

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 14.03.00.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 21.09.01 Bulletin 01/38.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LIMAGRAIN GENETICS GRANDES  
CULTURES S.A. Société anonyme — FR et INSTITUT  
NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
INRA — FR.

⑦② Inventeur(s) : DUFOUR PHILIPPE, MURIGNEUX  
ALAIN et BECKERT MICHEL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE CONSTITUANT DES MARQUEURS DE L'ANDROGENESE VEGETALE.

⑤⑦ L'invention concerne des marqueurs de l'androgénè-  
se végétale constitués par des séquences d'acide nucléique  
dérivées de gènes exprimés différemment au cours  
l'androgénèse précoce et/ ou associées à des facteurs sé-  
lectifs impliqués dans l'androgénèse.

Ces marqueurs sont utilisables notamment pour l'obten-  
tion de plantes aptes à l'androgénèse.



L'invention concerne l'isolement et la caractérisation de séquences nucléotidiques impliquées dans l'androgenèse.

L'androgenèse, qui est également dénommée « embryogenèse des microspores » ou « embryogenèse du pollen », est un processus aboutissant à la formation d'embryons, puis de plantes, à partir de microspores.

Les microspores, cellules haploïdes présentes dans l'anthere des étamines, se développent normalement pour former des grains de pollen, au cours d'un processus dénommé microgamétogénèse. Sous l'influence de divers facteurs de stress, ce développement peut être dévié vers l'androgenèse, et aboutir à la formation d'un embryon sporophytique.

L'androgenèse peut notamment être induite *in vitro*, en soumettant à un stress des cultures d'anthers ou de microspores isolées [RAGHAVAN, *Embryogenesis in Angiosperms : A development and experimental study*, Cambridge University Press, New York, (1986)].

Une petite partie des microspores soumises à ce traitement évolue vers la formation d'un embryon. Les embryons dérivés des microspores, cultivés sur milieu de régénération, passent par les mêmes stades morphologiques que les embryons zygotiques, et aboutissent à la production de plantes haploïdes, ou, après doublement chromosomique, de double-haploïdes (DH) qui sont des plantes diploïdes homozygotes pour l'ensemble de leur génome.

Ces plantes issues de l'androgenèse présentent un intérêt tout particulier dans le cadre de l'amélioration végétale, notamment pour la sélection variétale et les analyses génétiques.

L'androgenèse permet ainsi de produire de grandes populations de lignées homozygotes. Elle facilite la sélection en offrant au sélectionneur un choix plus large, l'haplo-diploïdisation fixant les différentes recombinaisons possibles entre les caractéristiques des lignées parentales, et un choix plus sûr, le matériel étant homogène. Elle peut permettre de réduire de moitié le temps de création d'une nouvelle variété. En effet, elle permet l'obtention de

lignées pures en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations, réduisant la durée d'un cycle de sélection de 3 à 4 ans.

5 Elle est également particulièrement intéressante pour fixer rapidement des combinaisons génétiques, par exemple pour fixer un transgène dans du matériel élite.

Elle permet en outre d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants, ce qui est particulièrement intéressant en sélection.

10 Toutefois, l'aptitude à l'androgenèse et la possibilité d'obtenir des plantes double-haploïdes varie beaucoup d'une espèce à l'autre, et à l'intérieur d'une même espèce, selon le génotype de la plante dont sont issues les microspores. De très nombreux facteurs favorables ou  
15 défavorables peuvent en effet intervenir au niveau de chacune des étapes de l'androgenèse, et de la régénération des plantes à partir des embryons formés.

Dans la plupart des espèces, des distorsions de ségrégation au niveau de loci marqueurs ont été observées  
20 dans de nombreuses cartes de liaison basées sur des populations double-haploïdes. Cette observation supporte l'hypothèse de pressions de sélection variées intervenant au cours de l'androgenèse *in vitro* et pendant le développement ultérieur de la plante.

25 Différentes approches ont été proposées dans le but d'évaluer et/ou améliorer l'aptitude à l'androgenèse, notamment dans le cas de certaines plantes d'intérêt telles que le maïs, où cette aptitude est généralement faible, et dépend fortement du cultivar concerné.

30 Le brevet US 5,306,864 décrit ainsi une méthode d'obtention de maïs dont l'aptitude à l'androgenèse est augmentée, qui consiste à prélever des anthères de maïs aptes à l'androgenèse, à régénérer des plantes double-haploïdes à partir de ces anthères, à croiser les individus pour obtenir  
35 une population F1 qui est auto-pollinisée pour obtenir une population F2 présentant une aptitude à l'androgenèse supérieure d'au moins 10% à celle des parents. Il décrit également un facteur génétique, dénommé : « HAC » (pour :

high anther culturability) associé à l'aptitude à l'androgenèse. Ce facteur est lié à 4 loci chromosomiques chez le maïs ; les 2 principaux sont localisés sur les bras longs des chromosomes 3 et 9 ; 2 loci secondaires sont situés sur les chromosomes 1 et 10.

De nombreux travaux ont été effectués pour identifier des marqueurs associés à l'androgenèse. Une revue de REYNOLDS [Plant Mol. Biol., 33, pp. 1-10 (1997)] décrit les deux principales approches qui ont été utilisées. La première est basée sur l'utilisation de gènes connus pour s'exprimer pendant l'embryogenèse zygotique, en tant que sondes pour identifier des marqueurs du développement d'embryons issus du pollen ; cette approche a permis d'identifier différents gènes qui pourraient constituer des marqueurs pour différents stades de l'androgenèse. La seconde est basée sur la comparaison de l'expression des gènes pendant la microgamétogenèse et pendant l'embryogenèse des microspores ; elle a notamment permis d'identifier un gène codant une métallothionéine [REYNOLDS et KITTO, Plant Physiol., 100, 1744-1750, (1992)], et un autre codant une « Heat Shock Protein » de faible poids moléculaire [ZARSKY et al., Plant Cell Environ., 18, 139-147, (1995)], qui ont été proposés comme marqueurs moléculaires de l'androgenèse. Cependant, il n'a pas été clairement établi si ces gènes étaient effectivement impliqués dans l'androgenèse, ou si leur expression reflétait une réponse au stress et aux conditions de culture.

On ne connaît donc à l'heure actuelle, que peu de séquences associées à l'androgenèse. La présente invention a en conséquence pour but de fournir de nouvelles séquences constituant des marqueurs de l'androgenèse chez les plantes et utilisables notamment pour la détermination chez une plante de l'aptitude ou l'inaptitude à l'androgenèse.

Les Inventeurs ont ainsi identifié, par amplification sélective par PCR de fragments de restriction obtenus à partir d'ADN génomique ou d'ADNc du maïs, des séquences d'acide nucléique utilisables comme marqueurs de l'aptitude à l'androgenèse.

Il s'agit notamment de marqueurs choisis parmi :

- un fragment d'acide nucléique de 243 pb, susceptible d'être obtenu par amplification sélective par PCR à partir d'ADN génomique de maïs, à l'aide du couple

5 d'amorces sélectives suivant :

E45 : 5'- GACTGCGTACCAATTCATG

M48 : 5'- GATGAGTCCTGAGTAACAC

(les nucléotides sélectifs sont soulignés).

Ce marqueur a été identifié suite à l'analyse  
10 génétique de quatre populations (embryons androgénétiques, cals, plantules haploïdes, plantules diploïdes spontanées), en utilisant la méthode AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) décrite par VOS et al. [Nucl. Acids Res., 23, 4407-4414, (1995)]. Dans ces populations issues du croisement  
15 entre les lignées HD7 et a188, ce marqueur présente une distorsion de ségrégation extrêmement importante en faveur de la forme allélique de la lignée parentale HD7, laquelle possède les capacités androgénétiques. En conséquence, ce  
20 marqueur apparaît étroitement lié à un facteur sélectif impliqué dans l'ensemble du processus d'obtention de double-haploïdes.

- les fragments d'acide nucléique représentés dans la liste de séquences en annexe sous les numéros 1 à 53.

Ces fragments représentent des fragments d'ADNc  
25 de maïs dérivés des transcrits (FDT) de gènes identifiés par les Inventeurs comme étant exprimés différemment pendant l'androgenèse.

Pour obtenir ces fragments les Inventeurs ont analysé et comparé des profils de transcription obtenus en  
30 utilisant la technique cDNA-AFLP, avant l'induction de l'androgenèse, et au cours de premières étapes de celle-ci, dans des microspores obtenues à partir de plantes choisies pour leur aptitude à l'androgenèse.

Les principales étapes de la méthode AFLP sont  
35 rappelées ci-après : on digère l'ADN avec des enzymes de restriction ; on utilise généralement une enzyme dont les sites de coupure sont peu nombreux (habituellement EcoRI) et

une enzyme dont les sites de coupure sont fréquents (habituellement MseI). Des adaptateurs oligonucléotidiques sont ensuite ligaturés aux extrémités de ces fragments de restriction. Une pré-amplification PCR est effectuée de manière à ce que seuls les fragments comprenant un site EcoRI à une extrémité et un site MseI à l'autre extrémité soient amplifiés. Une seconde amplification sélective est ensuite effectuée en conditions stringentes, à partir du produit de la première amplification, en utilisant des amorces complémentaires de l'adaptateur, et comprenant en outre une extension 3' arbitraire de quelques nucléotides (généralement 1 à 5), dénommés « nucléotides sélectifs ». Dans ces conditions, seuls les fragments parfaitement complémentaires de la totalité de l'amorce, y compris les nucléotides sélectifs, seront amplifiés. Ainsi, une extension 3' de 1 nucléotide aboutit à l'amplification sélective de 1 fragment sur 16, et une extension 3' de 2 nucléotides aboutit à l'amplification sélective de 1 fragment sur 256, etc. Les produits d'amplification peuvent ensuite être séparés sur gel de polyacrylamide. Chaque fragment peut être défini par sa taille, et la combinaison adaptateur/nucléotides sélectifs qui a permis de l'amplifier.

Dans le cas de la technique cDNA-AFLP [BACHEM et al., Plant J., 9, 745-753, (1996)], l'ADN de départ est de l'ADNc, obtenu classiquement à partir d'ARN par transcription inverse. Après la pré-amplification et l'amplification sélective, on obtient des fragments dérivés de transcrits, qui sont ensuite séparés sur gel. L'intensité de la bande d'un FDT permet d'évaluer le niveau d'expression du transcrit correspondant.

Les inventeurs ont ainsi pu mettre en évidence un ensemble de FDTs, représentant des transcrits différentiellement exprimés au cours des premières étapes de l'androgenèse, et pouvant être regroupés en 3 populations : des transcrits sur-exprimés, des transcrits sous-exprimés, et des transcrits exprimés de façon transitoire pendant l'androgenèse.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de marqueurs de l'androgenèse végétale, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 a) l'obtention de microspores et/ou d'anthers contenant des microspores, à partir d'une plante préalablement sélectionnée pour son aptitude à l'androgenèse ;
- b) le prélèvement d'un échantillon desdites microspores et/ou d'un échantillon desdites anthers et  
10 l'obtention d'un profil de transcription, à partir de chaque échantillon prélevé ;
- c) le traitement d'au moins une partie des microspores et/ou des anthers restantes dans des conditions d'induction du développement androgénétique ;
- 15 d) optionnellement, le prélèvement d'un échantillon desdites microspores et/ou d'un échantillon desdites anthers immédiatement à l'issue du traitement de l'étape c), et l'obtention d'un profil de transcription à partir de chaque échantillon prélevé ;
- 20 e) la mise en culture d'au moins une partie des microspores et/ou des anthers traitées à l'étape c) dans des conditions aptes au développement d'embryons androgénétiques ;
- f) au moins un prélèvement, dans une période de 1  
25 à 5 jours après la mise en culture, d'un échantillon desdites microspores et/ou d'un échantillon desdites anthers à partir de ladite culture, et l'obtention d'un profil de transcription à partir de chaque échantillon prélevé ;
- 30 g) la comparaison du profil de transcription obtenu à l'étape b) avec le(s) profil(s) de transcription obtenu(s) à l'étape f) et éventuellement avec le profil de transcription obtenu à l'étape d), et la sélection de fragments dérivés de transcrits dont le niveau d'expression apparaît différent sur au moins 2 desdits profils ;
- 35 h) la purification et optionnellement le séquençage des fragments sélectionnés à l'étape g).

