

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 984 076

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

②① N° d'enregistrement national :

11 61726

⑤① Int Cl⁸ : **A 01 H 5/00** (2013.01), **C 12 N 15/29**, 15/82

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 15.12.11.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.06.13 Bulletin 13/25.

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

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR
LE DEVELOPPEMENT (IRD) — FR.

⑦② Inventeur(s) : CHAMPION ANTONY.

⑦③ Titulaire(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DEVELOPPEMENT (IRD).

⑦④ Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤④ **SURPRODUCTION DE JASMONATES DANS DES PLANTES TRANSGENIQUES.**

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation d'un acide
nucléique permettant la synthèse de GhERF-IIa, GhERF-IIb
ou GhERF-IIc chez une plante pour induire, chez cette
plante, une accumulation d'acide jasmonique et/ou d'OPDA.
L'accumulation d'acide jasmonique et/ou d'OPDA confère,
en particulier, à la plante transformée, une résistance amé-
liorée aux bioagresseurs. Les acides nucléiques et mé-
thodes de transformation selon l'invention peuvent être
utilisés pour augmenter la production, par les plantes, de
métabolites secondaires présentant un intérêt pharmaceu-
tique et dont la synthèse est induite par les jasmonates.

FR 2 984 076 - A1



Surproduction de Jasmonates dans des Plantes Transgéniques

Domaine de l'Invention

La présente invention concerne l'amélioration des plantes, et notamment l'amélioration de la résistance des plantes aux bioagresseurs, par augmentation de la
5 production d'acide jasmonique et/ou d'OPDA dans ces plantes.

Contexte de l'Invention

La lutte contre les maladies de plantes est une préoccupation majeure de l'agriculture. On estime qu'au niveau mondial environ un tiers des récoltes est détruit au champ ou lors du stockage par des agents pathogènes (insectes, virus, bactéries,
10 oomycètes ou champignons). Cela se traduit par des pertes économiques considérables et, peut, dans certaines régions du globe, conduire à des problèmes de sous-alimentation ou de malnutrition des populations.

Au fil du temps, plusieurs approches ont été développées pour lutter contre les maladies de plantes, la plus ancienne étant l'approche chimique qui fait appel aux
15 pesticides, tels que les fongicides, bactéricides, nématocides, virucides et insecticides. Bien qu'efficace, l'utilisation de molécules issues de l'industrie chimique est généralement associée à des problèmes de pollution et à des risques potentiels pour la santé humaine et animale. De plus, de nombreux phytopathogènes d'origine virale ou bactérienne ne sont pas sensibles aux produits chimiques actuellement disponibles sur le
20 marché, et certains champignons pathogènes, acariens, nématodes et insectes peuvent supporter sans dommage de fortes doses de pesticides. Des alternatives aux traitements chimiques ont, depuis, été mises au point et sont couramment utilisées au champ ou arrivent peu à peu sur le marché. Il faut citer, en particulier, la lutte biologique qui emploie des organismes prédateurs naturels contre les agents pathogènes de plantes;
25 l'amélioration génétique des plantes qui demeure l'une des méthodes de choix lorsqu'on a identifié des gènes de résistance ou de tolérance stables qui peuvent être introduits dans le matériel héréditaire des plantes; et les méthodes fondées sur la résistance naturelle des plantes aux maladies provoquées par les ravageurs.

La résistance naturelle des plantes aux maladies provoquées par les ravageurs est
30 souvent initiée par la reconnaissance spécifique d'un pathogène donné, et particulièrement par la reconnaissance de molécules appelées "éliciteurs" ou "effecteurs" présentes à la surface des pathogènes ou excrétées par ceux-ci. Cette reconnaissance conduit à une

induction rapide des mécanismes de défense de la plante qui limitent la multiplication et la propagation du pathogène dans les différents tissus végétaux. Des travaux ont montré que l'application d'éliciteurs sur une plante augmente la résistance de celle-ci aux bioagresseurs en activant préventivement ses réactions de défense. Cette stimulation des défenses naturelles a ouvert la voie à de nouvelles approches en matière de lutte contre les maladies des plantes et suscite de plus en plus d'intérêt. Cependant, les éliciteurs présentent le désavantage d'avoir un spectre d'action limité et un coût encore trop élevé.

La reconnaissance des éliciteurs résulte généralement en la biosynthèse d'une ou de plusieurs molécules secondaires de signalisation cellulaire, les plus importantes étant: l'acide jasmonique (Memelink *et al.*, Trends Plant Sci., 2001, 6 : 212-219; Turner *et al.*, Plant Cell, 2002, 14 (suppl.): S153-S164), l'éthylène (Wang *et al.*, Plant Cell, 2002, 14 (suppl.): S131-S151; Guo *et al.*, Curr. Opin. Plant Biol., 2004, 7: 40-49) et l'acide salicylique (Shah, Curr. Opin. Plant Biol., 2003, 6: 365-371). La production de ces composés génère un réseau de signalisation conduisant à une cascade d'évènements responsables de l'adaptation physiologique des plantes aux stress externes. Les recherches actuelles visent à identifier des signaux activant tout ou une partie de ces éléments de défense naturelle dans le but de développer de nouvelles stratégies phytosanitaires plus respectueuses de l'environnement que les méthodes chimiques.

Un certain nombre de ces recherches concerne l'acide jasmonique qui joue un rôle essentiel dans les interactions plantes-insectes, plantes-bactéries et plantes-champignons en augmentant la défense de plantes (McConn *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 5473-5477; Dong, Curr. Opin. Plant Biol., 1998, 1: 316-323; Penninckx *et al.*, Plant Cell, 1998, 10: 2103-2113; Thomma *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 15107-15111; Vijayan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 7209-7214). L'acide jasmonique et ses précurseurs et dérivés, collectivement dénommés "jasmonates", constituent une famille de composés synthétisés à partir d'acide linoléique membranaire *via* la voie métabolique des octadécanoïdes (Turner *et al.*, Plant Cell, 2002, 14 (suppl.): S153-S164; Atallah *et al.*, In Encyclopedia of Plant and Crop Science, 2004, R.M. Goodman (Ed), New York: Marcel Dekker Inc, pp. 1006-1009). Le développement, chez *Arabidopsis*, de mutants présentant des déficiences dans certains mécanismes jasmonate-dépendants a révélé la complexité de la voie de signalisation de l'acide jasmonique. Cette voie se distingue en particulier par son autorégulation: les gènes de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique pouvant être eux-mêmes activés par les jasmonates (Bonaventure *et*

al., Plant J., 2007, 49: 889-898). Plus d'une dizaine de gènes, appelés gènes *ORA*, qui codent pour des facteurs de transcription du domaine AP2/ERF d'*Arabidopsis* et dont l'expression est jasmonate-dépendante ont été identifiés (Atallah, PhD thesis, « Jasmonate-responsive AP2-domain transcription factors in Arabidopsis », 2005, Pays-
5 Bas). Les présents demandeurs ont démontré que, contrairement à ce qui est observé chez *Arabidopsis thaliana*, la surexpression hétérologue du facteur de transcription ORA47 chez le cotonnier induit non seulement une forte accumulation d'OPDA (acide 12-oxo-phytodiénoïque), un précurseur de l'acide jasmonique, mais également une forte accumulation d'acide jasmonique.

10 Malgré les progrès réalisés permettant une meilleure compréhension de la fonction de l'acide jasmonique dans la résistance naturelle des plantes, la connaissance des bases moléculaires des mécanismes de régulation contrôlant la voie de signalisation de l'acide jasmonique demeure encore fragmentaire et reste insuffisante pour un développement logique et informé de nouvelles stratégies de lutte contre les maladies des plantes.

15 **Résumé de l'Invention**

D'une façon générale, la présente invention repose sur l'utilisation de mécanismes de défenses naturelles des plantes impliquant les jasmonates pour améliorer la résistance de ces plantes aux bioagresseurs, et/ou pour augmenter leur production de métabolites secondaires.

20 En se basant sur une homologie de séquence, les présents demandeurs ont identifié, chez le cotonnier, trois orthologues fonctionnels du gène *ORA47* d'*Arabidopsis*, qu'ils ont nommé *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc*. Ils ont également montré que la surexpression d'un de ces facteurs chez le cotonnier et chez le tabac induisait une forte accumulation d'acide jasmonique et de son précurseur, OPDA. Comme dans le cas
25 d'ORA47, la surexpression de *GhERF-IIc*, chez le cotonnier et chez le tabac, s'est révélée résulter en une production d'acide jasmonique plus élevée que la production d'OPDA. Au contraire, la surexpression de *GhERF-IIa* ou de *GhERF-IIb* est associée à une production d'OPDA supérieure à la production d'acide jasmonique.

30 Etant donné le rôle important de l'acide jasmonique dans les mécanismes de défense végétale contre les bioagresseurs, la surexpression d'un (ou de plusieurs) de ces facteurs de transcription peut être utilisée pour augmenter la teneur en acide jasmonique et/ou en OPDA dans les plantes et produire ainsi des plantes présentant une résistance améliorée

aux agents pathogènes. Cette approche a plusieurs avantages par rapport aux méthodes existantes: (1) elle est universelle, (2) elle permet une accumulation *in planta* de jasmonates, et (3) elle consiste à exploiter des mécanismes de défenses naturelles de plantes dans l'objectif d'une gestion durable des résistances, et de ce fait représente une

5 stratégie plus respectueuse de l'environnement que les méthodes chimiques de lutte contre les maladies des plantes.

En conséquence, dans un premier aspect, la présente invention concerne une plante transgénique contenant une séquence nucléotidique exogène permettant l'expression d'un facteur de transcription choisi parmi GhERF-IIa, GhERF-IIb et GhERF-IIc, caractérisée

10 en ce que l'expression du facteur de transcription induit, dans la plante, une surproduction d'acide jasmonique et/ou d'OPDA. Préférentiellement, la séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc est intégrée dans le génome de la plante transgénique.

Dans certains modes de réalisation, la plante transgénique contient une séquence

15 nucléotidique exogène permettant l'expression du facteur de transcription GhERF-IIa ou GhERF-IIb et est caractérisée par une teneur en OPDA supérieure à la teneur en acide jasmonique. Dans d'autres modes de réalisation, la plante transgénique contient une séquence nucléotidique exogène permettant l'expression du facteur de transcription GhERF-IIc et est caractérisée par une teneur en acide jasmonique supérieure à la teneur en

20 OPDA. Dans encore d'autres modes de réalisation, la plante transgénique contient une séquence nucléotidique exogène permettant l'expression d'une combinaison quelconque des facteurs de transcription GhERF-IIa, GhERF-IIb et GhERF-IIc (ex. GhERF-IIb et GhERF-IIc ou GhERF-IIa et GhERF-IIc).

Une plante transgénique selon l'invention est en outre caractérisée en ce qu'elle

25 présente une résistance améliorée à au moins un agent pathogène sélectionné parmi les bactéries, les virus, les champignons, les insectes et les oomycètes, où les bactéries, les virus, les champignons, les insectes et les oomycètes sont capables d'induire une maladie chez une plante.

Dans certains modes de réalisation, la plante transgénique appartient à la famille des

30 Malvacées (ex. cotonnier, cacao, okra, etc...), à la famille des Solanacées (ex. tabac, tomate, pomme de terre, aubergines, etc...), à la famille des Rubiacées (ex. café, etc...), à la famille des Poacées ou Graminées (ex. riz, maïs, blé, orge, avoine, seigle, mil, canne à

sucres, etc...) ou à la famille des Vitacées (ex. vigne, etc...). Dans certains modes de réalisation préférés, la plante transgénique appartient aux genres *Gossypium* ou *Cotoneaster* (coton), au genre *Nicotiana* (tabac), au genre *Oryza* (riz), au genre *Solanum* (tomate), au genre *Coffea* (café), ou au genre *Vitis* (vigne).

- 5 Dans un autre aspect, la présente invention concerne du matériel végétal obtenu ou extrait d'une plante transgénique de l'invention. Le matériel végétal peut être une cellule, une culture de cellules, un protoplaste, un organe, un cal, une graine, une feuille, une tige, une racine, une fleur, un fruit, un tubercule, du pollen, ou une bouture de la plante transgénique. Dans certains modes de réalisation, le matériel végétal est capable de
- 10 régénérer une plante entière, en particulier une plante transgénique de l'invention.

Dans un autre aspect, la présente invention concerne des procédés d'obtention d'une plante transgénique selon l'invention.

- Dans certains modes de réalisation, le procédé comprend les étapes suivantes:
- (a) une étape de transformation d'une cellule de plante avec une cassette d'expression ou
- 15 un vecteur comprenant une séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc, de manière à obtenir une cellule de plante transformée de façon stable; et
- (b) une étape de culture de la cellule de plante transformée de façon stable de manière à régénérer une plante entière contenant, intégrée dans son génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc. Cette
- 20 étape de culture peut comprendre: la culture de plusieurs cellules transformées de façon stable de manière à régénérer plusieurs plantes; et la sélection, parmi les plantes régénérées de celles qui contiennent, intégrée dans leur génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc.

- Dans d'autres modes de réalisation, le procédé comprend les étapes suivantes:
- 25 (a) une étape de transformation d'une cellule hôte d'*Agrobacterium* de manière à obtenir une cellule hôte recombinante; et une étape de transformation d'une plante ou d'une cellule de plante par infection avec la cellule hôte recombinante de manière à obtenir une plante entière contenant, intégrée dans son génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc. Cette étape de
- 30 transformation peut comprendre: l'infection de plusieurs plantes ou de plusieurs cellules de plante avec des cellules hôtes recombinantes, éventuellement la culture de plusieurs cellules de plantes infectées de manière à régénérer plusieurs plantes; et la sélection,

parmi les plantes infectées ou parmi les plantes régénérées, de celles qui contiennent, intégrée dans leur génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc.

5 Pour produire une plante transgénique contenant une séquence nucléotidique exogène permettant l'expression d'une combinaison des facteurs de transcription GhERF-IIa, GhERF-IIb et GhERF-IIc, les procédés de l'invention peuvent comprendre deux ou trois étapes de transformation utilisant chacune une cassette d'expression ou un vecteur comprenant une séquence nucléotidique codant pour l'un des facteurs de transcription de l'invention. Alternativement, les procédés de l'invention peuvent comprendre une seule
10 étape de transformation utilisant une cassette d'expression ou un vecteur comprenant une séquence nucléotidique codant pour deux ou trois des facteurs de transcription de l'invention.

Dans un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une cassette d'expression ou d'un vecteur comprenant une séquence nucléotidique permettant la synthèse de
15 GhERF-IIa, GhERF-IIb, GhERF-IIc ou d'une de leurs combinaisons chez une plante pour induire, chez cette plante, une surproduction d'acide jasmonique et/ou une surproduction d'OPDA.

Dans certains modes de réalisation, la plante surproduisant l'acide jasmonique et/ou OPDA présente une résistance améliorée à au moins un agent pathogène. L'agent
20 pathogène peut être choisi parmi les bactéries, les virus, les champignons, les insectes ou les oomycètes, où les bactéries, les virus, les champignons, les insectes et les oomycètes sont capables d'induire une maladie chez une plante.

Il est connu dans l'art que l'acide jasmonique induit, dans différentes espèces de plantes, l'expression de gènes intervenant dans la biosynthèse de métabolites secondaires
25 présentant un intérêt économique en tant que produits pharmaceutiques ou en tant que colorants ou arômes alimentaires. Plusieurs de ces métabolites secondaires appartiennent aux familles des taxoïdes, des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes, des anthocyanines, des guaianolides, des anthraquinones, des sesquiterpénoïdes, et des alcaloïdes.

En conséquence, dans un autre aspect, la présente invention concerne des plantes
30 transgéniques selon l'invention caractérisées en ce qu'elles surproduisent au moins un métabolite secondaire dont la biosynthèse est induite par l'acide jasmonique. Elle concerne également l'utilisation des méthodes décrites ici pour générer de telles plantes

transgéniques. Dans certains modes de réalisation préférés, le métabolite secondaire est la nicotine.

Une description plus détaillée de certains modes de réalisation préférés de l'invention est donnée ci-dessous.

5 Description Détaillée de l'Invention

Comme mentionné ci-dessus, la présente invention concerne la transformation d'une plante pour induire, chez cette plante, une surproduction ou accumulation d'acide jasmonique et/ou d'OPDA. La transformation inclut l'utilisation d'une cassette d'expression ou d'un vecteur permettant, chez la plante transformée, la synthèse d'un
10 facteur d'expression de transcription du cotonnier, ce facteur de transcription étant GhERF-IIa, GhERF-IIb, GhERF-IIc, ou une combinaison de ces facteurs de transcription.

I - Cassettes d'Expression et Vecteurs permettant la Surproduction de Jasmonates chez une Plante

Une cassette d'expression (ou un vecteur) selon l'invention comprend une séquence
15 nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc (ou une de leurs combinaisons). Comme mentionné plus haut, *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc* ont été identifiés comme des orthologues fonctionnels du gène *AtORA47* d'*Arabidopsis thaliana*, qui code pour ORA47, un facteur de transcription (c'est-à-dire une protéine capable de moduler l'expression des gènes) appartenant à la famille AP2/ERF et dont
20 l'expression entraîne l'induction coordonnée de plusieurs gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des jasmonates.

