(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 933 103**

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **08 03622**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 N 15/29*** *(2006.01), C 12 N 15/82, A 01 H 5/00, C 12 Q 1/68, A 23 K 1/14, C 10 L 1/00*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 27.06.08.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 01.01.10 Bulletin 09/53.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *GENOPLANTE-VALOR* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** RIBOULLET CEDRIC, BARRIERE YVES et FABRE FRANCOISE.

(73) **Titulaire(s) :** GENOPLANTE-VALOR.

(74) **Mandataire(s) :** FLESSELLES BRUNO.

(54) METHODE D'AMELIORATION DES PLANTES.

(57) La présente invention se rapporte au domaine de l'amélioration des plantes, en particulier de l'amélioration de la digestibilité et de l'ingestibilité du maïs, et l'amélioration de sa dégradabilité pour la production de biofuels, par inhibition de l'expression de l'enzyme SBP1.

FR 2 933 103 - A1

La présente invention se rapporte au domaine de l'amélioration des plantes, en particulier de l'amélioration de la digestibilité (proportion d'un aliment digéré dans le tractus digestif) et de l'ingestibilité (quantité d'un fourrage distribué ad libitum qui est spontanément ingéré par l'animal) du maïs fourrage. Cette invention se rapporte aussi au domaine de la production de biocarburants (biofuels ou biogaz) de seconde génération, puisque ce qui fait la dégradabilité du substrat végétal lignocellulosique est similaire pour les deux objectifs.

Le maïs est notamment utilisé en tant que fourrage pour l'alimentation des ruminants, et l'on peut améliorer la valeur alimentaire du maïs d'ensilage en diminuant la teneur en lignines, en modifiant la composition monomérique des lignines et les types de liaisons entre monomères, ou en modifiant les relations entre composants pariétaux (en particulier liaisons lignines x hémicelluloses et liaisons entre chaînes d'hémicelluloses). Toutefois, l'amélioration de la digestibilité par la modification de la voie de biosynthèse des lignines peut avoir pour contrepartie des plantes de faibles qualités agronomiques (notamment des problèmes de verse, ou une plus grande susceptibilité aux pathogènes). Une autre voie consisterait ainsi à modifier la friabilité de la paroi, notamment en modifiant les liaisons entre lignines et sucres (cellulose et hémicelluloses).

L'ensilage de maïs est un aliment intéressant : le rendement au champ est relativement élevé, la récolte et le stockage sont aisés, l'appétence et la valeur énergétique sont stables et ce fourrage peut aisément être complémenté en protéines par d'autres ensilages de fourrage ou surtout par des tourteaux d'oléoprotéagineux (soja, colza, tournesol). Différentes expérimentations (Emile 1995, Annales de zootechnie; Barrière *et al.*, J Dairy Sci. 2004 May;87(5):1439-45) ont montré qu'alimenter du bétail avec un maïs plus ingestible et plus digestible permet d'augmenter le niveau de production de lait permis par la ration de maïs de un à quatre kilogrammes par vache et par jour, avec une reprise de poids égale ou supérieure, par rapport à une alimentation avec un maïs élite classique. Ainsi, plus la variété est digestible et ingestible, plus on diminue les coûts en concentrés énergétiques pour un niveau de production laitière donné, sans modifier les reprises de poids. L'optimisation des qualités de l'ensilage de maïs consiste ainsi à

augmenter l'énergie nette ingérée fournie par ce type d'alimentation en améliorant sa digestibilité et ses qualités, et notamment en modifiant les caractéristiques biochimiques et physiques des polymères ligno-cellulosiques.

Etant donné l'importance qualitative des lignines dans les propriétés de digestibilité et d'ingestibilité, une augmentation, une diminution ou une modification de la structure des lignines peut avoir des conséquences industrielles et agronomiques importantes. La présente invention remet toutefois en cause en partie ce paradigme, puisqu'elle permet d'améliorer l'ingestibilité et la digestibilité du maïs en modulant l'expression d'un gène codant pour une enzyme qui n'est pas, *a priori*, directement liée à la synthèse des lignines.

Les lignines forment avec la cellulose et les hémicelluloses les composants majoritaires de la paroi végétale des graminées. La paroi végétale principalement offre à la cellule une barrière naturelle contre l'extérieur. De nombreux secteurs agronomiques ou industriels voient leurs rendements directement liés à la teneur et/ou à la composition en lignines de la paroi. Parmi eux, il est possible de citer les industries papetières, la production de biocarburants de seconde génération ou la production d'ensilage ou de foins.

Ainsi, la sélection ou l'obtention de plantes de maïs plus ingestibles et plus digestibles, notamment dont la voie de biosynthèse des lignines et phenylpropanes est modifiée est un des axes privilégiés d'amélioration du maïs. Il convient toutefois que les plantes sélectionnées possèdent de bons rendements et soient peu sensibles aux divers stress (mécaniques, hydriques, biotiques...).

La voie de biosynthèse des phénylpropanes dont les lignines est une voie complexe, faisant intervenir un grand nombre possible de réactions enzymatiques (Dixon et al., 2001, Phytochemistry, 57(7), 1069-1084; Barrière et al., 2007 Genes, Genomes and Genomics 1, 133-15), mais dont les chemins conduisant *in vivo* à chaque composant sont encore imparfaitement élucidés. Il est ainsi difficile de savoir comment modifier exactement la voie de biosynthèse des lignines et de prévoir quelles seront les conséquences des modifications apportées.

Les lignines sont des polymères insolubles de 3 monomères d'alcools *p*-hydroxycinnamiques, ou monolignols, avec l'alcool *p*-coumarylique (sous-unités H), l'alcool conifférylique (sous-unités G, auxquelles sont associées les acides férulique et diféruliques) et l'alcool sinapylique (sous-unités S, auxquelles est

associé l'acide *p*-coumarique). Les trois monolignols et les acides férulique et *p*-coumarique sont issus de la voie des phénylpropanoïdes (Neish, 1968, Constitution and Biosynthesis of lignin, eds New York, Springer Verlag 1-43). Chaque type de monolignol peut former une variété de liaisons avec les autres et ainsi constituer les lignines. D'autres liaisons stratégiques par rapport à la biodégradabilité des parois s'établissent également entre composés pariétaux (pont férulate entre chaines d'hémicelluloses et entre lignines et hémicelluloses) pour former un réseau complexe , rigide, et peu accessible aux enzymes microbiennes.

Depuis plusieurs années, on a tenté de modifier les teneur et composition des plantes en lignines en sur-exprimant ou sous exprimant un ou plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des lignines (Anterola et Lewis, 2002, Phytochemistry 61, 221-294). Un certain nombre de stratégies ont été imaginées, ainsi que décrites notamment dans les demandes de brevets WO 9924561, EP0516958, WO9305160, WO9305159, WO9712982. Cependant, les possibilités offertes par la surexpression ou la sous expression d'une ou plusieurs enzymes de la voie des phénylpropanes sont loin d'avoir été complètement imaginées et testées, faute en partie d'avoir choisi les bons gènes cibles, et ne donnent pas toujours des résultats constants et prévisibles.

