



HAL
open science

Séquences nucléotidiques promotrices inductibles par infection par les pathogènes

Bruno Favery, Pierre Abad

► **To cite this version:**

Bruno Favery, Pierre Abad. Séquences nucléotidiques promotrices inductibles par infection par les pathogènes. N° de brevet: FR2864104 (B1). 2006, 29 p. hal-02830649

HAL Id: hal-02830649

<https://hal.inrae.fr/hal-02830649>

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR04/003366

International filing date: 23 December 2004 (23.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0315314
Filing date: 23 December 2003 (23.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 18 March 2005 (18.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75000 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 P W / 210502

REMISE DES BREVETS DATE 23 DEC 2003 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0315314 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 23 DEC. 2003		<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36, rue de Saint-Pétersbourg 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv1516/16		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<input checked="" type="checkbox"/> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		N°	Date
<input checked="" type="checkbox"/> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES PROMOTRICES INDUCTIBLES PAR INFECTION PAR LES PATHOGENES.			
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		GENOPLANTE-VALOR	
Prénoms			
Forme juridique		Société par actions simplifiée	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	93, rue Henri Rochefort	
	Code postal et ville	19 1 0 2 5 EVRY Cedex	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			


**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES FEUILLES DATE 29 DEC 2003 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0315314 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI DB 540 W / 210502
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		ORES
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36, rue de Saint-Petersbourg
	Code postal et ville	75 10 10 18 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [] [] [] [] []
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) ORES, Béatrice (N° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

L'invention concerne l'isolement et la caractérisation de promoteurs inductibles par les pathogènes, plus particulièrement par les nématodes, et dirigeant plus spécifiquement l'expression dans les sites nourriciers desdits nématodes après l'infection.

5 Les nématodes ou « vers ronds » non segmentés forment un groupe zoologique caractérisé par sa richesse en espèces (20000 sont actuellement décrites), une structure corporelle simple et une organisation uniforme. Ce groupe, présent dans presque tous les milieux naturels, comprend des parasites de vertébrés, d'insectes et de plantes, ainsi que des espèces libres bactériophages-
10 saprophages ou des prédateurs. Les nématodes sont les plus simples des animaux organisés. Présents dans la grande majorité des sols, depuis la zone équatoriale jusqu'aux régions tempérées froides, les nématodes phytophages constituent des parasites très importants à l'échelle mondiale. La diversité des stratégies parasitaires développées (des espèces ectoparasites jusqu'aux endoparasites sédentaires), la
15 variabilité des exigences trophiques (spécificité d'hôte stricte ou polyphagie), ainsi que le potentiel reproducteur de ces organismes, sont à l'origine de dépréciations quantitatives et qualitatives des récoltes pouvant empêcher dans certaines conditions extrêmes, toute culture économiquement viable.

Les nématodes à galles et à kystes passent l'essentiel de leur vie à
20 l'intérieur des racines de leur plante-hôte. Leur cycle biologique comprend 4 stades juvéniles (J1 à J4), séparés par des mues, et un stade adulte. C'est au stade J2 qu'a lieu l'infection de la plante. A ce stade, le nématode, mobile, pénètre à l'intérieur de la racine et migre vers la région des tissus vasculaires, où il établit un site nourricier permanent.

25 Les sites nourriciers, sont des structures syncytiales ou des cellules géantes résultant de la modification par le nématode de cellules de la plante-hôte.

Après le démarrage du comportement de nutrition, le nématode, devenu sédentaire, subit trois mues successives jusqu'au stade adulte. Les mâles passent par un stade immobile temporaire, puis la troisième mue donne naissance à
30 un stade mobile; c'est à ce stade que les mâles quittent la racine. Chez la femelle, le stade adulte est entièrement immobile. La production d'œufs (des centaines par femelle) débute, selon les espèces et les conditions environnementales, 3 à 6 semaines après l'infection initiale.

