(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 099 178***

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

(21) **N° d'enregistrement national :** **19 08408**

(51) Int Cl[8] : ***C 12 N 15/29*** *(2019.12), C 12 N 15/53, 9/02, 15/87, A 01 H 1/04, 1/06, 5/00, 5/10, C 12 Q 1/689, A 01 H 6/14*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 24.07.19.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 29.01.21 Bulletin 21/04.

(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 :**

( ) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *SOLTIS Société par actions simplifiée (SAS)* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** COMADRAN TRABAN Jordi, LAFFAIRE Jean-Baptiste et ALBRECHT Elena.

(73) **Titulaire(s) :** SOLTIS Société par actions simplifiée (SAS).

(74) **Mandataire(s) :** REGIMBEAU.

(54) Tournesol à teneur élevée en acide oléique et procédé d'obtention.

(57) La présente invention concerne des séquences de nucléotides isolées qui codent une protéine oléate désaturase de tournesol tronquée. La présence de ces séquences de nucléotides permet ainsi de conduire à des plantes de tournesol ayant, de manière stable, une teneur élevée en acides oléiques. La présente invention concerne donc également les plantes, parties de plantes ou graines qui contiennent ces séquences, leur obtention et leurs utilisations dans des procédés d'introgression et/ou pour obtenir de l'huile à teneur élevée en acide oléique.

Figure à publier : NEANT

FR 3 099 178 - A1

Description

Titre de l'invention : Tournesol à teneur élevée en acide oléique et procédé d'obtention

DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION

[0001] L'invention concerne des séquences de nucléotides isolées qui codent une protéine Δ12-oléate désaturase de tournesol tronquée. En particulier ces séquences de nucléotides contiennent un codon stop prématuré qui conduit à la production de cette protéine tronquée. La présence de ces séquences de nucléotides permet ainsi de conduire à des plantes de tournesol ayant, de manière stable, une teneur élevée en acide oléique dans l'huile de graines. La présente invention concerne donc également les plantes, parties de plantes ou graines qui contiennent ces séquences, leur obtention et leurs utilisations dans des procédés d'introgression et/ou pour obtenir de l'huile à teneur élevée en acide oléique.

ARRIERE-PLAN TECHNIQUE

[0002] Le tournesol est le plus souvent cultivé pour obtenir des huiles qui contiennent des acides gras saturés et insaturés. Les acides gras saturés possèdent 16 ou 18 atomes de carbones (C16 ou C18). Les acides gras en C16 sont généralement saturés comme l'acide palmitique (16:0). Les acides gras en C18 sont soit saturés, comme l'acide stéarique (18:0), soit insaturés avec 1, 2 ou 3 doubles liaisons, comme l'acide oléique (18:1), l'acide linoléique (18:2), l'acide linolénique (18:3).

[0003] Les huiles provenant de variétés de tournesol dits oléique faible (*low oleic* ou LO) contiennent principalement de l'acide linoléique. Des lignées et des hybrides,dits oléique élevé (*high oleic* ou HO) qui possèdent une teneur 18:1 élevée dans leurs graines ont été obtenues par sélection à partir du mutant Pervenets.

[0004] Le mutant Pervenets a été obtenu par mutagenèse chimique par Soldatov en 1976 sur une population tournesol. Le contenu moyen en 18:1 dans les graines de cette population est supérieur à 65 %, les contenus individuels allant entre 60 et 90 %, comparé à un contenu moyen de 20 % dans les variétés normales LO.

[0005] La population Pervenets a été distribuée dans le monde entier et utilisée dans de nombreux programmes de sélection afin de convertir des génotypes sélectionnés avec un contenu 18:1 faible en des génotypes ayant un contenu 18:1 supérieur à 80 % dans leurs graines.

[0006] Il a été montré que le phénotype HO est associé à une diminution marquée de l'activité de l'enzyme Δ12-oléate désaturase, qui catalyse la désaturation du 18:1 vers 18:2 au cours des stades critiques de la construction du stock de lipides, ce qui explique l'accumulation de 18:1 (Garces R. et Mancha M., 1991). L'enzyme

Δ12-oléate désaturase (EC 1.3.1.35) est également connue sous les noms de : acide oléique désaturase, linoléate synthase, oléoyle CoA désaturase, oleoylphosphatidylcholine désaturase, oleoyl-PC désaturase, FAD2. Chez le tournesol, trois gènes *fad2* ont été identifiés (*fad2-1, fad2-2,* et *fad2-3*) codant pour des Δ12-désaturase microsomales.

[0007] L'enzyme Δ12-oléate désaturase (EC 1.3.1.35) est codée par le gène Δ12-désaturase correspondant au gène *fad2-1*.

[0008] Par ailleurs, l'analyse moléculaire a montré que la mutation Pervenets est associée à une duplication du gène Δ12-désaturase, conduisant à une mise sous silence génétique ou *silencing*. Cette diminution de transcription explique la diminution du niveau d'enzyme et ainsi la diminution de l'activité Δ12- oléate désaturase qui produit une plus grande accumulation d'acide oléique dans les graines de tournesol (Hongtrakul et al., 1998). Des marqueurs moléculaires associés à cette mutation ont été développés pour être utilisés dans les programmes de croisement basé sur la sélection des génotypes HO (WO 2005/106022 ; Lacombe et al. 2001).

[0009] Pour obtenir une teneur à la fois plus élevée en acide oléique et aussi plus stable, une mutation knock-down dans le gène Δ12-désaturase a été isolée par les inventeurs. Les documents WO2013004280 et WO2013004281 décrivent une mutation obtenue par traitement chimique dans le gène Δ12-désaturase sélectionnée pour un phénotype d'augmentation du contenu oléique comparé à celui de la mutation Pervenets. Différentes mutations ont été obtenues chez le tournesol, créant un codon STOP dans la phase de lecture, et conduisant à une protéine tronquée. Toutes ces mutations conduisent cependant à une protéine tronquée d'une longueur inférieure ou égale à 110 acides aminés.

[0010] Il est donc intéressant d'explorer si d'autres mutations peuvent aboutir à une teneur élevée en acide oléique et/ou à une meilleure stabilité chez le tournesol.

Résumé de l'invention

[0011] Selon un premier aspect, la présente invention concerne une séquence de nucléotides isolée qui comprend un codon stop aux positions 484 à 486 en référence à la séquence de nucléotides sauvage SEQ ID NO : 1, et qui code une protéine Δ12- oléate désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO 4 :

[0012] MGAGEYTSVTNENNPLDRVPHAKPPFTIGDLKKAIPPHCFQRSLTRSFSYVLS DLTITAVLYHIATTYFHHLPTPLSSIAWASYWVVQGCVLTGVWVIAHECGHHA FSDYQWVDDTVGFVLHSSLLVPYFSWKYSHHRHHSNTGSLERDEVFVPKSRS KVP.