La présente demande a pour objet de fournir à l'homme du métier une plante, et particulièrement un maïs qui possède effectivement une ingestibilité et une digestibilité améliorées, par la dérégulation de l'expression de l'enzyme SBP1, et notamment par la mise au point d'un allèle favorable de l'enzyme SBP1 (appelé SBP1-L), qui contient une délétion d'un codon glutamine dans le premier exon, une insertion de douze nucléotides dans l'intron.

Le gène représenté par SEQ ID N° 1 correspond à l'ADN génomique pour cette enzyme SBP1 dans la lignée F2. SEQ ID N° 4 correspond à l'ADN génomique de SBP1-L.

La séquence d'un ADNc (GenBank NM_001112606) est représentée par SEQ ID N° 2, la partie codante s'étendant des nucléotides 31 à 1222 pour cette séquence. Il est clair que ces séquences ne sont données qu'à titre d'exemples, et que l'homme du métier est à même d'identifier lui-même les séquences génomique et/ou d'ARNm de l'enzyme SBP1 pour différentes variétés de maïs. Il est anticipé

que de telles séquences présentent un pourcentage d'identité tel que décrit plus loin avec SEQ ID N° 2.

Le maïs selon l'invention présente une altération quantitative et/ou qualitative de la synthèse des lignines et des phénylpropanes pariétaux.

Par « altération quantitative de la synthèse des lignines », on entend désigner une diminution de la quantité de lignines dans le maïs modifié selon l'invention par rapport à un maïs normal (témoin non modifié selon l'invention), évalué, par exemple par mesure de la lignine de Klason ou de la lignine obtenue par détergent acid (acid detergent lignin) selon des méthodes bien connues dans l'art (voir par exemple Jung et al., J Agric Food Chem. 1999 May;47(5):2005-8 ; Jung et al, J Dairy Sci. 1997 Aug;80(8):1622-8).

Par « altération qualitative de la synthèse des phénylpropanes pariétaux », on entend désigner une modification dans la composition et de la structure des lignines et des réticulations entre polymères de la plante modifiée selon l'invention par rapport à une plante témoin (non modifiée selon l'invention), par exemple une variation du rapport entre sous unités H/S/G, les méthodes d'analyse qualitative des lignines étant également connues dans l'art. On peut notamment citer la RMN. Les modifications structurales du polymère lignines sont également liées à la fréquence d'acylation des unités S par l'acide *p*-coumarique. Par ailleurs, l'intensité de la réticulation des parois par des ponts d'acides férulique et diféruliques est également partie prenante de la qualité structurale de la paroi. Les acides *p*-hydroxycinnamiques se dosent pas des méthodes classiques, en particulier en HPLC (Méchin et al., J Sci Food Agric. 80, 574-580)..

Les inventeurs ont en effet localisé l'enzyme SBP1 du maïs et établi qu'il existe une colocalisation entre ce gène et des QTL liés à la digestibilité. Il a également été montré que ce gène est sous-exprimé chez les maïs plus ingestibles et plus digestibles.

Le gène SBP1 a été identifié par Scott-Craig et al (Plant Physiol. (1998) 116: 1083–1089) qui l'ont décrit comme une protéine permettant d'obtenir une résistance à certains herbicides, même s'ils ont noté une similitude avec des O-méthyl transférases. Toutefois, les auteurs de cette publication ont précisé que cette protéine ne possède pas un motif retrouvé chez d'autres OMT impliquées dans l'O-

méthylation de composés phénoliques. Toutefois, les recherches d'homologie laissent penser que ce gène code pour une OMT. Elle partage notamment 30 % d'identité et 54 % de similarité avec la séquence de COMT de maïs (il s'agit des plus forts pourcentages). Les auteurs concluent ainsi que cette enzyme ne semble pas catalyser la réaction de transfert d'un groupement méthyl du S-adenosyl methionine au catéchol ou à l'acide caféique, la COMT catalysant une réaction sur le 5OH-coniferaldéhyde.

Une séquence d'ADN génomique de SBP1 est représentée par SEQ ID N° 1. La séquence polypeptidique correspondante est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID N° 3.

La région codante est généralement constituée d'un intron de 79 paires de bases (pb) et de 2 exons. Dans une lignée ingestible et digestible, pour l'allèle SBP1-L, la longueur de l'intron est de 91 pb.

La séquence d'ADN génomique de SBP1 obtenue à partir de la lignée de maïs à digestibilité élevée, contenant l'insertion de 12 nucléotides dans l'intron est représentée par SEQ ID N° 4.

La mise en évidence par les inventeurs de l'implication de SBP1 dans la digestibilité fournit un ensemble de moyens permettant d'obtenir des maïs possédant une digestibilité et une ingestibilité accrues.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé pour améliorer la digestibilité et l'ingestibilité d'une plante, et de préférence une graminée, et de façon plus préférée un maïs, caractérisé en ce que l'on modifie la cinétique d'expression, et/ou inhibe totalement ou partiellement l'expression et/ou l'activité de l'enzyme SBP1 de ladite plante.

Ladite plante est notamment le maïs, le riz, le sorgho, le millet, le blé et autres céréales à paille, ou une plante fourragère.

On définit ici comme enzyme SBP1 toute protéine dont la séquence polypeptidique présente au moins 75 %, de préférence au moins 85 %, ou au moins 90 %, avantageusement au moins 94 %, et de manière tout à fait préférée au moins 95 %, de manière plus préférée au moins 97 % d'identité avec la séquence SEQ ID N° 3 sur une fenêtre de comparaison la plus large possible, correspondant de

préférence à la totalité de la séquence SEQ ID N° 3. Sauf précision contraire, les pourcentages d'identité indiqués ici sont établis à l'aide du logiciel BLAST2 (ALTSCHUL et al., Nucleic Acids Res.,25, 3389- 3402,1997) en utilisant les paramètres par défaut (matrice BLOSUM62 pour les comparaisons de protéines, avec des pénalités de 11 pour un « gap » ouvert, 1 pour un « gap » d'extension, 50 pour un « gap x_dropoff », une valeur d'attente aléatoire de 10, une taille de mots (word size) de 3, et pas de filtre).

L'inhibition totale ou partielle de l'expression et/ou de l'activité de l'enzyme SBP1 peut être obtenue de diverses manières, connues par l'homme du métier.

De façon préférée, on diminue l'expression du gène codant pour SBP1, par mutagenèse, ou bien par inhibition ou modification de sa transcription ou de sa traduction.

La mutagenèse du gène codant pour SBP1 peut intervenir au niveau de la séquence codante ou des séquences de régulation de l'expression, notamment du promoteur. On peut par exemple procéder à la délétion de tout ou partie dudit gène et/ou à l'insertion d'une séquence exogène. A titre d'exemple, on citera la mutagenèse insertionnelle : on produit un grand nombre d'individus dérivant d'une plante active pour la transposition d'un élément transposable, (élément AC ou Mutator chez le maïs), et on sélectionne, par exemple par PCR, les plantes chez lesquelles une insertion s'est effectuée dans le gène de SBP1, ou à proximité avec conséquence sur la traduction ou l'expression.