Séquence Nucléotidique Codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc

Dans la mise en œuvre de l'invention, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc peut être n'importe quelle séquence nucléotidique
25 dont la transcription résulte en la protéine GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 et SEQ ID NO: 3, respectivement) ou un polypeptide homologue. Préférentiellement, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc comprend, ou consiste en, la séquence SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 6, respectivement, ou une de leurs séquences homologues résultant de la
30 dégénérescence du code génétique. Alternativement, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc comprend, ou consiste en, une séquence

homologue de la séquence SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6, respectivement et codant pour un polypeptide homologue à GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc. Alternativement encore, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc comprend, ou consiste en, une séquence nucléotidique
 5 complémentaire de la séquence SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6, respectivement ou d'une de leurs séquences homologues; une séquence nucléotidique modifiée de la séquence SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6 ou d'une de leurs séquences homologues; ou un fragment représentatif d'une des séquences nucléiques précédentes (par exemple, un cadre ouvert de lecture).

10 Les termes “séquence nucléotidique”, “acide nucléique”, “séquence nucléique”, “polynucléotide” et “oligonucléotide” sont ici employés indifféremment. Par ces termes, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir une région d'un acide nucléique, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin ou un ADN simple brin qu'à des produits de transcription de ces ADNs.

15 Par “séquence nucléotidique homologue” d'une séquence particulière (par exemple, de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 6), on entend toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence particulière par substitution, délétion, et/ou insertion d'un nucléotide ou d'un nombre réduit de nucléotides, à des positions telles que ces séquences nucléotidiques homologues codent pour des polypeptides homologues à
 20 GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc et en particulier à SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3. De préférence, une telle séquence nucléotidique homologue a un pourcentage d'identité tel qu'elle est identique à au moins 75% de la séquence SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6, préférablement au moins 85%, plus préférablement encore au moins 95%.

25 Par “pourcentage d'identité” entre deux séquences nucléotidiques ou deux séquences peptidiques, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après alignement optimal. Ce pourcentage est purement statistique et les différences entre les deux séquences sont réparties au hasard et sur toute la longueur de la séquence. Les termes
 30 “alignement optimal” et “meilleur alignement”, qui sont utilisés de façon interchangeable ici, désignent l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme décrit ci-dessous est le plus élevé. L'alignement optimal des séquences, nécessaire à la comparaison, peut être réalisé manuellement ou au moyen de logiciels informatiques

(GAP, BESTFIT, BLASTP, BLASTN, FASTA, et TFASTA, qui sont disponibles soit sur le site NCBI, soit dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI). Le pourcentage d'identité entre deux séquences nucléotidiques ou deux séquences peptidiques est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100.

Préférentiellement, dans le contexte de la présente invention, une séquence nucléotidique homologue d'une séquence particulière (par exemple, de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 6) s'hybride spécifiquement à la séquence complémentaire de cette séquence particulière, dans des conditions stringentes (Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning – A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Par "séquence nucléotidique modifiée" d'une séquence particulière (par exemple, de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 6), on entend, au sens de l'invention, toute séquence nucléotidique obtenue par mutagenèse selon les techniques bien connues de l'homme du métier, et comportant des modifications par rapport à cette séquence particulière, par exemple des mutations dans les séquences régulatrices et/ou promotrices de l'expression du polypeptide, notamment conduisant à une modification du taux d'expression ou d'activité de ce polypeptide. Par séquence nucléotidique modifiée, on entend également toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide (GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc) modifié.

Le terme "fragment représentatif" d'une séquence nucléotidique particulière (par exemple, de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 6) désigne tout fragment de cette séquence particulière, qui code pour un polypeptide présentant une activité identique ou similaire à celle de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc. Dans certains modes de réalisation, un fragment représentatif d'une séquence particulière est un cadre ouvert de lecture de cette séquence. L'homme du métier sait identifier un cadre ouvert de lecture.

Les techniques pour isoler ou cloner un gène ou une séquence nucléotidique codant pour un facteur de transcription (tel que GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc) sont connues dans l'art et incluent l'isolation à partir d'ADN génomique, la préparation à partir d'ADN complémentaire, ou une combinaison de ces méthodes. Le clonage d'un gène, ou

d'une séquence nucléotidique codant pour un facteur de transcription, à partir d'un ADN génomique peut être effectué par exemple en utilisant une réaction en chaîne par polymérase (PCR) ou par criblage de bibliothèques d'expression pour détecter les fragments d'ADN clonés avec des caractéristiques structurales identiques (Innis *et al.*, "PCR: A
 5 Guide to Method and Application", 1990, Academic Press: New York). D'autres méthodes d'amplification d'acides nucléiques connues de l'homme du métier peuvent être utilisées, comme par exemple, une réaction en chaîne par ligase (LCR), une transcription activée par ligation (LAT) et la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification).

10 *Cassettes d'expression*

Dans une cassette d'expression selon la présente invention, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc est insérée en orientation sens et est préférablement liée à un ou plusieurs éléments permettant son expression et éventuellement sa régulation dans une cellule de plante. Ainsi,
 15 préférablement, une cassette d'expression selon l'invention inclut des séquences régulatrices 5' et 3' liées opérationnellement à la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc. Les termes "lié opérationnellement" et "lié de façon opérationnelle" sont utilisés indifféremment et font référence à un lien fonctionnel entre les séquences régulatrices 5' et 3' et la séquence d'acide nucléique qu'elles
 20 contrôlent. Une cassette d'expression selon l'invention comprend, dans la direction 5'→3' de transcription, une région d'initiation de la transcription, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc, et une région de terminaison de la transcription, qui sont fonctionnelles dans une cellule de plante ou dans une plante. Une telle combinaison est désignée ici par le terme "séquence nucléotidique
 25 permettant la synthèse de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc".

Promoteurs. La région d'initiation de la transcription est également appelée promoteur. Par "promoteur", on entend tout polynucléotide capable de réguler l'expression, dans une cellule, d'une séquence nucléotidique à laquelle il est lié de façon opérationnelle. Dans le contexte de l'invention, un promoteur est capable d'exercer son
 30 action régulatrice dans une cellule de plante (on parle d'un "promoteur végétal"). Ainsi, dans le contexte de l'invention, une séquence régulatrice de type promoteur est une région régulatrice reconnue par une ARN polymérase dans une cellule et capable d'initier la transcription de la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou

GhERF-IIc dans une cellule de plante. Le promoteur peut être homologue à la cellule de plante hôte ou, alternativement, peut être hétérologue à la cellule de plante hôte. De plus, le promoteur peut être une séquence naturelle (c'est-à-dire une séquence existant dans la nature) ou une séquence synthétique (c'est-à-dire une séquence n'existant pas en tant que telle dans la nature). Dans la mise en œuvre de l'invention, les promoteurs appropriés incluent, en particulier, les promoteurs constitutifs et les promoteurs tissu-spécifiques.

Promoteurs Constitutifs. Dans certains modes de réalisation, une cassette selon l'invention comprend un promoteur constitutif de plante lié de façon opérationnelle à la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc. Par “promoteur constitutif”, on entend un promoteur capable d'exprimer des séquences nucléotidiques liées de manière opérationnelle au promoteur, dans tous ou pratiquement tous les tissus de l'organisme hôte et pendant tout le développement de cet organisme. Les promoteurs constitutifs de plantes incluent, sans limitation, le promoteur du virus mosaïque de chou-fleur 35S (CaMV), le promoteur constitutif double 25S (pd35S) du CaMV, le promoteur de synthase nopaline, le promoteur de synthase octopine, le promoteur 19S, le promoteur actine de riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-LAR) contenu dans le plasmide pAct-1-F4, le promoteur du gène de l'actine 1 du riz, le promoteur du gène *AdH* du maïs, le promoteur de l'ubiquitine du maïs, et le promoteur pUbil du gène codant pour l'ubiquitine 1 du maïs. De tels promoteurs peuvent être obtenus à partir d'ADN génomique par PCR, puis ils peuvent être clonés dans une cassette d'expression selon l'invention.

Promoteurs Tissu-Spécifiques. Dans d'autres modes de réalisation, l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc est ciblée à certains tissus de la plante transgénique. Par “promoteur tissu-spécifique” ou “promoteur tissulaire spécifique”, on entend un promoteur capable d'exprimer, de manière sélective, des séquences nucléotidiques liées à lui de manière opérationnelle, dans certains tissus spécifiques de l'organisme hôte. Par exemple, l'expression spécifique des tissus peut être accomplie pour une expression préférentielle de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc dans les feuilles et/ou les tiges et/ou la racine de la plante plutôt que dans les graines ou les fruits de la plante (ce qui peut réduire les inquiétudes liées à la consommation humaine d'organismes génétiquement modifiés). L'expression spécifique des tissus peut également être utile dans le cas où le pathogène auquel la plante est naturellement sensible attaque spécifiquement seulement certains tissus de la plante.

Ainsi, dans certains modes de réalisation, une cassette selon l'invention comprend un promoteur tissu-spécifique de plante lié de façon opérationnelle à la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc. Plusieurs gènes régulateurs spécifiques de tissus et des promoteurs de tissus utilisables dans les plantes

5 sont connus dans l'art. De tels gènes incluent, sans limitation, les gènes codant pour des protéines de stockage ou de réserve des graines (telles que napine, cruciférine, β -conglycinine et phaséoline) de type zéine, des gènes impliqués dans la biosynthèse d'acide gras (y compris la protéine ACP – acyl carrier protein, stéaroyle ACP-désaturase, et les désaturases d'acides gras (fad 2-1)), et d'autres gènes exprimés pendant le

10 développement embryonnaire tel que *Bce4* (Kridl *et al.*, Seed Science Res., 1991, 1: 209). Les promoteurs spécifiques de tissus qui ont été décrits incluent, sans limitation, la lectine (Vodkin, Prog. Clin. Biol. Res., 1983, 138: 87; Lindstrom *et al.*, Der. Genet., 1990, 11: 160), l'alcool déshydrogénase-1 du maïs (Dennis *et al.*, Nucleic Acids Res., 1984, 12: 983), l'antenne collectrice de lumière du maïs (Bansal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

15 1992, 89: 3654), la protéine de choc thermique du maïs, la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase du pois, la mannopine synthase du plasmide Ti, la nopaline synthase du plasmide T1, la chalcone isomérase de pétunia (van Tunen *et al.*, EMBO J., 1988, 7:125), la protéine I riche en glycine du haricot (Keller *et al.*, Genes Dev., 1989, 3: 1639), le CaMV 25S tronqué (Odell *et al.*, Nature, 1985, 313: 810), la patatine de pomme

20 de terre (Wenzler *et al.*, Plant Mol. Biol., 1989, 13: 347), la zéine de maïs (Reina *et al.*, Nucleic Acids Res., 1990, 18: 6425; Kriz *et al.*, Mol. Gen. Genet., 1987, 207: 90; Wandelt *et al.*, Nucleic Acids Res., 1989, 17 2354), le promoteur PEPC du gène de la phosphoénolpyruvate carboxylase de sorgho (Crétin *et al.*, Gène, 1991, 99: 87-94), le promoteur HMGW du blé (Blechl and Anderson, Nat. Biotech., 1996, 14: 875-879) ou de

25 l'orge et les promoteurs de la chalcone synthase (Franken *et al.*, EMBO J., 1991, 10: 2605).

Région de Terminaison de Transcription. Dans la mise en œuvre de la présente invention, la région de terminaison de transcription présente dans la cassette d'expression peut être de la même origine que (c'est-à-dire homologue à) la région d'initiation de

30 transcription ou la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc, ou bien d'origine différente (c'est-à-dire hétérologue). Des régions de terminaison de transcription sont par exemple disponibles à partir du plasmide T₁ d'*Agrobacterium tumefaciens*, telles que les régions de terminaison de la synthase

octopine et de la synthase nopaline (An *et al.*, Plant Cell, 1989, 1: 115-122; Guérineau *et al.*, Mol. Gen. Genet., 1991, 262: 141-144; Proudfoot, Cell, 64, 671-674; Sanfaçon *et al.*, Genes Dev., 1991, 5: 141-149; Mogen *et al.*, Plant Cell, 1990, 2: 1261-1272; Munroe *et al.*, Gene, 1990, 91: 151-158; Ballas *et al.*, Nucleic Acids Res., 1989, 17: 7891-7903; and
 5 Joshi *et al.*, Nucleic Acids Res., 1987, 15: 9627-9639). D'autres exemples de régions de terminaison de transcription incluent, sans limitation, le polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Franck *et al.*, Cell, 1980, 21: 285-294) et le terminateur du gène histone (EP 0 633 317).

Autres Séquences Régulatrices. D'autres séquences qui peuvent être présentes dans
 10 une cassette d'expression selon l'invention sont des séquences qui augmentent l'expression génique comme les introns, les séquences "enhancer" et les séquences "leader".

Les introns dont on sait qu'ils augmentent l'expression génique dans les plantes sont, par exemple, les introns du gène *Adh1* du maïs, les introns du gène *bronzel* du maïs
 15 (J. Callis *et al.*, Genes Develop., 1987, 1 : 1183-1200), l'intron DSV de la mosaïque jaune du tabac (Morris *et al.*, Virology, 1992, 187: 633), et l'intron actine-1 du riz (McElroy *et al.*, Plant Cell, 1990, 2: 163-171). Les séquences enhancer appropriées incluent, sans limitation, l'activateur de transcription du virus de la mosaïque du tabac TEV (Carrington
et al., J. Virol., 1990, 64: 1590-1597). Les séquences leader non-traduites dont on sait
 20 qu'elles augmentent l'expression génique dans les plantes sont, par exemple, les séquences leader du virus mosaïque de tabac (TMV), du virus de la marbrure chlorotique du maïs (MCMV), et du virus mosaïque d'alfalfa (AIMV) (Gallie *et al.*, Nucl. Acids Res., 1987, 15: 8693-8711; Skuzeski *et al.*, Plant Mol. Biol., 1990, 15: 65-79). D'autres séquences leader appropriées incluent, sans limitation, le leader EMCV
 25 (Encephalomyocarditis 5'noncoding region (Elroy-Stein *et al.*, PNAS USA, 1989, 86: 6126-3130), le leader BiP-protéine de liaison humaine (Macejack *et al.*, Nature, 1991, 353 : 90-94), et le leader AMV RNA 4 provenant de l'ARNm de la protéine de virus de la mosaïque de la luzerne (Jobling *et al.*, Nature, 1987, 325 : 622-625).

Si nécessaire ou désiré, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-
 30 IIb ou GhERF-IIc peut être modifiée pour inclure des codons qui sont optimisés pour l'expression dans la plante transformée (Campbell *et al.*, Plant Physiol., 1990, 92: 1-11; Muray *et al.*, Nucleic Acids Res., 1989, 17: 477-498; Wada *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 19: 2367; and brevets U.S. 5,096,825; 5,380,831; 5,436,391; 5,625,136, 5,670,356 et

5,874,304). Les séquences codon optimisées sont généralement des séquences synthétiques.

Séquences Supplémentaires. Dans certains modes de réalisation, une cassette d'expression selon l'invention comprend en outre un ou plusieurs gènes marqueurs. Les gènes marqueurs sont des gènes qui confèrent un phénotype distinctif aux cellules exprimant le gène marqueur, ce qui permet de distinguer les cellules transformées des cellules non-transformées. Ces gènes marqueurs codent pour un marqueur de sélection. Le phénotype distinctif permet l'identification de cellules, de groupes de cellules, de tissus, d'organes, de parties de plantes ou de plantes entières contenant dans leur génome la cassette d'expression. De nombreux exemples de gènes marqueurs sont connus dans l'art. Certains marqueurs confèrent un bénéfice supplémentaire à la plante transgénique, comme par exemple une résistance à un herbicide, à des maladies, à des ravageurs ou au stress environnemental.

Des exemples de marqueurs qui confèrent une résistance aux herbicides et qui peuvent être utilisés dans la mise en œuvre de la présente invention incluent, sans limitation, le gène *bar* du *Streptomyces hygroscopicus* qui code pour l'acétylase phosphinothricine (PAT) procurant une résistance au glufosinate; les gènes mutants qui confèrent une résistance à l'imidazalinone ou au sulfonyleurée tels que les gènes codant pour la forme mutante des enzymes ALS et AHAS (Lee *et al.*, EMBO J., 1988, 7: 1241; Miki *et al.*, Theor. Appl. Genet., 1990, 80: 449; et brevet U.S. 5,773,702); les gènes qui confèrent une résistance au glyphosphate comme les formes mutantes de la synthase EPSP et *aroA*, une résistance au L-phosphinothricine comme les gènes de la synthase glycylamine, une résistance à la kanamycine comme les gènes *nptI* et *nptII* de la phosphotransférase omeycine, ou une résistance aux acides phénoxypropioniques et aux cyclohexones comme les gènes codant pour l'inhibiteur ACCase (Marshall *et al.*, Theor. Appl. Genet., 1992, 83: 435).