[0013] De préférence, la séquence de nucléotides selon l'invention est de séquence SEQ ID NO : 2 : ATGGGTGCAGGAGAATACACGTCTGTGACCAACGAAAACAACC-

CACTCGATCGAGTCCCTCATGCAAAACCACCCTTCACCATCGGCGATCTGA
AAAAAGCCATCCCACCACACTGCTTCCAGCGGTCGCTAACCCGTTCGTTCT
CCTACGTGCTGTCTGACCTCACCATAACCGCTGTCCTCTACCACATTGCCAC
CACCTACTTCCACCACCTCCCCACCCCTTTGTCATCCATCGCATGGGCCTCT
TACTGGGTAGTCCAAGGCTGCGTCCTCACCGGAGTCTGGGTCATCGCCCAC
GAATGTGGTCACCATGCGTTTAGTGATTATCAATGGGTCGACGACACTGTG
GGCTTTGTTCTCCACTCGTCTTTACTCGTCCCTTACTTTTCGTGGAAATATA
GTCACCACCGCCACCATTCCAACACTGGATCACTCGAGCGGGACGAGGTTT
TCGTCCCCAAATCCCGATCGAAAGTCCCGTAGTACTCGAAATACTTTAACA
ACACAGTGGGCCGCATTGTCAGTATGTTCGTCACTCTCACTCTCGGCTGGC
CCTTGTACTTAGCTTTCAATGTGTCGGGCCGACCCTATGACCGTTTCGCCTG
CCACTACGTCCCAACCAGCCCTATGTACAATGAACGTAAACGTTACCAGAT
AGTCATGTCCGACATCGGGATTGTTATCACATCGTTCATCCTTTATCGTGTT
GCTATGGCAAAAGGGTTGGTTTGGGTGATTTGCGTCTATGGGGTTCCGTTG
ATGGTTGTGAACGCGTTTCTGGTGTTGATCACTTATCTTCAACATACTCACC
CTGGCTTGCCGCATTATGATAGCTCGGAATGGGAATGGTTAAAGGGAGCAT
TGGCGACAGTGGACCGTGACTATGGTGTGTTGAACAAGGTGTTCCATCATA
TTACCGACACACATGTGGTGCACCATTTGTTTTCGACAATGCCTCATTATAA
TGCGATGGAAGCACAGAAGGCGCTGAGACCGGTGCTTGGGGAGTATTATC
GGTTTGACAAGACCCCGTTTTATGTAGCCATGTGGAGAGAGATGAAGGAAT
GTTTGTTTGTGGAGCAAGATGATGAAGGGAAAGGAGGTGTGTTTTGGTACA
AGAATAAGATGAATTAA.

[0014] Selon un autre aspect, la présente invention concerne une protéine Δ12-oléate désaturase de tournesol tronquée de séquence SEQ ID NO : 4.

[0015] Selon encore un autre aspect, la présente invention se rapporte à une plante de tournesol comprenant une séquence de nucléotides selon l'invention, qui peut être présente soit à l'état hétérozygote soit à l'état homozygote dans le génome de ladite plante. De préférence, la séquence des nucléotides selon l'invention est présente à l'état homozygote.

[0016] Les graines produites par les plantes de tournesol selon l'invention constituent également un autre aspect de la présente invention, ainsi que leur descendance dès lors qu'elles comprennent au moins une séquence de nucléotides selon la présente invention. De telles graines possèdent une teneur en acide oléique d'au moins 85 %, par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines, et de préférence une teneur en acide oléique comprise dans une gamme allant de 85 % à 95 %, en particulier lorsqu'elles comprennent la séquence selon l'invention à l'état homozygote.

[0017] Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne un procédé d'obtention d'une plante de tournesol comprenant une séquence de nucléotides selon l'invention,

ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Procéder à la mutagenèse d'une partie de plante de tournesol pour qu'elle comprenne une séquence de nucléotides selon l'invention,

b) Générer une plante à partir de ladite partie de plante ayant subi ladite mutagenèse,

c) Obtenir au moins une descendance à partir de la plante générée à l'étape b), et

d) Identifier et sélectionner au moins une plante obtenue à l'étape b) ou c) comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention.

[0018] Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé d'identification de la présence, ou de l'absence, d'une séquence de nucléotides ou d'acides aminés selon l'invention dans une plante de tournesol, comprenant l'extraction de l'ADN génomique, de l'ARN ou de l'ensemble des protéines du protéome de la plante de tournesol et l'utilisation de moyens d'identification de ladite séquence.

[0019] Les moyens d'identification d'une plante, partie de plante selon l'invention constituent également un des aspects de la présente invention. L'utilisation de ces moyens permet ainsi d'identifier et/ou de sélectionner des plantes de tournesol ou des graines selon l'invention.

[0020] Dans un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de croisement par sélection dite « *forward* » d'une plante de tournesol comprenant une séquence de nucléotides selon l'invention; ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Croisement de ladite plante avec toute autre plante de tournesol présentant des caractéristiques agronomiques pour obtenir une plante F1,

b) Autofécondation d'une plante F1 comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention,

c) Répétition de l'étape b) pour obtenir une descendance comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention et présentant au moins une desdites caractéristiques agronomiques.

[0021] Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un procédé d'introgression par rétrocroisement d'un fragment de génome comprenant une séquence de nucléotides selon l'invention telle que décrite ci-dessus, à partir d'une plante de tournesol donneuse vers une plante de tournesol receveuse qui ne contient pas ladite séquence de nucléotides dans son génome, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Croisement de la plante de tournesol donneuse avec la plante receveuse,

b) Obtention d'un hybride F1,

c) Rétrocroisement dudit hybride F1 avec la plante receveuse,

d) Sélection d'une plante comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention,

e) Rétrocroisement de la plante sélectionnée à l'étape d) avec la plante receveuse

f) Optionnellement, autofécondation des plantes obtenues en e) pour obtenir une

plante comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention à l'état homozygote.

[0022] Enfin, selon un dernier aspect, la présente invention concerne l'utilisation de graines de tournesol selon l'invention telles que décrites ci-dessus, pour obtenir de l'huile, et en particulier de l'huile ayant une teneur élevée en acide oléique, c'est-à-dire d'au moins 85 % d'acide oléique par rapport à la quantité totale d'acides gras présents dans cette huile.

Brève description des dessins

[0023] [fig.1] La figure 1 représente la structure du gène fad2-1 et la position de la mutation selon l'invention conduisant au codon STOP.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

[0024] La présente invention concerne une séquence de nucléotides isolée qui comprend un codon stop aux positions 484 à 486 en référence à la séquence de nucléotides sauvage SEQ ID NO : 1, et qui code une protéine Δ12- oléate désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 4.

[0025] La Δ12-oleate désaturase de tournesol (*Helianthus annuus)* selon la présente invention est exprimée à partir du gène *fad2-1* muté dont la structure est représentée sur la Figure 1. La mutation correspond au changement du codon correspondant à l'acide aminé tryptophane « W » en un codon STOP. Ce codon STOP est prématuré par rapport à la séquence sauvage SEQ ID NO : 1. La séquence de nucléotides selon l'invention code une protéine tronquée Δ12-oleate désaturase de tournesol qui comprend plus de 110 acides aminés, en particulier plus de 130 acides aminés, et de manière préférée plus de 160 acides aminés.

[0026] La séquence de nucléotides qui code une protéine Δ12-oleate désaturase de tournesol tronquée de séquence SEQ ID NO : 4 selon l'invention peut être toute séquence de nucléotides de séquence SEQ ID : 1, dans laquelle un quelconque codon STOP est présent aux positions 484 à 486, et notamment un codon choisi parmi TAA, TAG et TGA. De préférence, la séquence de nucléotides selon l'invention est la séquence SEQ ID NO : 2.