L'inhibition du gène SBP1 peut être réalisée par tout moyen connu dans l'art. Ainsi, on peut procéder à la mutation des gènes par insertion d'un élément transposable ou d'un ADN de transfert (T-DNA). On peut aussi effectuer une mutagenèse physique ou chimique, notamment par l'utilisation d'EMS, de rayons X ou d'ultraviolets (voir notamment McCallum et al, Plant Physiol.,123, 439-442, 2000). Les mutations intéressantes ont pour conséquence de décaler le cadre de lecture et/ou d'introduire un codon stop dans la séquence et/ou de modifier le niveau de la transcription et/ou de la traduction du gène et/ou de rendre l'enzyme moins active que la protéine sauvage.

Les plantes ainsi mutées sont criblées par exemple par PCR, en utilisant des amorces situées dans le gène cible. Toutefois, on peut aussi utiliser d'autres méthodes de criblage, comme les Southern Blots ou un criblage via la méthode AIMS décrite dans WO 99/27085 (pour détecter les insertions), en utilisant des sondes spécifiques des gènes cibles, ou les méthodes de détection de mutations ponctuelles ou de petites insertions/délétions utilisant des endonucléases particulières (Cel I, Endo I) telles que décrites dans WO 2006/010646.

Dans un autre mode de réalisation, l'inhibition est obtenue par transformation de la plante avec un vecteur contenant un construit sens ou anti-sens du gène cible. Ces deux méthodes sont connues pour permettre, dans certaines conditions, l'inhibition du gène cible. On utilise également la méthode de l'interférence d'ARN (RNAi) qui est particulièrement efficace pour l'extinction de gènes dans les plantes. Cette méthode est bien connue de l'homme du métier et consiste en la transformation de la plante avec un construit produisant, après transcription, un duplex double-brin d'ARN, dont l'un des brins est complémentaire à l'ARNm du gène cible (pour revue sur les techniques d'inhibition post-transcriptionnelles, Chicas et Macino, EMBO reports, 21(11), 992-996,2001 ; pour revue sur l'utilisation des ARN interférents, Hannon, Nature, 418,244-251, 2002).

La présente invention a ainsi notamment pour objet l'utilisation d'au moins un polynucléotide choisi parmi :

a) un polynucléotide codant pour une enzyme SBP1 telle que définie ci-dessus, et représentée par SEQ ID N° 3 ;

b) un polynucléotide complémentaire d'un polynucléotide a) ci-dessus ;

c) un fragment d'au moins 12 nucléotides consécutifs, de préférence au moins 15, avantageusement au moins 20, et de manière tout à fait préférée au moins 50 nucléotides consécutifs, spécifique d'un polynucléotide a) ou b) ci-dessus, ou capable de s'hybrider sélectivement avec ledit polynucléotide,

d) un polynucléotide contenant un polynucléotide X contenant au moins 12 nucléotides, de préférence au moins 15, avantageusement au moins 20, et de manière tout à fait préférée au moins 50 nucléotides capable de s'hybrider sélectivement avec un polynucléotide défini en a), ainsi qu'un polynucléotide Y complémentaire dudit polynucléotide X,

pour obtenir une plante possédant une digestibilité et une ingestibilité accrues.

On définit ici comme polynucléotide codant pour SBP1 tout polynucléotide contenant l'information génétique permettant la synthèse de la protéine SBP1 représentée par SEQ ID N° 3, ou d'une protéine présentant au moins 94 %, ou 95 % ou 97 % d'identité avec SEQ ID N° 3.

Ceci englobe notamment l'ADN génomique, par exemple la séquence SEQ ID N° 1 représentée en annexe, ainsi que l'ADNc correspondant (SEQ ID N° 2).

Un fragment spécifique d'un polynucléotide a) ou b) ci-dessus est un fragment dudit polynucléotide dont la séquence n'est pas trouvée dans d'autres gènes de la même plante.

Un polynucléotide capable de s'hybrider sélectivement avec un polynucléotide a) ou b) ci-dessus, est un polynucléotide qui lorsqu'il est hybridé en conditions stringentes avec une banque d'acide nucléique de la même plante (notamment une banque d'ADN génomique, ou d'ADNc) produit un signal d'hybridation détectable au moins 2 fois supérieur, et de préférence au moins 5 fois supérieur au bruit de fond avec ledit polynucléotide, mais ne produit aucun signal détectable avec d'autres séquences de ladite banque.

L'homme du métier est capable de définir la stringence des conditions d'hybridation, qui dépendent de la taille et de la composition en bases du polynucléotide concerné, ainsi que de la composition du mélange d'hybridation (notamment pH et force ionique). Généralement, des conditions stringentes, pour un polynucléotide de taille et de séquence données, sont obtenues en opérant à une température inférieure d'environ 5 °C à 10 °C à la température de fusion (Tm) de l'hybride formé, dans le même mélange réactionnel, par ce polynucléotide et son complémentaire.

La présente invention a en particulier pour objet un procédé pour augmenter la digestibilité et l'ingestibilité d'une plante, par inhibition totale ou partielle de l'enzyme SBP1 endogène de ladite plante, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de ladite plante avec une construction d'ADN recombinant comprenant un polynucléotide tel que défini ci-dessus, placé en orientation sens ou

en orientation antisens, ou pouvant être transcrit en ARN double brin, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

La présente invention a également pour objet des constructions d'ADN recombinant, comprenant un polynucléotide tel que défini ci-dessus. Ces constructions sont notamment des cassettes d'expression, comprenant un polynucléotide tel que défini ci-dessus, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié. Ces cassettes d'expression peuvent également contenir d'autres éléments de régulation, en particulier des éléments de régulation de la transcription tels que des terminateurs, amplificateurs.

Des vecteurs recombinants qui comprennent des polynucléotides tels que définis selon l'invention ou une cassette d'expression selon l'invention sont également objets de l'invention.

De tels vecteurs peuvent également comprendre d'autres éléments, par exemple un ou plusieurs marqueurs de sélection, et sont notamment utilisables pour l'obtention de plantes transgéniques.

A titre d'exemples non-limitatifs de promoteurs utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les promoteurs constitutifs, tels que le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), ou ses dérivés, le promoteur du virus de la mosaïque des nervures de manioc (CsVMV) (WO 97/48819), le promoteur de l'ubiquitine ou le promoteur Actine-Intron-actine, du riz (McElroy et,al., Mol. Gen. Genet.,231, 150-160,1991 ; GenBank S 44221).

Des promoteurs inductibles ou tissu-spécifiques peuvent également être utilisés. Ceci permet de n'induire l'inhibition de SBP1 qu'à certains stades du développement de la plante, dans certaines conditions environnementales, ou dans certains tissus cibles, comme par exemple, les tiges, les feuilles, les graines, les spathes, le cortex ou le xylème. On peut ainsi utiliser les promoteurs de gènes impliqués dans la synthèse des lignines tels les promoteurs des COMT, CCoAOMT, C4H...

On utilise également avantageusement d'autres éléments de régulation de la transcription tels des terminateurs, et notamment le terminateur 3'NOS de la nopaline synthase (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet.,1, 561-573,1982), ou le terminateur 3'CaMV (Franck et al. Cell, 21,285-294,1980 ; GenBank V00141).