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, l'étape f) comprend plusieurs

prélèvements successifs. Avantageusement, au moins un desdits  
prélèvements est effectué 1 jour après la mise en culture, et  
au moins un desdits prélèvements est effectué 5 jours après  
la mise en culture. On peut ainsi, par exemple, effectuer un  
5 prélèvement quotidien pendant la totalité de la période  
suivant la mise en culture, définie ci-dessus. Si l'on  
effectue des prélèvements au delà de 5 jours, les FDTs  
obtenus ne constituent plus des marqueurs de l'induction de  
l'androgénèse, mais des marqueurs du développement des  
10 structures androgénétiques.

A l'étape g) on peut sélectionner soit la  
totalité des FDTs dont le niveau d'expression apparaît  
différent sur au moins 2 profils de transcription, soit une  
partie seulement de ces FDTs. Par exemple, on peut effectuer  
15 la sélection des FDTs correspondant à une sous-population A  
de transcrits dont l'expression est augmentée au cours de  
l'androgénèse, ou bien la sélection des FDTs correspondant à  
une sous-population B de transcrits dont l'expression est  
diminuée au cours de l'androgénèse, ou encore la sélection  
20 des FDTs correspondant à une sous-population C de transcrits  
présentant une expression transitoire au cours de  
l'androgénèse.

La présente invention a également pour objet les  
FDTs susceptibles d'être obtenus par le procédé conforme à  
25 l'invention, ainsi qu'une banque de séquences d'acide  
nucléique comprenant au moins deux desdits FDTs, de  
préférence au moins 2 à 5 FDTs, avantageusement au moins de 6  
à 20 FDTs, et de manière tout à fait préférée au moins de 21  
à 50 FDTs différents choisis parmi lesdits FDTs.

30 Pour la mise en œuvre du procédé conforme à  
l'invention, l'obtention des anthères ou des microspores  
isolées, l'induction de l'androgénèse et la mise en culture  
des anthères et des microspores sont effectués selon les  
protocoles classiques d'androgénèse, connus en eux-mêmes de  
35 l'homme de l'art.

Par exemple, on utilisera généralement du  
matériel (anthères ou microspores isolées) prélevé lorsque  
les microspores ont atteint un stade de développement compris

entre le début du stade uninucléé et la fin du stade binucléé, et de préférence, entre la fin du stade uninucléé et le début du stade binucléé, ou des microspores isolées obtenues à partir de ces anthères ; l'androgenèse peut  
5 notamment être induite en provoquant des conditions de stress, par exemple un stress thermique par le froid ou la chaleur.

Le procédé conforme à l'invention peut être mis en œuvre à partir de n'importe quelle plante, notamment une  
10 monocotylédone, et de préférence une céréale.

Les inventeurs ont choisi comme plante modèle le maïs, chez lequel l'induction du développement androgénétique peut par exemple être obtenue en maintenant la panicule au froid et à l'obscurité pendant quelques jours avant de  
15 prélever les microspores et de les mettre en culture [GAILLARD et al., Plant Cell Rep., 10, 55-58, (1991)]. Environ 1% des microspores sont alors capables de se différencier en embryons. Après 5 jours de culture, les embryons qui contiennent une centaine de cellules sont encore  
20 inclus dans la paroi de la microspore d'origine.

Les inventeurs ont purifié des ARNs à partir de prélèvements d'anthères et de microspores effectués à des stades représentant le développement androgénétique précoce :  
a) des anthères contenant des microspores, prélevées avant le  
25 traitement par le froid, et après 1 jour et 5 jours de culture en conditions permettant développement d'embryons androgénétiques ; b) des microspores isolées prélevées avant et après traitement par le froid, et après 1 jour, 2 jours, 3 jours, 4 jours, et 5 jours de culture en conditions  
30 permettant développement d'embryons androgénétiques. Ils ont comparé les populations de FDTs dérivés de ces ARNs, et sont ainsi parvenus à identifier de manière reproductible des fragments dérivés de transcrits différentiellement exprimés. Ils ont ainsi isolé 559 FDTs, exprimés pour moitié  
35 spécifiquement dans les parois cellulaires des anthères (289 FDTs) et pour l'autre moitié dans les microspores isolées ou contenues dans les anthères (270 FDTs).

Les inventeurs ont analysé plus spécifiquement 53 FDTs, qui présentaient des profils d'expression différentielle particulièrement intéressants pendant l'androgenèse, à savoir 25 FDTs présentant une augmentation d'expression, 17 FDTs présentant une répression d'expression et 11 FDTs présentant une expression transitoire.

Les séquences obtenues à partir de ces FDTs sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros 1 à 53. La présente invention englobe tout FDT, ou ensemble de FDTs choisi(s) parmi les 53 FDTs définis ci-dessus. Une banque d'acides nucléiques conforme à l'invention comprend de préférence au moins 2 à 5 FDTs, avantageusement au moins de 6 à 20 FDTs, et de manière tout à fait préférée au moins de 21 à 50 FDTs différents choisis parmi des FDTs comprenant les séquences définies dans la liste de séquences en annexe sous les numéros 1-53.

A titre d'exemples :

- une banque d'acides nucléiques conforme à l'invention peut être constituée de FDTs présentant une augmentation d'expression pendant l'androgenèse, choisis parmi les FDTs comprenant respectivement les séquences identifiées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros d'identification : 1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 6 ; 7 ; 13 ; 15 ; 17 ; 18 ; 19 ; 23 ; 25 ; 30 ; 33 ; 36 ; 37 ; 39 ; 40 ; 48 ; 49 ; 50 ; 53. Avantageusement, lesdits FDTs sont choisis parmi les FDTs comprenant les séquences : 1 ; 2 ; 5 ; 6 ; 13 ; 17 ; 23 ; 30 ; 33 ; 36 ; 37 ; 40 ; 49 et 53.

- une banque d'acides nucléiques conforme à l'invention peut être constituée de FDTs présentant une répression d'expression pendant l'androgenèse, choisis parmi les FDTs comprenant respectivement les séquences identifiées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros : 4 ; 8 ; 11 ; 12 ; 14 ; 16 ; 21 ; 26 ; 27 ; 31 ; 32 ; 34 ; 35 ; 41 ; 45 ; 46 ; 47. Des FDTs préférés sont choisis parmi ceux comprenant les séquences identifiées sous les numéros 4, 8, 11, 12, 14, 21 et 26.

- une banque d'ADNc conforme à l'invention peut être constituée de FDTs présentant une expression transitoire

pendant l'androgenèse, choisis parmi les FDTs comprenant les séquences identifiées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros : 9 ; 10 ; 20 ; 22 ; 24 ; 28 ; 29 ; 38 ; 42 ; 43 ; 44 ; 51 ; 52. Des FDTs préférés sont choisis parmi  
5 ceux comprenant les séquences identifiées sous les numéros : 9, 10, 22, 24, 28, 29, 42 et 43.

La présente invention englobe également les séquences d'acides nucléiques capables de s'hybrider en conditions stringentes avec un marqueur de l'androgenèse  
10 conforme à l'invention, et notamment avec une des séquences d'acides nucléique identifiées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros 1 à 53.

Des marqueurs de l'androgenèse conformes à l'invention peuvent notamment être utilisés dans le cadre de  
15 l'obtention de plantes et de lignées végétales aptes à l'androgenèse.

Par exemple, ils peuvent être utilisés pour évaluer le potentiel androgénétique d'une lignée végétale, ou d'une culture de microspores obtenue à partir de celle-ci.

20 Ils peuvent également être utilisés pour isoler et cloner des gènes impliqués dans l'androgenèse et/ou les séquences de régulation de ces gènes. Ils permettent notamment de cribler des banques d'ADNc ou d'ADN génomique obtenues à partir de lignées de plantes possédant une  
25 aptitude élevée à l'androgenèse, et cloner ainsi des formes alléliques de gènes impliqués dans l'androgenèse associées à cette aptitude élevée.

Les allèles favorables à l'androgenèse ainsi identifiés peuvent être séquencés, et à partir de leurs  
30 séquences, il est possible d'obtenir des séquences d'acide nucléique spécifiques de ces allèles, permettant notamment de sélectionner des lignées végétales possédant un ou plusieurs desdits allèles favorables, et donc, potentiellement aptes à l'androgenèse.

35 Alternativement, ces allèles favorables isolés et clonés peuvent être introduits chez des plantes inaptées à l'androgenèse, mais possédant par ailleurs des caractéristiques d'intérêt agronomique, afin de permettre

l'obtention, à partir de ces plantes de lignées dont le processus androgénétique serait débloqué par l'expression, la surexpression, ou la reprogrammation d'expression de ces gènes, ou de lignées double-haploïdes.

5 Des marqueurs de l'androgenèse conformes à l'invention, associés entre eux, ou à d'autres marqueurs génétiques, peuvent également être utilisés directement pour l'analyse et la cartographie génétique, notamment dans le cadre de l'identification de locus individuels affectant un  
10 caractère quantitatif ("QTL" = Quantitative Trait Loci) impliqué dans l'androgenèse.

Les marqueurs de l'androgenèse conformes à l'invention peuvent être utilisés, comme indiqué ci-dessus, non seulement chez le maïs mais également d'autres plantes,  
15 notamment des monocotylédones, et en particulier des céréales telles que le riz, le sorgho, le blé, l'orge, etc.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un exemple non-limitatif illustrant l'obtention et  
20 la caractérisation de marqueurs de l'androgenèse conformes à l'invention.

**EXEMPLE : PREPARATION D'UNE BANQUE DE FDTs UTILISABLES COMME MARQUEURS DE L'ANDROGENESE.**

**Culture d'embryons androgénétiques**

25 Des plants de maïs de la lignée haploïde doublée HD229 issue d'un hybride DH5xDH7, sont cultivés en chambre de croissance à 24°C sous une photopériode de 12 heures. Les lignées DH5 et DH7 sont des lignées androgéniques produisant approximativement 30% d'anthères embryogéniques, alors que la  
30 lignée 229 possède environ 70 à 80% d'anthères embryogéniques.

Les panicules sont prélevées juste avant l'anthèse, et le traitement par le froid, l'isolement, et la culture *in vitro* des anthères et des microspores sont  
35 effectués selon les protocoles décrits par DIEU et BECKERT [Maydica, 31, 245-259, (1986)] et améliorés par GAILLARD et al. [Plant Cell Rep., 10, 55-58, (1991)] et ANTOINE-MICHARD

et BECKERT [Plant Cell Tissue and Organe Culture, 48, 202-207, (1997)].

Les deux premiers échantillons des anthères excisées et des microspores isolées sont immédiatement collectés en conditions stériles après la récolte des panicules (I0 = témoin), congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN.