[0027] Dans ce contexte, selon un premier aspect, la présente invention concerne une séquence de nucléotides comprenant un codon stop aux positions 484 à 486 en référence à la séquence nucléotidique sauvage SEQ ID NO :1 et, qui code une protéine Δ12-oleate désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 4, et préférentiellement, une protéine Δ12-oleate désaturase qui présente au moins 96%, 97%, 98% ou au moins 99% d'identité avec SEQ ID NO : 4.

[0028] De manière particulièrement préférée, la protéine de tournesol selon l'invention est la séquence de 161 acides aminés de séquence SEQ ID NO : 4. La protéine sauvage est la

séquence SEQ ID NO : 3 (Figure 1) de 378 acides-aminés codée par la séquence nucléotidique sauvage SEQ ID NO : 1.

[0029] Les pourcentages d'identité auxquels il est fait référence dans le cadre de l'exposé de la présente invention sont déterminés après alignement optimal des séquences à comparer, qui peuvent donc comprendre une ou plusieurs additions, délétions, troncatures et/ou substitutions. Ce pourcentage d'identité peut être calculé par toute méthode d'analyse de séquences bien connue de l'homme du métier.

[0030] De préférence, le pourcentage d'identité défini dans le cadre de la présente invention est déterminé au moyen d'un alignement global des séquences à comparer sur toute leur longueur. Il peut notamment être évalué à l'aide du programme BLASTP, plus spécifiquement BLASTP 2.2.29, Altschul et al, 1997 et Altschul et al, 2005, avec la séquence mutante tronquée SEQ ID NO : 4. Ainsi, on peut notamment utiliser les paramètres suivants de l'algorithme :

[0031] "Seuil attendu (*Expected threshold*) : 10

Longueur de mot (*Word size*) : 3

Nombre maximum de concordances dans une zone de la requête (*Max matches in a query range*) : 0

Matrice (*Matrix*) : BLOSUM62

Coûts des trous (*Gap Costs*) : Existence 11, Extension 1.

Ajustements des compositions (*Compositional adjustments*) : ajustement de la matrice de scores sur la composition conditionnelle (*Conditional compositional score matrix adjustment*)

Pas de filtre des régions de faible complexité (*No filter for low complexity regions*)".

[0032] Selon un autre aspect, la présente invention se rapporte à une plante de tournesol comprenant une séquence de nucléotides comprenant un codon STOP aux positions 484 à 486 en référence à la séquence nucléotidique sauvage SEQ ID NO : 1 et qui code une protéine Δ12-oleate désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 4, et préférentiellement, une protéine Δ12-oleate désaturase qui présente au moins 96%, 97%, 98% ou au moins 99% d'identité avec SEQ ID NO : 4.

[0033] La présente invention est relative à toute plante de tournesol qui possède au moins un allèle muté du gène codant la protéine Δ12-oleate désaturase correspondant à une séquence de nucléotides selon l'invention. En particulier, la plante de tournesol selon l'invention possède cette séquence de nucléotides dans son génome, à l'état hétérozygote ou homozygote.

[0034] La plante de tournesol selon l'invention peut être une lignée ou un hybride.

[0035] Lorsque la séquence nucléotides selon l'invention est présente à l'état hétérozygote, ladite plante peut éventuellement comprendre un autre allèle qui conduit à une inhibition du gène codant la protéine Δ12-oleate désaturase et qui permet, en com-

binaison avec la mutation selon l'invention, de produire des graines ayant une teneur en acide oléique d'au moins 85 % par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines. Parmi les exemples d'autre allèle connu de l'art antérieur qui conduit à une inhibition du gène codant la protéine Δ12-oleate désaturase, on peut notamment citer la mutation Pervenets. Par « inhibition du gène codant la protéine Δ12-oleate désaturase », on entend une inhibition de l'expression du transcrit, de sa traduction, ou l'absence de protéine fonctionnelle. De manière avantageuse, la séquence de nucléotides selon l'invention est présente à l'état homozygote dans la plante de tournesol de l'invention, ladite plante produisant des graines comprenant cette séquence de nucléotides selon l'invention et ayant une teneur en acide oléique d'au moins 85 % par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines.

[0036] De préférence, la teneur en acide oléique de ces graines est comprise dans une gamme allant de 85 % à 95 %, par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines.

[0037] Un autre objet de la présente invention concerne donc également des graines de tournesol susceptible d'être obtenues à partir d'une plante de tournesol telle que décrite ci-dessus. Ces graines contiennent au moins un allèle muté du gène codant la protéine Δ12-oleate désaturase correspondant à une séquence de nucléotides selon l'invention. Lorsque la séquence nucléotides selon l'invention est présente à l'état hétérozygote, ladite graine peut éventuellement comprendre un autre allèle qui conduit à une inhibition du gène codant la protéine Δ12-désaturase et qui permet, en combinaison avec la séquence nucléotides selon l'invention, d'obtenir des graines ayant une teneur en acide oléique d'au moins 85 % par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines. Parmi les exemples d'autre allèle connu de l'art antérieur qui conduit à une inhibition du gène codant la protéine Δ12-désaturase, on peut notamment citer la mutation Pervenets.

[0038] De façon préférée, les graines possèdent la séquence de nucléotides selon l'invention à l'état homozygote et ont une teneur en acide oléique d'au moins 85 % par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines. De préférence, ces graines possèdent une teneur en acide oléique comprise dans une gamme allant de 85 % à 95 %.

[0039] Toute descendance d'une graine selon l'invention telle décrite ci-dessus constitue un autre objet de la présente invention dès lors qu'elle comprend une séquence de nucléotides selon l'invention comme décrit ci-dessus.

[0040] Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne un procédé d'obtention d'une plante de tournesol comprenant une séquence de nucléotides selon l'invention, comprenant les étapes suivantes :

a) Procéder à la mutagenèse d'une partie de plante de tournesol pour qu'elle comprenne une séquence de nucléotides selon l'invention,

b) Générer une plante à partir de ladite partie de plante ayant subi ladite mutagenèse,
c) Obtenir au moins une descendance à partir de la plante générée à l'étape b), et
d) Identifier et sélectionner au moins une plante obtenue à l'étape b) ou c) comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention.

[0041] En particulier, le procédé permettra d'obtenir une plante de tournesol à teneur élevée en acide oléique.

[0042] Plus particulièrement, le procédé d'obtention pourra comprendre une étape supplémentaire, comme par exemple une autofécondation, pour permettre d'obtenir une plante à teneur élevée en acide oléique comprenant la séquence de nucléotides selon l'invention à l'état homozygote.

[0043] Dans ce cadre, on entend par « plante de tournesol à teneur élevée en acide oléique », une plante dont la teneur en acide oléique des graines est d'au moins 85 %, par rapport à la teneur totale en acide gras de ces graines et préférentiellement dans une gamme allant d'au moins 85 à 95% ou plus préférentiellement d'au moins 86 à 95%, ou d'au moins 87 à 95% ou d'au moins 88 à 95% ou d'au moins 89 à 95%. Plus spécifiquement, le teneur pourra être comprise dans une gamme allant d'au moins 89 à 94% ou d'au moins 89 à 93% ou d'au moins 89 à 92% ou d'au moins 89 à 91% ou d'au moins 89 à 90%.