Les gènes marqueurs de sélection utilisables dans le cadre de la présente invention sont notamment des gènes conférant une résistance à un antibiotique tel que l'hygromycine, la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine, ou à un herbicide (EP 0 242 246) tel que le glufosinate, le glyphosate ou la bromoxynil. Le gène nptII qui confère la résistance à la kanamyine peut ainsi être utilisé.

La transformation des plantes peut s'effectuer par de nombreuses méthodes, connues en elles-mêmes de l'homme du métier.

On peut par exemple transformer des cellules végétales, des protoplastes ou des explants, et régénérer une plante entière à partir du matériel transformé. La transformation peut ainsi être réalisée, par transfert des vecteurs conformes à l'invention dans des protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol (PG) en présence de cations divalents (Ca2+) selon la méthode décrite dans l'article de Krens et al. (Nature, 296,72-74,1982) ou par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm et al. (Nature, 319,791-793, 1986). On peut également utiliser un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Finer et al. (Plant Cell Report, 11,323- 328,1992) ou la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

On utilise préférentiellement la méthode de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon la méthode décrite par Ishida et al. (1996, Nature Biotechnol. 14, 745-50).

La présente invention a également pour objet les cellules végétales et les plantes transgéniques susceptibles d'être obtenues par un procédé conforme à l'invention, et les cellules et plantes contenant un polynucléotide recombinant ou une cassette d'expression tels que définis ci-dessus. L'invention se rapporte également aux cellules végétales et aux plantes obtenues après mutation du gène codant pour SBP1 de telle sorte qu'il en résulte une inhibition de l'expression et/ou l'activité de ladite enzyme.

Bien entendu, la présente invention englobe les plantes dérivées de plantes selon l'invention, qui sont notamment les descendants, notamment les hybrides issus d'un croisement impliquant au moins une plante selon l'invention, obtenus par

semis ou par multiplication végétative, des plantes selon l'invention ou obtenues directement ou indirectement par un procédé selon l'invention.

L'invention comprend également les cellules et tissus végétaux, ainsi que les organes ou parties de plantes, y compris feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits, et/ou graines obtenues à partir d'une plante conforme à l'invention.

De façon préférée, l'invention s'applique au maïs et aux cellules et tissus issus de maïs.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de sélection de maïs, caractérisé en ce qu'il comprend la recherche d'un allèle du gène de SBP1 possédant une mutation résultant en une amélioration de la digestibilité et de l'ingestibilité dudit maïs. Dans un cas préféré, ladite mutation résulte en une inhibition totale ou partielle de l'expression et/ou de l'activité de la protéine SBP1.

Ledit allèle peut être recherché par détection directe de la mutation responsable de l'inhibition; il peut également être recherché par détection de la forme allélique associée à cette mutation d'un polymorphisme en déséquilibre de liaison avec celle-ci. Par exemple, la présence des 12 nucléotides insérés dans l'intron de SBP1 peut être détectée directement.

On peut ainsi utiliser des couples d'amorces qui amplifient sélectivement l'intron du gène SBP1, et détecter l'insertion des 12 nucléotides par comparaison de la taille du fragment amplifié avec le fragment obtenu d'un maïs qui ne contient pas ces nucléotides.

Les allèles mutants favorables à la digestibilité ainsi identifiés peuvent ensuite être introgressés dans des lignées choisies, et notamment dans des lignées élites à savoir des lignées présentant un potentiel agronomique et commercial important.

L'invention se rapporte ainsi également à un allèle particulier du gène SBP1, qui est associé avec une meilleure digestibilité. Cet allèle est appelé SBP1-L.

L'invention se rapporte ainsi notamment à une plante de maïs, ou un grain de maïs possédant ledit allèle SBP1-L, et aux méthodes permettant de les obtenir. De façon opposée, l'invention se rapporte à une plante ou un grain de maïs présentant un allèle SBP1 muté, ladite mutation résultant en une inhibition de

l'expression et/ou l'activité de SBP1 (par rapport à un maïs quasi-isogénique ne possédant pas la mutation), et n'étant pas SBP1-L.

De façon préférée, le maïs selon l'invention est un maïs « élite ». L'homme du métier connaît bien la définition d'un maïs élite. Par maïs élite, on entend un maïs destiné à générer des hybrides destinés à être commercialisés par croisement avec un autre maïs élite. Un maïs élite est défini comme tel en relation avec le territoire envisagé pour la commercialisation, ainsi que le(s) caractère(s) agronomique(s) recherché(s) pour la descendance hybride. Il s'agit notamment d'un maïs pouvant être inscrit dans un catalogue de référence.

Ainsi, si la descendance est destinée à l'alimentation animale, on recherchera par exemple un rendement élevé et régulier en tonnage de matière sèche à l'hectare et une bonne ingestibilité et digestibilité, lorsque l'on évalue la nature « élite du maïs ». Si la descendance est destinée à la production de biocarburants, tels les biofuels ou les biogaz, on recherchera les maïs présentant le meilleur rendement énergétique après transformation.

Afin de déterminer le caractère élite d'un maïs, on compare des hybrides obtenus à partir de celui-ci aux hybrides commerciaux de référence (vendus pour le même objectif dans la même région), par des essais en champs, par relevé et mesures de caractères agronomiques appropriés à l'objectif recherché. Un maïs est défini comme élite si les résultats obtenus paramètres étudiés pour un hybride obtenu par croisement dudit maïs sont supérieurs à 90 % aux résultats relevés pour les mêmes paramètres des hybrides de référence. Dans le cadre de la présente invention, on étudie notamment le caractère de digestibilité et les composants de la parois (mesurés par NIRS (near infrared spectroscopy), par exemple).

La spectroscopie de réflectance dans le proche infrarouge (NIRS) est la mesure de l'intensité de réflectance de la lumière proche infrarouge par un échantillon, dans les domaines 800 nm - 2.5 µm (12,500 - 4000 cm-1). Cette spectroscopie est typiquement utilisée pour des mesures quantitatives de groupes fonctionnels organiques, en particulier O-H, N-H et C=O. Cette méthode est couramment utilisée dans l'analyse de la digestibilité et de la composition biochimique d'échantillons végétaux.

Ainsi, un maïs élite est un maïs rassemblant le maximum de caractéristiques agronomiques nécessaires pour une pénétration économique du marché visé. Le

marché du maïs étant aujourd'hui un marché d'hybrides, l'évaluation du caractère élite d'un maïs s'effectue également par l'aptitude dudit maïs à la combinaison/production d'hybrides.

Ainsi, la mise en œuvre de la présente invention permet d'obtenir un maïs élite destiné à la commercialisation d'hybrides pour l'alimentation animale et l'ensilage, ou la production de biocarburants présentant l'allèle SBP1-L. Ce maïs élite est donc homozygote pour l'allèle SBP1-L.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention permet d'obtenir un maïs hybride obtenu par croisement de deux lignées parentes homozygotes, ledit maïs hybride présentant un allèle SBP1-L. Ce maïs hybride peut être homozygote (si chaque parent homozygote présente l'allèle SBP1-L) ou hétérozygote pour l'allèle SBP1-L.