Les gènes marqueurs qui confèrent une résistance aux maladies et aux ravageurs et qui peuvent être utilisés dans la mise en œuvre de la présente invention incluent, sans limitation, les gènes codant pour une protéine de *Bacillus thuringiensis* telle que l'endotoxine-delta (brevet U.S. 6,100,456); des gènes qui codent pour les lectines (Van Damme *et al.*, Plant Mol. Biol., 1994, 24 : 825); des gènes qui codent pour des protéines se liant aux vitamines telles que l'avidine et les homologues de l'avidine qui sont utilisés comme larvicides contre les insectes ravageurs; des gènes codant pour des inhibiteurs de

protéase ou d'amylase comme l'inhibiteur de la protéinase cystéine du riz (Abe *et al.*, J. Biol. Chem., 1987, 262: 16793) et l'inhibiteur I de la protéinase du tabac (Hubb *et al.*, Plant Mol. Biol., 1993, 21: 985); des gènes codant pour des hormones spécifiques d'insectes ou des phéromones telles que l'hormone ecdystéroïde et l'hormone juvénile et leurs équivalents; des gènes codant pour des peptides ou neuropeptides spécifiques d'insectes qui, en s'exprimant perturbent la physiologie du ravageur; des gènes codant pour du venin spécifique d'insectes; des gènes codant pour des enzymes responsables de l'accumulation de monoterpènes, sesquiterpènes, astéroïde, acide hydroxamique, dérivé de phénylpropanoïde ou d'autres molécules non-protéiniques présentant une activité insecticide; des gènes codant pour des enzymes impliqués dans la modification de l'activité biologique d'une molécule (brevet U.S. 5,539,095); des gènes codant pour des peptides hydrophobiques tels que des dérivés de Tachyplesine qui inhibent des pathogènes fongiques; des gènes codant pour une protéine invasive virale ou une toxine dérivée (Beachy *et al.*, Ann. Rev. Phytopathol., 1990, 28 : 451); et des gènes codant pour un anticorps ou une antitoxine spécifique d'insectes ou un anticorps spécifique de virus (Tavladoraki *et al.*, Nature, 1993, 366 : 469).

Les gènes marqueurs qui confèrent une résistance au stress environnemental et qui peuvent être utilisés dans la mise en œuvre de l'invention incluent, sans limitation, *mtld* et *HVAI*; *rd29A* et *rd19B* qui sont des gènes d'*Arabidopsis thaliana* codant pour des protéines hydrophiles qui sont induites en réponse à la déshydratation, les basses températures, le stress dû à la salinité, ou une exposition à l'acide abscissique (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, Plant Cell, 1994, 6: 251-26). D'autres exemples de tels gènes sont décrits dans les brevets U.S. 5,296,462 et U.S. 6,356,816.

Alternativement, un gène marqueur peut provoquer, chez les cellules de plante ou chez les plantes transformées une réponse visible (par exemple une apparence distinctive telle qu'une couleur ou une croissance différente, par rapport aux cellules de plante ou aux plantes qui n'expriment pas le gène marqueur). Ces gènes marqueurs codent pour un rapporteur. Il est connu dans l'art que les activateurs de transcription de la biosynthèse d'anthocyanine, liés opérationnellement à un promoteur approprié dans une cassette d'expression, sont de grande utilité en tant que marqueurs non-phytotoxiques pour la transformation de cellules de plante.

La localisation d'une protéine peut être altérée en modifiant la séquence nucléotidique codant pour la protéine par addition d'une région codant pour un peptide

signal. Pour l'addition de séquences codant pour de tels peptides signal, l'homme du métier peut se référer, par exemple, aux documents suivants (Dai *et al.*, Trans. Res., 2005, 14: 627; Keegstra *et al.*, Physiol. Plant., 1995, 93: 157-162; Zoubenko *et al.*, Nucleic Acids Res., 1994, 22: 3819-3824; Jones *et al.*, Plant. Physiol., 1993, 101: 595-606; 5 Nhakamura *et al.*, Plant. Physiol., 1993, 101: 1-5; Hemon *et al.*, Plant Molecular Biology, 1990, 15: 895-904; Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 4144-4184; Thoma *et al.*, Plant. Physiol., 1994, 105: 35-45; ou WO 88/02402).

Une cassette d'expression selon l'invention peut également comprendre toute autre séquence nucléotidique qui, après transcription, confère à la plante transformée obtenue 10 une propriété désirable supplémentaire. Les exemples de propriétés désirables supplémentaires des plantes transformées selon l'invention incluent, sans limitation, la capacité d'adaptation de croissance dans différentes conditions de climats et/ou de sols; l'incorporation de caractéristiques de bio-confinement comme par exemple des fleurs stériles (males uniquement ou bien males et femelles); l'incorporation de caractéristiques 15 de phytoremédiation; et une biomasse augmentée.

Vecteurs

Dans certains modes de réalisation de l'invention, la cassette d'expression est insérée dans un vecteur approprié. On entend ici par "vecteur" une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou de 20 double brin. Un vecteur recombinant selon l'invention est de préférence un vecteur d'expression ou plus spécifiquement un vecteur d'insertion, un vecteur de transformation ou un vecteur d'intégration. Le vecteur peut être d'origine bactérienne ou virale.

Dans tous les cas, dans un vecteur selon l'invention, la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc est placée sous le contrôle d'une ou 25 de plusieurs séquences contenant des signaux de régulation de son expression dans la plante considérée, comme mentionné ci-dessus. Dans certains modes de réalisation, les signaux de régulation sont tous contenus dans la cassette d'expression insérée dans le vecteur. Dans d'autres modes de réalisation, un ou plusieurs signaux de régulation sont contenus dans la cassette d'expression et un ou plusieurs autres signaux sont contenus dans 30 le vecteur. Dans encore d'autres modes de réalisation, tous les signaux de régulation sont contenus dans le vecteur.

Un vecteur recombinant selon l'invention comprend avantageusement des séquences appropriées d'initiation et d'arrêt de la transcription. En outre, un vecteur recombinant selon l'invention peut inclure une ou plusieurs origines de répllication fonctionnelle chez les plantes dans lesquelles leur expression est désirée, ainsi que, le cas échéant, des séquences nucléotidiques marqueurs de sélection. Les vecteurs recombinants selon l'invention peuvent aussi inclure un ou plusieurs signaux de régulation de l'expression tels que définis ci-dessus. Dans certains modes de réalisation, un vecteur recombinant selon l'invention est un vecteur intégratif permettant l'insertion de multiples copies fonctionnelles de la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc dans le génome de la plante.

De préférence, un vecteur selon l'invention sera choisi parmi ceux spécialement adaptés à l'expression de séquences d'intérêt dans des cellules de plante, tels que le vecteur pCAMBIA 1302 (Hajdukiewicz *et al.*, Plant Mol. Biol., 1994, 25: 989-994) et les vecteurs commercialisés par Clontech; le vecteur pBIN19 (Bevan *et al.*, Nucleic Acids Res., 1984, 12: 8711-8721), le vecteur pBI 101 (Jefferson, Plant Mol. Biol. Report., 1987, 5: 387-405), le vecteur pBI 121 (Jefferson, Plant Mol. Biol. Report., 1987, 5: 387-405) et le vecteur pEGFP (Yang *et al.*, Nat. Biotechnol., 1996, 14 : 1246-1251, Yang *et al.*, Nucleic Acids Res., 1996, 24: 4592-4593).

Le plus souvent, les vecteurs utilisés pour la transformation génétique existent sous forme de plasmides. Dans ce cas, le "plasmide" est une molécule d'ADN circulaire autonome capable de répllication dans une cellule. Si un micro-organisme ou une culture cellulaire recombinante est décrit comme hôte d'un plasmide d'expression, celui-ci comprend à la fois des molécules d'ADN circulaires extrachromosomiques et de l'ADN ayant été intégré au(x) chromosome(s) hôte(s). Si le plasmide est maintenu dans une cellule hôte, le plasmide est soit répliqué de manière stable par les cellules pendant la mitose en tant que structure autonome, soit intégré au génome de l'hôte. Les plasmides qui peuvent être utilisés dans la mise en œuvre de la présente invention incluent, sans limitation, les plasmides Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* (Darnell, Lodish, Baltimore, "Molecular Cell Biology", 2nd Ed., 1990, Scientific American Books: New York), un plasmide comprenant un gène de β -glucuronidase et un promoteur du virus mosaïque de chou-fleur (CaMV) avec une séquence leader du virus mosaïque d'alfalfa (Sanford *et al.*, Plant Mol. Biol., 1993, 22: 751-765) et un plasmide comprenant un gène *bar* cloné downstream d'un promoteur CaMV 35S avec une séquence leader du virus mosaïque de

tabac (TMV). Certains plasmides peuvent contenir des introns, tels que ceux dérivés de l'alcool déshydrogénase (*Adh1*), et d'autres séquences ADN. La taille du vecteur n'est pas un facteur limitant.

5 Pour les cassettes d'expression ou les vecteurs destinés à être utilisés dans des transformations par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens*, le plasmide peut comprendre une origine de répllication qui permet une répllication dans *Agrobacterium* et un nombre élevé d'origines de répllication fonctionnelles dans *E. Coli*. Cela permet une production et un test faciles de transgènes dans *E. Coli* avant le transfert à l'*Agrobacterium* pour une introduction subséquence dans les plantes.

10 Comme le reconnaîtra l'homme du métier, une cassette d'expression ou un vecteur selon l'invention peut comprendre une séquence nucléotidique codant pour un seul des facteurs de transcription GhERF-IIa, GhERF-IIb et GhERF-IIc, ou peut comprendre des séquences nucléotidiques codant pour deux des facteurs de transcription ou pour les trois.

Préparation de Cassettes d'Expression et de Vecteurs

15 Une cassette d'expression ou un vecteur selon l'invention peut être préparé par n'importe quelle méthode appropriée, la méthode d'obtention de la cassette ou du vecteur n'étant pas un élément critique ou limitant de l'invention.

Des méthodes de préparation de telles constructions d'acide nucléique sont connues dans l'art et ont, par exemple, été décrites dans plusieurs ouvrages de référence comme
20 Sambrook, Fritsch et Maniatis, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 1989, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, et Silhavy, Berman, et Enquist, "*Experiments with Gene Fusions*", 1984, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor; F.M. Ausubel *et al.*, "*Current Protocols in Molecular Biology*", 1989, John Wiley & Sons: New York.

25 II - Méthodes de Préparation de Plantes Présentant une Surproduction de Jasmonates

Les cassettes d'expression ou les vecteurs décrits ci-dessus peuvent être utilisés pour obtenir des plantes transgéniques présentant une surproduction ou une accumulation d'acide jasmonique et/ou d'OPDA. En conséquence, un aspect de la présente invention
30 concerne des méthodes de préparation de telles plantes transgéniques. On entend par "plante transgénique" une plante ayant été obtenue par des techniques de manipulation génétique. Plus spécifiquement, une plante transgénique est une plante dont au moins une

cellule contient des séquences nucléotidiques exogènes introduites par l'intermédiaire d'une intervention humaine. Typiquement, les plantes transgéniques expriment des séquences ADN qui confèrent à ces plantes un ou plusieurs caractères différents de ceux de plantes non-transgéniques de la même espèce.

5 D'une façon générale, la présente invention fournit une méthode pour obtenir une plante transgénique surproduisant de l'acide jasmonique et/ou de l'OPDA. Cette méthode comprend la transformation d'une plante en utilisant une cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc, ou un vecteur contenant ladite cassette d'expression. Les termes "surproduction d'acide jasmonique" et "accumulation d'acide jasmonique" sont ici utilisés de façon interchangeable et désignent une production ou une accumulation d'acide jasmonique dans la plante transformée qui est supérieure à la production ou à l'accumulation d'acide jasmonique dans une plante non-transformée de la même espèce et au même stade de développement. Dans certains modes de réalisation, la production d'acide jasmonique dans la plante transformée est au moins 2 fois supérieure à celle dans la plante non-transformée, préférablement au moins 5 fois, au moins 10 fois, au moins 25 fois, au moins 50 fois, au moins 75 fois, au moins 100 fois, ou plus de 100 fois supérieure à la production ou l'accumulation d'acide jasmonique dans la plante non-transformée. De même, le terme "surproduction d'OPDA", "accumulation d'OPDA" et les termes apparentés désignent une production ou une accumulation d'OPDA dans la plante transformée qui est supérieure à la production ou à l'accumulation d'OPDA dans une plante non-transformée de la même espèce et au même stade de développement. Dans certains modes de réalisation, la production d'OPDA dans la plante transformée est au moins 2 fois supérieure à celle dans la plante non-transformée, préférablement au moins 5 fois, au moins 10 fois, au moins 15 fois, au moins 25 fois, au moins 30 fois, au moins 40 fois, au moins 50 fois, au moins 75 fois, au moins 100 fois ou plus de 100 fois supérieure à la production ou l'accumulation d'OPDA dans la plante non-transformée.

La transformation d'une plante en utilisant une cassette d'expression ou un vecteur de l'invention peut être réalisée par n'importe quelle méthode appropriée, la méthode de transformation utilisée n'étant pas critique pour la présente invention. Les techniques possibles incluent, sans limitation, les méthodes non-biologiques (ex. la micro-injection, le bombardement de micro-projectiles, l'électroporation, l'infiltration sous vide, ou la précipitation directe) et les méthodes biologiques (ex. l'infection par une souche

bactérienne transformée notamment une souche d'*Agrobacterium*). Toute combinaison de ces méthodes qui permet une transformation efficace de cellules de plantes ou de plantes peut également être utilisée dans la mise en œuvre de la présente invention.

Méthodes Générales de Transformation

5 Ainsi, dans certains modes de réalisation, une méthode pour obtenir une plante transgénique surproduisant l'acide jasmonique, et éventuellement l'OPDA, comprend: (a) une étape de transformation d'une cellule de plante avec une cassette d'expression ou un vecteur de l'invention pour obtenir une cellule de plante transformée de façon stable; et (b) une étape de culture de la cellule de plante transformée de manière à régénérer une
10 plante entière contenant, intégrée dans son génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc dans la plante. L'étape de culture peut comprendre la régénération de plusieurs plantes et la sélection, parmi ces plantes régénérées, de celles qui ont intégré, dans leur génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc dans la
15 plante.

Dans d'autres modes de réalisation, une méthode pour obtenir une plante transgénique surproduisant l'acide jasmonique, et éventuellement l'OPDA, comprend: (a) une étape de transformation d'une cellule hôte d'*Agrobacterium tumefaciens* ou d'*Agrobacterium rhizogenes* pour obtenir une cellule hôte recombinante; et (b) une étape
20 de transformation d'une plante ou de cellules de plante par infection avec une cellule hôte recombinante pour obtenir une plante contenant, intégrée dans son génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc dans la plante. L'étape de transformation de la plante peut comprendre l'infection de plusieurs plantes avec des cellules hôte recombinantes et la sélection, parmi ces plantes infectées,
25 de celles qui ont intégré, dans leur génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc dans la plante.

Dans certains modes de réalisation particuliers, ces méthodes peuvent en outre comprendre les étapes additionnelles suivantes: (c) croisement entre elles de deux plantes transformées pour obtenir des plantes croisées; et (d) sélection, parmi ces plantes croisées
30 ou hybrides, des plantes homozygotes pour le transgène. Alternativement, ces méthodes peuvent comprendre les étapes additionnelles suivantes: (c) croisement d'une plante transformée avec une plante de la même espèce pour obtenir des plantes croisées; et (d) sélection, parmi ces plantes croisées ou hybrides, des plantes ayant conservé le transgène.

Transformation de Cellules de Plantes et de Cellules Hôtes

Tel qu'utilisé ici, le terme "cellule de plante" inclut les protoplastes (cellules végétales sans paroi), les cellules végétales germinales ou somatiques, et plus généralement toute cellule ou groupement de cellules capable de régénérer une plante
 5 entière. Ainsi, une graine comprenant une multitude de cellules de plante capable de régénérer une plante entière est inclut dans le terme "cellule de plante". La cellule de plante utilisée dans une méthode de l'invention peut être isolée de la plante de laquelle elle provient (ex lignée cellulaire) ou sous forme de culture de tissus ou d'organes de plante. Les cellules de plantes utilisées dans une méthode de l'invention peuvent provenir
 10 de toute plante quelle que soit son espèce (voir ci-dessous).

Des cellules de plantes peuvent être obtenues d'un grand nombre de sources commerciales différentes telles que l'American Type Culture Collection (Rockland, MD), ou les producteurs et revendeurs de graines comme par exemple A. Atlee Burpee Seed Co. (Warminster, PA), Park Seed Co. (Greenwood, SC), Johnny Seed Co. (Albion, ME),
 15 or Northrup King Seeds (Hartsville, SC), Vilmorin, France, Thompson & Morgan, Graines Baumaux: Clause vegetale seeds.

On trouve également des descriptions de cellules hôtes utiles à la transformation de plantes dans I.K. Vasil, "*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*", Vol. I, II and II; 1984, Laboratory Procedures and Their Applications Academic Press: New York; R.A.
 20 Dixon *et al.*, "*Plant Cell Culture – A Practical Approach*", 1985, IRL Press: Oxford University; and Green *et al.*, "*Plant Tissue and Cell Culture*", 1987, Academic Press: New York.