[0044] Pour procéder à la mutagenèse d'une partie de plante de tournesol, toute technique bien connue de l'homme du métier peut être utilisée. On peut notamment utiliser des techniques de mutagenèse aléatoire telles que la mutagenèse induite par un agent chimique ou physique comme le traitement au éthyl-méthanesulfonate (EMS) ou l'irradiation ou encore des méthodes telles que le TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) (Till et al, 2003), ou encore telle que la technique de recombinaison aléatoire ou « *DNA shuffling* » (Stemmer, 1994). Il est également possible d'utiliser toute technique d'édition de gènes, permettant une modification ciblée des gènes, telle que TALENs, telle que décrite dans WO2011072246 ou la technologie CRISPR comme décrite par exemple dans WO2013181440, ou grâce aux technologies comme celles décrites dans WO2017004375 ou WO2018015956 couplant la technologie d'édition et l'induction d'haploïdes.

[0045] Dans le cas d'utilisation de technologie d'édition ciblée, la mutation selon l'invention pourra être générée directement sur des lignées élites de tournesol qui seront utilisées comme géniteurs dans la production d'hybrides.

[0046] De préférence, on utilise une cellule, un tissu cellulaire, un cal ou une graine issue de la plante comme partie de plante du tournesol pour procéder à l'étape a) de mutagenèse dans le cadre du procédé d'obtention d'une plante de tournesol selon l'invention.

[0047] Les méthodes permettant de générer une plante à partir d'une partie de plante ayant subi une mutagenèse, ainsi que pour produire une descendance à partir de celle-ci, sont

bien connues de l'homme du métier.

[0048] L'identification et la sélection d'une plante obtenue à l'étape b) peuvent être réalisées par toute technique bien connue de l'homme du métier. Notamment, par des techniques d'amplification PCR, *Northern Blot* ou *Southern Blot*, puces, « *ligase chain reaction* » (LCR), et « *genotyping-by-sequence* » (GBS), ou une combinaison de ces techniques.

[0049] Différentes méthodes de PCR sont connues de l'homme du métier, comme la RT-PCR ou la méthode mettant en œuvre des amorces de type Kaspar (KBioscience (LGC Group, Teddington, Middlesex, UK).

[0050] La méthode de génotypage *Kompetitive Allele Specific* PCR « KASP™ » utilise trois amorces cibles spécifiques : deux amorces, chacune étant spécifique de chaque forme allélique d'un SNP donné (*Single Nucleotide Polymorphism*) et une troisième amorce pour permettre l'amplification reverse pour chaque forme allélique.

[0051] Les moyens d'identification selon l'invention qui sont décrits ci-dessous sont avantageusement utilisés dans le procédé d'obtention ou d'identification d'une plante de tournesol à teneur élevée en acide oléique selon l'invention.

[0052] Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé d'identification de la présence, ou de l'absence, d'une séquence de nucléotides ou d'acides d'aminés selon l'invention dans une plante de tournesol, qui comprend l'extraction du matériel génétique de la plante tel que l'ADN génomique, l'ARN ou le protéome, et l'utilisation de moyens d'identification de la séquence de nucléotides ou d'acides aminés selon l'invention.

[0053] Par marqueur moléculaire, on entend par exemple un fragment spécifique d'une séquence pouvant être identifiée au sein du génome d'une plante à l'aide de différents moyens d'identification tels que des sondes ou amorces. Le marqueur peut être un fragment de séquence de protéine, pouvant être identifiée au sein de l'ensemble des protéines d'une cellule ou protéome d'une plante, notamment à l'aide d'anticorps. En particulier, un marqueur moléculaire spécifique de la séquence nucléotides selon l'invention correspond à un fragment d'au moins 20 nucléotides de la séquence nucléotides selon l'invention, ledit fragment comprenant la mutation correspondant au codon STOP aux positions 484 à 486 en référence à la séquence sauvage SEQ ID NO : 1. Le marqueur peut être dominant, co-dominant.

[0054] L'identification de la séquence d'intérêt, ou sa non-identification, permet de sélectionner les plantes présentant le gène ou l'allèle d'intérêt ou la caractéristique particulière, ou au contraire, de ne pas sélectionner les plantes ne présentant pas la séquence d'intérêt.

[0055] Dans la présente invention, les moyens d'identification peuvent être des sondes ou des amorces d'au moins 12 nucléotides jusqu'à 30 nucléotides complémentaires du brin d'ADN que l'on souhaite amplifier, hybrider ou encore séquencer. Ces moyens

d'identification sont en l'occurrence spécifique du marqueur que l'on souhaite identifier et permettent de détecter rapidement la présence de la mutation selon l'invention dans le génome de plantes issues de croisements donnés, ou les parties de plantes.

[0056] Ces moyens d'identification peuvent constituer des moyens d'identification et/ou de sélection de plantes de tournesol qui contiennent au moins un allèle de la séquence selon l'invention décrite ci-dessus, De préférence, ils permettent d'identifier et/ou de sélectionner des plantes de tournesol qui produisent des graines ayant une teneur en acide oléique d'au moins 85%, et de préférence comprise dans une gamme allant de 85 % à 95%. En particulier, lorsque ladite plante comprend une séquence nucléotides selon l'invention à l'état héterozygote, ladite plante peut comprendre un autre allèle qui conduit à une inhibition du gène codant la protéine Δ12-désaturase et qui permet, en combinaison avec la séquence nucléotides selon l'invention, d'obtenir des graines ayant une teneur en acide oléique d'au moins 85 % par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines. Parmi les exemples d'autre allèle connu de l'art antérieur qui conduit à une inhibition du gène codant la protéine Δ12-désaturase, on peut notamment citer la mutation Pervenets.

[0057] De façon préférée, ces moyens d'identification permettent d'identifier et/ou de sélectionner des plantes de tournesol qui produisent des graines qui possèdent la séquence nucléotides selon l'invention à l'état homozygote et ont une teneur en acide oléique d'au moins 85 % par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines, et de préférence comprise dans une gamme allant de 85 % à 95%.

[0058] Les moyens d'identification d'une plante, partie de plante selon l'invention, constituent également un des aspects de la présente invention. Préférentiellement, ces moyens d'identification sont capables de détecter spécifiquement la mutation dans la séquence nucléotidique selon l'invention, à savoir la présence d'un codon STOP aux positions 484 à 486 en référence à la séquence SEQ ID NO : 1. Comme indiqué ci-dessus, ces moyens peuvent consister en des amorces ou des sondes spécifiques de la mutation décrite ci-dessus selon l'invention. Plus particulièrement, le jeu d'amorces qui peut être utilisé dans les procédés selon l'invention est le jeu d'amorces KASP de séquences SEQ ID NO : 7, 8 et 9.

[0059] Selon un autre aspect, la présente invention couvre également un procédé de croisement par sélection dite « *forward* » d'une plante de tournesol comprenant une séquence de nucléotides selon l'invention; ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Croisement de ladite plante avec toute autre plante de tournesol présentant des caractéristiques agronomiques pour obtenir une plante F1,

b) Autofécondation d'une plante F1 comprenant ladite séquence de nucléotides selon

l'invention,

c) Répétition de l'étape b) pour obtenir une descendance comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention et présentant au moins une desdites caractéristiques agronomiques.

[0060] De préférence, la descendance présente la séquence nucléotides selon l'invention à l'état homozygote.