Par la mise en œuvre de l'invention, on peut également générer un maïs ou un grain de maïs, contenant un ou plusieurs transgènes en plus de l'allèle SBP1-L. On peut citer des transgènes conférant une stérilité mâle, une fertilité mâle, la résistance à un herbicide (notamment le glyphosate, le glufosinate, l'imidazolinone, la sulfonylurée, la L-phosphinotricine, la triazine, le benzonitrile), la résistance aux insectes (notamment un transgène codant pour une toxine de *Bacillus thuringiensis*), la tolérance au stress hydrique. Ces maïs peuvent être obtenus en croisant un maïs contenant l'allèle SBP1-L avec un maïs contenant ledit transgène. La mise en œuvre de rétrocroisements suivis d'une autofécondation permet d'obtenir un maïs élite homozygote pour l'allèle SBP1-L et le trangène. Ainsi, on peut obtenir un maïs hybride contenant à la fois l'allèle SBP1-L et le transgène en suivant l'enseignement de l'invention.

La présente invention fournit également à l'homme du métier les moyens permettant de sélectionner les plantes de maïs possédant des caractéristiques de tolérance aux pathogènes fongiques améliorées. Il suffit en effet d'effectuer une PCR, ou un Southern Blot (hybridation de l'ADN génomique sur membrane) pour suivre la présence de l'insertion de 12 nucléotides dans le premier intron du gène codant pour SBP1. L'homme du métier peut aisément déterminer les amorces et sondes permettant d'identifier la présence de l'allèle SBP1-L. L'invention se rapporte ainsi également à une méthode de suivi de l'allèle SBP1-L, par des

techniques de biologie moléculaire, et notamment *via* la PCR en utilisant les amorces mentionnées dans les exemples.

L'invention se rapporte également à une méthode pour obtenir une lignée de maïs présentant une meilleure ingestibilité et digestibilité, comprenant l'étape d'introgression de l'allèle SBP1-L, dans une lignée de référence, présentant un caractère agronomique de qualité. L'introgression du caractère est notamment réalisée par sélection, selon les méthodes connues dans l'art (croisements et auto-fécondation). On sélectionne notamment les plantes à l'aide de marqueurs moléculaires.

Le principe en est rappelé ci-dessous :

On réalise une série de rétrocroisements (back-cross) entre la lignée élite et la lignée portant l'allèle SBP1-L.

Au cours des rétrocroisements, on peut sélectionner les individus porteurs de l'allèle SBP1-L, et ayant recombiné le plus petit fragment de la lignée donneuse autour de cet allèle. En effet, grâce aux marqueurs moléculaires, on sélectionne les individus ayant pour les marqueurs proches du gène, le génotype de la lignée élite.

De plus, il est également possible d'accélérer le retour vers le parent élite grâce aux marqueurs moléculaires répartis sur l'ensemble du génome. A chaque rétrocroisement, seront choisis les individus ayant le plus de fragments issus du parent élite récurrent.

Avec une bonne mise en œuvre, dès la quatrième génération, on peut obtenir une lignée quasi isogénique de la lignée élite, c'est-à-dire identique à la lignée élite de départ, mais ayant intégré le locus portant l'allèle SBP1-L. Le fragment intégré porte l'allèle SBP1-L ainsi que des régions chromosomiques flanquantes issues de Fl16.

L'invention se rapporte ainsi à une méthode pour obtenir un maïs présentant une digestibilité et ingestibilité accrues, comprenant l'introgression de l'allèle SBP1-L dans ledit maïs, comprenant les étapes consistant à :

a) croiser une première lignée de maïs présentant l'allèle SBP1-L avec un second maïs ne présentant pas ledit allèle,

b) effectuer un génotypage de la descendance obtenue et sélectionner les descendants présentant l'allèle SBP1-L,

c) effectuer un rétrocroisement desdits descendants avec ladite seconde lignée de maïs élite utilisable pour la production d'hybrides,

d) répéter si nécessaire les étapes b) et c) jusqu'à obtenir une lignée isogénique dudit second maïs, présentant l'allèle SBP1-L,

e) de façon optionnelle, effectuer une auto-fécondation afin d'obtenir une plante homozygote pour l'allèle SBP1-L.

Le génotypage de l'étape b) est effectué préférentiellement en utilisant des marqueurs moléculaires (marqueurs microsatellites par exemple), permettant de définir la part de chacun des deux parents dans la descendance. On sélectionne également, dans la descendance, les maïs qui possèdent le caractère génétique approprié pour ce qui est de l'allèle SBP1-L, de façon classique, par les méthodes de biologie moléculaire (telles que PCR ou Southern Blot). De façon optionnelle, à l'étape b), on sélectionne les descendants ayant le meilleur génome ratio pour ce qui est dudit second maïs.

Les maïs obtenus à l'issue de l'étape d) ou e) peuvent être utilisés pour créer des hybrides, ou multipliés en tant que parents. Les descendants (hybrides ou descendance par autofécondation ou autres croisements) sont ainsi des maïs dérivés de maïs obtenus par le procédé de sélection mentionné ci-dessus.

La digestibilité et l'ingestibilité accrues du maïs selon la présente invention sont entendues par rapport à un maïs quasi-isogénique ne comprenant pas l'allèle SBP1-L, et est mesurée par NIRS, ainsi que décrit ci-dessus ou par la baisse de l'acide férulique réticulant et de la quantité de lignines (Acid Detergent Lignin) après isolement des parois (Neutral Detergent Fibers), selon les méthodes connues de l'homme du métier. On peut aussi directement mesurer l'amélioration de la digestibilité de la matière organique de la partie tige + feuilles de la plante, en pourcentage de matière organique digérée, ou le pourcentage de lignines et la digestibilité des parois, et la teneur en acide férulique réticulant selon les méthodes connues dans l'art.

Par ailleurs, les résultats agronomiques observés après de multiples rétrocroisements ne montrent pas de différence entre les lignées isogéniques présentant l'allèle SBP1-L et les plantes quasi-isogéniques.

Enfin, l'invention se rapporte à l'utilisation d'un maïs selon l'invention, obtenu par un procédé selon l'invention, ou dérivé d'un tel maïs (notamment un maïs hybride dont au moins l'un des deux parents est un maïs selon l'invention ou a été obtenu par un procédé selon l'invention) pour la préparation d'une composition destinée à l'alimentation animale, à une méthode pour la préparation d'une composition destinée à l'alimentation animale comprenant l'ensilage d'un maïs selon l'invention, ainsi qu'à la composition destinée à l'alimentation animale, ainsi obtenue. En particulier, ledit maïs est particulièrement utile pour l'alimentation du bétail, ou pour la production de biocarburants, et notamment de biofuels ou biogaz.

Les exemples non-limitatifs qui suivent illustrent l'invention et l'implication de SBP1 dans la digestibilité, et son utilisation pour l'obtention de plantes possédant une digestibilité et une ingestibilité améliorées et la production de biocarburants tels les biofuels ou biogaz.