Le nématode à kystes (genre *Heterodera* ou *Globodera*) pénètre dans la racine au niveau de l'épiderme et migre à travers le cortex en perçant et détruisant les cellules à l'aide de son stylet. Les cellules sont endommagées et des nécroses racinaires peuvent apparaître. Après avoir atteint l'endoderme, le nématode
5 perce la membrane d'une cellule procambiale près du xylème primaire (faisceau conducteur de la sève brute) et injecte des sécrétions grâce aux glandes salivaires. Rapidement, la cellule procambiale devient métaboliquement très active et se met à grossir par fusion successive avec les cellules voisines. Le syncytium formé peut
10 incorporer plus de 200 cellules et se caractérise alors par des noyaux volumineux, un cytoplasme dense et des invaginations de la paroi cellulosique, qui permettent d'augmenter la surface en contact avec les tissus vasculaires.

Le nématode à galles (du genre *Meloidogyne*), après une phase de reconnaissance à la surface de la racine, pénètre au niveau de la zone d'élongation proche de l'apex racinaire. Généralement, le nématode migre ensuite en passant
15 entre les cellules, à l'extrémité de la racine, puis remonte dans le cylindre central jusqu'à la zone de différenciation. A cet endroit, le nématode pique, avec son stylet, 5 à 7 cellules et induit leur transformation en cellules géantes par de multiples mitoses sans formation de paroi. Les cellules géantes ainsi activées présentent les mêmes caractéristiques que le syncytium formé par le nématode à kystes : cytoplasme
20 dense, parois épaissies et présence d'invaginations, nombreux (>100) et volumineux noyaux dans chaque cellule. L'augmentation de volume des cellules corticales conduit à la formation d'une galle typique de l'infection par *Meloidogyne*.

Aux dégâts directs que provoquent les nématodes par l'action de leur stylet buccal peuvent s'adjoindre des effets indirects qui aggravent le stress infligé à
25 la plante (envahissement par d'autres agents pathogènes telluriques ou transmission de virus). Parmi les nématodes phytoparasites, les formes endoparasites obligatoires sédentaires représentées par les nématodes à kystes des genres *Heterodera* et *Globodera* et les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sont responsables des dégâts les plus importants au niveau mondial.

30 La crucifère *Arabidopsis thaliana* est une plante-hôte pour de nombreuses espèces de nématodes à galles et à kystes, qui a la particularité de posséder des racines fines et transparentes, se prêtant particulièrement bien à des études microscopiques. De plus, *Arabidopsis thaliana* est adaptée à des études

moléculaires, du fait de la petite taille de son génome, entièrement séquencé, et de son cycle biologique court.

L'utilisation d'*Arabidopsis thaliana* permet l'identification de gènes de la plante impliqués dans la formation des sites nourriciers et l'évaluation de l'effet de leur inactivation sur le développement de la plante et du nématode. De plus, on peut tester chez *Arabidopsis thaliana* des gènes codant pour des composés défavorables au métabolisme du nématode.

Ainsi, cette plante a été un outil important de la recherche sur les interactions nématode/plante-hôte. Des cycles biologiques complets ont été obtenus *in vitro* pour les parasites suivants: *Heterodera schachtii*, *H. trifolii*, *H. cajani* (nématodes à kystes), *Meloidogyne incognita* et *M. arenaria* (nématodes à galles) ainsi que le migrateur *Pratylenchus penetrans*. Un grand nombre d'écotypes d'*Arabidopsis* ont été séparés en différents groupes, selon leur sensibilité à *H. schachtii*. Cependant, aucune résistance aux nématodes n'a encore été montrée chez *Arabidopsis*.

Une des stratégies pour rendre une plante résistante aux nématodes est la destruction du site nourricier. Cela peut être réalisé par l'expression locale d'un gène cytotoxique, par exemple le gène de la barnase (HARLEY *et al.*, *J. Mol. Biol.*, vol.202(4), p.913-5, 1988) sous le contrôle d'un promoteur de plante inductible par les nématodes et actif dans le site nourricier. Il faut également que ce promoteur soit le plus spécifique possible du site nourricier, afin d'éviter l'expression du gène cytotoxique dans les autres tissus de la plante.