Sur les autres échantillons, les portions du panicule comprenant les anthères sont enveloppées dans une feuille d'aluminium, et placées à 7°C à l'obscurité pendant 1 à 2 semaines, afin de provoquer un stress inducteur de l'androgenèse. Les anthères excisées et les microspores isolées sont alors mises en culture *in vitro* à 28°C. Les échantillons d'anthères sont collectés après le 1<sup>er</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de culture *in vitro* (D1 et D5), congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN. Une partie de ces échantillons est cultivée pendant 6 à 8 semaines afin de noter le nombre d'anthères embryogéniques et de structures de type embryonnaire et de contrôler ainsi la réactivité de ce matériel.

Des échantillons de microspores isolées sont collectés immédiatement après le traitement par le froid, (I7), ainsi qu'après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture *in vitro* (D1, D2, D3, D4 et D5). La suspension comprenant des microspores mortes et des microspores viables est rapidement centrifugée, le liquide en excès est éliminé, et les microspores sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN.

La figure 1 représente schématiquement les différents prélèvements effectués, en les situant par rapport au processus d'androgenèse.

#### Extraction et purification de l'ARN

L'ARN total est isolé à partir d'environ 100 mg de matériel végétal, en utilisant le protocole « RNEASY MINI HANDBOOK » (QIAGEN). L'absence de dégradation de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et marquage au bromure d'éthidium ; la concentration des extraits est mesurée par spectrophotométrie et ajustée à 0,2 µg/µl. Un

traitement à la DNase I (MESSAGECLEAN kit, GENHUNTER) est effectué pour éliminer la contamination par l'ADN chromosomique ; 10 µg d'ARN total est incubé pendant 30 min à 37°C avec 10 unités de DNase I (GENHUNTER) dans un tampon DNA Digest 1x (QIAGEN). Après traitement à la DNase I, l'ARN est purifié en utilisant le protocole « RNEASY FOR RNA CLEAN-UP » (QIAGEN).

### Synthèse de l'ADNc

La synthèse du premier brin d'ADNc est effectuée à 42°C pendant 1 heure dans un volume réactionnel de 50 µl en utilisant 1 µg d'ARN total purifié, 0,4 µg de mélange d'oligonucléotides (mélange équimolaire de 3 oligonucléotides 5'-AGTGAATTCT12V-3' dans lesquels V représente A, C ou G), 2 µl de mélange de dNTPs (10 mM de chaque), 4 µl de tampon pour la transcriptase inverse 5x, 200 U de transcriptase inverse (SUPERScript II, LIFE TECHNOLOGIES), 20 U de RNasin, 40 mM de DTT. A l'issue de cette première réaction, le mélange est additionné de 10 µl de second tampon PCR 10x, 3 µl de dNTPs (10 mM de chaque), 2 U de RNase H, 25 U d'ADN polymérase I, et complété à 100 µl par addition d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate. La synthèse du second brin est effectuée à 16°C pendant 2 heures. L'ADNc est purifié en utilisant le protocole de purification « QIAQUICK » (QIAGEN), et repris dans un volume final de 100 µl.

### 25 AFLP

La moitié de la préparation d'ADNc (50 µl) est utilisée pour préparer une matrice AFLP selon la procédure classique décrite par VOS et al. [Nucl. Acids Res., 23, 4407-4414, (1995)]. L'ADNc est digéré avec EcoRI et MseI (5 U de chaque) puis ligaturé avec des adaptateurs. 20 cycles de pré-amplification sont effectués sur une aliquote du produit de ligation primaire, en utilisant les amorces EcoRI et MseI sans extensions nucléotidiques, de séquences suivantes :

amorce EcoRI (E00):  
35 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'  
amorce MseI (M00):  
5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 30 secondes de dénaturation à 94°C ;
- 30 secondes d'hybridation à 56°C ;
- 1 minute d'extension à 72°C.

Les produits d'amplification sont dilués 10 fois  
5 dans l'eau.

Une deuxième amplification est effectuée en utilisant 88 combinaisons d'amorces à 2 nucléotides sélectifs :

EcoR1 + (AA/AT/AC/AG/CA/GA/GT/GC/GG/TA/TT)  
10 Mse1 + (AA/AT/AC/AG/CA/CT/CC/CG).

Le marquage radioactif des amorces et les cycles de PCR sont effectués comme décrit par VOS et al. Toutes les amplifications PCR sont effectuées sur un thermocycleur PE-9600 (PERKIN ELMER) en utilisant l'ADN polymérase Taq  
15 (AMERSHAM). Les produits de PCR sont séparés sur un gel de séquençage standard à 5% de polyacrylamide. L'électrophorèse est effectuée en conditions standard convenant à la résolution de fragments de taille comprise entre 70 et 800 pb. Après séchage, les gels sont auto-radiographiés.  
20 Chaque expérimentation est effectuée en double, et les bandes ambiguës ont été écartées afin d'éliminer les faux positifs.

#### Profils d'expression des FDTs

Les tableaux I à III ci-après représentent les FDTs pour lesquels une différence d'expression très  
25 significative au cours du processus androgénétique a été observée pour au moins 2 des prélèvements. Lorsqu'une bande est observée, le niveau d'expression est noté de +- (bandes de faible intensité) à +++ (bandes d'intensité élevée).

I0 représente les FDTs exprimés dans les  
30 échantillons (microspores et anthères) recueillis immédiatement après la récolte des panicules.

I7 représente les FDTs exprimés dans les échantillons après 7 jours de stress froid (7°C à l'obscurité).

35 D1 représente les FDTs exprimés dans les échantillons après 1 jour de culture *in vitro*.

D2 représente les FDTs exprimés dans les échantillons après 2 jours de culture *in vitro*.

D3 représente les FDTs exprimés dans les échantillons après 3 jours de culture *in vitro*.

D4 représente les FDTs exprimés dans les échantillons après 4 jours de culture *in vitro*.

5 D5 représente les FDTs exprimés dans les échantillons après 5 jours de culture *in vitro*.

Les FDTs pour lesquels on observe une surexpression au cours de l'androgenèse sont indiquées dans le Tableau I ci-après :

10

TABLEAU I

FDT	SEQ ID NO	Anthères			Microspores isolées						
		I0	D1	D5	I0	I7	D1	D2	D3	D4	D5
E01	1		-+	++				-+	+	++	++
E02	2			+++				+	++	+++	+++
E03	3		+	++			-+	+	++	+++	+++
E05	5		-+	+			+	+	+	+	+
E08	6	+	++	+++		-+	+	+	+	++	++
E13	7	++	++	++			++	++	++	++	++
E19	13		+	++		+	++	++	++	++	+++
E21	15	+++	+++	+++			++	++	++	++	++
E23	17		-+	+++	-+	-+	+	+	++	+++	+++
E24	18		-+	+		+	+	+	++	+++	+++
E25	19	+	++	+++			+	+	++	++	++
E29	23	+	+	++	-+	-+	++	+++	+++	+++	+++
E32	25		+		-+	++	++	++	++	++	++
E37	30		++	++			+	+	+	+	+
E41	33		+	+		++	++	++	++	++	++
E47	36	++	++	++	-+	-+	+	+	++	++	++
E49	37		+++	+++			++	++	++	++	++
E51	39	+	+	+			+	+	+	+	+
E52	40	+	++	++		-+	++	++	++	++	++
E63	48	+	++	+++			++	++	++	++	+
E64	49					-+	+	+	++	++	++
E65	50		+	+		+	+	+	+	++	++
E70	53			+			-+	-+	+	+	++

Les FDTs sous-exprimés au cours de l'androgenèse sont indiqués dans le Tableau II ci-dessous :

TABLEAU II

FDT	SEQ ID NO	Anthères			Microspores isolées						
		I0	D1	D5	I0	I7	D1	D2	D3	D4	D5
E04	4	+			++	+	+	+	-+	-+	-+
E14	8	+	+	-+	++	++	++	+	+	+	-+
E17	11	+	+		++	++	+	+	+	+	+
E18	12	+++	++	+	+++	+++	++	++	++	+	+
E20	14	++	+	-+	+++	+++	++	++	++	+	+
E22	16	+	+	+	++		+	+	+	-+	-+
E27	21	++			++	-+					
E33	26				+	+	+	+	+		
E34	27	+	+	+	++		++	++	+	+	+
E38	31	+	+		++		+	+	+	+	-+
E40	32	-+			+	+	+	+	-+		
E42	34	++	++	+	++	++	++	++	++	+	+
E43	35	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
E53	41	+	+	+	++		++	+	-+	-+	-+
E57	45	++	+	-+	+	++	+	+	+	-+	-+
E60	46	+	+	+	++		++	+	+	+	
E61	47	+	+	+	+		+	+	-+		

Les FDTs exprimés de façon transitoire au cours de l'androgenèse sont indiqués dans le Tableau III ci-dessous :

5

TABLEAU III

FDT	SEQ ID NO	Anthères			Microspores isolées						
		I0	D1	D5	I0	I7	D1	D2	D3	D4	D5
E15	9					+	++	++	++	+	+
E16	10		++	++		+	++	++	+	+	+
E26	20	++	++	++			-+	+	+	+	-+
E28	22	+	++	-+	+	-+	++	++	++	+	+
E30	24	+	++	++	-+	+	++	++	++	+	+
E35	28	+	++	++	-+	+	++	++	++	+	+
E36	29		++				+	++	+		
E50	38				+	++	++	+	-+		
E54	42	-+	+	+		+	++	+	-+		
E55	43		-+			+	+	+	-+		
E56	44	-+	+	-+	-+	+	+	+	+	-+	-+
E67	51	-+	+	-+	-+	++	++	++	++	++	+
E68	52	+	+++	+			-+	+	++	++	+

### Isolement et analyse des fragments obtenus

Les bandes d'intérêt, correspondant aux FDTs indiqués dans les tableaux ci-dessus, ont été excisées à partir du gel. Les fragments de gel ont été placés dans des tubes de micro-centrifugation avec 100 µg d'eau pendant 1 heure et portés à ébullition pendant 10 min. 5 µl des fragments d'ADNc ainsi élués ont été à nouveau amplifiés en utilisant les conditions de PCR et les amorces déjà utilisées dans la 1<sup>ère</sup> étape de pré-amplification décrite ci-dessus. 10 µl de chaque produit de PCR ont été analysés sur un gel 1,5% agarose - bromure d'éthidium, puis séquencés.

15

La liste suivante indique les caractéristiques des FDTs isolés

La combinaison d'amorces sélectives utilisées, et la taille du fragment sur le gel de séquençage sont indiqués entre parenthèses. La taille du fragment séquencé et le numéro d'identification dans la liste de séquences en annexe sont également indiqués.