EXEMPLES

Exemple 1 : Comparaison de l'expression du gène SBP1 entre deux variétés de maïs présentant des digestibilités différentes

On a utilisé des lignées de maïs nommées Fl16 (plus digestible) et F2 (moins digestible). Les plantes ont été maintenues en serre. Les tiges ont été prélevées juste après l'émergence des panicules, 4 heures après le lever du soleil. Les échantillons des trois répétitions biologiques ont été mélangés pour l'extraction d'ARN. Les échantillons ont été maintenus à -80°C dans l'azote liquide.

L'ARN total a été isolé de 2 g de chaque échantillon, et le matériel resuspendu dans le tampon d'extraction (100 mM Tris, pH 8.0, 100 mM LiCL, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1% PVPP, 1% PVP, 770 mg/l DTT) et extrait deux fois avec un mélange phénol:chloroforme:alcool isoamyl (25:24:1). L'ARN total a été précipité avec 2 M LiC1 à 4°C pendant une nuit et centrifugé (45 min à 12,000 tours par minute et 4°C). Le culot a été resuspendu dans de l'eau distillée stérile. L'ARN total a alors été purifié avec le kit RNeasy Midi (Qiagen; Ref 75144), et soumis à digestion d'ADN avec le kit DNase sans RNase (Qiagen; Ref 79254) pendant 45 min à 30°C. La quantité d'ARN a été mesurée à 260 nm avec un

Biophotomètre (Eppendorf) et visualisée sur des gels à 1,5% d'agarose. La concentration d'ARN a été ajustée à 1 µg/µl pour utilisation future.

On a utilisé une membrane contenant des étiquettes spécifiques de 691 gènes (gene-specific tags (GSTs)), décrite par Guillaumie et al (Plant Physiol. 2007 Jan;143(1):339-63). La synthèse des sondes d'ADNc, l'hybridation de la membrane et l'analyse des données ont été réalisées selon Pesquet et al. (Plant Physiol. 2005 Dec;139(4):1821-39) et Guillaumie et al. (op.cit.). Chaque gène a été déposé deux fois sur deux membranes, ce qui correspond à quatre répétitions (20 x 20 cm Nytran Super-Charge nylon membrane, Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA). Deux hybridations indépendantes ont été réalisées pour chaque échantillon. La reproductibilité de l'intensité brute du signal sur les membranes a été vérifiée pour chaque membrane et entre les membranes pour chaque gène. Les valeurs aberrantes n'ont pas été prises en compte. La normalisation a été réalisée sur la base du bruit de fond sans hybridation, l'hybridation non-spécifique et les contrôles positifs (Tris-EDTA pH8, pBluescriptII, ubiquitine et kanamycin-nptII). La déviation standard a été calculée pour chaque gène après normalisation. Selon Pesquet et al. (2005) et Guillaumie et al. (2007), les gènes qui présentent une différence d'hybridation de plus de deux fois par rapport aux signaux moyens sont considérés comme différentiellement exprimés. Le niveau d'hybridation normalisé sous 3000 étant similaire au niveau observé sur une membrane sans hybridation, le niveau minimal d'hybridations significatives a été fixé à une valeur normalisée de 6000 (2 fois la valeur du blanc).

On a ainsi montré que le gène SBP1 est différentiellement exprimé de façon significative. Ce gène est sous-exprimé dans la lignée Fl16 avec un rapport d'intensité Fl16/F2 égal à 0,39. Ce gène a été cloné par Scott-Craig et al. (Plant Physiol. (1998) 116: 1083–1089) dans la lignée de maïs B73, et était considéré comme impliqué dans les mécanismes de protection de la plante contre les blessures liées aux herbicides chloroacétanilide et thiocarbamate. Le rôle normal de SBP1 dans le métabolisme du maïs n'a toujours pas été élucidé, bien que certaines études l'aient lié à une possible implication dans les phénomènes de lignification (Scott-Craig et al. 1998). Les inventeurs ont également montré son implication dans la biosynthèse de l'acide férulique et sans doute des unités S.

On a également utilisé les mêmes échantillons d'ARN pour effectuer une étude sur une puce à ADN. Cette puce contient 57 000 oligonucléotides spécifiques de maïs.

On a effectué une transcription inverse des échantillons d'ARN, que l'on a marqués avec un système Cy3 and Cy5 avec le kit Ambion Amino Allyl MessageAmp (ref 1752; www.ambion.com). Les échantillons ont été hybridés aux lames et incubés toute une nuit à 37°C sur un Slide Booster (Advalytix; www.advalytix.com). Après hybridation, les lames ont été scannées. Chaque hybridation produit une paire d'images qui ont été traitées avec Arrayvision software (Imaging Research Inc), qui permet la segmentation et la correction du bruit de fonds et produit des paires d'intensité de fluorescence pour chaque oligonucléotide sur chaque lame avec R = red for Cy5 and G = green for Cy3.

Pour la normalisation des données, la méthode loess a été utilisée, et permet une normalisation locale A-dépendante.

Sur les 57 000 oligonucléotides déposés sur la lame, 175 ont été identifiés comme correspondant à des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire. Sur ces 175 gènes, 14 sont sous-exprimés, 27 sur-exprimés, et 134 ne présentent pas de différences d'expression entre F2 et Fl16.

Cette étude a permis de montrer que le gène SBP1 est sous-exprimé dans Fl16 par rapport à F2, avec un ratio d'expression Fl16/F2 étant proche de 0,4.

Ces deux études montrent que le gène SBP1 est sous-exprimé dans une lignée de maïs plus digestible par rapport à une autre lignée de maïs.

Exemple 2 : Identification d'un allèle spécifique d'une variété digestible

Le séquençage du gène SBP1 a été effectué sur quatre produits d'amplification avec les paires d'amorces suivantes : SBP1_01 forward 5'-GAGCACACTTGACTAGTC-3' (SEQ ID N° 6), SBP1_01 reverse 5'-CAGAAGCCATTGCTAGAG-3' (SEQ ID N° 7); SBP1_11 forward 5'-CACATACACAAGCACAAGCG-3' (SEQ ID N° 8), SBP1_11 reverse 5'-TATCTCGATGCCGAAGTTGTC-3' (SEQ ID N° 9); SBP1_21 forward 5'-GGTGCAATCTCACGGATAGAC-3' (SEQ ID N° 10), SBP1_21 reverse 5'-

GGTGCAATCTCACGGATAGAC-3' (SEQ ID N° 11); SBP1_31 forward 5'-CCTGAAGGAATTTGGAGCTC-3' (SEQ ID N° 12), SBP1_31 reverse 5'-CGGTAGTGATAGTAGTAAGCA-3' (SEQ ID N° 13).

Les PCR ont été réalisées dans un volume total de 50 µl avec 30 ng d'ADN génomique, le tampon Taq polymérase, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de chaque DNTP, 0,4µM de chaque amorce, 0,5 unités de Platinium Taq DNA polymerase (Invitrogen Ref 10966-018). Les conditions étaient les suivantes : 94°C pendant 2 min; 40 cycles à 94°C pendant 1 min, 56°C pendant 1 min, 72°C pendant 1 min 30; et une extension finale à 72°C pendant 7 min. Les produits d'amplification ont été vérifiés sur un gel à 1% d'agarose et le séquençage réalisé.