Quelques promoteurs dont l'expression est inductible par une infection par les nématodes ont été décrits dans l'art antérieur.

Des promoteurs induits par l'infection par les nématodes ont été décrits chez *Arabidopsis* par GODDIJN *et al.* (*Plant J.*, vol.4(5), p.863-73, 1993).

Cinq promoteurs inductibles par les nématodes (ARM1, 1164, 728, 25 et Lemmi9) et quatre promoteurs inhibés (CaMV35S, promoteur de la nopaline synthase, et les promoteurs RolC et RoID) ont été fusionnés à un gène reporter GUS et introduits dans les racines de la betterave à sucre par transformation avec *Agrobacterium rhizogenes* pour évaluer leur profil d'expression. (VAN POUCKE *et al.*, *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.*, vol.66(2b), p.591-8, 2001).

La demande française FR 2 779 737 décrit l'implication du gène de la D-ribulose-5-phosphate-3-épimérase (RPE) dans les stades précoces de développement de cellules nourricières induites par les nématodes. La demande WO 97/46692 décrit des séquences nucléotidiques d' *A. thaliana* capables de diriger l'expression d'une séquence d'intérêt, notamment une séquence codant pour une substance cytotoxique, dans les racines suite à l'infection par des nématodes à galles ou à kystes. Cependant, cette expression n'est que peu spécifique, et nécessite pour éviter des effets phytotoxiques généraux indésirables, d'utiliser en complément une construction chimérique exprimant dans les autres tissus de la plante un gène codant pour un neutralisant de la toxine utilisée. La demande WO 98/31822 se rapporte à des promoteurs inductibles suite à l'infection par un pathogène, notamment par les nématodes. La lignée ARM1 (lignée Att001 dans l'article de BARTHELS *et al.* (Plant Cell., vol.9(12), p.2119-34, 1997) présente une expression dans les sites nourriciers après infection par *Meloidogyne* et *Heterodera* détectée 2 à 4 jours après infection et plus faible à 14 jours. Au cours du développement de la plante, l'expression est détectée au niveau des sites d'initiation des racines latérales mais également dans tous les vaisseaux des feuilles et des racines. De plus on observe une réponse du promoteur après application d'hormones végétales (auxine).

Il apparaît souhaitable de disposer d'autres promoteurs inductibles par les nématodes, et dont l'expression est la plus spécifique possible des tissus nourriciers.

Les inventeurs ont montré que les promoteurs des gènes des formines *AtFH6* ou *AtFH1* ou *AtFH10* d'*Arabidopsis thaliana* étaient capables d'induire l'expression d'une séquence d'intérêt dans les sites nourriciers des racines de la plante après infection par un nématode, à galles ou à kystes. D'autre part l'expression en dehors des sites nourriciers observée au cours du développement de la plante présente un niveau moins important que celle induite par les nématodes et est limitée à certains tissus, notamment, dans le cas d'*AtFH6*, l'apex racinaire et les zones de différenciation précoce (sites d'initiation des racines latérales) des vaisseaux racinaires, ainsi que les vaisseaux des tissus aériens des très jeunes plantules et stipules. En outre, contrairement à ce qui a été observé pour certains autres promoteurs inductibles par les nématodes, comme par exemple celui décrit

par BARTHELIS *et al.* (1997, précité), les promoteurs des formines ne sont pas inductibles par les hormones végétales.