[0061] Le croisement peut être réalisé par toute méthode classique bien connue dans le domaine. L'étape c) peut être répétée autant de fois que nécessaire pour obtenir une descendance comprenant la séquence de nucléotides selon l'invention. Par caractéristique agronomique, on entend tout trait d'intérêt permettant d'améliorer une plante ou une variété, comme par exemple des résistances aux herbicides ou à des pathogènes ou tout autre trait permettant d'améliorer des caractères quantitatifs ou qualitatifs.

[0062] De préférence, cette descendance comprend un gène codant une protéine de séquence SEQ ID NO : 4.

[0063] La sélection « *forward* » est généralement utilisée pour améliorer les performances agronomiques d'une variété ou d'une lignée portant une mutation ou un trait spécifique alors que la sélection par rétrocroisement est utilisée pour introduire une mutation ou un trait spécifique dans le contexte génotypique particulier d'une variété ou lignée. Une comparaison des deux procédés est décrite dans Mumm et al, 2007.

[0064] Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un procédé d'introgression par rétrocroisement d'un fragment de génome comprenant une séquence de nucléotides selon l'invention telle que décrite ci-dessus, à partir d'une plante de tournesol donneuse vers une plante de tournesol receveuse qui ne contient pas ladite séquence de nucléotides dans son génome, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Croisement de la plante de tournesol donneuse avec la plante receveuse,

b) Obtention d'un hybride F1,

c) Rétrocroisement dudit hybride F1 avec la plante receveuse,

d) Sélection d'une plante comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention,

e) Rétrocroisement de la plante sélectionnée à l'étape d) avec la plante receveuse,

f) Optionnellement, autofécondation des plantes obtenues en e) pour obtenir une plante comprenant ladite séquence de nucléotides selon l'invention à l'état homozygote.

[0065] La plante receveuse ne contient pas dans son génome la séquence de nucléotides selon l'invention, c'est-à-dire une séquence de nucléotides présentant un codon STOP aux positions 484 à 486 en référence à la séquence nucléotidique sauvage SEQ ID NO : 1 et codant une protéine Δ12-désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 4, et préférentiellement, qui présente au moins 96%, 97%, 98% ou

au moins 99% d'identité avec SEQ ID NO : 4. Ainsi, la plante receveuse ne contient pas dans son génome la mutation décrite ci-dessus, à savoir un codon STOP aux positions aux positions 484 à 486 en référence à la séquence SEQ ID NO : 1.

[0066] Les rétrocroisements effectués visent à accroître le pourcentage de génome de la plante récurrente ou receveuse. Le nombre d'autofécondation ou rétrocroisements effectués est répété autant de fois pour obtenir un pourcentage d'au moins 80% du génome de la plante receveuse utilisée dans le croisement, de préférence d'au moins 98%.

[0067] Enfin, selon un dernier aspect, la présente invention concerne l'utilisation de graines de tournesol selon l'invention telles que décrites ci-dessus ou leur descendance, pour obtenir de l'huile, et en particulier de l'huile ayant une teneur élevée en acide oléique, c'est-à-dire d'au moins 85 % d'acide oléique par rapport à la quantité totale d'acides gras présents dans cette huile.

[0068] Les techniques d'obtention d'huile à partir de graines de tournesol sont bien connue dans le domaine de l'invention.

EXEMPLES

[0069] EXEMPLE 1 : Création et criblage d'une population TILLING de tournesol.

[0070] La population TILLING a été obtenue en 2015 à partir de 2 variétés de tournesol selon le protocole Kumar A. et al (2013). La population comprend initialement 18407 familles M2 à partir desquelles 10000 familles M2 ayant plus de 50 graines par famille ont été sélectionnées pour isoler l'ADN génomique et réaliser le criblage. L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de matériel foliaire de 5 plantes individuelles par familles M2. L'ADN est normalisé à 5 ng/µl pour les expérimentations suivantes.

[0071] EXEMPLE 2 : Identification in silico de codons STOP potentiels dans la séquence sauvage du gène *fad2-1*:

[0072] La séquence du gène fad2-1 sauvage HanXRQChr14g0452931 ou autrement décrite dans SEQ ID NO :1) a été analysées pour identifier l'ensemble des codons STOP pouvant être générés par le traitement EMS. 34 potentielles mutations ponctuelles EMS générant chacune un codon STOP pouvant produire une protéine FAD2 tronquée ont été identifiées. Des amorces spécifiques ciblant spécifiquement chacune des 34 mutations ont été générés pour le criblage des familles M2.

[0073] EXEMPLE 3 : Identification de la mutation

[0074] L'identification de la mutation a été réalisée à partir de pool d'ADNs issus de 96 familles M2 par amplification PCR. Puis, grâce à l'analyse des pools, la présence de mutations potentielles a été vérifiée chez 10 graines individuelles M2. Une seule famille mutante (HABT-3816 M2) a été confirmée et la mutation a été identifiée par séquençage Sanger. La mutation identifiée correspond à une modification G en A

localisée à la position nucléotidique 485 dans la séquence décrite dans SEQ ID NO : 1. La mutation ponctuelle créé un codon STOP qui produit une protéine tronquée de 161 acides-aminés décrites dans la séquence SEQ ID NO : 4, au lieu des 378 acides-aminés de la protéine sauvage décrite dans la séquence SEQ ID NO : 3 (Figure 1). Les séquences contextes mutante et sauvage utilisées pour l'identification de la mutation STOP dans la famille mutante sont décrites dans les séquences SEQ ID NO : 5 (ACCACCGCCACCATTCCAACACTGGATCACTCGAGCGGGACGAGGTTTTC GTCCCCAAATCCCGATCGAAAGTCCCGTAGTACTCGAAATACTTTAACAAC ACAGTGGGCCGCATTGTCAGTATGTTCGTCACTCTCACTCTCGGCTGGCCCT TGTACTTAGCTTTCAATGTGTCGGG) et SEQ ID NO : 6 (ACCACCGCCACCATTCCAACACTGGATCACTCGAGCGGGACGAGGTTTTC GTCCCCAAATCCCGATCGAAAGTCCCGTGGTACTCGAAATACTTTAACAAC ACAGTGGGCCGCATTGTCAGTATGTTCGTCACTCTCACTCTCGGCTGGCCCT TGTACTTAGCTTTCAATGTGTCGGG).

[0075] Ces séquences génomiques flanquants la mutation d'intérêt G485A peuvent être utilisées pour développer un test de génotypage pour suivre la mutation dans une procédure de sélection assistée par marqueur. Dans cet exemple, des marqueurs co-dominants "KASP" (Ha_FAD2-1_2439_E1_485) ont été développés et les amorces pour l'identification de la mutation G485A dans le gène fad2-1 sont décrites dans le tableau 1. Ils permettent de différentier entre elles, les plantes homozygotes pour l'allèle mutant, les plantes homozygotes pour l'allèle normal et les plantes hétérozygotes.

[0076] [Tableaux[TABLE 1]]

Nom du marqueur	**Type d'amorce**	**Séquence de l'amorce**	**SEQ ID**
Ha_FAD2-1_2439_E1_485	A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAATCCCGATC GAAAGTCCCGTG	NO:7
Ha_FAD2-1_2439_E1_485	A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAATCCCGAT CGAAAGTCCCGTA	NO:8
Ha_FAD2-1_2439_E1_485	Commun	CCCACTGTGTTGTTAAAGTATTTCGAGTA	NO:9

[0077] EXEMPLE 4 : Validation phénotypique et utilisation en sélection.