Une étude de polymorphisme a été effectuée sur les deux lignées Fl16 et F2. Par rapport à l'allèle de F2, l'allèle de Fl16 présente une délétion d'un codon codant pour un acide glutamique (GAG) dans le premier exon, et une insertion de 12 pb dans l'intron. Ces éléments sont tout à fait originaux et spécifiques de Fl16 (d'après une comparaison avec d'autres lignées). On a également mis en évidence une insertion de 12 pb dans la région 3' non traduite (3'UTR) chez Fl16, absente chez F2. Il est toutefois à noter que ces 12 nucléotides sont présents dans le génome de la lignée B73, étudiée par Scott-Craig et al., ou dans le génome d'autres lignées. L'allèle spécifique de Fl16 (SEQ ID N° 4) est appelé SBP1-L.

Sans être lié par cette interprétation, il est possible que l'ajout de nucléotides dans l'allèle SBP1-L mène à une plus grande instabilité de l'ARN messager, et à une dégradation importante. Il est également possible que la protéine traduite (SEQ ID N° 5) présente une activité moins importante que la protéine obtenue pour l'allèle décrit par SEQ ID N° 1, du fait de la disparition d'un acide glutamique.

Exemple 3 : Introduction de l'allèle SBP1-L dans la lignée F2

Afin d'évaluer l'effet de l'allèle SBP1-L, on a développé 140 lignées recombinantes (RIL, Recombinant Inbred Lines) entre les lignées F2 et Fl16, jusqu'à la 7ème génération. Ces lignées ont été testées pour leur digestibilité.

On a ainsi montré que le gène SBP1, situé sur le bin 2.04 colocalise avec plusieurs QTL liés à l'acide férulique. La présence de l'allèle SBP1-L provenant de Fl16 dans des lignées quasi-isogéniques (qui ne diffèrent globalement que par la présence ou l'absence de cet allèle a pour effet un contenu en acide férulique

éthérifié inférieur au contenu observé pour la lignée contenant l'allèle provenant de F2, et une meilleure digestibilité *in vitro*.

On conclut de ces données que l'allèle SBP1-L permet par lui-même de modifier la teneur en férulates (et en S possiblement) et d'améliorer la digestibilité et l'ingestibilité d'un maïs.

Exemple 4 : Sous-expression de SBP1 par transgenèse

Des plants de maïs ont été transformés par *Agrobacterium tumefaciens* par une séquence partielle du gène SBP1 (Plant Physiol 1998 : 116 : 1083-1089) dans le but d'inhiber spécifiquement l'expression de ce gène afin d'augmenter leur digestibilité.

La séquence partielle de SBP1 correspond aux nucléotides 597-1047 de SEQ ID N° 1. Ce fragment a été obtenu par PCR sur ADN génomique et cloné dans le vecteur pGEMT-easy afin d'obtenir le plasmide nommé pBIOS1428. Ce fragment PCR a ensuite été cloné dans le pENTR-1A par coupure du pBIOS1428 par *Spe*I (bouts rendus cohésifs) et *Not*I et coupure du pENTR-1A par *Xmn*I et *Not*I. Après ligation, le plasmide pBIOS1451 a été obtenu. La réaction de ligation entre pBIOS1451 et pBIOS893 a permis d'obtenir le plasmide pBIOS1461 (FIGURE 1) qui porte la séquence partielle de SBP1 en orientation sens et antisens, les deux fragments étant séparés par un intron afin de favoriser la rencontre des 2 brins complémentaires pour former un ARN double brin lors de la transcription. Ce construit permet d'inhiber l'expression du gène SBP1 par RNAi.

Le plasmide pBIOS893 est un dérivé de pSB11 (Komari *et al.*, Plant J. 10, 165-174, 1996) qui contient notamment des gènes marqueurs pour la sélection des maïs transformés, un promoteur CsVMV constitutif (Verdaguer *et al.* Plant Mol Biol 6, 1129-1139, 1996) suivi de l'intron du gène actine de riz (McElroy *et al.*, Plant Cell, (2) 163, 1990), et un site de polyadénylation Sac66 (Jenkins *et al.*, Plant Cell Environ. 22, 159-167, 1999).

pBIOS1461 a été transféré dans la souche d'*Agrobacterium* LBA4404 (pSB1) selon les dispositions de Komari *et al.*(1996, *op.cit.*) et la lignée A188 a été transformée avec la souche d'agrobactérie comme décrit par Ishida *et al.* (1996, *op.cit.*).

Les transformants sont analysés par Southern Blot afin de déterminer le nombre de copies et si possible le nombre de loci.

Des semis sur la génération T1 sont effectués afin de prélever le mésocotyle et l'hypocotyle. Ces prélèvements sont destinés à extraire les ARN afin de doser l'expression résiduelle de SBP1 dans ces tissus. On obtient donc des données transcriptomiques permettant de sélectionner les transformants dans lesquels l'expression de SBP1 est réduite et ceux ci seront utilisés pour des analyses plus poussées.

Il s'agit ensuite de phénotyper ces plantes *via* des analyses biochimiques afin de doser le contenu en acide férulique, qui intervient dans la réticulation des parois, et de vérifier l'ingestibilité et la digestibilité des plantes ainsi obtenues.

Revendications

1. Procédé pour améliorer la digestibilité et l'ingestibilité d'une plante, ainsi que sa dégradabilité pour la production de biocarburants, caractérisé en ce que l'on inhibe totalement ou partiellement l'expression et/ou l'activité dans ladite plante, d'une enzyme dénommée ci-après SBP1, dont la séquence polypeptidique possède au moins 75% d'identité avec la séquence SEQ ID N° 3.

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

3. Utilisation d'au moins un polynucléotide choisi parmi :
   a) un polynucléotide codant pour une enzyme SBP1 telle que définie dans la revendication 1 ;
   b) un polynucléotide complémentaire d'un polynucléotide a) ci-dessus ;
   c) un fragment d'au moins 12 nucléotides consécutifs, d'un polynucléotide a) ou b) ci-dessus, ou capable de s'hybrider sélectivement avec ledit polynucléotide ;
   d) un polynucléotide permettant la production d'un duplex utilisable pour l'interférence d'ARN (RNAi), ledit un polynucléotide contenant un polynucléotide X contenant au moins 12 nucléotides, de préférence au moins 15, avantageusement au moins 20, et de manière tout à fait préférée au moins 50 nucléotides capable de s'hybrider sélectivement avec un polynucléotide défini en a), ainsi qu'un polynucléotide Y complémentaire dudit polynucléotide X

   pour la mise en oeuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2.

4. Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de l'enzyme SBP1 est obtenue par mutagenèse du gène codant pour ladite enzyme.

5. Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de ladite plante avec une construction d'ADN recombinant comprenant un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

6. Cassette d'expression comprenant un polynucléotide tel que défini dans la revendication 3, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

7. Vecteur recombinant contenant une cassette d'expression selon la revendication 6.

8. Maïs susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 4, et présentant une mutation dans le gène codant pour l'enzyme SBP1 dont la séquence possède au moins 75 % d'identité avec SEQ ID N° 2, ladite mutation résultant en une inhibition de l'expression et/ou l'activité de SBP1.