Dans une méthode selon l'invention, la transformation de cellules de plantes (ou de cellules hôtes) peut être réalisée par n'importe quelle technique connue de l'homme du
 25 métier. Des méthodes d'introduction de cassettes d'expression dans des cellules de plantes ont été décrites. Voir, par exemple, "*Methods for Plant Molecular Biology*", Weissbach and Weissbach (Eds.), 1989, Academic Press, Inc; "*Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*", 1995, Springer-Verlag: Berlin, Germany; et les brevets U.S. 4,945,050; 5,036,006; 5,100,792; 5,240,855; 5,302,523; 5,322,783;
 30 5,324,646; 5,384,253; 5,464,765; 5,538,877; 5,538,880; 5,550,318; 5,563,055; et 5,591,616). On peut citer notamment les méthodes de transfert direct de gènes telles que la microinjection directe dans les embryoïdes de plante (Neuhaus *et al.*, Theoretical and Applied Genet., 1987, 75: 30-36), l'infiltration sous vide (Bechtold *et al.*, Comptes

Rendus Acad. Sci. Série III – Sciences de la Vie, 1993, 316(10) : 1194-1199), l'électroporation (Chupeau *et al.*, Biotechn., 1989, 7: 503-508) ou encore la précipitation directe au moyen de PEG (Schocher *et al.*, Biotechn., 1986, 4 : 1093-1096) ou le bombardement par canon de particules recouvertes de l'ADN d'intérêt (Fromm *et al.*,
5 Biotechn., 1990, 8 : 833-839).

En particulier, l'électroporation a fréquemment été utilisée pour transformer des cellules de plantes (brevet US 5,384,253). Cette méthode est généralement effectuée sur des tissus friables (comme par exemple une culture de cellules en suspension ou un cal embryogénique) ou cible des cellules d'embryons ou d'autres tissus organisés qui ont été
10 rendus plus susceptibles à l'électroporation par exposition à des enzymes qui dégradent la pectine ou par traitement mécanique. Des cellules intactes de maïs, de blé, de tomate, de soja, et de tabac ont, par exemple, été transformées par électroporation (D'Halluin *et al.*, Plant cell, 1992, 4: 1495-1505; Rhodes *et al.*, Methods Mol. Biol. 1995, 55: 121-131; et brevet US 5,384,253). L'électroporation peut également être utilisée pour transformer des
15 protoplastes (Bates, Methods Mol. Biol. 1999, 111: 359-366).

Les techniques de bombardement par canon de particules peuvent être utilisées pour transformer pratiquement n'importe quelle espèce de plantes monocotylédones ou dicotylédones (brevets US 5,036,006; 5,302,523; 5,322,783 et 5,563,055; WO 95/06128; Ritala *et al.*, Plant Mol. Biol. 1994, 24: 317-325; Hengens *et al.*, Plant Mol. Biol. 1993,
20 23: 643-669; Hengens *et al.*, Plant Mol. Biol. 1993, 22: 1101-1127; Buising *et al.*, Mol. Gen. Genet. 1994, 243: 71-81; Singsit *et al.*, Transgenic Res. 1997, 6: 169-176).

La transformation de protoplastes de plantes peut être effectuée par des méthodes basées sur la précipitation par du phosphate de calcium, traitement au polyéthylène glycol, électroporation et des combinaisons de ces méthodes (Potrykus *et al.*, Mol. Gen. Genet.
25 1985, 199: 169-177; Fromm *et al.*, Nature, 1986, 31: 791-793; Callis *et al.*, Genes Dev. 1987, 1: 1183-1200; Omirulleh *et al.*, Plant Mol. Biol. 1993, 21: 415-428).

D'autres méthodes de transformation de cellules de plantes, qui ont par exemple été décrites dans l'art antérieur (par exemple Rakoczy-Trojanowska, Cell Mol. Biol. Lett. 2002, 7: 849-858), peuvent également être utilisées dans la mise en œuvre de l'invention.

30 La transformation de cellules de plantes *via Agrobacterium* est également bien connue dans l'art (brevet US 5,563,055). Cette méthode peut être utilisée pour la transformation de plantes dicotylédones ou monocotylédones. Pour les espèces de plantes

pour lesquelles la transformation *via Agrobacterium* est efficace, c'est souvent la méthode de choix. La transformation *via Agrobacterium* s'effectue en plusieurs étapes: tout d'abord le clonage et les modifications d'ADN sont réalisés dans *E. Coli*, puis le plasmide contenant les séquences nucléotidiques d'intérêt est transféré par conjugaison ou par électroporation dans une souche bactérienne d'*Agrobacterium* (généralement *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*), et les cellules d'*Agrobacterium* recombinantes obtenues sont utilisées pour infecter les plantes ou les cellules de plantes. A titre d'exemple, les cellules de plantes qui peuvent être transformées par cette méthode sont typiquement des cellules de cal, d'embryons, de tissu méristématique, ou de cultures cellulaires en suspension.

Préférentiellement, dans une méthode de transformation de l'invention, les cellules de plantes sont transformées de façon stable. Le terme "transformé de façon stable", tel qu'utilisé ici, désigne une cellule, un cal ou un protoplaste dans lequel un acide nucléique exogène qui a été introduit par une méthode de transformation, est capable de réplication. La stabilité de la transformation est démontrée par la capacité de la cellule transformée à établir des lignées cellulaires ou des clones comprenant une population de cellules filles qui contiennent elles aussi l'acide nucléique exogène.

Le succès de la transformation d'une cellule de plante peut être évalué de façon préliminaire visuellement lorsque la cassette d'expression ou le vecteur utilisé contient un gène marqueur (voir ci-dessus). Alternativement, les cellules de plantes comprenant la séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc (ou une de leurs combinaisons) et qui expriment GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc (ou une de leurs combinaisons) peuvent être identifiées et sélectionnées par une variété de procédures appropriées telles que par hybridations ADN-ADN ou ADN-ARN, par des essais protéiniques ou immunologiques connus pour détecter et quantifier les acides nucléiques et les protéines.

Les cellules de plantes (y compris les protoplastes, les cals, etc...) transformées de façon stable par une méthode de l'invention font également partie de l'invention.

Régénération de Plantes

Il est connu dans l'art que la régénération à partir de cellules transformées individuelles pour obtenir des plantes entières transgéniques est possible pour un grand nombre de plantes. La régénération a été démontrée aussi bien pour les plantes

dicotylédones que pour les plantes monocotylédones. Dans la mise en œuvre de l'invention, les cellules de plante transformées de façon stable peuvent être cultivées pour obtenir des plantes transgéniques par n'importe quelle méthode standard connue de l'homme du métier (voir, par exemple, McCormick *et al.*, Plant Cell Reports, 1986, 5: 81-84). La régénération des plantes à partir de protoplastes a également été décrite, par exemple, par Evans *et al.*, "*Handbook of Plant Cell Cultures*", Vol. 1, 1983, MacMilan Publishing Co: New York; and I.R. Vasil (Ed.), "*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*", Vol. I (1984) and Vol. II (1986), Acad. Press: Orlando. Tel qu'utilisé ici, le terme "régénération" désigne le procédé consistant à faire pousser une plante à partir d'une cellule de plante.

Les moyens de régénération peuvent varier d'une espèce de plante à une autre, mais généralement, une suspension de cellules végétales transformées ou des explants transformés contenus dans un boîte de Pétri sont utilisés. Un cal se forme, d'où sont induits des germes et par la suite, une racine. Alternativement, une technique d'embryogenèse somatique peut être utilisée. Cette technique permet d'obtenir, à partir d'une seule graine ou d'un seul cal, un nombre illimité de copies de cette graine ou de ce cal, chacune des copies étant morphologiquement et génétiquement semblable à la graine ou au cal de départ.

Les plantes transgéniques primaires peuvent être cultivées en utilisant des méthodes conventionnelles. De nombreuses techniques de culture de plantes sont bien connues dans l'art. Ainsi, les plantes peuvent être cultivées dans le sol, ou alternativement hors-sol (culture hydroponique – voir, par exemple, les brevets US 5,364,451; 5,393,426; et 5,785,735).

Sélection de Plantes Transformées

La sélection de plantes qui ont été transformées peut être effectuée par n'importe quelle méthode appropriée, par exemple par Northern Blot, Southern Blot, détection de résistance à un herbicide ou à un antibiotique, ou par toute combinaison de ces méthodes ou d'autres méthodes connues de l'homme du métier. Les techniques de Southern Blot et de Northern Blot, qui testent respectivement la présence d'une séquence polynucléotidique d'intérêt (ex. séquence codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc) et de son ARN correspondant, sont des méthodes standard connues (voir, par exemple, Sambrook & Russell, "*Molecular Cloning*", 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor). Alternativement ou additionnellement, la

sélection des plantes peut se faire par détection de la surproduction d'acide jasmonique et/ou d'ODPA (voir Exemples).

Les plantes transgéniques primaires transformées (et éventuellement sélectionnées) peuvent être soit croisées entre elles, soit croisées avec des plantes de la même espèce, et
 5 parmi les plantes croisées ou hybrides obtenues, on peut sélectionner celles qui présentent les caractéristiques phénotypiques désirées. Plusieurs générations de plantes peuvent être générées pour s'assurer que les caractéristiques phénotypiques désirées sont bien héritées et maintenues de façon stable, et des graines de ces plantes peuvent être récoltées.

Par exemple, une plante transformée selon l'invention peut être croisée avec une
 10 plante d'une lignée à valeur agronomique de la même espèce et les plantes hybrides obtenues ayant conservé le transgène, peuvent être soumises à une procédure de rétrocroisement avec la plante de la lignée à valeur agronomique pour obtenir des plantes qui ont conservé le transgène et qui possèdent un fond génétique proche ou identique au fond génétique de la plante de la lignée à valeur agronomique.

15 **III - Plantes Transgéniques Présentant une Surproduction de Jasmonates**

La présente invention concerne également les plantes transgéniques obtenues par les méthodes décrites ici, c'est-à-dire les plantes transgéniques contenant, intégrée dans leur génome, une séquence nucléotidique exogène permettant l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc (ou une de leurs combinaisons). En particulier, les plantes
 20 transgéniques de l'invention sont caractérisées en ce que l'expression de GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc induit une surproduction d'acide jasmonique et/ou d'OPDA. Comme mentionné plus haut, une surproduction d'acide jasmonique dans une plante transgénique est une production ou une accumulation d'acide jasmonique dans la plante transformée qui est supérieure à la production ou à l'accumulation d'acide jasmonique
 25 dans une plante non-transformée de la même espèce et au même stade de développement. Dans certains modes de réalisation, la surproduction d'acide jasmonique dans la plante transformée est au moins 2 fois, au moins 5 fois, au moins 10 fois, au moins 25 fois, au moins 50 fois, au moins 75 fois, au moins 100 fois, ou plus de 100 fois supérieure à la production ou l'accumulation d'acide jasmonique dans la plante non-transformée. De
 30 même, comme mentionné plus haut, une surproduction d'OPDA dans une plante transgénique est une production ou une accumulation d'OPDA dans la plante transformée qui est supérieure à la production ou à l'accumulation d'OPDA dans une plante non-

transformée de la même espèce et au même stade de développement. Dans certains modes de réalisation, la surproduction d'OPDA dans la plante transformée est au moins 2 fois, au moins 5 fois, au moins 10 fois, au moins 20 fois, au moins 25 fois, au moins 30 fois, au moins 40 fois, au moins 50 fois, au moins 75 fois, au moins 100 fois, ou plus de 100 fois supérieure à la production ou l'accumulation d'OPDA dans la plante non-transformée.

Dans certains modes de réalisation, la surexpression de GhERF-IIc dans une plante transgénique selon l'invention résulte en une surproduction d'acide jasmonique et d'ODPA, telle que la teneur en acide jasmonique dans la plante est supérieure à la teneur en OPDA. Dans d'autres modes de réalisation, la surexpression de GhERF-IIa ou de GhERF-IIb dans une plante transgénique selon l'invention résulte en une surproduction d'acide jasmonique et d'OPDA, telle que la teneur en OPDA est supérieure à la teneur en acide jasmonique. Tel qu'utilisé ici le terme "supérieure" fait référence à la teneur en un jasmonate (ou quantité d'un jasmonate) qui est au moins 1,1 plus élevée que la teneur en l'autre jasmonate (ou quantité de l'autre jasmonate), préférablement au 1,25 fois plus élevée, plus préférablement encore au moins 1,5 fois plus élevée et encore plus préférablement au moins 1,75 fois plus élevée, par exemple 2 fois, 2,25 fois, 2,5 fois, 2,75 fois, 3 fois ou plus de 3 fois plus élevée.

Les plantes transgéniques de l'invention peuvent appartenir à n'importe quel genre ou espèce de plantes pour lesquelles une transformation par introduction d'une cassette d'expression ou d'un vecteur contenant une séquence nucléotidique codant pour GhERF-IIa, GhERF-IIb ou GhERF-IIc résulte en une surproduction d'acide jasmonique et/ou d'OPDA. Ainsi, les plantes transgéniques de l'invention peuvent être des plantes de grandes cultures, des plantes potagères, des fleurs ou des arbres. Les plantes transgéniques de l'invention peuvent être des dicotylédones, telles que notamment les malvacées (ex. cotonnier, etc...), les solanacées (ex. tabac, tomate, pomme de terre, aubergines, etc...), les cucurbitacées (ex. melon, concombre, pastèque, courges, etc...), les crucifères (ex. colza, moutarde, etc...), les composées (ex. chicorée, etc...), les ombellifères (ex. carotte, cumin, etc...), ou les rosacées (en particulier arbres et arbustes dont les fruits ont une importance économique), ou des monocotylédones, telles que par exemple notamment les céréales (ex. blé, orge, avoine, riz, maïs, etc...) ou les liliacées (ex. oignon, ail, etc...).

Dans certains modes de réalisation, une plante transgénique de l'invention appartient à la famille des Malvacées (ex. cotonnier, cacao, okra, etc...), à la famille des Solanacées (ex. tabac, tomate, pomme de terre, aubergines, etc...), à la famille des Rubiacées (ex. café, etc...), à la famille des Poacées ou Graminées (ex. riz, maïs, blé, orge, avoine, seigle, mil, canne à sucre, etc...) ou à la famille des Vitacées (ex. vigne, etc...).

Dans certains modes de réalisation préférés, une plante transgénique de l'invention appartient aux genres *Gossypium* ou *Cotoneaster* (coton), au genre *Nicotiana* (tabac), au genre *Oryza* (riz), au genre *Solanum* (tomate), au genre *Coffea* (café), ou au genre *Vitis* (vigne).

L'invention englobe les plantes transgéniques entières, leur progéniture (ou descendants) croisée ou non, ainsi que le matériel végétal obtenu à partir de ces plantes. Le terme "matériel végétal", tel qu'utilisé ici, inclut les cellules de plantes, les organes de plantes, les protoplastes, les cals, les cultures de cellules et toutes autres cellules de plantes organisées en tant qu'unité fonctionnelle et/ou structurelle, les graines, les feuilles, les tiges, les racines, les fleurs, les fruits, les tubercules, le pollen, les boutures, etc.

IV - Utilisation des Plantes Transgéniques Surproduisant des Jasmonates

Résistance Améliorée aux Agents Pathogènes

Etant donné le rôle important mentionné ci-dessus des jasmonates dans les mécanismes de défense végétale, en particulier contre les insectes et les bactéries mais également contre les champignons, les méthodes de l'invention peuvent être utilisées pour produire des plantes présentant une résistance améliorée aux agents pathogènes. Tel qu'utilisé ici, le terme "résistance améliorée aux agents pathogènes" désigne une résistance d'une plante transformée (c'est-à-dire une capacité à se défendre) contre au moins un agent pathogène, qui est supérieure à la résistance d'une plante non-transformée de la même espèce. Un agent pathogène dans le contexte de l'invention peut être n'importe quel microorganisme (bactéries, champignons, mycoplasmes, virus), insecte ou autre ravageur qui est capable d'induire une pathologie dans une plante.

Production de Métabolites Secondaires

Beaucoup de métabolites secondaires de plantes ont une valeur économique en tant que produits pharmaceutiques (ex. taxol, digoxine, colchicine, codéine, morphine, quinine, quinidine, shikonine, ajmaline, ajmalicine, vinblastine, vincristine, réserpine, rescinnamine, camptothécine, ellipticine, nicotine, etc...), colorants ou arômes

alimentaires (ex. anthocyanines, vanilline, etc...), ou parfums. Cependant, l'utilisation industrielle de ces métabolites secondaires est limitée par le fait que les plantes ne produisent qu'une faible quantité de ces métabolites.

La biosynthèse de nombreuses classes de métabolites secondaires est stimulée par les jasmonates et certains de leurs précurseurs (Memelink, Curr. Opin. Plant Biol., 2005, 8: 23-235). En particulier, dans certaines plantes, l'acide jasmonique induit l'expression de gènes intervenant dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Menke *et al.*, EMBO J., 1999, 18: 4455-4463). Une liste non-exhaustive de classes de métabolites secondaires dont la biosynthèse est induite par les jasmonates comprend les taxoïdes, les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes, les anthocyanines, les guaianolides, les anthraquinones, les sesquiterpénoïdes, et plusieurs types d'alcaloïdes comme les alcaloïdes indol-terpénoïdes.

Par conséquent, les plantes transgéniques de l'invention, qui surproduisent l'acide jasmonique, peuvent être utilisées pour la production de métabolites secondaires. De même, les méthodes de l'invention peuvent être utilisées pour produire des plantes surproduisant au moins un métabolite secondaire.