[0078] Afin d'évaluer l'effet de la mutation, la composition en huile saturée a été mesurée à partir de 73 graines ségrégées à partir d'une plante hétérozygote au locus HABT-3816. Pour chaque graine, lune moitié est utilisée pour mesurer la composition en acides saturés par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et l'autre moitié est semée pour réaliser le génotypage sur feuilles.

[0079] La CPG est réalisée à l'aide du dispositif GC Thermo 1310 GC_1 et GC_2 selon le protocole suivant :

[0080] Des broyats de graines de tournesol sont aliquotés dans des boites 96 de type Collection Microtubes racked 10x96.

[0081] Dans une première étape les acides gras sont dissolus dans l'isooctane (2,2,4 - Trimethyl pentane) puis conversion en esters méthyliques par ajout de l'hydroxyde de potassium méthanolique (2N KOH/MeOH).

[0082] Une fois la réaction terminée, l'hydroxyde de potassium est neutralisé avec de l'hydrogénosulfate de sodium, afin d'éviter la saponification des esters méthyliques.

[0083] Enfin, les esters méthyliques sont séparés et quantifiés par CPG.

[0084] Pour le génotypage, des feuilles de jeunes plantes ont été échantillonnées en vue du génotypage à l'aide des marqueurs Ha_FAD2-1_2439_E1_485 KASP décrits dans l'exemple 3. 29 graines sont des plantes mutantes homozygotes (A : A), 44 graines sont hétérozygotes (A : G) et 10 graines sont des plantes sauvages homozygotes (G : G) ont été respectivement analysées pour leur teneur en acides gras

[0085] Les résultats de correspondance entre génotype et phénotype sont présentés dans le tableau 2 qui regroupe les moyennes des teneurs en acides gras des plantes mutantes homozygotes (A:A), hétérozygotes (A:G) et des plantes sauvages homozygotes (G:G) (*s.e.*: écart-type). La mutation est récessive avec un effet majeur sur la teneur en acide Oléique et linoléique. Les graines homozygotes qui portent la mutation ont une teneur stable en acide oléique supérieure à 90% (moyenne de 92.8 +/- 0.17 %) et un très faible niveau en acide linoléique.

[0086]

[Tableaux[TABLE 2]]

Ha_FAD2_1_2439_E1_485		**A:A**	**A:G**	**G:G**
Acide oléique	Moyenne	92.81	44.26	35.06
	s.e.	0.17	1.49	2.98
Acide linoléique	Moyenne	0.88	46.37	54.62
	s.e.	0.07	1.57	3.04
Acide palmitique	Moyenne	3.13	4.69	4.97
	s.e.	0.05	0.15	0.17
Acide stéarique	Moyenne	3.02	4.58	5.28
	s.e.	0.18	0.26	0.38

REFERENCES

[0087] Altschul et al, (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402

[0088] Altschul et al, (2005) FEBS J. 272:5101-5109)

[0089] Garces R, Mancha M (1991) "In vitro oleate desaturase in sunflower seeds developing" Phytochemistry 30:2127-2130

[0090] Hongtrakul et al. (1998) « A seed specific Δ 12 oleate-desaturase gene is duplicated, rearranged and weakly expressed in high oleic acid sunflower lines". Crop Sci 38:1245-1249

[0091] Kumar A et al. (2013) SMART – Sunflower Mutant population And Reverse genetic Tool for crop improvement. BMC Plant Biol. 13: 38. Lacombe et al. (2001) « An oleate-desaturase and a suppressor locus direct high oleic acid content of sunflower (Helianthus annuus L.) oil in the Pervenets mutant". C.R. Acad. Sci, Life Sci 324:839-845.

[0092] Mumm et al (2007) "Backcross versus Forward Breeding in the Development of Transgenic Maize Hybrids: Theory and Practice". Crop Sci (Suppl 3) 47: S164-S171.

[0093] Soldatov (1976) "Chemical mutagenesis in sunflower breeding". InProc. VIIthInt. Sunflower Conference, June 27th - July 3, Krasnodar.

Revendications

[Revendication 1] Procédé d'obtention d'une plante de tournesol comprenant une séquence nucléotides isolée qui comprend un codon stop aux positions 484 à 486 en référence à la séquence de nucléotides sauvage SEQ ID NO : 1 et qui code une protéine Δ12- oleate désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 4, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) Procéder à la mutagenèse d'une partie de plante de tournesol pour qu'elle comprenne ladite séquence de nucléotides par une technique de mutagenèse aléatoire ou d'édition de gènes,

b) Générer une plante à partir de ladite partie de plante ayant subi ladite mutagenèse

c) Obtenir au moins une descendance à partir de la plante générée à l'étape b), et

d) Identifier et sélectionner au moins une plante obtenue à l'étape b) ou c) comprenant ladite séquence de nucléotides .

[Revendication 2] Procédé d'obtention d'une plante de tournesol selon la revendication 1, ladite plante comprenant une séquence de nucléotides de séquence SEQ ID NO : 2.

[Revendication 3] Le procédé d'obtention selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans lequel l'étape a) de mutagenèse est réalisée par une technique de mutagenèse aléatoire induite par un agent chimique ou physique.

[Revendication 4] Procédé d'identification de la présence dans une plante de tournesol d'une séquence choisie parmi une séquence de nucléotides isolée qui comprend un codon stop aux positions 484 à 486 en référence à la séquence de nucléotides sauvage SEQ ID NO : 1 et qui code une protéine Δ12- oleate désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 4, une séquence de nucléotides de séquence SEQ ID NO : 2 et une protéine Δ12-oleate désaturase de tournesol tronquée de séquence SEQ ID NO : 4., ledit procédé comprenant l'extraction de l'ADN génomique, de l'ARN ou du protéome de la plante et l'utilisation de moyens d'identification de ladite séquence choisi parmi des sondes ou des amorces d'au moins 12 nucléotides jusqu'à 30 nucléotides complémentaires du brin de ladite séquence de nucléotides à amplifier, hybrider ou séquencer, et parmi des anticorps pour identifier la séquence de protéine correspondante.

[Revendication 5] Séquence de nucléotides isolée qui comprend un codon stop aux

positions 484 à 486 en référence à la séquence de nucléotides sauvage SEQ ID NO : 1 et qui code une protéine Δ12- oleate désaturase qui présente au moins 95% d'identité avec SEQ ID NO : 4.

[Revendication 6] Séquence de nucléotides selon la revendication 5 de séquence SEQ ID NO : 2.

[Revendication 7] Protéine Δ12-oleate désaturase de tournesol tronquée de séquence SEQ ID NO : 4.

[Revendication 8] Plante de tournesol obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

[Revendication 9] La plante de tournesol selon la revendication 8, dans laquelle la séquence de nucléotides est présente dans le génome de ladite plante à l'état hétérozygote ou homozygote.

[Revendication 10] La plante de tournesol selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, dans laquelle la plante est une lignée ou un hybride.