Les formines sont des protéines impliquées dans la cytokinèse et la polarité cellulaire, chez les levures et la drosophile. Elles ont été mises en évidence récemment chez les végétaux : BANNO et CHUA (Plant Cell Physiology, vol.41(5), p.617-626, 2000) décrivent l'identification d'un ADNc complet codant pour AFH1 (Arabidopsis Formin Homology protein 1) et l'obtention de séquences complémentaires par homologie chez le tabac, CYRCKOVA (Genome Biology, vol.1(1), 27 avril 2000) divulgue l'utilisation des séquences des régions conservées FH1 et FH2 comme sondes pour identifier des séquences codant potentiellement pour des formines ; DEEKS *et al.* (Trends in Plant Science, vol.7(11), p.492-498, 2002) présentent l'identification par analyse bioinformatique de 21 gènes de la famille des protéines FH chez *Arabidopsis arabidopsis* et discutent de leur rôle putatif comme intermédiaires dans la cascade de signalisation affectant la réorganisation du cytosquelette chez les plantes. Aucune relation entre l'expression des formines chez les plantes et l'infection par des nématodes n'a été rapportée dans l'art antérieur.

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation du promoteur d'un gène de formine pour exprimer préférentiellement un gène d'intérêt, en réponse à l'infection par un nématode, dans les sites nourriciers formés par ledit nématode.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit promoteur est choisi parmi les promoteurs des gènes de formine *AtFH6*, *AtFH1*, ou *AtFH10* d'*Arabidopsis thaliana*, ou parmi les promoteurs des gènes orthologues d'autres espèces végétales.

La présente invention a en particulier pour objet un polynucléotide isolé constituant un promoteur inductible chez une plante par l'infection par un nématode, caractérisé en ce qu'il comprend les séquences de régulation d'un promoteur choisi parmi :

- le promoteur du gène de formine *AtFH6* d'*Arabidopsis thaliana*, représenté par la séquence SEQ ID NO: 1 ;
- le promoteur du gène de formine *AtFH1* d'*Arabidopsis thaliana*, représenté par la séquence SEQ ID NO: 2 ;
- le promoteur du gène de formine *AtFH10* d'*Arabidopsis thaliana*, représenté par la séquence SEQ ID NO: 3 ;

Dans un promoteur, on désigne sous le nom de « séquences de régulation » les séquences reconnues par des facteurs de transcription qui ne sont actifs que dans certains types cellulaires particuliers, ou en réponse à un stimulus spécifique. Dans le cas présent, les séquences de régulation des promoteurs des gènes *AtFH6*, *AtFH1* ou *AtFH10* sont les régions de ces promoteurs spécifiquement impliquées dans la réponse à l'infection par un nématode, et/ou dans l'expression préférentielle dans les sites nourriciers.

L'homme du métier peut, à partir des promoteurs définis par les séquences SEQ ID NO: 1, 2, ou 3, identifier ces séquences de régulation, par des techniques connues en elles-mêmes de dissection des promoteurs, par exemple en mesurant l'inductibilité par l'infection par un nématode et la spécificité de l'activité promotrice de mutants de délétion de ce polynucléotide, et/ou par des techniques telles que celles des empreintes sur l'ADN (footprints), en incubant les polynucléotides de séquence SEQ ID NO: 1, 2, ou 3, ou des portions de ceux-ci, avec des extraits nucléaires de cellules des sites nourriciers, ainsi qu'avec des extraits nucléaires de cellules de tissus dans lesquels les promoteurs des gènes *AtFH6*, *AtFH1* ou *AtFH10* sont inactifs.

Selon un mode de réalisation préféré d'un polynucléotide de la présente invention, il comprend une séquence ayant au moins 80%, de préférence au moins 85%, avantageusement au moins 90%, et de manière tout a fait préférée au moins 95% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID N° 1, 2 ou 3.

Un polynucléotide de la présente invention peut également être un promoteur chimérique, contenant un promoteur minimal fonctionnel dans une cellule végétale, associé aux séquences de régulation de l'un des promoteurs des gènes *AtFH6*, *AtFH1* ou *AtFH10*.