Toute plante connue pour produire un métabolite secondaire dont la biosynthèse est induite par les jasmonates, et en particulier par l'acide jasmonique et/ou l'OPDA, peut être transformée par une méthode de l'invention en vue d'obtenir une plante transgénique surproduisant ce métabolite secondaire. Des exemples de plantes connues pour produire de tels métabolites secondaires incluent, sans limitation, la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) dont les feuilles synthétisent la vinblastine et la vincristine – des composés utilisés dans le traitement du cancer – et dont les racines synthétisent l'ajmalicine, qui est utilisée pour l'amélioration de la circulation sanguine cérébrale; le pavot à opium (*Papaver somniferum*), dont le latex contient des alcaloïdes narcotiques tels que la morphine et la codéine; la *Rauwolfia serpentina* qui produit un certain nombre de composés bioactifs comme la réserpine qui est utilisée comme agent hypotenseur; les plantes du genre *Cinchona* qui produisent la quinine, utilisée contre la malaria et la quinidine, un agent antiarythmique; les jusquiames telles que la jusquiame blanche (*Hyoscyamus albus* L.) et la jusquiame noire (*Hyoscyamus niger* L.) ou les plantes du genre *Datura* qui contiennent divers alcaloïdes tels que l'atropine – un antagoniste cholinergique utilisé par exemple pour réduire les tremblements chez les patients atteints de la maladie de Parkinson – l'hyoscyamine qui est utilisée dans le traitement de

nombreuses maladies gastrointestinales, et la scopolamine, un sédatif central; et le tabac (*Nicotiana*) qui produit la nicotine, connue pour avoir des effets thérapeutiques utiles dans le traitement de conditions neurologiques et psychiatriques.

5 A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés dans la description ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevet, tous les brevets et toutes autres références mentionnés ici sont incorporés par référence.

Exemples

10 Les exemples suivants décrivent certains modes de réalisation de la présente invention. Cependant, il est entendu que les exemples ne sont présentés qu'à titre illustratif seulement et ne limitent en aucun cas la portée de l'invention.

Exemple 1: Induction des Facteurs de Transcription *GhERF-IIa* et *GhERF-IIc*

Matériels et Méthodes

15 Le cultivar de cotonnier *Gossypium hirsutum* cv. Reba B50, qui porte les gènes B2B3 de résistance à la rouille, a été utilisé. Ce cultivar est résistant à la race 18 de la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* (*Xcm18*) mais développe des symptômes de maladie en réponse à la race 20 de cette même bactérie (*Xcm20*) (Innes *et al.*, Biol. Rev., 1983, 58 : 157e176; Hillocks *et al.*, Cotton Diseases, 1992, Redwood Press CAB, International Melksham). Les bactéries *Xcm18* et *Xcm20* ont été maintenues à 28°C dans un agar LPG dans de l'eau distillée (0,5% d'extrait de levures, 0,5% de peptone bactériologique, 0,5% de glucose comme source de carbone, solidifié avec 1,5% d'agar, les pourcentages étant exprimés en poids par volume, Difco, Etats-Unis). Avant inoculation, les bactéries ont été cultivées à 29°C dans 20 mL de milieu LPG dans un incubateur sous agitation à 150 rpm/minute. Après environ 18 heures dans ces conditions, les cultures ont été centrifugées à 4°C à 4000 min⁻¹ pendant 20 minutes et lavées deux fois avec de l'eau par centrifugation à 4°C à 4000 min⁻¹ pendant 10 minutes pour éliminer le milieu de culture et les exopolysaccharides. Les bactéries ainsi obtenues ont ensuite été resuspendues dans de l'eau et ajustées à 10⁸ cfu/mL (ce qui correspond à une absorbance de 0,2 à 600 nm).

20

25

30

Les cotonniers utilisés ont été cultivés dans une serre avec un cycle lumière naturelle/nuit de 29°C/24°C et une humidité relative moyenne de 80%, ce qui représente les conditions optimales pour les interactions cotonnier/*Xcm*. Les suspensions de bactéries (10^8 cfu/ml), ou l'eau stérile utilisée comme contrôle, ont été injectées dans les domaines intercellulaires de cotylédons de cotonnier âgés de 10 jours en utilisant une seringue sans aiguille.

Résultats

Une étude bioinformatique a été réalisée dans le but de rechercher chez le cotonnier des orthologues fonctionnels du gène *AtORA47*, qui appartient à la famille des facteurs de transcription dénommée AP2/ERF, en se basant sur l'homologie de séquences avec *AtORA47* d'*Arabidopsis thaliana*. L'équipe des présents demandeurs (Champion *et al.*, Mol. Plant Pathol., 2009, 10: 471-485) a déjà effectué une recherche systématique des membres de la famille AP2/ERF dans la base d'unigène du cotonnier. En utilisant les résultats de cette étude et par comparaison avec la séquence du gène *AtORA47* d'*Arabidopsis*, trois séquences phylogéniquement proches d'*AtORA47* ont été identifiées.

Ces séquences ont été clonées à partir d'ADNc de *Gossypium hirsutum* cv. Réba B50, et ont été nommées *GhERF-IIa* (SEQ ID NO: 4), *GhERF-IIb* (SEQ ID NO: 5) et *GhERF-IIc* (SEQ ID NO: 6). Les séquences protéiques déduites de ces séquences génomiques (respectivement SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 et SEQ ID NO: 3) possèdent avec la séquence d'ORA47 (SEQ ID NO: 7) un domaine commun de liaison à l'ADN, nommé AP2-domaine et les domaines CMII-1 et CMII-3 caractéristiques du groupe II de la famille ERF (voir Figure 1).

Pour étudier les effets de la bactérie *Xcm* (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) sur l'expression des gènes *GhERF-IIa* et *GhERF-IIc*, des cotonniers ont été inoculés avec *Xcm*. Une analyse par PCR quantitative a ensuite été effectuée sur les ADNc issus de la rétro-transcription des ARN totaux extraits de 10 cotylédons pour chaque traitement. Deux races différentes de bactérie ont été utilisées: *Xcm18* qui induit l'apparition de la réaction hypersensible, une réponse de défense rapide spécifique permettant à la plante de résister et *Xcm20* qui est responsable de la bactériose du cotonnier. La cinétique d'infection par chacune de ces deux races a été suivie pendant les 16 heures qui ont suivi l'inoculation. Une cinétique témoin contrôle a également été générée sur des cotonniers inoculés avec de l'eau (le solvant utilisé pour diluer les cultures de bactéries *Xcm*).

Les résultats obtenus montrent que l'expression des gènes *GhERF-IIa* (Figure 2(A)) et *GhERF-IIc* (Figure 2(B)) est induite en réponse à *Xcm18*, et ce de manière significative par rapport au T0. On observe que l'expression de *GhERF-IIa* est induite rapidement et spécifiquement en réponse à la race *Xcm18* avec un facteur d'augmentation d'expression de 6 à T=1h. L'expression décroît ensuite pour atteindre un facteur 4 à T=4h. Un second pic d'induction de l'expression est également observé à T=8h (facteur 9), avant une diminution progressive de l'expression jusqu'à T=16h. En revanche, l'expression de *GhERF-IIa* est réprimée par *Xcm20* au cours des 8 premières heures post inoculation, puis augmente très faiblement par la suite pour atteindre un facteur 3 à T=16h. Le traitement

Comme pour *GhERF-IIa*, on observe que *GhERF-IIc* est induit spécifiquement en réponse à la race *Xcm18* mais de manière plus importante que *GhERF-IIa*. Un premier pic d'induction est visible à T=1h (facteur 55), suivi d'une décroissance très rapide entre T=1h et T=4h (facteur 20 à T=2h; facteur 1 à T=4h). Comme pour *GhERF-IIa*, l'expression de *GhERF-IIc* ré-augmente à partir de T=8h (facteur 20) et s'amplifie à T=10h (facteur 35).

Ces résultats indiquent que l'expression des gènes *GhERF-IIa* et *GhERF-IIc* est spécifiquement et rapidement induite dans un contexte de défense du cotonnier en réponse à *Xcm*.

Exemple 2: Transactivation du Promoteur *AtAOC2* par *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc* dans des Protoplastes de Cotonnier

Matériels et Méthodes

Des protoplastes de cotonnier ont été transformés avec du polyéthylène glycol par une méthode connue dans l'art (Schirawski *et al.*, J. Virol. Methods, 2000, 86: 85-94) avec 3 constructions dans un rapport 2:2:6 (μg *GUS:LUC*:plasmide). Les protoplastes de cotylédons de cotonnier ont été produits et transformés en utilisant un protocole adapté de la méthode décrite par Sheen *et al.* (Sheen J, 2002, A transient expression assay using *Arabidopsis mesophyll* protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheeweb/>). Les protoplastes ont été recueillis 18 heures après la transformation et congelés dans de l'azote liquide. Des tests d'activité de GUS et LUC ont été réalisés comme décrit précédemment (Zarei *et al.*, Plant Mol. Biol., 2011, 75: 321-331). Dans chaque échantillon, l'activité de GUS et l'activité de LUC ont été prises en compte pour corriger

les différences d'efficacité de transformation et d'extraction de protéines. Les rapports moyens GUS/LUC déterminés pour 3 expériences indépendantes ont été exprimés relativement aux vecteurs de contrôle respectifs.

Des protoplastes de feuilles d'*Arabidopsis* ont été préparés et transformés comme décrit précédemment (Sheen *et al.*, 2002 A transient expression assay using Arabidopsis mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheeweb/>). Les protoplastes ont été co-transformés avec 10 µg de GFP-fusion et le plasmide d'ADN NtKIS1a-DsRFP (Jasinski *et al.*, Plant Physiol., 2002, 130 : 1871-1882) et incubés dans le noir pendant au moins 16 heures. La localisation nucléaire a été étudiée par expression, dans les protoplastes, de GhERF-IIa, GhERF-IIb et GhERF-IIc fusionnés à la région C-terminale de la protéine fluorescente verte 6 (GFP6) et par microscopie de fluorescence.

Résultats

La biosynthèse de l'acide jasmonique s'effectue par la voie métabolique des octadécanoïdes (Turner *et al.*, Plant Cell, 2002, 14 (suppl.): S153-S164) qui comprend plusieurs étapes enzymatiques bien caractérisées. Une de ces étapes inclut l'action d'un enzyme de plastide, l'allène oxide cyclase (AOC). Zarei *et al.* (Plant Mol. Biol., 2011, 75: 321-331) ont montré que AtOR47 se lie au promoteur AOC2 *in vitro*. L'objectif de la présente étude était de déterminer si *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc* sont capables d'activer l'expression du gène *AOC2* par liaison avec le promoteur de ce gène. La capacité de ces facteurs de transcription de transactiver le promoteur de *AOC2* a donc été testée dans un essai transitoire.

Les constructions qui ont été utilisées dans les expériences sur les protoplastes de cotylédons de cotonnier sont présentées sur la Figure 3(A). Les constructions 'effector' consistent en un vecteur d'expression comprenant le promoteur CaMV 35S (flèche) avec ou sans les ADNc de *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb*, *GhERF-IIc* ou *GhERF-IXa5*. Le gène LUC (Firefly luciférase) est fusionné au promoteur CaMV 35S et sert de gène de référence pour corriger les différences dans les efficacités de transformation et d'extraction de protéines entre échantillons.

Les protoplastes de *Gossypium hirsutum* ont été co-transformés avec la construction 'reporter', un des plasmides 'effector' et le plasmide de référence. Les résultats obtenus sont présentés sur le graphe de la Figure 3(B). Dans ce graphe, les barres d'erreur

représentent les rapports GUS/LUC déterminés dans trois expériences indépendantes $\pm$ SE (l'erreur type) et exprimés relativement au vecteur contrôle.

Comme le montrent les résultats, *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc* activent le gène *AOC2* 2,5, 6,5 et 5 fois, respectivement. Au contraire, *GhERF-IXa5* et le vecteur vide n'ont aucun effet sur *AOC2*. Ces résultats démontrent que *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc* sont capables de transactiver, dans un protoplaste de cotonnier, un promoteur de la biosynthèse des jasmonates d'*Arabidopsis*, ce qui suggère une conservation au niveau moléculaire de l'expression du gène de la biosynthèse des jasmonates entre *Arabidopsis* et le cotonnier.

La Figure 4 montre des images obtenues par microscopie de protoplastes d'*Arabidopsis* transformés simultanément par le marqueur nucléaire NtKIS1a-DsRFP et un plasmide d'expression de *GhERF-IIa*-GFP6, de *GhERF-IIb*-GFP6 ou de *GhERF-IIc*-GFP6. Un recouvrement total des localisations est observé indiquant que les facteurs de transcription, *GhERF-IIa*, de *GhERF-IIb* et de *GhERF-IIc* sont exprimés dans le noyau des protoplastes.

Exemple 3: La Surexpression des Facteurs de Transcription GhERF-II augmente les Taux Endogènes d'OPDA et d'Acide Jasmonique chez le Cotonnier

Matériels et Méthodes

Constructions et Transformation Transitoire des Cotonniers: Pour transformer transitoirement le cotonnier, une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA1119 a été utilisée. Le système de transformation utilisé est nommé « ternaire ». Ce système a permis, pour de nombreuses espèces végétales, d'augmenter la fréquence du transfert de l'ADN-T (Van der Fits *et al.*, Plant Mol. Biol., 2000, 43: 495-502). Schématiquement, après contact entre les agrobactéries et les cellules végétales blessées, les composés phénoliques, les oses et un pH acide créent un environnement favorable à l'induction des gènes *vir*. Le facteur de transcription VirG activé par phosphorylation peut induire l'expression des gènes *vir* qui est nécessaire au transfert de l'ADN-T. Le système ternaire utilise une forme mutée de la protéine virG (*virGN54D*) mimant la forme active.

Ce système a été introduit dans la souche d'agrobactérie LBA1119. Cette souche possède également l'un des vecteurs binaires suivants: *pCAMBIA1300-GUS-intron*, *pCAMBIA1300-GhERF-IIa*, *pCAMBIA1300-GhERF-IIb*, *pCAMBIA1300-GhERF-IIc* ou *pCAMBIA1300-GhERF-IXa5*. Les souches ont été étalées et mises en culture sur milieu

LB contenant trois antibiotiques (Gentamicine (Gen), Rifampicine (Rif) et Kanamycine (Kan)) pendant 48 heures à 29°C. Quelques colonies ont été prélevées et mises en culture liquide (milieu contenant 20 mL de LB, 20 µL de Gen, 20 µL de Rif et 20 µL de Kan). Puis, la culture a été mise sous agitation à 200 rpm et 29°C durant environ 18 heures. Les agrobactéries ont ensuite été mesurées par un spectrophotomètre à 600 nm. Lorsque l'absorbance mesurée est comprise entre 0,6 et 1 (sans dilution), une centrifugation est effectuée à 4°C à 3000 rpm pendant 20 minutes, et au culot formé récupéré on ajoute un milieu d'infiltration (contenant MgSO₄ (10 mM), Acétosyringone (200 µM) et MES pH 5,5 (20mM)) pour obtenir une absorbance égale à 0,5.

L'agrofiltration a été réalisée sur de cotylédons (cotonnier) âgés de 10 jours. Chaque cotylédon a été inoculé à l'aide d'une seringue sans aiguille sur la face inférieure. L'infiltration a été effectuée de bas en haut et entre 2 nervures principales, pour que l'inoculum se répartisse sur toute la surface du demi-cotylédon. Pour chaque construction, 6 demi-cotylédons ont été agroinfiltrés. Deux jours (48 heures) plus tard, les demi-cotylédons ont été prélevés et placés rapidement dans l'azote liquide. La conservation a été réalisée à -80°C. L'expérience a été répétée trois fois. Aucun effet visible n'a été observé sur les cotylédons inoculés 48 heures après transformation par les deux constructions.

Extraction d'OPDA et de l'Acide Jasmonique: Dans un premier temps, le matériel végétal obtenu d'un cotonnier transformé a été finement broyé au mortier dans l'azote liquide, et 250 mg de cette poudre ont été placés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Cette poudre a été reprise par 1 mL de méthanol auquel ont été ajoutés 100 ng de jasmonate deutéré (d₆Ja) et 100 ng d'OPDA deutéré (d₅OPDA) qui servent de calibrateurs internes. L'extrait méthanolique a été centrifugé à 5000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant a été récupéré dans des tubes en verre. Cette étape d'extraction a été réalisée trois fois en combinant les extraits méthanoliques. Le méthanol a ensuite été éliminé par évaporation sous flux d'azote (40°C pendant 1 à 1h30 environ). Les résidus secs obtenus ont été repris par 5 mL de tampon phosphate (phosphate de sodium 100 nM, pH 7,8; NaCl 5 %). Une extraction par partage de phase a été réalisée sur l'extrait aqueux par 2,5 mL d'hexane, et la phase contenant l'hexane (phase supérieure) a été éliminée. Cette extraction par partage de phase a été réalisée trois fois. La phase aqueuse purifiée a été acidifiée à pH 1, 4 par une solution de HCl 5 N.

Une seconde purification par partage de phase a été réalisée avec 2,5 mL de chloroforme et la phase chloroformique a été récupérée (phase inférieure) à l'aide d'une pipette pasteur dans une autre série de tubes en verre. Cette étape de purification par partage de phase a été répétée trois fois en combinant les extraits chloroformiques.