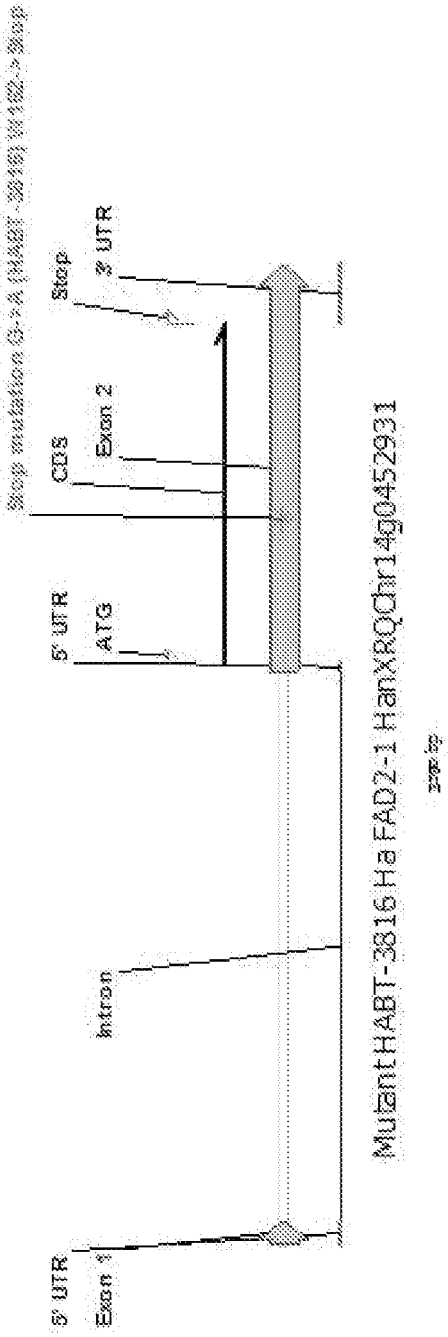
[Revendication 11] La plante de tournesol selon l'une quelconque des revendications 9 à 10, caractérisée en ce qu'elle produit des graines comprenant ladite séquence de nucléotides et que lesdites graines ont une teneur en acide oléique d'au moins 85 %, de préférence une teneur comprise dans une gamme allant de 85 % à 95 % par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines.

[Revendication 12] Graine de tournesol susceptible d'être obtenues à partir d'une plante selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce qu'elle comprend ladite séquence de nucléotides et qu'elle possède une teneur en acides oléiques d'au moins 85 %, de préférence une teneur comprise dans une gamme allant de 85 % à 95% par rapport au pourcentage total d'acides gras desdites graines.

[Revendication 13] Moyens d'identification d'une plante, partie de plante selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, choisis parmi des sondes ou des amorces d'au moins 12 nucléotides jusqu'à 30 nucléotides complémentaires du brin de ladite séquence de nucléotides à amplifier, hybrider, et parmi des anticorps pour identifier la séquence de protéine correspondante.

[Revendication 14] Utilisation de graines de tournesol selon la revendication 12, pour obtenir de l'huile, en particulier de l'huile ayant une teneur élevée en acide oléique.

[Fig. 1]


Stop mutation G->A (MABT-3816) W162-> Stop
Stop
3' UTR
CDS
Exon 2
5' UTR
ATG
Intron
5' UTR
Exon 1
Mutant MABT-3816 Ha FAD2-1 HanXRQChr14g0452931
200 bp

Sequence de nucléotide

SEQUENCE LISTING

<110> SOLTIS

<120> TOURNESOL A TENEUR ELEVEE EN ACIDE OLEIQUE ET PROCEDE D'OBTENTION

<130> B251162FR D39254

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1137
<212> DNA
<213> Helianthus annuus

<400> 1
atgggtgcag gagaatacac gtctgtgacc aacgaaaaca acccactcga tcgagtccct 60

catgcaaaac cacccttcac catcggcgat ctgaaaaaag ccatcccacc acactgcttc 120

cagcggtcgc taacccgttc gttctcctac gtgctgtctg acctcaccat aaccgctgtc 180

ctctaccaca ttgccaccac ctacttccac cacctcccca ccccttttgtc atccatcgca 240

tgggcctctt actgggtagt ccaaggctgc gtcctcaccg gagtctgggt catcgcccac 300

gaatgtggtc accatgcgtt tagtgattat caatgggtcg acgacactgt gggctttgtt 360

ctccactcgt ctttactcgt cccttacttt tcgtggaaat atagtcacca ccgccaccat 420

tccaacactg gatcactcga gcgggacgag gttttcgtcc ccaaatcccg atcgaaagtc 480

ccgtggtact cgaaatactt taacaacaca gtgggccgca ttgtcagtat gttcgtcact 540

ctcactctcg gctggccctt gtacttagct ttcaatgtgt cgggccgacc ctatgaccgt 600

ttcgcctgcc actacgtccc aaccagccct atgtacaatg aacgtaaacg ttaccagata 660

gtcatgtccg acatcgggat tgttatcaca tcgttcatcc tttatcgtgt tgctatggca 720

aaagggttgg tttgggtgat ttgcgtctat ggggttccgt tgatggttgt gaacgcgttt 780

ctggtgttga tcacttatct tcaacatact caccctggct tgccgcatta tgatagctcg 840

gaatgggaat ggttaaaggg agcattggcg acagtggacc gtgactatgg tgtgttgaac 900

aaggtgttcc atcatattac cgacacacat gtggtgcacc atttgttttc gacaatgcct 960

cattataatg cgatggaagc acagaaggcg ctgagaccgg tgcttgggga gtattatcgg 1020

tttgacaaga ccccgtttta tgtagccatg tggagagaga tgaaggaatg tttgtttgtg 1080

gagcaagatg atgaagggaa aggaggtgtg ttttggtaca agaataagat gaattaa 1137

<210> 2
<211> 1137
<212> DNA
<213> Helianthus annuus

<400> 2
atgggtgcag gagaatacac gtctgtgacc aacgaaaaca acccactcga tcgagtccct 60

catgcaaaac cacccttcac catcggcgat ctgaaaaaag ccatcccacc acactgcttc 120

cagcggtcgc taacccgttc gttctcctac gtgctgtctg acctcaccat aaccgctgtc 180

ctctaccaca ttgccaccac ctacttccac cacctcccca ccccttttgtc atccatcgca 240

tgggcctctt actgggtagt ccaaggctgc gtcctcaccg gagtctgggt catcgcccac 300

gaatgtggtc accatgcgtt tagtgattat caatgggtcg acgacactgt gggctttgtt 360

ctccactcgt ctttactcgt cccttacttt tcgtggaaat atagtcacca ccgccaccat 420

tccaacactg gatcactcga gcgggacgag gttttcgtcc ccaaatcccg atcgaaagtc 480

ccgtagtact cgaaatactt taacaacaca gtgggccgca ttgtcagtat gttcgtcact 540

ctcactctcg gctggccctt gtacttagct ttcaatgtgt cgggccgacc ctatgaccgt 600

ttcgcctgcc actacgtccc aaccagccct atgtacaatg aacgtaaacg ttaccagata 660

gtcatgtccg acatcgggat tgttatcaca tcgttcatcc tttatcgtgt tgctatggca 720

aaagggttgg tttgggtgat ttgcgtctat ggggttccgt tgatggttgt gaacgcgttt 780

ctggtgttga tcacttatct tcaacatact caccctggct tgccgcatta tgatagctcg 840

gaatgggaat ggttaaaggg agcattggcg acagtggacc gtgactatgg tgtgttgaac 900

aaggtgttcc atcatattac cgacacacat gtggtgcacc atttgttttc gacaatgcct 960

cattataatg cgatggaagc acagaaggcg ctgagaccgg tgcttgggga gtattatcgg 1020

tttgacaaga ccccgtttta tgtagccatg tggagagaga tgaaggaatg tttgtttgtg 1080

gagcaagatg atgaagggaa aggaggtgtg ttttggtaca agaataagat gaattaa 1137

<210> 3
<211> 378
<212> PRT
<213> Helianthus annuus

<400> 3

Met Gly Ala Gly Glu Tyr Thr Ser Val Thr Asn Glu Asn Asn Pro Leu

1 5 10 15

Asp Arg Val Pro His Ala Lys Pro Pro Phe Thr Ile Gly Asp Leu Lys
20 25 30

Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Leu Thr Arg Ser Phe
35 40 45