9. Maïs génétiquement modifié, susceptible d'être obtenu par un procédé selon la revendication 5.

10. Procédé de sélection de maïs, caractérisé en ce qu'il comprend la recherche d'un allèle du gène de l'enzyme SBP1 possédant une mutation résultant en une amélioration de la digestibilité dudit maïs.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé ce que ledit allèle est représenté par SEQ ID N° 4.

12. Méthode pour obtenir un maïs présentant une digestibilité accrue, comprenant l'introgression de l'allèle SBP1-L dans ledit maïs, comprenant les étapes consistant à :

    a) croiser une première lignée de maïs présentant l'allèle SBP1-L avec un second maïs ne présentant pas ledit allèle,

b) effectuer un génotypage de la descendance obtenue et sélectionner les descendants présentant l'allèle SBP1-L, et optionnellement ayant le meilleur génome ratio pour ce qui est dudit second maïs,

c) effectuer un rétrocroisement desdits descendants avec ladite seconde lignée de maïs élite utilisable pour la production d'hybrides,

d) répéter si nécessaire les étapes b) et c) jusqu'à obtenir une lignée isogénique dudit second maïs, présentant l'allèle SBP1-L,

e) de façon optionnelle, effectuer une auto-fécondation afin d'obtenir une plante homozygote pour l'allèle SBP1-L.

13. Utilisation d'un maïs selon la revendication 8 ou 9, obtenu par un procédé selon la revendication 12 ou dérivé d'un tel maïs, pour la préparation d'une composition destinée à l'alimentation animale ou la préparation de biocarburants.

14. Méthode pour la préparation d'une composition destinée à l'alimentation animale comprenant l'ensilage d'un maïs selon la revendication 8 ou 9, obtenu par un procédé selon la revendication 12 ou dérivé d'un tel maïs.

15. Méthode pour la préparation de biocarburants comprenant la dégradation d'un maïs selon la revendication 8 ou 9, obtenu par un procédé selon la revendication 12 ou dérivé d'un tel maïs.

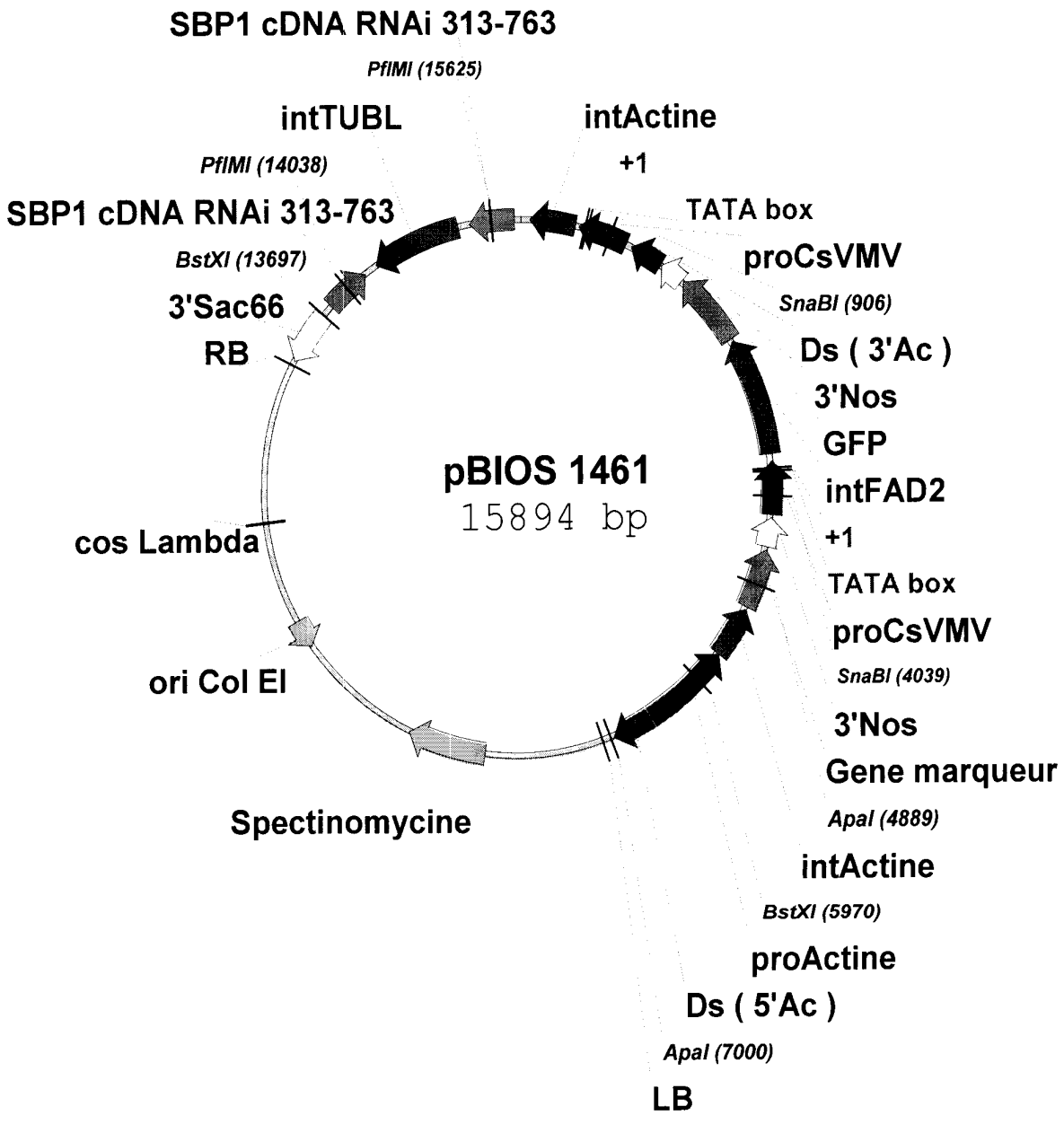

SBP1 cDNA RNAi 313-763
PflMI (15625)
intTUBL
intActine
PflMI (14038)
+1
SBP1 cDNA RNAi 313-763
TATA box
BstXI (13697)
proCsVMV
3'Sac66
SnaBI (906)
RB
Ds (3'Ac)
3'Nos
GFP
pBIOS 1461
15894 bp
intFAD2
cos Lambda
+1
TATA box
proCsVMV
ori Col El
SnaBI (4039)
3'Nos
Gene marqueur
Spectinomycine
ApaI (4889)
intActine
BstXI (5970)
proActine
Ds (5'Ac)
ApaI (7000)
LB

Figure 1

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement national

FA 712019
FR 0803622

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 973 229 A (WALTON JONATHAN D [US] ET AL) 26 octobre 1999 (1999-10-26) * revendications 1-26; séquences 1,2 * -----	6,7	C12N15/29 C12N15/82 A01H5/00 C12Q1/68 A23K1/14 C10L1/00

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)

C12N
A01H

Date d'achèvement de la recherche: 12 janvier 2009

Examinateur: Seroz, Thierry

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0803622 FA 712019

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 12-01-2009
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5973229 A	26-10-1999	AUCUN	

EPO FORM P0465