- 5 Finalement, le chloroforme a été éliminé par évaporation sous flux d'azote (40°C pendant 10 à 30 minutes environ) et les tubes ont été stockés à -80°C.

Dosage de l'Acide Jasmonique et de l'OPDA extraits par LC-MS: Les analyses ont été réalisées sur une LC de type Waters 1515 couplée à un spectromètre de masse de type Waters ZQ contrôlé par le logiciel MassLynk V5.0 5 (MicroMass, Cray, USA). La
10 colonne utilisée était une XTerra MS C18, 3,5 µm, 100 x 2,1 mm (Waters, milford, MA, USA).

L'extrait végétal a été repris avec 100 µL de méthanol, dont 20 µL ont été injectés sur la colonne. La séparation a été réalisée avec un gradient acide formique 15 mM: méthanol (0-2 min, 40/60 % (v/v); 2-14 min, de 40/60% à 60/40%; avec un débit de
15 0,25 µL/min. Dans ces conditions, le temps de rétention de l'acide jasmonique et de sa forme deutérée est de 9.3 minutes, alors que celui de l'OPDA et de sa forme deutérée est de 16.50 minutes. L'acide jasmonique et l'OPDA ont été détectés et dosés en mode ESI (Electron Spray Ionisation) négative. Les conditions d'analyse pour la spectrométrie de masse étaient les suivantes: Température vaporisation 120°C, Température source 450°C,
20 Capillary voltage 2.5 KV, Cone voltage 20 V. La quantification a été réalisée en mode «selected ion monitoring» avec l'ion 209 pour l'acide jasmonique, l'ion 215 pour l'acide jasmonique deutéré, l'ion 291 pour l'OPDA et 295 pour OPDA deutéré, et a été faite grâce au rapport des surfaces des pics acide jasmonique/acide jasmonique deutéré et OPDA/OPDA deutéré où la surface du pic acide jasmonique deutéré représente 100 ng.

25 *Extraction d'ARNt:* Les transcriptions inverses et les PCR quantitatives en temps réel noté qPCR ont été réalisées sur les échantillons ayant servis au dosage de l'OPDA et de l'acide jasmonique.

La qPCR utilisée est basée sur la détection et la quantification d'un reporteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons
30 générés pendant la réaction. Le thermocycleur MX 3500P (Stratagene, Etats-Unis) a été utilisé pour les réactions de qPCR. Le système de détection utilisé repose sur un agent qui se lie à l'ADN double brin, il s'agit du SYBR Green. La quantification des transcrits se

base sur la valeur du Ct (THRESHOLD CYCLE), ce point est défini comme étant le cycle seuil et apparaît toujours au cours de la phase exponentielle. Plus il y a de matrices à amplifier au départ, moins élevé sera le Ct.

Les amorces utilisées ont été désignées à l'aide du logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft International, Etats-Unis); leur efficacité et concentration optimale ont été vérifiées. La réaction de qPCR a été réalisée avec le Mesa Green qPCR Master Mix Plus for SYBER Assay (Eurogentec, Belgique) dans un volume total de 20 µL (4 µL d'ADNc dilués au 10^{ème}; 0,6 µL de chaque amorce qPCR sens et anti-sens à 10 µM; 10 µL de Master Mix (Taq polymérase, les nucléotides et le Syber Green) et 4,8 µL d'eau stérile. Le programme utilisé au cours de la réaction qPCR était le suivant: un cycle à 50°C/2 min suivi d'un cycle à 95°C/10 min (phase de dénaturation), puis 40 cycles à 95°C/15 s, 58°C/20 s, 72°C/40 s et un cycle de dissociation à 95°C/1 min, 60°C/30 s, 95°C/30 s. Lorsque la réaction qPCR est terminée, la quantification des transcrits a été effectuée à partir du logiciel MXPro, et normalisée par rapport au calibrateur (T0, temps avant l'infection), et au normalisateur (l'actine; *GhACT2*, Champion *et al*, Mol. Plant Pathology, 2009, 10: 471-485).

L'analyse de l'expression de quatre gènes codant potentiellement pour des enzymes de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique ont été analysées. Ces gènes notés *GhAOS*, *GhAOC2* et *GhACX1a* codent respectivement pour les enzymes Allene Oxyde Synthase, Allene Oxyde Cyclase 2 et Acyl-CoA Oxydase.

Résultats

Les résultats présentés sur la Figure 5 correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes. Pour chacune des expériences, cinq plantes ont été transformées par agroinfiltration à l'aide des quatre constructions testées.

Les Figures 5(A)-(C) montrent que l'expression des trois gènes associés à la biosynthèse de l'acide jasmonique sont induits en réponse à la surexpression de chacun des gènes *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb*, et *GhERF-IIc*. En revanche, la surexpression du contrôle négatif GFP ne modifie l'expression d'aucun des gènes *GhAOC2*, *GhAOS* et *GhACX1a*.

Les deux gènes, nommés *GhLOX1* et *GhERF-Ixa2*, sont associés à la résistance du cotonnier à *Xcm*. *GhLOX1* est inductible d'une part par *Xcm18* (race avirulante) et d'autre part par la surexpression d'AtORA47 (voir demande internationale

PCT/EP2011/060026 des présents demandeurs). *GhERF-IXa2* est un gène dont l'expression est régulée spécifiquement par la race avirulente *Xcm18* chez le cotonnier. Les résultats obtenus en PCR quantitative indiquent que l'expression des gènes *GHLOX1* et *GhERF-IXa2* est induite dans les plantes surexprimant *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb*, ou

5 *GhERF-IIc* (voir Figure 5(D) et (E)).

Les résultats de dosage de l'OPDA et de l'acide jasmonique dans les cotonniers transformés avec les trois facteurs de transcription sont présentés sur la Figure 5(E). Ces résultats montrent que la surexpression de chacun des gènes *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc* entraîne une accumulation importante d'OPDA et d'acide jasmonique. Ainsi,

10 par rapport à une transformation contrôle (GFP), les taux d'accumulation de l'OPDA et de l'acide jasmonique sont multipliés respectivement par un facteur 4 et 8 chez le cotonnier transformé par le gène *GhERF-IIa*, 32 et 56 chez le cotonnier transformé par le gène *GhERF-IIb*, et 10 et 60 chez le cotonnier transformé par le gène *GhERF-IIc*.

Ainsi, cette étude démontre que les gènes *GhERF-IIa*, *GhERF-IIb* et *GhERF-IIc*

15 sont des orthologues fonctionnels, chez le cotonnier, d'*AtORA47* issu d'*Arabidopsis*. Ces gènes codent donc pour des éléments de signalisation essentiels au contrôle de la production de l'acide jasmonique.

Exemple 4: Rôle de *GhERGF-IIc* dans la Résistance contre *Xcm*

Matériels et Méthodes

20 *Souches bactériennes, Culture des Cotonniers, et Agro-infiltration.* Voir Exemple 1.

Extraction et Quantification de Xcm20. Les isolations ont été réalisées sur des tissus de cotylédons 1, 6 et 12 jours après inoculation avec *Xcm20*. Les densités de populations bactériennes ont été calculées par comptage de dilutions en série sur des plaques. Trois séries indépendantes de dilutions en série ont été effectuées pour chaque demi-cotylédon.

25 Trois disques (de 12 mm de diamètre) de tissus inoculés ont été découpés de trois régions inoculées de chaque cotylédon. Les disques obtenus ont été désinfectés avec de l'éthanol à 70% pendant 2 minutes et rincés dans deux bains d'eau stérilisée. Ils ont ensuite été broyés par homogénéisation dans 5 mL d'eau filtrée (Ultraturax). La suspension ainsi obtenue a été diluée en série dans de l'eau filtrée, et trois aliquotes ont été préparés à

30 partir de chaque échantillon. Cent (100) µL de chacune des trois dilutions ont été placés sur une plaque d'agar 3 LPG et incubés à 28°C jusqu'au comptage des colonies.

Résultats

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 6. Ces résultats montrent que, comme *AtORA47*, *GhERF-IIc* accroît la résistance du cotonnier à la race virulente *Xcm20*.

Exemple 5: La Surexpression de *GhERGF-IIc*, chez le Tabac augmente les Taux Endogènes d'OPDA et d'Acide Jasmonique, et induit l'Expression des Enzymes de la Biosynthèse de la Nicotine

Matériels et Méthodes

Extraction et Quantification d'OPDA et de l'Acide Jasmonique: Voir Exemple 3, la seule différence étant que le tabac (*Nicotiana Benthiana*) a été utilisé à la place du cotonnier.

Culture du Tabac, et Transformation Transitoire du Tabac: Le tabac, *Nicotiana Benthiana*, a été cultivé en pot contenant du terreau de type azoté, en chambre de culture sous des conditions climatiques de 24°C la journée, 22°C la nuit et 50% d'humidité relative avec un éclairage de type jour long (16h/24h). Les tabacs utilisés sont âgés de 25 jours au moment de leur transformation génétique. Le procédé de transformation des feuilles de tabac par agro-infiltration est le même que celui utilisé pour la transformation des cotylédons de cotonnier (voir Exemple 3). La seule différence réside dans la concentration d'agro-bactérie utilisée pour la transformation des feuilles de tabac, elle est deux fois et demie plus faible.

Extraction d'ARNt: La méthode utilisée est similaire à celle décrite dans l'Exemple 2 à l'exception du fait que les gènes *Nubiquitine*, *NbAOX*, *NbODC*, *NbPMT* et *NbMPO* ont été testés et amplifiés à l'aide des amorces publiées par Todd *et al.* (Plant J., 2010, 62: 589-600). Pour le tabac, c'est l'expression du gène *Nubiquitine* qui a été utilisée pour normaliser les données d'expression. *NbAOX*, *NbODC*, *NbPMT* et *NbMPO* codent respectivement pour les enzymes aspartate oxidase, ornithine décarboxylase, putrescine N-méthyltransférase, et méthylputrescine oxidase, qui sont tous impliqués dans la biosynthèse de la nicotine.

Résultats

La Figure 7(A) montre la localisation intracellulaire de la protéine de fusion GhERF-IIc-GFP chez le tabac. Cette protéine est localisée dans les noyaux des cellules épidermiques des feuilles de tabac, comme c'est le cas dans les protoplastes produits à

partir des feuilles d'*Arabidopsis*. Par contraste, la GFP seule est localisée dans le cytoplasme des cellules.

Les résultats présentés sur la Figure 7(B) indiquent une forte production *de novo* des métabolites OPDA et acide jasmonique en réponse à la surexpression du gène *GhERF-IIc* chez le tabac. Deux jours après transformations, les feuilles de tabac présentent des teneurs proches de 1000 pMole/FW d'OPDA et plus de 2000 pMole/FW d'acide jasmonique. Vingt-quatre heures après transformation du tabac par le gène *GhERF-IIc*, les taux d'accumulation de l'OPDA et de l'acide jasmonique sont multipliés respectivement par un facteur de 14 et 9 par rapport à une transformation contrôle (GUS). Quarante huit heures après transformation, ces taux d'accumulation sont multipliés respectivement par un facteur 28 et 53.

Comme le montrent les Figures 8(A)-(D), l'expression des 4 gènes associés à la synthèse de nicotine (*NbAOX*, *NbODC*, *NbPMT*, et *NbMPO*) est induite par la surexpression de *GhERF-IIc*. Dans tous les cas testés, on constate une forte induction de l'expression de ces gènes 24 heures et 48 heures après transformation. En revanche, l'expression transcriptionnelle de ces 4 gènes est peu ou pas induite par la surexpression de la GFP.

Revendications

1. Une plante transgénique présentant une surproduction d'acide jasmonique, et éventuellement une surproduction d'OPDA, et contenant une séquence nucléotidique exogène codant pour un facteur de transcription choisi parmi
5 GhERF-IIa, GhERF-IIb, GhERF-IIc et leurs combinaisons, la séquence nucléotidique étant préférablement intégrée dans le génome de la plante transgénique.
2. Plante transgénique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente une résistance améliorée à au moins un agent pathogène, l'agent
10 pathogène étant une bactérie, un virus, un champignon, un insecte ou un oomycète, où la bactérie, le virus, le champignon, l'insecte ou le oomycète est capable d'induire une maladie chez une plante.
3. Plante transgénique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que la plante appartient à la famille des Malvacées, à la
15 famille des Solanacées, à la famille des Rubiacées, à la famille des Poacées ou Graminées ou à la famille des Vitacées, et préférablement appartient aux genres *Gossypium* ou *Cotoneaster* (coton), au genre *Nicotiana* (tabac), au genre *Oryza* (riz), au genre *Solanum* (tomate), au genre *Coffea* (café), ou au genre *Vitis* (vigne).
- 20 4. Un matériel végétal obtenu ou extrait d'une plante transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, le matériel végétal appartenant au groupe constitué des cellules, cultures de cellules, protoplastes, organes, cals, graines, feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits, tubercules, pollen, et boutures de plantes.
- 25 5. Matériel végétal selon la revendication 4, caractérisé en ce que le matériel végétal est capable de régénérer une plante entière.

6. Un procédé d'obtention d'une plante transgénique présentant une surproduction d'acide jasmonique, et éventuellement une surproduction d'OPDA, le procédé comprenant les étapes suivantes :
 - 5 (a) une étape de transformation d'une cellule de plante avec une cassette d'expression ou un vecteur comprenant une séquence nucléotidique codant pour un facteur de transcription choisi parmi GhERF-IIa, GhERF-IIb, GhERF-IIc et leurs combinaisons, de manière à obtenir une cellule de plante transformée de façon stable ; et
 - 10 (b) une étape de culture de la cellule de plante transformée de façon stable de manière à régénérer une plante entière contenant, intégrée dans son génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression du facteur de transcription.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de culture comprend : la culture de plusieurs cellules transformées de façon stable de manière à régénérer plusieurs plantes ; et la sélection, parmi les plantes régénérées, de celles qui contiennent, intégrée dans leur génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression du facteur de transcription.
 - 15
8. Un procédé d'obtention d'une plante transgénique présentant une surproduction d'acide jasmonique, et éventuellement une surproduction d'OPDA, le procédé comprenant les étapes suivantes :
 - 20 (a) une étape de transformation d'une cellule hôte d'*Agrobacterium* de manière à obtenir une cellule hôte recombinante ; et
 - (b) une étape de transformation d'une plante ou d'une cellule de plante par infection avec la cellule hôte recombinante de manière à obtenir une
 - 25 plante entière contenant, intégrée dans son génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression d'un facteur de transcription,
 le facteur de transcription étant GhERF-IIa, GhERF-IIb, GhERF-IIc ou une de leurs combinaisons.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape de transformation comprend : l'infection de plusieurs plantes ou de plusieurs
 - 30

- 5 cellules de plante avec des cellules hôtes recombinantes, éventuellement la culture de plusieurs cellules de plantes infectées de manière à régénérer plusieurs plantes ; et la sélection, parmi les plantes infectées ou parmi les plantes régénérées, de celles qui contiennent, intégrée dans leur génome, une séquence nucléotidique permettant l'expression d'un facteur de transcription, le facteur de transcription étant GhERF-IIa, GhERF-IIb, GhERF-IIc ou une de leurs combinaisons.

