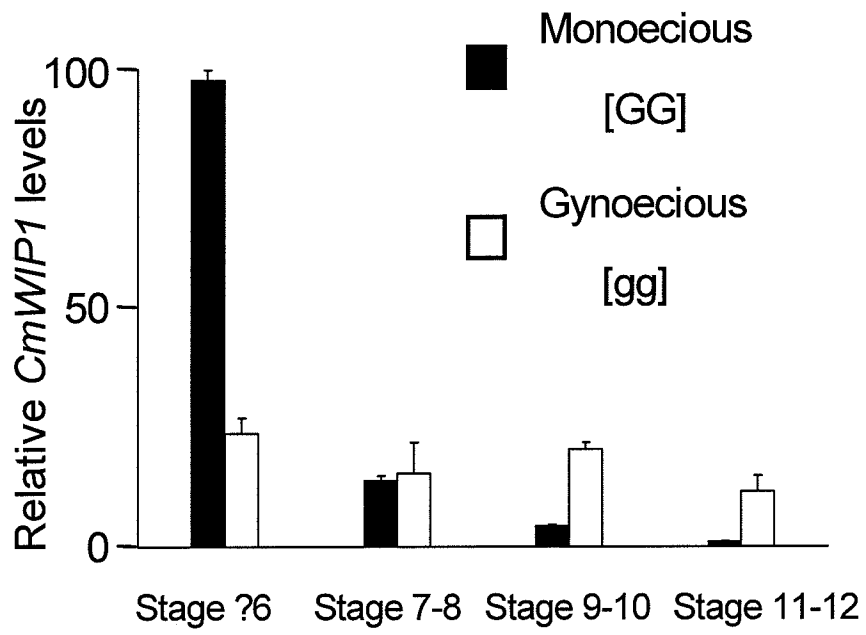


Figure 5

Relative expression levels

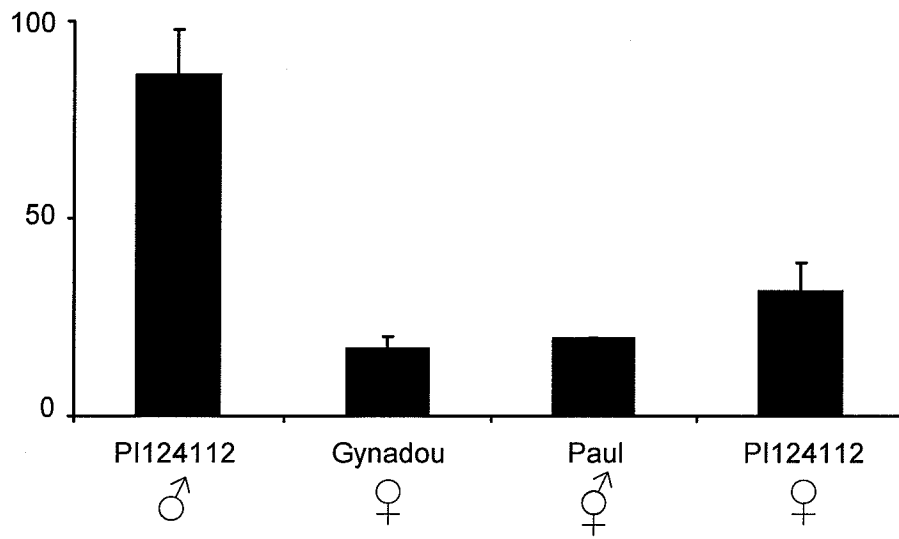


Figure 6

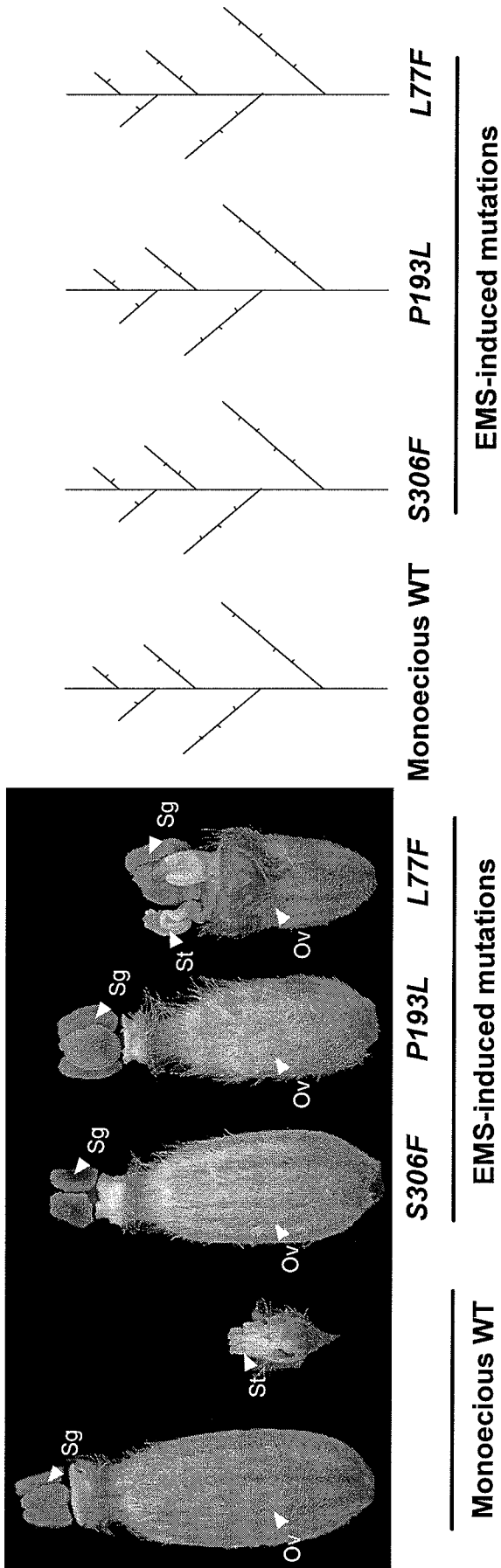


Figure 7

A

131 140 150 160 170 180 190 200

1
 A. MSRAA MATCAACAAATCTCTCTGGTGTATTCAACAAAGGGCTTAGCTGGAAATATCAAGAGTGCATTGGACTTATTGGAA
 B. MSRAA MATCAACAAATCTCTCTGGTGTATTCAACAAAGGGCTTAGCTGGAAATCAAGAGTGCATTGGACTTATTGGAA

B

Cm-geneA	AGMKRAYDEDP	XNESTINPSSV	IQMGELAA	IQV	SFDLLEETYLE
Cm-geneB	AGMKRAYDEDE	XNESTINPSSV	IQMGELVA	IQV	SFDLLEETYLE
At-ACS1	HSMKRAYDNNS	FHPITHNPQSV	IQMGELAA	IQQL	CSDLIKENIK
At-ACS2	DGMKRAYDKDP	FHLSPNPHSTI	IQMGELAA	IQQL	CLDLIKDNVVK