Un promoteur minimal comprend au moins les séquences permettant la fixation de l'ARN polymérase et l'initiation de la transcription. Par exemple, un promoteur minimal pour la transcription par l'ARN polymérase II comprend généralement, outre un site d'initiation de la transcription, au moins une boîte TATA située en général à environ 20 à 40pb en amont du site d'initiation de la transcription, et/ou au moins un élément INR (INItiatoR) localisé au niveau du site d'initiation de la transcription ; il peut comprendre en outre, pour un niveau d'expression plus élevé, des séquences dénommées « éléments promoteurs amont » (upstream promoter elements ou UPEs), telles que la boîte CCAAT, et/ou les séquences riches en GC

qui sont reconnues par différents facteurs de transcription exprimés constitutivement dans tous les types cellulaires.

La présente invention a également pour objet tout sous-fragment d'au moins 15, de préférence au moins 20, de manière tout à fait préférée d'au moins 30, et avantageusement d'au moins 50 bases consécutives de l'une des séquences SEQ ID NO: 1, 2, ou 3, ou de son complémentaire, ainsi que tout polynucléotide d'au moins 20, de manière tout à fait préférée au moins 30, et avantageusement au moins 50 pb capable de s'hybrider dans des conditions de forte stringence avec l'une quelconque des séquences SEQ ID NO: 1, 2, ou 3, ou avec son complémentaire.

Le terme « isolé » au sens de la présente invention désigne un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement). Par exemple, un polynucléotide présent à l'état naturel dans une plante n'est pas isolé. Un polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeurer néanmoins à l'état isolé du fait que le vecteur ou la composition ne constitue pas son environnement naturel.

Selon la présente invention, on entend par « % d'identité » le pourcentage de nucléotides identiques qui peut être calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquences tel que, par exemple, ceux de la suite BLAST (ALTSCHUL *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, vol.25, p.3389-3402, 1997), ou le programme FastDB avec les paramètres suivants : « Mismatch penalty : 1.00 ; Gap penalty : 1.00 ; Gap Size Penalty : 0.33 ; joining penalty : 30.0 ». Ces algorithmes sont présentés dans *Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications*, pages 127-149, 1988, Ala. R. Liss, Inc, incorporé dans la description par référence.

Sauf précision contraire, les pourcentages d'identité indiqués dans le cadre de l'exposé de la présente invention sont ceux obtenus en utilisant les programmes BLAST avec les paramètres par défaut, et sur une fenêtre de comparaison constituée par la totalité de la séquence SEQ ID NO: # indiquée comme séquence de référence.

On peut également définir des polynucléotides selon l'invention par leurs propriétés d'hybridation sélective avec l'un des polynucléotides définis par les séquences SEQ ID n°1 ou SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3 dans des conditions de forte

stringence telles que définies dans SAMBROOK *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61.

En général, des conditions de forte stringence, pour un polynucléotide donné peuvent être obtenues en opérant à une température inférieure de 5 à 10°C à la température de fusion du duplex constitué par ledit polynucléotide et son complémentaire, dans un milieu de composition donnée.

A titre d'exemple de conditions d'hybridation de forte stringence utilisables dans un grand nombre de cas, on indiquera les conditions suivantes:

Préhybridation :

10 Même conditions que pour l'hybridation

Durée : 1 nuit.

Hybridation :

5X SSPE (0.9 M NaCl, 50 mM phosphate de sodium pH 7.7, 5 mM EDTA)

5X Denhardt's (0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 0.2% SAB)

15 0.1% SDS

Durée: 1 nuit.

Lavages:

2X SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C

1X SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C

20 0.5X SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C

0.1X SSC, 0.1% SDS 10 min 65°C

Les différences nucléotidiques que peut comprendre un acide nucléique selon l'invention par rapport aux séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 ou encore SEQ ID N°3 peut résulter en des substitutions, délétions ou additions d'un ou plusieurs nucléotides consécutifs ou non.