Figure 1 / 8

GhERF-IIb	MVKP-----TQTEAT----TN---HGSDH	SGNGSKKGVRRKRKWKWSEIRL	SR	45
GhERF-IIc	MVKP	ICTTHSSASQTEYASDINTNSCSSNSSSSSSSSSKKGVRRKRKWKWSEIRL	SR	60
GhERF-IIa	MVKH-----ISEKP-----	AVERSI	SR	39
AtORA47	MVKQ-----AMKEEE-----	KKRNTAMCSKGVRRKRKWKWSEIRL	SR	42

GhERF-IIb	ERIWLGSYDS	EKAARAFDAAP	CLRGNGARFNFF	NPPE	IAGATSL	EPHEICAVASR	FA	105
GhERF-IIc	ERIWLGSYDS	EKAARAFDAAP	CLRGRLARFNFF	NPPE	IAGGTSL	SPPEICVVAAR	FA	120
GhERF-IIa	ERIWLGSYDS	EKAARAFDAAP	CLRGLSARFNFF	NPPE	IAGARSL	PPCICAAAR	FA	99
AtORA47	ERIWLGSYDT	EKAARAFDAAP	CLRGGLARFNFF	NPPE	ISVENSL	PPPEICAAAR	FA	102

Domaine AP2**CMII-1**

GhERF-IIb	N----	ESVNNNNA--	MTDRTVEQYTT	SSSVSV	SDGGVATQ	VES---	HETRID	SSFLSML	156
GhERF-IIc	KGVELET	GNNS--	ILG--	TEEYTS	SS---	SGGGATQ	ESRHHEEDM	SSFLSML	171
GhERF-IIa	NS---	EPPIQSE--	QSN	SGFQTES	SP---	SVSDGTVQ	DS---	ELPMDS	FIDIL
AtORA47	NTFQDIVK	EEEE	GLVPG	SEIRPES	EST---	SASVATST	VDY-----	DES	FLDIL

GhERF-IIb	D---	SNEGMS	DYG-FY	PLGHLPG---	DQFYPPPPPP	PVDDDMDDDM	AGDGF	SQHS	209
GhERF-IIc	DN	ITNDGGMS	DYG-FYS	NLGHLP	GGDDDL	QLYPPP-----	IDDDEN	GGSAF	SP-SS
GhERF-IIa	T--	IGSGNYES	DVGLLE	PGFED	SS----	AFLGSSLP	---	SIGYEED	YLDGILVPES-
AtORA47	PM	IFGFDS	FD	DFS-GFS	GGDR	TE-----	ILPIEDY	GGESIL	DES

GhERF-IIb	ELWNF	214
GhERF-IIc	ELWNF	225
GhERF-IIa	ELWNF	198
AtORA47	ELWNF	195

CMII-3

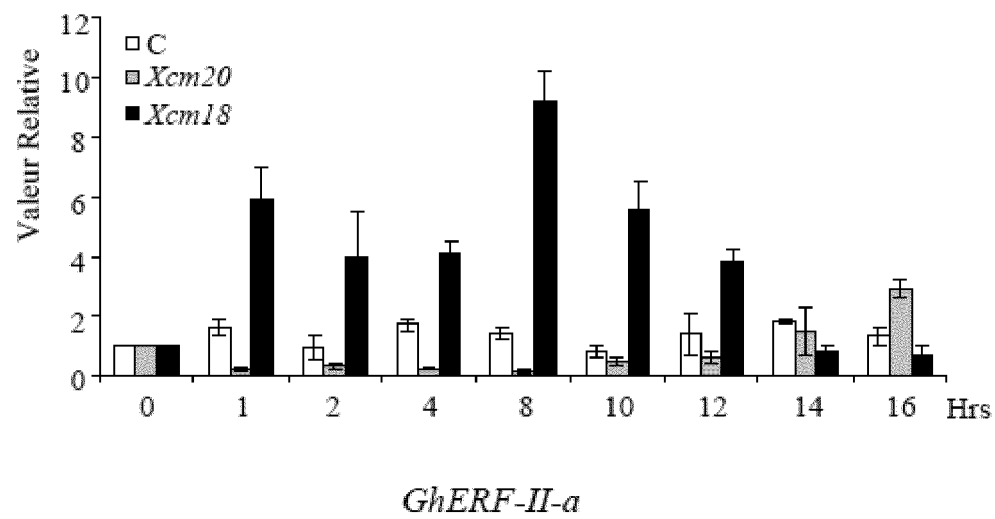
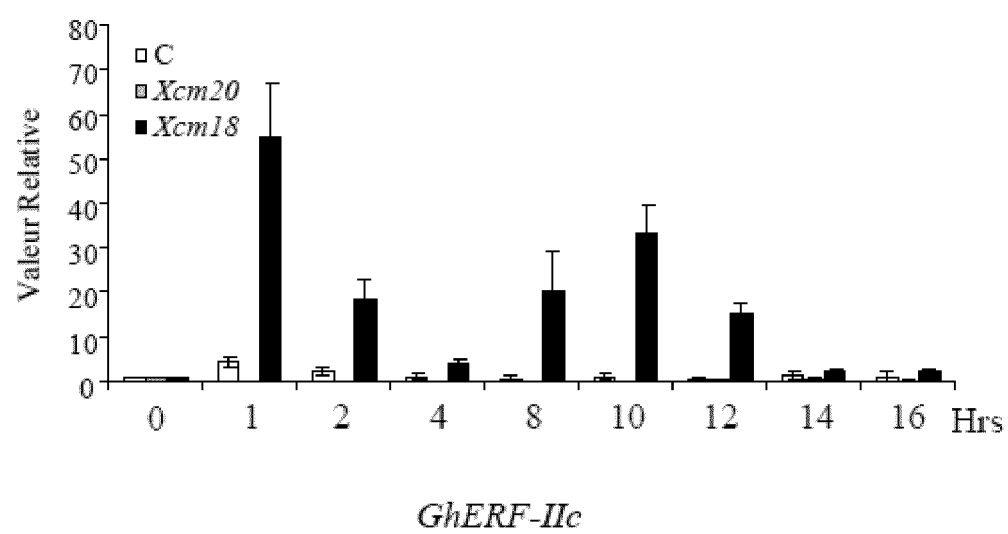
Figure 2 / 8**A****B**

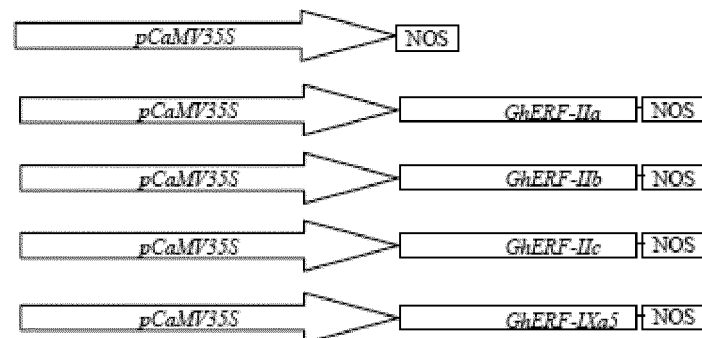
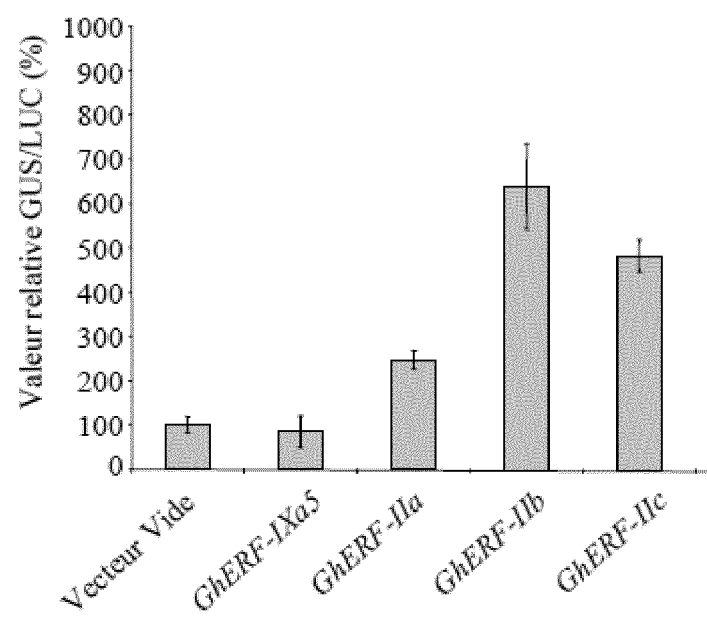
Figure 3 / 8**A**RAPPORTEUREFFECTEURSREFERENCE**B**