	E01 :	(AA/AA-310)	;	247bp	;	SEQ ID NO :1
	E02 :	(AA/AA-250)	;	186bp	;	SEQ ID NO :2
10	E03 :	(AA/AA-90)	;	42bp	;	SEQ ID NO :3
	E04 :	(AA/AT-250)	;	197bp	;	SEQ ID NO :4
	E05 :	(AA/AT-120)	;	92bp	;	SEQ ID NO :5
	E08 :	(AA/CA-320)	;	211bp	;	SEQ ID NO :6
	E13 :	(AT/AG-230)	;	181bp	;	SEQ ID NO :7
15	E14 :	(AT/CA-110)	;	71bp	;	SEQ ID NO :8
	E15 :	(AT/CC-450)	;	403bp	;	SEQ ID NO :9
	E16 :	(AT/CC-300)	;	226bp	;	SEQ ID NO :10
	E17 :	(AT/CC-190)	;	155bp	;	SEQ ID NO :11
	E18 :	(AC/AT-205)	;	132bp	;	SEQ ID NO :12
20	E19 :	(AC/AT-225)	;	197bp	;	SEQ ID NO :13
	E20 :	(AC/AT-250)	;	209bp	;	SEQ ID NO :14
	E21 :	(AC/AC-270)	;	237bp	;	SEQ ID NO :15
	E22 :	(AC/CA-260)	;	215bp	;	SEQ ID NO :16
	E23 :	(AG/AT-90)	;	51bp	;	SEQ ID NO :17
25	E24 :	(AG/AG-190)	;	150bp	;	SEQ ID NO :18
	E25 :	(AG/CT-410)	;	105bp	;	SEQ ID NO :19
	E26 :	(AG/CT-160)	;	104bp	;	SEQ ID NO :20
	E27 :	(AG/CT-90)	;	64bp	;	SEQ ID NO :21
	E28 :	(AG/CC-210)	;	163bp	;	SEQ ID NO :22
30	E29 :	(CA/AA-90)	;	71bp	;	SEQ ID NO :23
	E30 :	(CA/AT-320)	;	274bp	;	SEQ ID NO :24
	E32 :	(GA/AA-125)	;	93bp	;	SEQ ID NO :25
	E33 :	(GA/AT-330)	;	184bp	;	SEQ ID NO :26
	E34 :	(GA/AT-190)	;	163bp	;	SEQ ID NO :27
35	E35 :	(GA/AC->800)	;	564bp	;	SEQ ID NO :28
	E36 :	(GA/AG-110)	;	77bp	;	SEQ ID NO :29
	E37 :	(GA/CA-260)	;	234bp	;	SEQ ID NO :30
	E38 :	(GA/CT-350)	;	151bp	;	SEQ ID NO :31

	E40	:	(GA/CC-315)	;	289bp	;	SEQ ID NO :32
	E41	:	(GT/AT-85)	;	41bp	;	SEQ ID NO :33
	E42	:	(GT/AC-350)	;	270bp	;	SEQ ID NO :34
	E43	:	(GT/AC-340)	;	308bp	;	SEQ ID NO :35
5	E47	:	(GT/CA-390)	;	343bp	;	SEQ ID NO :36
	E49	:	(GT/CC-205)	;	172bp	;	SEQ ID NO :37
	E50	:	(GT/CT-90)	;	46bp	;	SEQ ID NO :38
	E51	:	(GT/CG->800)	;	380bp	;	SEQ ID NO :39
	E52	:	(GC/AA-280)	;	256bp	;	SEQ ID NO :40
10	E53	:	(GC/AA-145)	;	105bp	;	SEQ ID NO :41
	E54	:	(GC/AT-490)	;	521bp	;	SEQ ID NO :42
	E55	:	(GC/AT-195)	;	129bp	;	SEQ ID NO :43
	E56	:	(GC/AT-165)	;	128bp	;	SEQ ID NO :44
	E57	:	(GC/AC-410)	;	319bp	;	SEQ ID NO :45
15	E60	:	(GC/CG-330)	;	179bp	;	SEQ ID NO :46
	E61	:	(GG/AT-320)	;	177bp	;	SEQ ID NO :47
	E63	:	(TA/AA-200)	;	148bp	;	SEQ ID NO :48
	E64	:	(TA/AC-500)	;	430bp	;	SEQ ID NO :49
	E65	:	(TA/AC-150)	;	115bp	;	SEQ ID NO :50
20	E67	:	(TA/CC-280)	;	214bp	;	SEQ ID NO :51
	E68	:	(TT/AT-130)	;	98bp	;	SEQ ID NO :52
	E70	:	(TT/CC-400)	;	254bp	;	SEQ ID NO :53

### Analyse des séquences

Les séquences obtenues ont été analysées en recherchant leur homologie avec des séquences présentes sur les bases de données. La recherche a été effectuée à partir des bases disponibles sur le site Internet de l'EMBL en utilisant le programme BLAST2 [ALTSCHUL et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) ; GISH et al., Nat. Genet., 3, 266-272 (1993)]. L'identité supposée est considérée comme significative lorsque la « P-value » (probabilité de poisson de BLAST) est inférieure à  $1 \times 10^{-5}$  et le score de similarité optimisé de FASTA supérieur à 100 [NEWMAN et al., Plant Physiol., 106, 1241-1255, (1994)].

Cette analyse a permis de mettre en évidence l'existence d'homologies significatives pour les FDTs suivants :

FDTs sous-exprimés au cours de l'androgénèse :

- E04 (SEQ ID NO:4) : une grande partie de la séquence SEQ ID NO:4 code pour un polypeptide correspondant à une protéine kinase sérine/thréonine hypothétique. 40  
5 séquences d'acides aminés et 1 séquence nucléotidique présentant une homologie significative avec cette séquence ont été identifiés sur les bases de données. L'homologie la plus importante est observée avec une protéine hypothétique de 41 kD. Parmi les autres séquences, 24 correspondent à des  
10 BACs d'*A. thaliana*, possédant un fragment correspondant à une protéine kinase sérine/thréonine hypothétique.

Des homologies au niveau de séquences caractéristiques des protéine-kinases ont également été constatées avec ARSK1, avec l'homologue CTRL de la protéine-  
15 kinase Raf, et avec les gènes APK1b d'*Arabidopsis*, ainsi qu'avec un BAC de riz localisé sur le chromosome 4 à proximité du marqueur CD0539 (chromosome 2S et 10S du maïs), avec des séquences de tomates appartenant à la famille du gène Pto (gène fen et pto), et avec les gènes ltk, lk2 et pk3  
20 du maïs.

Le rôle des protéines kinases récepteurs (RPKS) dans le développement des plantes a fait l'objet d'une revue récente par BECRAFT [Trends in plant science, 3(10), 384-388, (1998)]. Elles constituent des composants de voies de  
25 transduction du signal qui élicitent des réponses cellulaires à une information extracellulaire. En ce qui concerne plus particulièrement l'embryogenèse ou le pollen, un gène SERK (somatic embryogenesis receptor-like kinase) a été identifié comme s'exprimant spécifiquement dans des cultures  
30 embryogéniques de cellules de carottes [SCHMIDT et al., Development, 124, 2049-2062, (1997)]. Il a été observé que l'expression de SERK était associée à la capacité embryogénique, cependant la nature du signal initiant la réponse embryogénique n'a pas été déterminée. MU et al.  
35 [Plant Cell, 6, 709-721, (1994)] ont observé l'expression d'un gène PRK1 dans le pollen mature et dans les tubes polliniques en croissance de *Petunia inflata*. Il a également été observé que l'expression d'un ADNc antisens de PRK1

induisait 50% d'avortement de la maturation du pollen par  
arrêt des cellules au stade uninucléé [LEE et al., The Plant  
Journal, 9, 613-624, (1996)]. Enfin, il a été montré qu'un  
5 membre de la famille des kinases GSK-3 jouait un rôle dans le  
développement du pollen chez le tabac [EINZENBERGER et al.,  
Biochem. Biophys. Acta., 1260, 315, (1995)].

En ce qui concerne plus particulièrement les  
gènes identifiés par leur homologie avec la séquence  
SEQ ID NO: 4 :

10 \* Les gènes Pto et Fen de la tomate codent des  
kinases actives, qui confèrent respectivement la résistance à  
*Pseudomonas syringae*, et la sensibilité à l'insecticide  
« Fenthion » [LOH et MARTIN, Plant Physiol., 108(4), 1735-  
1739, (1995) ; JIA et al., Plant Cell 9(1), 61-73, (1997)].  
15 La réponse hypersensible induite par un pathogène et la  
sensibilité au fenthion se manifestent, de manière similaire  
par une nécrose de cellules. Ainsi, E04 pourrait représenter  
l'homologue chez le maïs d'un ADNc impliqué dans la mort  
cellulaire observée chez une majorité de microspores au cours  
20 des étapes précoces de l'androgenèse (isolement et induction  
du stress).

\* La famille de gènes ltk a été décrite par LI et  
WURTZEL (Plant Molecular Biology, 37, 749-761, (1998)]. Les  
transcrits de ltk1 ont été observés chez le maïs dans les  
25 feuilles, les racines, l'embryon et l'endosperme et les  
transcrits de ltk2 ont été détectés seulement dans  
l'endosperme, ce qui suggère que les protéines ltk peuvent  
jouer un rôle dans le développement de l'endosperme et la  
maturation des graines (établissement de la dormance). Les  
30 phases de maturation et de dormance sont associées avec une  
tolérance à la dessiccation de l'embryon et de la couche  
d'aleurone de l'endosperme. En outre, le développement de  
l'endosperme se caractérise par une répression de la division  
cellulaire à partir de 10 jours après la pollinisation. Les  
35 protéines ltk pourraient transduire des signaux impliqués  
dans la régulation de la division cellulaire (ltk2 dans  
l'endosperme et ltk1 dans l'ensemble de la plante).

\* Le gène ARSK1 a été cloné et caractérisé par HWANG et GOODMAN [Plant. J. 8(1), 37-43, (1995)]. L'expression de ce gène est augmentée spécifiquement dans les racines par la sécheresse (exposition à l'air), et les  
5 traitement par l'acide abscissique (ABA) ou le NaCl. Ceci suggère que ARSK1 pourrait être impliqué dans la réponse cellulaire au déficit en eau causé par la sécheresse ou une salinité élevée (le niveau élevé de l'expression d'ARSK1 est réduit par la réhydratation des racines). L'un des principaux  
10 changements physiologiques observés chez les plantes en association avec un stress par dessiccation ou un stress osmotique est une augmentation du niveau d'acide abscissique. Il a été montré que l'acide abscissique était associé à l'expression du gène de la métallothionéine marqué par la  
15 cystéine pendant les stades précoces de l'embryogenèse des microspores chez le blé [REYNOLDS et CRAWFORD, Plant Molecular Biology, 32, 823-829, (1996)].

\* Le gène CTRL1 a été décrit chez *Arabidopsis* comme un régulateur négatif de la voie de réponse à  
20 l'éthylène [KIEBER et al., 72, 427-441, (1993)]. La biosynthèse d'éthylène est induite par le dessèchement, les maladies, ou par des stress mécaniques. En outre, les microspores isolées et les anthères sont cultivés en culture stérile dans des conditions d'échange gazeux limitées où  
25 l'éthylène peut s'accumuler à haut niveau. Il a été montré que l'éthylène influençait de nombreux processus intervenant dans la croissance et le développement des plantes. Il a ainsi été montré qu'elle inhibaient la gamétogenèse mâle chez certaines espèces [DAHNOUS et al., Agro. J., 74, 580-582,  
30 (1982)] ; il a également été rapporté que l'éthylène peut inhiber l'élongation cellulaire par l'intermédiaire de la réorientation des microtubules [STEEN et CHADWICK, (1981) ; ROBERTS et al., (1985)]. Il a également été observé que le gène CTRL1 était étroitement apparenté à la famille des  
35 protéines-kinases Raf. Dans des cellules humaines, Raf1 a été identifié comme activateur d'une autre kinase qui phosphoryle les protéines-kinases activées par les mitogènes (et impliquées dans la mitose et la division cellulaire)

[KYRIAKIS et al., Nature, 358, 417-421, (1992)]. En conséquence, E04 pourrait également représenter un gène impliqué dans la transmission de la réponse à l'éthylène.