Ser Tyr Val Leu Ser Asp Leu Thr Ile Thr Ala Val Leu Tyr His Ile
50 55 60

Ala Thr Thr Tyr Phe His His Leu Pro Thr Pro Leu Ser Ser Ile Ala
65 70 75 80

Trp Ala Ser Tyr Trp Val Val Gln Gly Cys Val Leu Thr Gly Val Trp
85 90 95

Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp
100 105 110

Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Val Leu His Ser Ser Leu Leu Val Pro
115 120 125

Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His His Arg His His Ser Asn Thr Gly
130 135 140

Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys Ser Arg Ser Lys Val
145 150 155 160

Pro Trp Tyr Ser Lys Tyr Phe Asn Asn Thr Val Gly Arg Ile Val Ser
165 170 175

Met Phe Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Phe Asn
180 185 190

Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Arg Phe Ala Cys His Tyr Val Pro Thr
195 200 205

Ser Pro Met Tyr Asn Glu Arg Lys Arg Tyr Gln Ile Val Met Ser Asp
210 215 220

Ile Gly Ile Val Ile Thr Ser Phe Ile Leu Tyr Arg Val Ala Met Ala

225 230 235 240

Lys Gly Leu Val Trp Val Ile Cys Val Tyr Gly Val Pro Leu Met Val
245 250 255

Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Pro
260 265 270

Gly Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Glu Trp Leu Lys Gly Ala
275 280 285

Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu Asn Lys Val Phe His
290 295 300

His Ile Thr Asp Thr His Val Val His His Leu Phe Ser Thr Met Pro
305 310 315 320

His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Gln Lys Ala Leu Arg Pro Val Leu Gly
325 330 335

Glu Tyr Tyr Arg Phe Asp Lys Thr Pro Phe Tyr Val Ala Met Trp Arg
340 345 350

Glu Met Lys Glu Cys Leu Phe Val Glu Gln Asp Asp Glu Gly Lys Gly
355 360 365

Gly Val Phe Trp Tyr Lys Asn Lys Met Asn
370 375

<210> 4
<211> 161
<212> PRT
<213> Helianthus annuus

<400> 4

Met Gly Ala Gly Glu Tyr Thr Ser Val Thr Asn Glu Asn Asn Pro Leu
1 5 10 15

Asp Arg Val Pro His Ala Lys Pro Pro Phe Thr Ile Gly Asp Leu Lys
20 25 30

Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Leu Thr Arg Ser Phe
35 40 45

Ser Tyr Val Leu Ser Asp Leu Thr Ile Thr Ala Val Leu Tyr His Ile
50 55 60

Ala Thr Thr Tyr Phe His His Leu Pro Thr Pro Leu Ser Ser Ile Ala
65 70 75 80

Trp Ala Ser Tyr Trp Val Val Gln Gly Cys Val Leu Thr Gly Val Trp
85 90 95

Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp
100 105 110

Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Val Leu His Ser Ser Leu Leu Val Pro
115 120 125

Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His His Arg His His Ser Asn Thr Gly
130 135 140

Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys Ser Arg Ser Lys Val
145 150 155 160

Pro

<210> 5
<211> 178
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Amorce identification mutant

<400> 5
accaccgcca ccattccaac actggatcac tcgagcggga cgaggttttc gtccccaaat 60

cccgatcgaa agtcccgtag tactcgaaat actttaacaa cacagtgggc cgcattgtca 120

gtatgttcgt cactctcact ctcggctggc ccttgtactt agctttcaat gtgtcggg 178

<210> 6
<211> 178
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce identification WT

<400> 6
accaccgcca ccattccaac actggatcac tcgagcggga cgaggttttc gtccccaaat 60

cccgatcgaa agtcccgtgg tactcgaaat actttaacaa cacagtgggc cgcattgtca 120

gtatgttcgt cactctcact ctcggctggc ccttgtactt agctttcaat gtgtcggg 178

<210> 7
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce A1 marqueur Ha_FAD2-1_2439_E1_485

<400> 7
gaaggtgacc aagttcatgc taatcccgat cgaaagtccc gtg 43

<210> 8
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce A2 marqueur Ha_FAD2-1_2439_E1_485

<400> 8
gaaggtcgga gtcaacggat taaatcccga tcgaaagtcc cgta 44

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce commune marqueur Ha_FAD2-1_2439_E1_485

<400> 9
cccactgtgt tgttaaagta tttcgagta 29

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 875438
FR 1908408

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,D	WO 2013/004280 A1 (ADVANTA INTERNAT BV [NL] ET AL.) 10 janvier 2013 (2013-01-10) * le document en entier * -----	1-14	C12N15/29 C12N15/53 C12N9/02 C12N15/87
X	US 6 342 658 B1 (DEBONTE LORIN R [US] ET AL) 29 janvier 2002 (2002-01-29) * abrégé * * colonne 1, ligne 1 * * colonne 2, ligne 10 - ligne 20 * * colonne 2, ligne 38 - ligne 47 * * colonne 4, ligne 31 - ligne 38 * * colonne 5, alinéa 1 * -----	1-14	A01H1/04 A01H1/06 A01H5/00 A01H5/10 C12Q1/6895 A01H6/14
X	SÃ VERINE LACOMBE ET AL: "An insertion of oleate desaturase homologous sequence silences via siRNA the functional gene leading to high oleic acid content in sunflower seed oil", MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 281, no. 1, 28 octobre 2008 (2008-10-28), pages 43-54, XP019658427, ISSN: 1617-4623 * le document en entier * -----	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A01H C12N
T	ALBERIO CONSTANZA ET AL: "A new sunflower high oleic mutation confers stable oil grain fatty acid composition across environments", EUROPEAN JOURNAL OF AGRONOMY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 73, 11 novembre 2015 (2015-11-11), pages 25-33, XP029377029, ISSN: 1161-0301, DOI: 10.1016/J.EJA.2015.10.003 * le document en entier * ----- -/--		

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
11 mai 2020	Keller, Yves

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

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

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 875438
FR 1908408

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		
T	Unknown: "Tour", , 10 mai 2015 (2015-05-10), XP055693603, Extrait de l'Internet: URL:http://www.open-source-biology.com/Synthese_high-oleic_final_27-06-2015.pdf [extrait le 2020-05-11] -----		

DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
11 mai 2020	Keller, Yves

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

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1908408 FA 875438

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 11-05-2020
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
WO 2013004280 A1	10-01-2013	AR 087014 A1	05-02-2014
		WO 2013004280 A1	10-01-2013
US 6342658 B1	29-01-2002	US 6342658 B1	29-01-2002
		US 2003131379 A1	10-07-2003
		US 2007163002 A1	12-07-2007

EPO FORM P0465