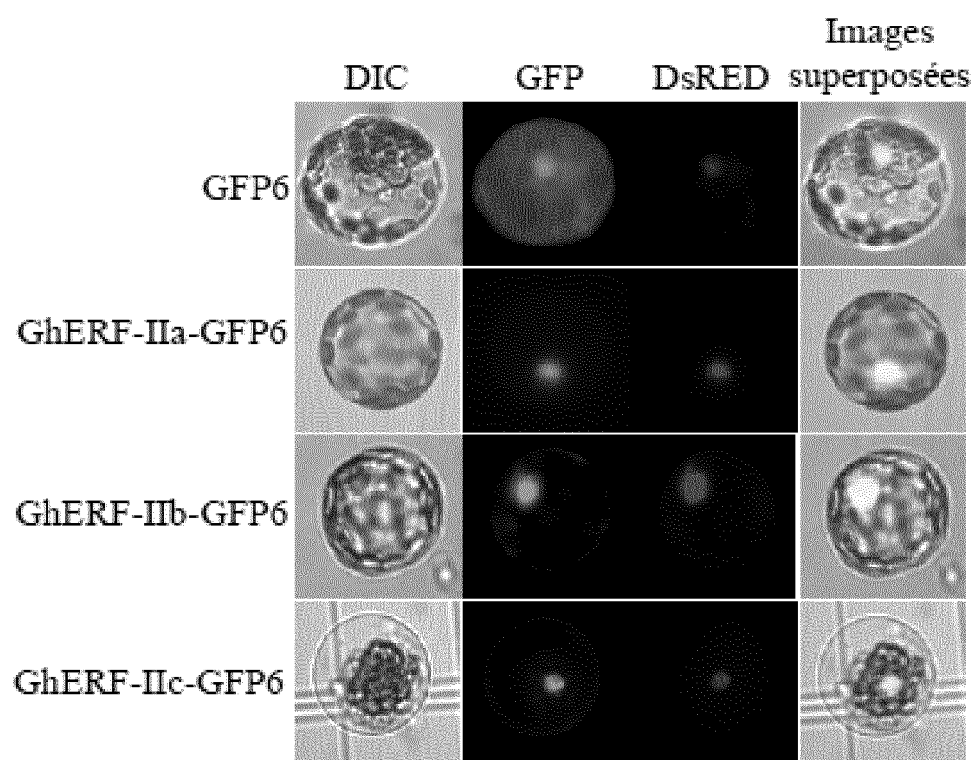
Figure 4 / 8

Figure 5 / 8

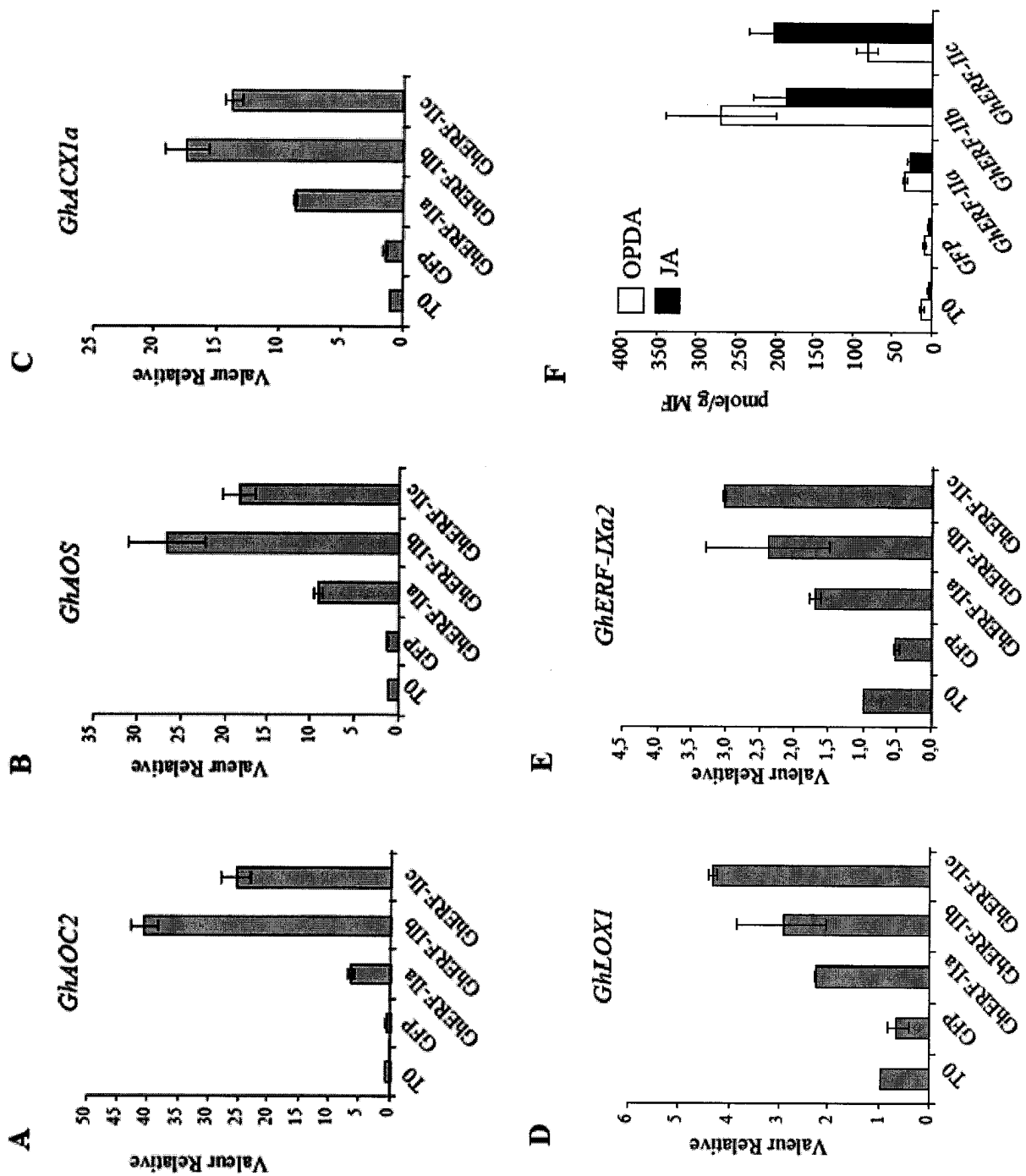


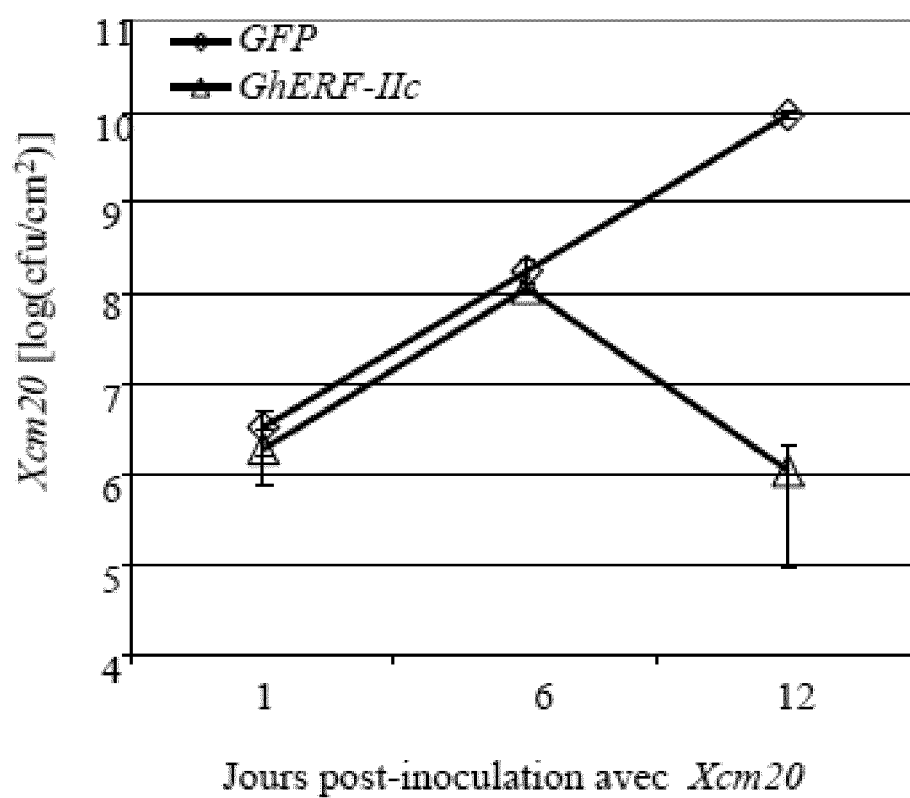
Figure 6 / 8

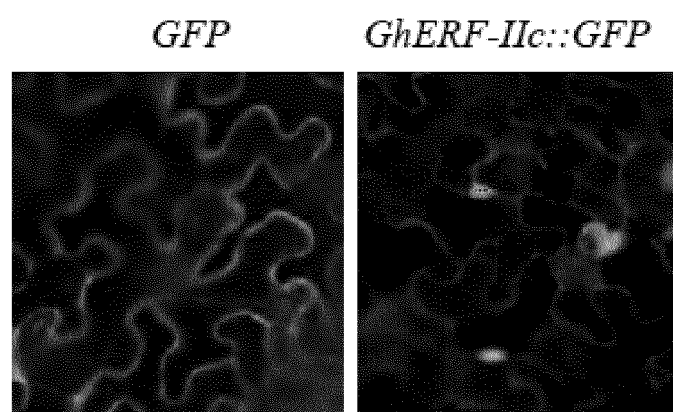
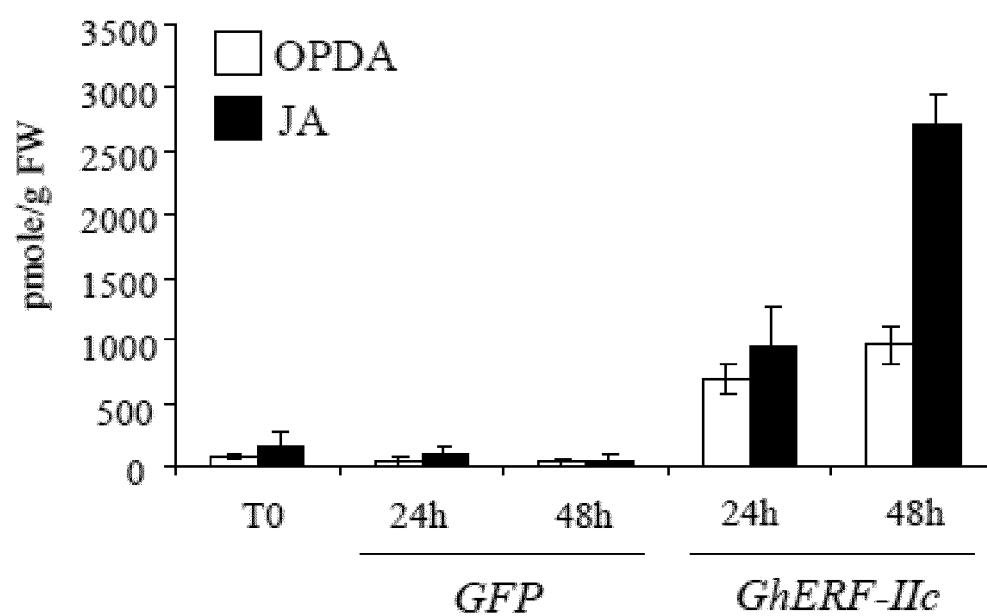
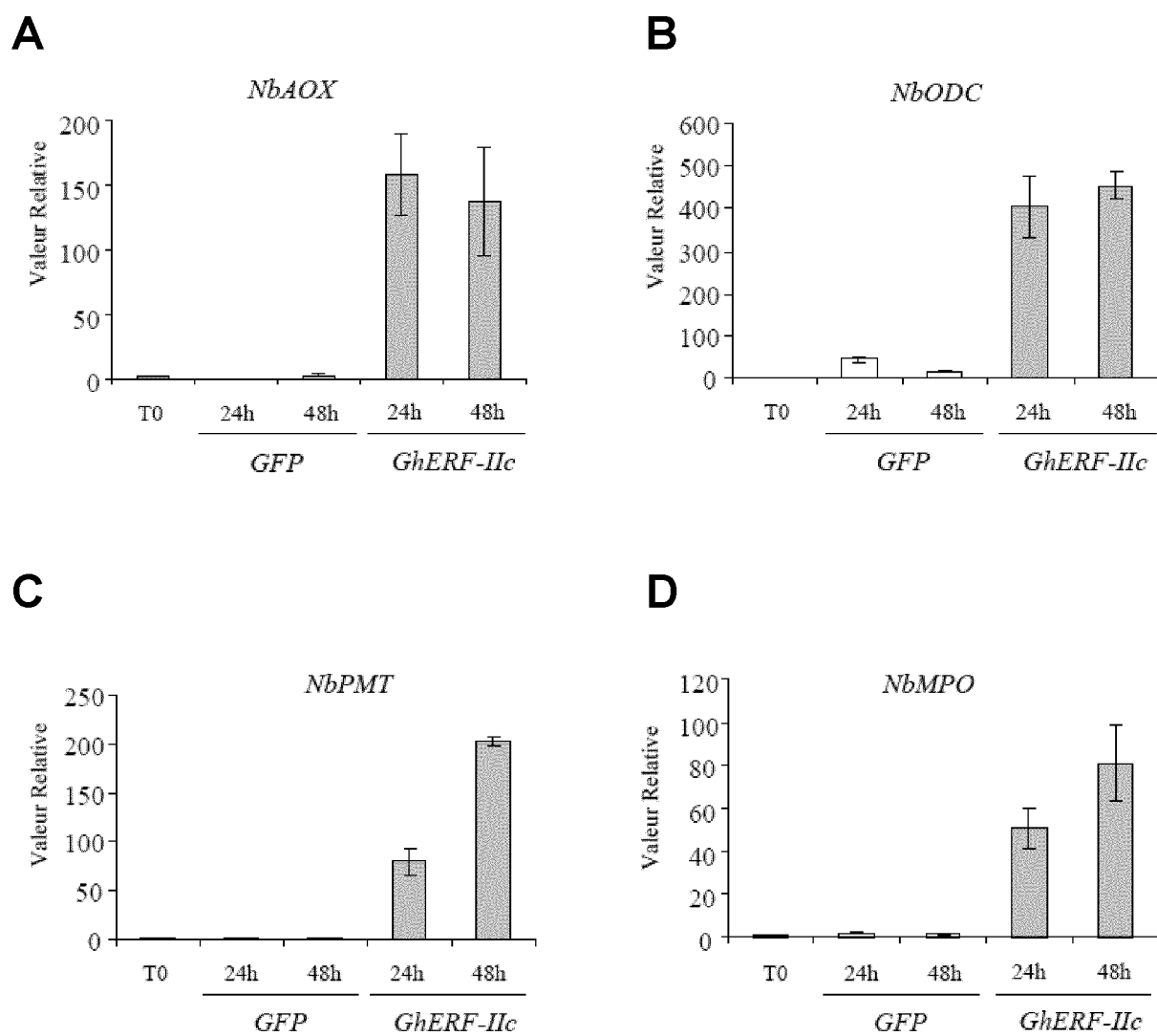
Figure 7 / 8**A****B**

Figure 8 / 8

Champion et al. sequence listing
SEQUENCE LISTING

<110> IRD
Champion, Antony
<120> Superproduction de Jasmonates dans des Plantes Transgéniques
<130> BFF111096
<160> 7
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 198
<212> PRT
<213> Gossypium hirsutum

<400> 1

Met Val Lys His Ile Ser Glu Lys Pro Ala Val Glu Arg Ser Asp Ser
1 5 10 15

Arg Phe Lys Gly Val Arg Lys Arg Lys Trp Gly Lys Trp Val Ser Glu
20 25 30

Ile Arg Leu Pro Asn Ser Arg Glu Arg Ile Trp Leu Gly Ser Tyr Asp
35 40 45

Ser Ala Glu Lys Ala Ala Arg Ala Phe Asp Ala Ala Leu Phe Cys Leu
50 55 60

Arg Gly Leu Ser Ala Lys Phe Asn Phe Pro Asp Asn Pro Pro Glu Ile
65 70 75 80

Ala Gly Ala Arg Ser Leu Thr Pro Pro Gln Ile Gln Ala Ala Ala Ala
85 90 95

Gln Phe Ala Asn Ser Glu Pro Pro Arg Ile Gln Ser Glu Gln Ser Asn
100 105 110

Ser Gly Phe Gln Thr Glu Ser Pro Ser Pro Ser Val Ser Asp Gly Thr
115 120 125

Val Gln Leu Asp Ser Glu Leu Pro Met Asp Gly Ser Phe Leu Asp Leu
130 135 140

Leu Thr Ile Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Ser Asp Tyr Gly Leu Leu Phe
145 150 155 160

Pro Gly Phe Glu Asp Phe Ser Ser Ala Phe Leu Gly Ser Ser Leu Pro
165 170 175

Ser Ile Gly Tyr Glu Glu Asp Tyr Leu Asp Gly Ile Leu Val Pro Glu
180 185 190

Ser Phe Leu Trp Asn Phe

Champion et al. sequence listing

195

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Gossypium hirsutum

<400> 2

Met Val Lys Pro Thr Gln Thr Glu Ala Thr Thr Asn His Gly Ser Asp
 1 5 10 15

Pro Thr Gly Asn Gly Ser Lys Tyr Lys Gly Val Arg Lys Arg Lys Trp
 20 25 30

Gly Lys Trp Val Ser Glu Ile Arg Leu Pro Asn Ser Arg Glu Arg Ile
 35 40 45

Trp Leu Gly Ser Tyr Asp Ser Pro Glu Lys Ala Ala Arg Ala Phe Asp
 50 55 60

Ala Ala Gln Tyr Cys Leu Arg Gly Asn Gly Ala Lys Phe Asn Phe Pro
 65 70 75 80

Asp Asn Pro Pro Asp Ile Ala Gly Ala Thr Ser Leu Gly Pro His Glu
 85 90 95

Ile Gln Ala Val Ala Ser Arg Phe Ala Asn Glu Ser Val Asn Asn Asn
 100 105 110

Asn Ala Met Thr Asp Arg Thr Val Glu Gln Tyr Thr Thr Ser Ser Ser
 115 120 125

Val Ser Val Ser Asp Gly Gly Val Ala Thr Gln Val Glu Ser His Glu
 130 135 140

Thr Arg Thr Asp Trp Ser Ser Phe Leu Ser Met Leu Asp Ser Asn Glu
 145 150 155 160

Gly Met Ser Ser Asp Tyr Gly Phe Tyr Pro Gly Leu Gly His Leu Pro
 165 170 175

Gly Asp Gln Phe Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Pro Val Asp Asp Asp
 180 185 190

Met Asp Asp Asp Gln Asn Tyr Ala Gly Asp Gly Phe Ser Gln His Ser
 195 200 205

Ser Phe Leu Trp Asn Phe
 210

<210> 3
 <211> 225
 <212> PRT

Champion et al. sequence listing

<213> Gossypium hirsutum

<400> 3

Met Val Lys Pro Ile Cys Thr Thr His Ser Ser Ala Ser Gln Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Ala Ser Asp Ile Asn Thr Asn Ser Cys Ser Ser Asn Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Ser Ser Ser Ser Lys Tyr Lys Gly Val Arg Lys Arg Lys Trp Gly
35 40 45

Lys Trp Val Ser Glu Ile Arg Leu Pro Asn Ser Arg Glu Arg Ile Trp
50 55 60

Leu Gly Ser Tyr Asp Ser Pro Glu Lys Ala Ala Arg Ala Phe Asp Ala
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Cys Leu Arg Gly Arg Asp Ala Lys Phe Asn Phe Pro Glu
85 90 95

Asn Pro Pro Glu Ile Ala Gly Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Glu Ile
100 105 110

Gln Val Val Ala Ala Arg Phe Ala Lys Gly Val Glu Leu Glu Thr Pro
115 120 125

Gly Asn Asn Asn Ser Ile Leu Gly Thr Glu Glu Tyr Thr Ser Ser Ser
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Ala Thr Thr Gln Val Glu Ser Arg His His Glu Glu
145 150 155 160

Asp Met Met Asp Trp Ser Phe Leu Ser Met Leu Asp Asn Asn Thr Thr
165 170 175

Asn Asp Gly Gly Met Ser Asp Tyr Gly Phe Tyr Ser Asn Leu Gly His
180 185 190

Leu Pro Gly Gly Asp Asp Asp Gln Leu Tyr Pro Pro Pro Ile Asp Asp
195 200 205

Asp Glu Asn Gly Gly Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Phe Leu Trp Asn
210 215 220

Phe
225

<210> 4

<211> 597

<212> DNA

<213> Gossypium hirsutum

Champion et al. sequence listing

<400> 4
 atggtgaaac acataagtga aaaaccagca gtggagcgaa gcgattcacg gttcaagggg 60
 gtccgaaagc gaaaatgggg gaaatgggtg tccgaaatca gactacccaa cagcagggaa 120
 aggatttggc tgggatctta tgactcagcc gagaaagcag cgcgtgcttt cgacgccgct 180
 cttttttgct tacgcggcct ctctgccaaa ttcaacttcc ctgataacct tcccagagata 240
 gctggagcta ggtctttaac gccgccccaa attcaagccg ctgcagcaca gtttgcgaa 300
 tcggagcctc ccaggatcca atccgagcaa tccaactctg ggttccaaac ggagtcccca 360
 tcaccgtcgg tttcggacgg gactgttcag ttagatagtg agttgcctat ggacgggtcg 420
 tttctggatc ttttgacaat cggttcgggt aattatgaat cggattatgg gttgctattc 480
 cctggatttg aggatttctc aagtgtttt ctcgatcat cgttgcccag catcggttac 540
 gaagaggatt atttggatgg gatttttagtt ccagaatctt ttctttggaa tttctaa 597

<210> 5
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 5
 atggtgaagc caacacagac tgaggcaacc acgaaccatg gctcggaccc gaccggtaat 60
 ggttcaaagt acaaggggtg aaggaagagg aaatggggga aatgggtatc cgaaattcga 120
 cttcccaaca gccgtgaacg tttttggtta ggttcttacg actcgccgga aaaagccgct 180
 cgggcattcg acgccgctca gtattgttta cgtggcaatg gagcaaagtt taacttcccc 240
 gataaccac cgatatagc cgggtgaacg tcacttggcc cacatgagat ccaagcggtg 300
 gcgtctaggt ttgccaacga gtcggttaat aacaacaatg cgatgacgga ccggactgta 360
 gaacaatata cgacgtcttc gtcggtttcg gtgtcggacg gtggagttgc gacgcaagta 420
 gaaagccatg aaacgaggac ggatttgtcc tcgtttttga gcatgttgga ttccaatgaa 480
 gggatgtcgt ccgattatgg gttttatcca gggctgggtc atttaccgg cgatcaattc 540
 tatcctctc ctccaccgcc gccggttgat gacgacatgg acgatgatca aaactacgcc 600
 ggcgacggtt tttccagca ctcatcttt ctttgaact tctaa 645

<210> 6
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> *Gossypium hirsutum*

<400> 6
 atggtgaagc caatctgcac aacacattct tcagcatcac aaacagagta tgcctccgac 60
 ataaacacca acagctgcag cagtaatagc agtagcagta gcagtagttc caagtataag 120
 ggagtacgga agaggaaatg gggaaaatgg gtgtccgaaa ttcgacttcc caacagccgt 180
 gagcgtatct ggtaggttc ttacgactcg ccggaaaaag cagccagggc gttcgacgcg 240
 gctctttatt gtttacgtgg ccgtgatgcc aagttcaatt tccctgaaaa tccaccagag 300
 atcgccggtg ggacgtcgt tagcccccg gaaattcaag tgggtggcagc taggttcgcc 360

Champion et al. sequence listing

aaaggggtgg aactggaaac cccggggaat aacaacagta ttttagggac agaagagtat 420
 acatcgtctt cgtcgggagg gggagcgaca acgcaagtgg agagtcgtca tcatgaagaa 480
 gacatgatgg actggtcgtt tttgagcatg ttggataata acaccaccaa tgatggaggg 540
 atgtccgatt atggctttta ttcaaatttg ggccatttgc ctggtggtga tgatgatcaa 600
 ctctatcctc cgccgattga tgatgatgaa aacggtggca gcgctttttc accgtcatcg 660
 tttcttttga acttttaa 678

<210> 7
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 7

Met Val Lys Gln Ala Met Lys Glu Glu Glu Lys Lys Arg Asn Thr Ala
 1 5 10 15

Met Gln Ser Lys Tyr Lys Gly Val Arg Lys Arg Lys Trp Gly Lys Trp
 20 25 30

Val Ser Glu Ile Arg Leu Pro His Ser Arg Glu Arg Ile Trp Leu Gly
 35 40 45

Ser Tyr Asp Thr Pro Glu Lys Ala Ala Arg Ala Phe Asp Ala Ala Gln
 50 55 60

Phe Cys Leu Arg Gly Gly Asp Ala Asn Phe Asn Phe Pro Asn Asn Pro
 65 70 75 80

Pro Ser Ile Ser Val Glu Lys Ser Leu Thr Pro Pro Glu Ile Gln Glu
 85 90 95

Ala Ala Ala Arg Phe Ala Asn Thr Phe Gln Asp Ile Val Lys Gly Glu
 100 105 110

Glu Glu Ser Gly Leu Val Pro Gly Ser Glu Ile Arg Pro Glu Ser Pro
 115 120 125

Ser Thr Ser Ala Ser Val Ala Thr Ser Thr Val Asp Tyr Asp Phe Ser
 130 135 140

Phe Leu Asp Leu Leu Pro Met Asn Phe Gly Phe Asp Ser Phe Ser Asp
 145 150 155 160

Asp Phe Ser Gly Phe Ser Gly Gly Asp Arg Phe Thr Glu Ile Leu Pro
 165 170 175

Ile Glu Asp Tyr Gly Gly Glu Ser Leu Leu Asp Glu Ser Leu Ile Leu
 180 185 190

Trp Asp Phe



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 763284
FR 1161726

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2007/061916 A1 (KOVALIC DAVID K [US] ET AL) 15 mars 2007 (2007-03-15) * abrégé; revendications 1-3 * * séquence 85567 * -----	1-16	A01H5/00 C12N15/29 C12N15/82
X	ANTONY CHAMPION ET AL: "Molecular diversity and gene expression of cotton ERF transcription factors reveal that group IXa members are responsive to jasmonate, ethylene and Xanthomonas", MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 10, no. 4, 1 juillet 2009 (2009-07-01), pages 471-485, XP002655702, ISSN: 1464-6722, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00549.X [extrait le 2009-04-27] * abrégé * * Results * * tableaux 1-4 * * figures 1-6 * -----	1-16	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
X	LONG-GUO JIN ET AL: "Molecular Characterization of Three Ethylene Responsive Element Binding Factor Genes from Cotton", JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY, 1 mars 2010 (2010-03-01), XP55032148, ISSN: 1672-9072, DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00914.x * le document en entier * ----- -/--	1-16	A01H C12N A01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 juillet 2012		Keller, Yves	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		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	
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			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 763284
FR 1161726

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		
A	NAKANO T ET AL: "Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice", PLANT PHYSIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 140, no. 2, 1 février 2006 (2006-02-01), pages 411-432, XP002377262, ISSN: 0032-0889 * le document en entier *	1-16	
A	TOURNIER B ET AL: "New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 550, no. 1-3, 28 août 2003 (2003-08-28), pages 149-154, XP004448384, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00757-9 * le document en entier *	1-16	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 juillet 2012		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			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1161726 FA 763284**

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 **10-07-2012**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2007061916 A1	15-03-2007	US 2004181830 A1	16-09-2004
		US 2007061916 A1	15-03-2007