5 - E17 (SEQ ID NO: 11) correspond à une portion d'ARN messenger de *Lilium longiflorum*.

2 séquences d'acides aminés et 3 séquences nucléotidiques montrant des homologies significatives avec cette séquence ont été identifiées. L'homologie la plus forte est observée avec une portion du gène LIM16, cloné par 10 KOBAYASHI et al. [DNA Res., 1(1), 15-26, (1994)] à partir de microsporocytes de *Lilium longiflorum* en prophase méiotique. Il a été observé que ce gène s'exprimait au stade précoce de la méiose (stade zygotène de la prophase méiotique) et que son expression continuait à être détectée tout au long de la 15 méiose avec une intensité plus faible.

- E33 (SEQ ID NO: 27) correspond à une portion du génome du maïs contenant des rétro-éléments (PREM-1).

4 séquences nucléotidiques possédant une homologie significative avec cette séquence ont été 20 identifiées. Les homologies les plus importantes sont observées avec un ADNc de maïs comprenant une région d'homologie avec le rétro-élément PREM-1 [TURCICH et MASCARENHAS, Sex. Plant Reprod., 7, 2-11, (1994)]. La comparaison du reste de la séquence sans la séquence Prem-1 25 ne fait apparaître aucune homologie avec les produits de gènes connus.

Tous les rétrotransposons actifs des plantes sont quiescents pendant le développement, mais activés par le stress, y compris les blessures, l'attaque par les pathogènes 30 et la culture de cellules [HIROCHIKA et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(15), 7783-7788, (1996) ; GRANDBASTIEN, Trends in Plant Science, 3(5), 181-187, (1998) ; WESSLER, Curr. Biol., 6(8), 959-961, (1996)].

Ceci peut refléter une stratégie de survie de la 35 plante, ou bien les rétrotransposons peuvent constituer des générateurs, induits par le stress, de diversité génomique. L'activation des rétrotransposons est une cause importante de mutations induites par la culture de tissus, et peut

constituer un outil utile pour la mutagenèse d'insertion et l'analyse fonctionnelle des gènes.

Les séquences Prem-1 sont les LTRs d'une famille de rétroéléments putatifs, et sont principalement transcrits pendant le développement du pollen (niveaux les plus élevés dans les microspores uniclées précoces). Le profil d'expression observé pour les transcrits contenant Prem-1 suggèrent qu'ils peuvent comprendre des éléments de régulation en cis, tels que Ttol.

Le rétrotransposon du tabac Ttol est l'un des quelques rétrotransposons LTR actifs chez les plantes. Sa transposition est activée par la culture de tissus et principalement régulée au niveau transcriptionnel. Il a été démontré qu'un motif répété de 13-bp (TGGTAGGTGAGAT) dans le LTR fonctionne comme un élément de régulation en cis, qui confère la réactivité à la culture de tissus, aux blessures et au méthyl jasmonate. Ce motif de 13-bp contient un motif conservé : la Boîte L, également dénommée AC-I ou « H-box like sequence » dont l'implication dans l'expression des gènes de synthèse des phénylpropanoïdes a été montrée [TAKEDA et al., Plant J., 18(4), 383-393, (1999); TAKEDA et al., Plant. Mol. Biol., 36(3), 365-376, (1998)].

E53 (SEQ ID NO: 41) correspond à un fragment d'un gène de la famille du cytochrome P450.

2 séquences d'acides aminés et 531 séquences nucléotidiques possédant des homologies significatives avec la séquence SEQ ID NO: 41 ont été identifiées. En ce qui concerne les protéines, l'homologie la plus forte est observée avec une portion du gène de la monooxygénase de cytochrome P450 de maïs (cf. E16 ci-dessous).

FDTs sur-exprimés au cours de l'androgenèse :

- E08 (SEQ ID NO: 6) correspond à un fragment d'une cellulose synthase. 15 séquences d'acides aminés et 20 séquences de nucléotides présentant une homologie significative avec cette séquence ont été identifiées. En ce qui concerne les protéines, l'homologie la plus forte est observée avec une portion du gène celA3 de coton. Des homologies ont également été observées avec la sous-unité

catalytique du gène RSW1 d'*Arabidopsis* et du riz, ainsi qu'avec les sous-unités catalytiques des gènes ATH-A, ATH-B et IRX3 d'*Arabidopsis*, avec les gènes *celA1* et *celA2* du coton, et avec les gènes *cell* et *celA* du peuplier [ARIOLI et al., Science, 279(5351), 717-720, (1998) ; PEAR et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(22), 12637-12642, (1996) ; TAYLOR et al., Plant Cell 11(5), 769-780, (1999) ; WU et al., Plant Physiol., 117(3), 1125, (1998) ; WANG et LOOPSTRA, Plant Physiol., 118(3), 1101, (1998) ; CHAPPLE et al., Curr. Opin. Plant Biol., 1(2), 179-185, (1998) , HAIGLER et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 93(22), 12082-12085, (1996) ; REITER, Trends in Plant Sciences, 3(1), 27-32, (1998) ; DELMER, Trends in Plant Sciences, 3(5), 164-165, (1998); ARIOLI et al., Trends in Plant Sciences, 3(5), 165-166, (1998)].

- E47 (SEQ ID NO: 36) correspond à un fragment d'une séquence codant pour une phosphoribosylanthranilate transférase hypothétique.

6 séquences d'acides aminés et 16 séquences nucléotidiques montrant des homologues significatives avec la séquence SEQ ID NO: 36 ont été identifiées. Les homologues les plus importantes sont observées avec une phosphoribosylanthranilate transférase putative du pois (n° d'accès D86180). Cette enzyme fait partie du système de biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane. Elle convertit le N-(5-phospho-D-ribosyl)-anthranilate + pyrophosphate en anthranilate + 5-phospho- $\alpha$ -D-ribose 1-diphosphate [ROSE et al., Plant Physiol., 100, 582-592, (1992) ; RADWANSKI et LAST, The Plant Cell., 7, 921-934, (1995)]. CONKLIN et al. [Plant. Physiol., 109(1), 203-212, (1995)] ont observé chez *Arabidopsis thaliana* exposée à un stress oxydatif par l'ozone, l'accumulation de divers ARNm, parmi lesquels celui codant la phosphoribosylanthranilate transférase. La voie de biosynthèse du tryptophane conduit à la production de nombreux métabolites secondaires aux fonctions diverses, et sa régulation est supposée répondre aux besoins de la synthèse des protéines et du métabolisme secondaire. La

régulation des enzymes de la voie du tryptophane en conditions de carence en acides aminés est principalement une réponse au stress [[ZHAO et al., *The Plant Cell*, 10, 359-370, (1998)].

5 Une autre homologie intéressante a été observée avec un clone d'ADNc de graines immatures de riz, dont l'annotation fait référence à une métallothionéine (5 jours après pollinisation - AA754438 - 1<sup>e</sup>-41). L'expression d'un gène de métallothionéine de classe II pendant l'embryogenèse  
10 du pollen a déjà été observée par REYNOLDS et al. [*Plant Molecular Biology*, 32, 823-829, (1996)].

- E51 (SEQ ID NO: 39) correspond à un fragment d'une arabinosidase.

4 séquences d'acides aminés et 7 séquences  
15 nucléotidiques montrent des homologies significatives avec la séquence SEQ ID NO: 39. Les homologies sont observées principalement avec une séquence hypothétique d'arabinosidase.

L'arabinosidase intervient dans le métabolisme  
20 des sucres des nucléotides. Elle convertit l' $\alpha$ -L-arabinofuranoside en  $\alpha$ -L-arabinoside [STOLLE-SMITS et al., *Plant Physiol.*, 121(2), 363-372, (1999) ; BIH et al., *J. Biol. Chem.* 274(32), 22884-22894, (1999) ; BLACK et al., *J. Biotechnol.*, 57(1-3), 59-69, (1997)].

25 FDTs exprimés de façon transitoire au cours de l'androgenèse

- E16 (SEQ ID NO: 10) correspond à un fragment d'un gène de la famille du cytochrome P450. 187 séquences d'acides aminés et 22 séquences nucléotidiques possédant des homologies significatives avec la séquence SEQ ID NO: 10 ont  
30 été identifiées. En ce qui concerne les protéines, l'homologie la plus forte est observée avec une portion du gène P450 hypothétique de la pomme de terre. En ce qui concerne plus particulièrement la famille P450, des homologies ont été notées avec la férulate-5-hydroxylase,  
35 l'aldéhyde-5-hydroxylase, la trans-cinnamate-4-monooxygénase, la dihydrokaempferol hydroxylase, la bermamunine synthase, la flavonoïde 3',5'-hydroxylase, la (S)-N-méthylcoclaurine 3'-hydroxylase et la flavone synthase II. Toutes ces protéines

participent à la voie de synthèse des flavonoïdes [PAULI et  
KUTCHAN, Plant J., 13(6), 793-801, (1998) ; KRAUS et KUTCHAN,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(6), 2071-2075, (1995) ;  
OSAKABE et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 8955-8960,  
5 (1999) ; MEYER et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(14),  
6869-6874, (1996) ; MITZUTANI et al., Plant Mol. Biol.,  
37(1), 39-52, (1998) ; FREY et al., Mol. Gen. Genet., 246,  
100-109, (1995) ; HELLIWEL et al., Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA, 95, 9019-9024, (1998) ; FRANK et al., Plant Physiol.,  
10 110(3), 1035-1046, (1996) ; HUMPHREYS et al., Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA, 96(18), 10045-10050, (1999) ; MARITA et al.,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(22), 12328-12332, (1999) ;  
Meyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(12), 6619-6623,  
(1998) ; RUEGGER et al., Plant Physiol., 119(1), 101-110,  
15 (1999)].

- E30 (SEQ ID NO: 24) correspond à un fragment  
d'une protéine apparentée à une cyanohydrine lyase.

5 séquences d'acides aminés et 1 séquence  
nucléotidique possédant une homologie significative avec  
20 cette séquence ont été identifiées. En ce qui concerne les  
protéines, l'homologie la plus importante est observée avec  
une portion d'une protéine hypothétique d'*Arabidopsis*  
apparentée aux cyanohydrine lyases. Cette enzyme (EC  
4.2.1.39) intervient dans le métabolisme des carbohydrates et  
25 dans le cycle des pentose phosphates. Elle convertit le D-  
gluconate en 2-déhydro-3-déoxy-D-gluconate-6P.

- E35 (SEQ ID NO: 28) et E54 (SEQ ID NO: 42)  
correspondent à un fragment d'un gène de nitrilase.

16 séquences d'acides aminés et 29 séquences  
30 nucléotidiques présentant des homologies significatives avec  
la séquence SEQ ID NO: 28, et 12 séquences d'acides aminés et  
27 séquences nucléotidiques présentant des homologies  
significatives avec la séquence SEQ ID NO: 42 ont été  
identifiés.

35 En ce qui concerne les protéines, les homologies  
les plus importantes ont été observées avec les gènes de la  
famille nitrilase. En particulier, des homologies ont été  
observées avec les gènes NIT1, NIT2, NIT3 et NIT4

d'arabidopsis, avec le gène ONIT4 du riz, et avec le gène TNIT 4 du tabac.