At-ACS4	IQNEEYEEKNP	YDVTKNPKGI	IQMGELAA	IQQL	CFDLLESNLA
At-ACS5	IQNEEYEEKNP	YDEIKKPNQM	IQMGELAA	IQQL	CFDLLESMLT
At-ACS6	DGMKAYEENP	FHPIDRFDGV	IQMGELAA	IQQL	CGDLNPKNVL
At-ACS7	AGMKAYDENP	YDESHNPSSV	IQMGELAA	IQV	SFDLLEETYLE
At-ACS8	WQNEEYEEKNP	YDEIKKPDGI	IQMGELAA	IQQL	SFDLLESNLA
At-ACS9	IQNEEYEEKNP	YDEIKKPNSTI	IQMGELAA	IQQL	CFDLLEETMLA
At-ACS10	VQQRVVEDDP	YDELGNPDGV	IQLGELAA	LNK	LS--LDDNVL
At-ACS11	IQNQEYEEKNP	FHESTINTSGI	VQMGELAA	IQQL	SFDLLEETYLE
At-ACS12	ISLERVKDEP	YDRITKTDGI	IQLGELAA	STL	CFDLLQRNMS

Figure 8

B



A

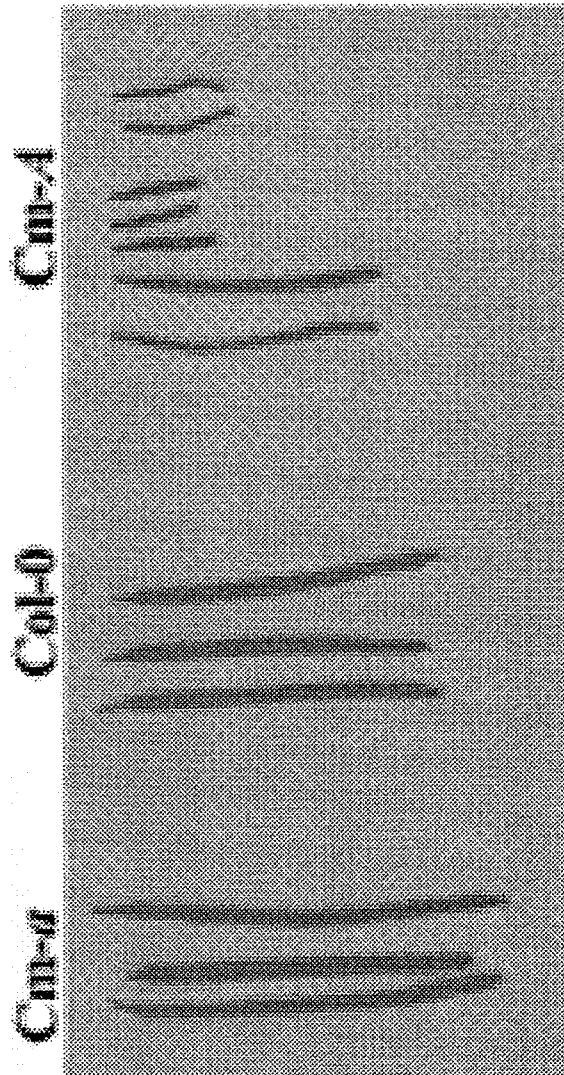


Figure 9