La nitrilase pourrait être une enzyme clé dans la voie de biosynthèse des auxines. Elle convertit l'indole-3-acétonitrile (IAN) en une auxine, l'acide indole-3-acétique (IAA). Les auxines sont une classe de phytohormones qui jouent un rôle central dans le développement des plantes. En particulier, elles sont impliquées dans l'élongation et la division cellulaire. Les nitrilases sont aussi impliquées dans le métabolisme des cyanoamino acides (nitrile → carboxylate /  $\alpha$ -amino-propionitrile → alanine /  $\gamma$ -amino- $\gamma$ -cyanobutanoate → glutamate) et celui de l'azote (nitrile → carboxylate). [BARTEL et FINK, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(14), 6649-6653, (1994 ; BARTLING et al., Eur. J. Biochem., 205(1), 417-424, (1992) ; BARTLING et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(13), 6021-6025, (1994) ; QUIRINO et al., Plant. Mol. Biol., 40(2), 267-278, (1999) ; NORMANLY et al., Curr. Opin. Plant. Biol., 2(3), 207-213, (1999) ; HILLEBRAND et al., Plant. Mol. Biol., 36(1), 89-99, (1998) ; NORMANLY et al., Plant Cell., 9(10), 1781-1790, (1997) ; KOBAYASHI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90(1), 247-251 (1993).]

FDTs d'origine ribosomale ou mitochondriale :

- E34 (SEQ ID NO: 27), E52 (SEQ ID NO: 40) et E60 (SEQ ID NO:46) correspondent à des portions d'ARN ribosomaux.

250 EST et 3871 séquences génomiques possédant une homologie significative avec la séquence SEQ ID NO: 27 ont été identifiées. Les homologies les plus importantes sont observées avec les séquences d'ARN ribosomaux 17S et 18S.

1969 EST et 200 séquences génomiques présentant une homologie significative avec la séquence SEQ ID NO: 40 ont été identifiées. Des homologies sont plus particulièrement observées avec les séquences d'ARN ribosomal 26S.

250 EST et 320 séquences génomiques présentant une homologie significative avec la séquence SEQ ID NO: 46 ont été identifiées. Des homologies sont en particulier observées avec les séquences d'ARN ribosomaux des sous-unités 25S et 18S.

- E05 (SEQ ID NO: 5) représente la séquence nucléotidique d'une portion du gène mitochondrial matR. 9 séquences nucléotidiques parmi celles identifiées dans les bases de données possèdent des homologies significatives avec  
5 cette séquence. L'homologie la plus importante est observée avec un gène codant la protéine mat-r (protéine apparentée à une maturase) mitochondriale FRB73 de *Zea maïs*.

Le cadre ouvert de lecture mat-R code une protéine qui apparaît très similaire aux maturases (protéines  
10 nécessaires à l'épissage de l'ARN) [THOMSON et al., *Nucleic Acids Res.*, 22(25), 5745-5752, (1994) ; BEGU et al., *Curr. Genet.*, 33(6), 420-428, (1998) ; FARRE et ARAYA, *Plant Mol Biol.*, 40(6), 959-967, (1999) ; WAHLEITHNER et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87(2), 548-552, (1990)].

15 - E38 (SEQ ID NO: 31) correspond à un fragment d'une séquence codant une protéine mitochondriale S13 de maïs.

2 séquences d'acides aminés et 16 séquences nucléotidiques possédant une homologie significative avec la  
20 séquence SEQ ID NO: 31 ont été identifiées. Les homologies les plus importantes sont observées avec un ADN mitochondrial codant la protéine ribosomale S13 [WILLIAMS et al., *Curr. Genet.*, 34(3):221-6 (1998) ; BONEN, *Nucleic Acids Res.*, 15(24), 10393-10404, (1987)].

25 La comparaison des autres séquences avec les bases de données n'a fait apparaître aucune similitude avec des produits de gènes connus.

## REVENDICATIONS

1) Marqueur de l'androgenèse végétale constitué par un fragment d'acide nucléique susceptible d'être obtenu à partir d'ADN génomique ou d'ADNc de maïs, et choisi parmi :

5                   - un fragment d'acide nucléique de 243 pb, susceptible d'être obtenu par amplification sélective à partir d'ADN chromosomique de maïs, à l'aide du couple d'amorces sélectives suivant :

E45 : 5' - GACTGCGTACCAATTCATG

10 M48 : 5' - GATGAGTCCTGAGTAACAC

- les fragments d'ADNc de maïs identifiés dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 1 à SEQ ID NO: 53 ;

2) Procédé d'obtention de marqueurs de l'androgenèse végétale, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

a) l'obtention de microspores et/ou d'anthères contenant des microspores, à partir d'une plante préalablement sélectionnée pour son aptitude à l'androgenèse ;

b) le prélèvement d'un échantillon desdites microspores et/ou d'un échantillon desdites anthères et l'obtention d'un profil de transcription, à partir de chaque échantillon prélevé ;

25 c) le traitement d'au moins une partie des microspores et/ou des anthères restantes dans des conditions d'induction du développement androgénétique ;

d) optionnellement, le prélèvement d'un échantillon desdites microspores et/ou d'un échantillon desdites anthères immédiatement à l'issue du traitement de l'étape c), et l'obtention d'un profil de transcription à partir de chaque échantillon prélevé ;

35 e) la mise en culture d'au moins une partie des microspores et/ou des anthères traitées à l'étape c) dans des conditions aptes au développement d'embryons androgénétiques ;

f) au moins un prélèvement, dans une période de 1 à 5 jours après la mise en culture, d'un échantillon desdites

microspores et/ou d'un échantillon desdites anthères à partir de ladite culture, et l'obtention d'un profil de transcription à partir de chaque échantillon prélevé ;

5 g) la comparaison du profil de transcription obtenu à l'étape b) avec le(s) profil(s) de transcription obtenu(s) à l'étape f) et éventuellement avec le profil de transcription obtenu à l'étape d), et la sélection de fragments dérivés de transcrits dont le niveau d'expression apparaît différent sur au moins 2 desdits profils ;

10 h) la purification et optionnellement le séquençage des fragments sélectionnés à l'étape g).

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'étape f) comprend plusieurs prélèvements successifs.

15 4) Procédé selon une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que l'on sélectionne, à l'étape g) les transcrits dont l'expression est augmentée au cours de l'androgénèse.

20 5) Procédé selon une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que l'on sélectionne, à l'étape g) les transcrits dont l'expression est diminuée au cours de l'androgénèse.

25 6) Procédé selon une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que l'on sélectionne, à l'étape g) les transcrits présentant une expression transitoire au cours de l'androgénèse.

30 7) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que la plante dont sont issues lesdites microspores et/ou anthères est une monocotylédone.

8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite plante est une céréale.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite céréale est le maïs.

35 10) Marqueur de l'androgénèse végétale constitué par un fragment dérivé de transcrit susceptible d'être obtenu par le procédé selon une quelconque des revendications 2 à 9.

11) Banque de séquences d'acide nucléique constituant des marqueurs de l'androgenèse végétale caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 2 fragments dérivés de transcrits selon la revendication 10.

5 12) Banque de séquences d'acide nucléique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins de 6 à 20 fragments dérivés de transcrits selon la revendication 10.

10 13) Banque de séquences d'acide nucléiques selon une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que lesdits fragments dérivés de transcrits sont choisis parmi les fragments identifiés dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 53.

15 14) Utilisation d'au moins un marqueur de l'androgenèse végétale selon une quelconque des revendications 1 ou 10, pour évaluer le potentiel androgénétique d'une plante ou d'une culture de microspores dérivées de ladite plante.

20 15) Utilisation d'au moins un marqueur de l'androgenèse végétale selon une quelconque des revendications 1 ou 10, pour cloner un gène impliqué dans l'androgenèse chez une plante.

25 16) Utilisation d'au moins un marqueur de l'androgenèse végétale selon une quelconque des revendications 1 ou 10, pour l'analyse génétique afin d'identifier des QTLs impliqués dans l'androgenèse chez une plante.

30 17) Utilisation selon une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisé en ce que ladite plante est une monocotylédone.

18) Utilisation selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite plante est une céréale.

19) Utilisation selon la revendication 18, caractérisé en ce que ladite céréale est le maïs.

1/1

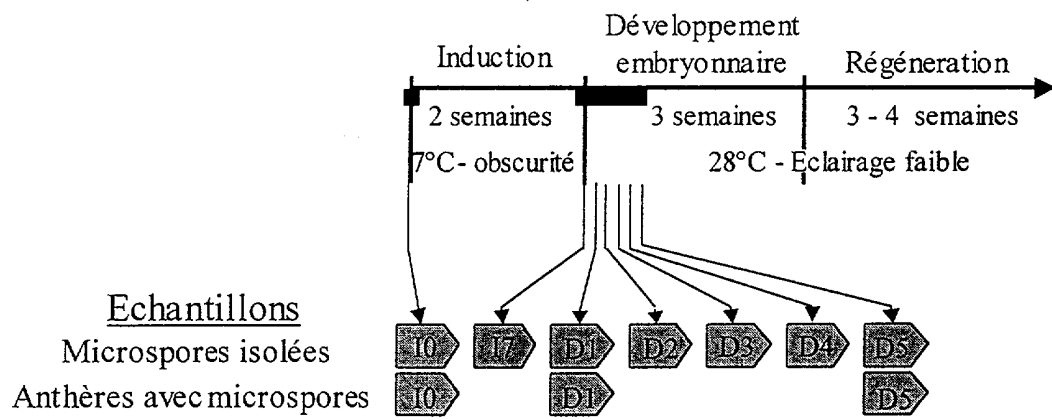


FIGURE 1

## LISTE DE SEQUENCES

<110> LIMAGRAIN  
INRA

<120> Marqueurs de l'androgenèse

<130> MJPCb1392-1

<140>

<141>

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 247

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 1

```
aagggcacct gcatgagtcc caatggatgc gactgcgagt actgcgcgcg agtgccgcg 60
ctgatttcct ntccgcgaaa ccgcgcgtag cagtagatcg atcaaatgca gtanaacctg 120
attgggcccg gttagctggc gtttganaga gagagagatg taataaacca tgtgtccatg 180
tactagtact gaagcaccgg aaaagcctat canaagacgg ngaacagaag ncaatcaatt 240
tgttttt 247
```

<210> 2

<211> 186

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 2

```
aaatgtatgc gttatgaata atgtggtcag tcagtcagtc agtcagtcac acatgcatgc 60
acgcactgat catccanaat tatatgcgca tgtcgcaagt gtgtgttcta gtggtgctgt 120
accttcattc tgatgttaca tggttcangg ttgtcaccga taaattacat tggaaggatg 180
ttgttt 186
```

<210> 3

<211> 42

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 3

```
cagtgnccnn gagatggtgc aacgtcagtt tgttcagggt tt 42
```

<210> 4

<211> 197

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 4

```
aaagaagaga tttctattgc tcatggcaca gctaaaggcc tgagtcacct gcattogctg 60
acaccccctg cgggccatat gaatttcaaa acttctaatt tacttgtgga cgaggacttc 120
gcacaaaag ttgcagatac nnggattcca ggcattgctg atcgacttgg ngttacagga 180
ctgtcttcca naanatt 197
```

<210> 5  
 <211> 92  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 5  
 aagntacatt cngaccnct ctttcangan cttttntacg gntataacta cngngancgg 60  
 nctaaacttc aacccttctt tctttcttca tt 92

<210> 6  
 <211> 211  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 6  
 aactgtgag aatcaatgcc ttagttgcta aagcccagaa agttcctgaa gaaggatgga 60  
 caatgcaaga tggaaacccc tggcctgaa acaatgttcg tgatcatcct ggaatgattc 120  
 aggtcttctt tggccaaagc ggaggccttg actgtgaggg aatgaactg ccacgattgg 180  
 tttatgtttc tagagagaaa cnaccannct c 211

<210> 7  
 <211> 181  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 7  
 natttttggc cagcgacnan ggnaaaaata taaataaggg tgggccnng aatcattnn 60  
 aaaangnata ntntgttng tttttgagtt aggatntnt tcagtntcgn tttgtttgna 120  
 nntnttctt atttatttna tctttactnt ttggttaatc tcatttcaat gggngtttt 180  
 t 181

<210> 8  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 8  
 ggatggacta gaatgcaagc aatggggta ttttgaatca actttgctgg gattgcagtt 60  
 cttactgatg t 71

<210> 9  
 <211> 403  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 9  
 atagacaaat tacatctgct actaacttgt agaccttact atgacagtac accataaac 60  
 gactcaacca ttacttgtgt cagaacgacc acaaatgaac tagggcacgt cgaacattac 120  
 acttattgaa ttgaagttgc aagtacatag tgaactatac ataagctcac atacttccac 180  
 ggcgagccca caaatgctcc acaagatcat tttgtagtgt gcaagacctt tcttgccgac 240  
 gaagatcgaa gtgatcaatg acccaatcag agcgtccttc ttgaataagt tgacatggtt 300  
 caatgccaga actggtctct ccgaaatcaa tgtttactgc aaactcacct gcgtcttcca 360  
 caatcatggt gtgcatgatg atgcatgctg ttactatctc ggt 403

<210> 10

<211> 226  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 10  
 ggacgggttcg agaactccaa cctagactac aagggaacat actacgagta cctcccgttc 60  
 gggctctggcc gtcgcatgtg cccgggagca aaccttggag tggccaactt ggagcttgca 120  
 ctggccagcc ttctgtacca ttctgattgg aagctaccaa gtggacagga gcctaaggat 180  
 gtcgatgttt gggaggctgc aggactggnt gccaaaaaaa nnnnnn 226

<210> 11  
 <211> 155  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 11  
 atctctgttt tgctaacagt cggtagcgaa atagctgaga agaagctaata aagccaatca 60  
 gtgataaagc attgcattga tttatTTTTT cagtaccctt ataataactt tttgcatcat 120  
 catgttgaga acattattgt ttcttgcctt gaggt 155

<210> 12  
 <211> 132  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 12  
 caacgctaga tatgtcagcg acaagtattc aaaagcctcg tcatgtaagg agggctgtct 60  
 ctgggttatt agcccatcgt caagcaattg aacacagctc ctgcaaaaaa agttttcaaa 120  
 tttcaawycc aa 132

<210> 13  
 <211> 197  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 13  
 aacacaaggg gacaagcata tttgataaaa tgcaattatc cagctacttc tcatecttct 60  
 cttcttcaaa accgaataaa gcattcagga agagtgacaa ggatttcaac atccagccaa 120  
 aagaacttcc actagcattt cttaggcatg gncngcacg tgctgaanac ggaatggagt 180  
 atttgaaga tagtatt 197

<210> 14  
 <211> 209  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 14  
 aacctnacc cgggattcct gtcnagcaag tgatcnagga cccaggtgct cancatgtgg 60  
 aaaatTTTga ncaggagctc gttgaagggt aanancaggt antccaggag gaggtctana 120  
 acnaggagta cnagattatc taggtggcgt cttccantca gctttatggc gccaaaggaan 180  
 aanatttagt tcnctttatt gttatcatt 209

<210> 15  
 <211> 237  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 15

taacacatcc agcatcaaac atacttgtgt ctgcataaac atcctcagtc cttggacaac 60  
 tactccagtc ctgcccgatg gtttgtcttg agccgattct caaagcgaca catgatagta 120  
 tatgggtcca ggacgcccga tgggttcgcg aactgactgc attcagcctg cacgggcatg 180  
 cccatggaca ccgtgacttg ggtggttgcc agcaacgaga atgtogttga tgcggtt 237

<210> 16

<211> 215

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 16

cgcgtcatgc tgaagatgtg caagaagggt ggcgacacca ctcaataccg ccaattcatg 60  
 aacgatgtgc tcaagcccgg gctacatggc ctctgcgacg gtctgtcgga ggagaacgcc 120  
 gagtgcgtgg actgcaactc tggacgatcc tagtatcttt atttatcttt tcattcagtt 180  
 ctatattagc aagtttttag gagctttgac agtgt 215

<210> 17

<211> 51

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 17

anaaagnatn gtcaatacaa gaggaantgg ggntggncna ngggagnaat t 51

<210> 18

<211> 150

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 18

naagatcgtt tagctaagct ttacatacta gtactagtag taatgagtgg tggtcataat 60  
 attttgttcg gtttagctgga agctgtggac tataaggatc tgcaggtgga atgctgtata 120  
 ggattaggct tananatcca tagtgacctt 150

<210> 19

<211> 105

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 19

gcagatggtg ctattaggca accgtgcatt tgcactggga tcaaaacaag catgcatcat 60  
 ccaaggatag gttcagcata aggtttttat tggatggttc ttgtg 105

<210> 20

<211> 104

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 20

aggtaaaata ngtagagttg gaatcttatt taggcgctg agtttccgtt tttcggctcct 60  
 ggttatcttc aatgtaata ctagcttagt agctttcgtg cagt 104

<210> 21

<211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 21  
 gttgtgccga gctggtgagt atccacccat ctgtttcctc gctccctcg tgtttttttt 60  
 cagt 64

<210> 22  
 <211> 163  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 22  
 aagatagcat ttgcgcaact catcaaaaca aatgaataaa gccattggct agcatggatg 60  
 tatgtgtata catgcagcta gctgatctct acgctccaac cttctccctc agctcatcaa 120  
 gaagcaacgg gaaatggtgt gccagctgag taaaatcatc ggt 163

<210> 23  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 23  
 ccctttcgtg tatgcgagag ctatcacaca tatcgtgtt tgttctcttc attccccatc 60  
 gcgtcttgtt t 71

<210> 24  
 <211> 274  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 24  
 tngcagcggc atcgactatc acaacaaagc cctgaagagg aatcagtact tgcttcaatg 60  
 ctgatgcgtc cgtggcctgc aacagctatc agtacagcaa gcttcgaagg agatgatgag 120  
 agattgaacc gaatcaaacg aactttcata aagatggagc gcgaccacat gctggatcct 180  
 caacagcaag actccatgat caaaaagtgg ccaccagtg aggttttggg cataaataca 240  
 gatcacagcc ccttcttctc tgcaccagaa cagt 274

<210> 25  
 <211> 93  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 25  
 atcatcaagt ctgccctgtc aagtcttcat ctgcctagtg ttttgacttt caatgcacct 60  
 ggatgcttgt cgtactgaat gctggtgatc ttt 93

<210> 26  
 <211> 184  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 26  
 gtgttcgaga tttccgctgt gacaccactg tggcatggtc acgagtcaca atcatccagc 60  
 aatgagtgat gtcacgagga tttgaagaat caccctggta actggaatct caagtgccng 120

gagaagaaca tgtggttcaa gtggagccgc atatcgagga gttcgattcn atttangng 180  
ngnn 184

<210> 27  
<211> 163  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<400> 27  
ggtcaagtta ccatgaatca tcggatcggc gggcagagcc cgcgtcagcc ttttatctaa 60  
taaatgcgcc cctcccggaa gtcgggggtt gttgcacgta ttagctctag aattactacg 120  
gttatccgag tagcacgtac catcaaacia actataactg att 163

<210> 28  
<211> 564  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<400> 28  
gaaanaacct cgggagctaa ccccgntggn gngggagcta gatctggctg gactgcccct 60  
attacgtgtc ttatnantng tntgagtcac cctcancttt ctccaccttc gtcacgaatg 120  
taaccgattt cctcgggtgc tcatttacgg tcaagtgtaa aacatctggt ctcgagtaat 180  
gtccaaccga atcgaagtat aacttggtc ttgctatata accaagatca atatcagctg 240  
tgacgagacc ctctgattca aagtttggtc cggcgagaaac ttgtcccaaa ggtgaaataa 300  
tgacacttcc accttgggag acaatagaat catgttcttt ggcgtcgtac caatcggtaa 360  
acaagtagtc aggatgatca ggggaaatgt ttacgctggc agaattggca agccgaccag 420  
acgaaacatc caccttccat cgcaatgtga aagcatcnga cnatttgccc atttcttttt 480  
cnaaccatcc angccaggta agggttgcac caaataaaan gcctcaaag gccccttttg 540  
gccgntacca aatggncnac tttc 564

<210> 29  
<211> 77  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<400> 29  
caccgggacc tocaccaccg taccgcccc cctcggggcc ngctctcacc tcgccngat 60  
ttgccgatca ttatctt 77

<210> 30  
<211> 234  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<400> 30  
gtccccgcat gggccatggc cccgtcgtca cctaccgctg tgacnacntt ctcaaaaact 60  
tctgccaanag cagctgcccg gaggcgccgg cgccataggc ggggtggccgg tgtcttcttc 120  
tgacgtacgg natgggacnc caagtcnant ttgcttcnnc ccagtttcgt caganaaaaag 180  
aaataaataa ntaaataant gtcnccggcc gcnctgttcg gtgcttgenc ttgt 234

<210> 31  
<211> 151  
<212> ADN  
<213> Zea mays

<400> 31

agatggatcg ccttacgcg tcaacgaact cataactaatg caaggactgc tcgcaagcaa 60  
 attcggaaat gaaagaaggc taccgaaaga acaagcaacg gattgagcgc tontccnttg 120  
 cgctgcgca tacnttttct tgctccttgc c 151

<210> 32  
 <211> 289  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 32  
 tgtatgggtca gctaaccata cctgcgacga aacgcgccga gtccaggagc gcgtcgacgc 60  
 aggggctcgg gaatgcggtg tcgccatcgc ggaaccctag cgagatcgtc gtgaagggtcc 120  
 aaaggcgagc atgtttttgt gtaacctttc tccccttccc ccctttgtcg gccggccctt 180  
 cagcgaaat aagtgccac cgcccaccag gtaatactgg tgttgctgtc atgctttatg 240  
 agcccagata taagcacagt gtcagcagac tagaaagggg gtctaggg 289

<210> 33  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 33  
 cttatatcca aagttcaa atctgtagagtt ggaattttat t 41

<210> 34  
 <211> 270  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 34  
 ctaaagcaga gccttgagaa cgtccggatc atgcgcaagg tggatccagg gcatcaagag 60  
 cgaaccgagg ctgcctcaaa cgggtgcagga gctgctgcgt agaccctgat ctgccctcgg 120  
 ttgagttgca ggtgtggccg gaaataagct ggtcgtagat gacatacgcct ttgtacattc 180  
 tcagtgtgta aaaggttacc tctcttagtg ttcattggcag catgcaaag taagctattg 240  
 ggttgaattt ttagcccaag catgtgctac 270

<210> 35  
 <211> 308  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 35  
 tcngagaaan tttggtaacg tagaaaacac aataagccct aacaggtaaa ttaggccaga 60  
 taaactgatt gatgataagc aagcataaaa cacacaant gataatanct tgcgctgtg 120  
 ccaaattaaa aaccttctta ggaaccccag aagtccagat tctgaagcat cagatacacc 180  
 aaagttcttg tcaactgttt gtctncgttc ataacngtaa ngttgcatta cnactanatn 240  
 ggccaatgnt tgccaaacat tttccancaa anangcttca gggtaacnt ccatntcagg 300  
 gnatnntt 308

<210> 36  
 <211> 343  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 36  
 cctccagagc ccagatctca ttcggatgag gtacgacagg ttacggcatg ttgctgggag 60

gatacagaca gttgttgggg acattgccac tcagggagag agactacagt cattgctcag 120  
 ctggagggac ccaagggcaa cagctatggt cctaataatt tgcttgatta ctgccattat 180  
 actgtatgtg acaccattcc aagcgattgc actctgcctt gggttcttct cgatgaggca 240  
 tcctcggttt cgccacaagg tgccatcagc accagcaaac ttcttcagga ggctacctgc 300  
 aaagacggat tctttgctgt aaagttcctt aaaagacagc tgt 343

<210> 37  
 <211> 172  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 37  
 gatgtaacag gctgaagaac gctacatcct tattcagtag ctatataatc acaagaagca 60  
 anggagcac acaggctctc gatcacaaga taacaataca cgctccctcc agagagaant 120  
 tgctaaagcg caagaccaca cgggacatct gtgacggcgc tgcgtcatgg gt 172

<210> 38  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 38  
 tcagcatgca tgcaaacttc ttctttttcc aaataaacac acgagt 46

<210> 39  
 <211> 380  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 39  
 ctctgttaga gccaaaatgg ggcacccata accatttcca gtcaagtatg ttgcaattgg 60  
 aaatgaagat tgtgagagaa agttttatag aggtaattac ctcaagtttt acaacgctat 120  
 aagagaggtc tatccagaca ttcaactgat ttogaactgt gatggctcgt cgggaccact 180  
 tgatcatcct gctgacatat acgatttcca cgtctatgcc gatgctaaga ctctgttttc 240  
 catgaagagc acgtttgaca agtcaccccg cagtggaccc aaggcttttg tcagcgagta 300  
 tgcagtttgg aaaactgacg ccggtagagc aactctcctg gctgcattgg cagaagcggc 360  
 tttccttact gcactggaga 380

<210> 40  
 <211> 256  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 40  
 ttggaanngc ctgtgttgnn tgganctccn anctataggg ancgtnnncn gctccgaggg 60  
 gataactgnaa nnggtngtt ttancgtant gnnnactgcc cacccanaga aggtgatnct 120  
 acacacgagc aggactgcca caatcggaan cntgatctat tccanttgnt gganattaat 180  
 tcactttgac attcagagca ctgggcagaa atcacattgn gtcagcatcc tcgaggaccg 240  
 tcgcaatgct ttgttt 256

<210> 41  
 <211> 105  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 41

gaaagaacac cctggtgagc ttgactctag tccgactttg tgaaatgact tgagaggtgt 60  
 aggataagtg ggagcctccg ggcgcaagtg aatatccact acttt 105

<210> 42  
 <211> 521  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 42  
 tttgcctgga tggaagaaat tctccttcag cacgtgctcc cactctgtag gtgaaccacc 60  
 atactgggtca actggagagg agattgggtg cgctccctga gacccttctg ggcaaacang 120  
 aaagtcncca antnctggn gnntcattt acgggtcaant gtaaaacatc tggncctngan 180  
 gaatgtccaa cccaanctaa atataacttg gctcttgcta taccaccaag atcaatatca 240  
 gctgtgacga gaccctctga ttcaaagttt ggtccggcga gaacttgtcc caaaggtgaa 300  
 ataatgacac ttccacctg ggagacaata gaatcatggt ctttgtcgtc gtaccaatcg 360  
 ttaaacaagt agtcaggatg atcagggaaa tgtttaccct ggcanaattg gcaagcccg 420  
 caagacgaaa catccacctt cgatcgcaat gngaagcatc gaccgattgc ccattctttc 480  
 caaccatcag cagtaggngc acaataanag gctcaatgcc t 521

<210> 43  
 <211> 129  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 43  
 tgctatgatg atctgtttga agagggggag atacacgacg gagaaccacg tagttagcat 60  
 ttcaaagatt atgcctcgtc atgagtgccc aaaggaatgt cacataattg caagagcatg 120  
 agtatgatt 129

<210> 44  
 <211> 128  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 44  
 aannagagn tttgtcggna gannnggnng ggnacaaaag atgacggcgg tagnatnat 60  
 acaactactn agantanatg tgagggcccn acngaatgct nnatanttgn aagagcatga 120  
 gtatgant 128

<210> 45  
 <211> 319  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

<400> 45  
 ttcttcccga tgacattaca gtagtgttg tttacataga tcacggatta ctgcaagaga 60  
 gggatacttc cgtgccagag ctctcagtc gtggctttgt tgactccgtt ggccctcaa 120  
 gtttctcagg gataaccgcc atatcatgac tcaactactaa tcgatcagca caattttggt 180  
 gtacggcatt caagtagcat gtgactatct gagtgttatg ctttaccagg cgtttgcttt 240  
 tagtattgcc tttatattga gtactactac aatacttcat gtcgctttgt tttcaaaaat 300  
 aacttgccn nnnnnnnn 319

<210> 46  
 <211> 179  
 <212> ADN  
 <213> Zea mays

&lt;400&gt; 46

gttcaccac caatagggaa cgtgagctgg ggtagaccg ncgcgagacn ggttantttt 60  
 accctactga tgaccgcgcc gcgatagtan ttcaacctan tacgagagga accgttgatt 120  
 cacacaattg gtcatngngc ttggntgaaa ngccagtgnn gcaaactctnn ggtgcnnnn 179

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 177

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 47

gtttgggcct ccntnttgct acaaggcaag aaccaaccac tataagtcaa ctccaataaa 60  
 gaagcttggg ggaaagaagg ancganagaa cctcntttn gcttcngctc ccttttctn 120  
 nncntttngc ttccncttcn ccnttctct ccttcogtgc ctncncctc ctntnnn 177

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 148

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 48

cttanatctg atcaactggaa agagaaggct tgtcctctat tgcgtctttt tatgagttgt 60  
 actctgtagc tacctgcccc tatgactgtg agtacaagta cagaaactat tgttaccttt 120  
 tgttgtaaaa gggatatatcc agttcttt 148

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 430

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 49

aaggtagcta gttgctggcg tcacgaggat taggggggcc gccatcctcg tcgccccct 60  
 ggatctgcat ctctggcgc tggacttgt ggtatgccct ctcccgttg gcgogggcc 120  
 tgtcmagctc tgcccgcagc maagaaaaag tcgagccttg tggcttggct atgatctcct 180  
 tcagmaagcc cgagcaggag gagatcttct ccatctcgtc gttgagctgc agctcgagtt 240  
 taccgatctt cgcgtctaaa accctaattt cacgtaagac gttgcgctcg tacacaatca 300  
 tcttcagtcc ctgagcaggg agaagctggt tgttctggtg ggggtggaaag gcggcggcma 360  
 tggctgctgc ggtgcgata acctaaattg cctttcgaac gaacgatctc ttgtcttgcc 420  
 ttgtggatgg 430

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 50

taccgatga gtatgagacc aacaaccagt atagttgtga catttatttc aatcgaaatt 60  
 gctctgttca aaagactttt catgtcactg cctttttct ttgtgtcgac aagtt 115

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 51

```
tatttcaccg cacgtatttc agagacgagt tccactggtg gagcagcagg agtgcagtaa 60
ttcagattgk gtgatttgac acaatacttg acttgtggtt gcgttattga gattataact 120
tggagctgat tatattcggt atctatgata gaamcctcca aatatgataa gtttccttgt 180
gaaaccatgc tgttttagyc atgttggagt tggt 214
```

```
<210> 52
<211> 98
<212> ADN
<213> Zea mays
```

```
<400> 52
ngcaacagta tggatgatgat tggcagatga cagaagatga tgggaaggatga agggctgaca 60
acaacatatg acgacacaga ttccatgcaa gggacatt 98
```

```
<210> 53
<211> 254
<212> ADN
<213> Zea mays
```

```
<400> 53
ataaatgcat ctgccttgtg tccattctc ctagtctcca agtccttctg gatgcccttg 60
aggaaatatt tgttcttctg tttctcctt caggggtgcag caagcctttg ngggacataa 120
tatctcatat ggngtcacat gtgacattac ccacaccagg aaagaatcgt gcacttattt 180
gccattgaat aattgatact tttctnccna agctcctccn aaagaatggt tttcccatgc 240
ngatatanna tnnn 254
```

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	VRINTEN P L ET AL: "Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley ( <i>Hordeum vulgare</i> ) L." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 41, no. 4, novembre 1999 (1999-11), pages 455-463, XP002157651 ISSN: 0167-4412 * le document en entier * ---	2-8, 10-12, 14-18	C12N15/29 A01H4/00 A01H1/04 C12Q1/68
X,D	REYNOLDS THOMAS L: "Pollen embryogenesis." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 33, no. 1, 1997, pages 1-10, XP002157652 ISSN: 0167-4412 * le document en entier * ---	2-8, 10-12, 14-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A,D	US 5 306 864 A (PETOLINO JOSEPH F) 26 avril 1994 (1994-04-26) * le document en entier * ---		
A	EP 0 974 672 A (KEYGENE NV) 26 janvier 2000 (2000-01-26) voir SEQ ID NO: 47 et 48 (pp. 38 à 39) * revendications 1-16; exemple 1 * * page 1 - page 11 * ---		C07K
A,D	VOS P ET AL: "AFLP: A NEW TECHNIQUE FOR DNA FINGERPRINTING" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 21, 1995, pages 4407-4414, XP000939214 ISSN: 0305-1048 * le document en entier * ---		
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 janvier 2001		Oderwald, H	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES			
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	



**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 588189  
FR 0003245

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

**1. revendication :**

Invention 1: Revendications: {1,10-19 partiellement}, {2-9 complètement}

Marqueur de l'androgenèse végétale constitué par un fragment d'acide nucléique obtenu par amplification à l'aide du couple d'amorces E45 et M48, le fragment est identifié sous le numéro SEQ ID NO: 1. Procédé d'obtention de marqueurs de l'androgenèse. Banque de séquences d'acide nucléique et utilisation d'un marqueur de l'androgenèse.

Invention 2 à 53: Revendications {1,10-19 partiellement}

Comme pour l'invention 1 mais concernant SEQ ID NO: 2 à 53 (invention 2 comprend SEQ NO: 2 et invention 53 comprend SEQ ID NO: 53).

La première invention a été recherchée.

Des marqueurs de l'androgenèse végétale, des procédés d'obtention de marqueurs de l'androgenèse et leur utilisation ont déjà été décrites dans l'art antérieur. Voir par exemple: Plant Molecular Biology 41 (1999): 455-463, Plant Molecular Biology 33 (1997): 1-10 et US 5.306.864.

Au vue de l'art antérieur, le problème que se propose de résoudre la demande peut être défini comme la mise à disposition des marqueurs de l'androgenèse alternatifs.

Les solutions proposées dans la demande sont les marqueurs de l'androgenèse alternatifs mentionné ci-dessus.

Du fait que les marqueurs de l'androgenèse végétale étaient déjà connus de l'art antérieur, du fait que les procédés pour l'obtention des marqueurs de l'androgenèse végétale étaient déjà connus de l'art antérieur, du fait de la différence essentielle de structure primaire des acides nucléiques, et du fait qu'aucune autre des caractéristiques techniques proposées dans la présente demande ne peuvent être considérées comme les caractéristiques techniques particulières reliant les différentes inventions, il n'y pas de concept inventif commun entre les différentes inventions revendiquées, et une objection de non-unité d'inventions a posteriori doit être soulevée.