Des modes de réalisation préférés de promoteurs conformes à l'invention sont représentés par les polynucléotides définis par les séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3, ainsi que par les polynucléotides suivants :

- le polynucléotide défini par la SEQ ID NO: 4, qui est constitué par une séquence de 1129 pb en amont de l'ATG du gène AtFH6 et qui comprend, outre la séquence SEQ ID N°1, une séquence 5'UTR de 122 pb (soulignée dans la séquence représentée ci-après) :

GTCTT'TGAAGTTTGGAA'TGTTGGCCCATATTATGTTGTAGGTAATATGGAATCAGCCGGT
ACACTGGACCACAGAGGATTGTCTTTCCGTCTACAGTCTACAGAATCAGCCGGACTAGTTTT

GTAAC TTTTGT TTTAAA GAGCTAT TTTATT ATTTGTA ATCTTAG TTTTAA GTTTTAA CTTAAA
 AGAATGA AGAAAATGT AGACAAAATCG AAAAGTCGATGGTGGAGGTATGTACGTGTCTTTT
 CCTTTGTCCGTCTTGAAACCAACGAAACAAAATCGGAAATTGTCTACGTTAAAGGACAATCA
 CATTCTTAGTTAATTAATACTCCATAACCAAGGGACATTTACGTCTTTAAGCACCAAAAACCAT
 5 AGTATTGGATTGGCGAATCTCACGTGGCGAAAATTTCCAAATTTCCAAAGCAACAAGACCAT
 GAGAGTCCATCCATAATCATTTTTATTATAAACTTAATAGTCAATTTCCATGAAGCTGGACT
 TGAATAGTTAGGCTGTCTATTCTTCGTTTTTATGTCTTTTACGTGAACAACCTCGTAATTTCT
 TATCTGTTTTTCTGAACATATGTTTGTGTCGCACACGTATAATACAATTATACAAAATACAT
 TTGTTTTTAGTCTAAAACCATCTACATTGGGATATTTTATAAGAGTTTTTTACAATAAAAAA
 10 AATAAAAATAATAAAAATGAAAGAAAGAAAGTGAATAATTAAATTATAATATAATATTAATA
 TTTTTTTTGT TTTGAAA AACTTTGTGGGTTTCTGTCCTAAGTTATTTTTTTAATCATTTTATT
 AAGTACTGGTAATTACTAATTAACGGATAGTTTAAAATAAGCAGATTAAACGATCCCGGAAT
 GCTGACGTCAGCATCATAAATCTCAGATCTCGATACGAAACGAATTTCTCACTGCAGCAGCT
 ATTACTTTCCCTTTTTTACCTTTTTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCCATTTCTTAAT
 15 TTTTTCTTCCATTGAAGATTACTCTACGATCTGACGAACAAGGCAACCAAAAAAAGGGCAA
AGAACAGAGAGAGAGCAAAAAGCAGAAGAAGATGAATTTAGACGAGAATTGTAAAATAGTTT
ATCACGATTCGCC

- le polynucléotide défini par la SEQ ID NO: 5, qui est constitué par
 une séquence de 1221 pb en amont de l'ATG du gène AtFH1 et qui comprend, outre
 20 la séquence SEQ ID N°2, une séquence 5'UTR de 32 pb (soulignée dans la
 séquence représentée ci-après) :

TGTCGGTGGTTTCTTGATACTCTTGTACTCTTACATTTTTCAGTAGCTTTCCCACGTGACCAA
 TTATTTTACTCCCTTTCTTAGTCCAATTATGGTTTTCTAGCACCTCTTTTTATTGAACTTT
 TATATGAACTATTAATAGTTCACCTTTATAGTTTTTCTTAACATTCACAGGCCCCACAAATTTT
 25 ACAAGAATCAGACATTATTTGCTTTAAATTTGATAAATTTTGCAGTCCTAGTCCTGGTAAAT
 TCAGTATTTCTGTCATATTCAATACCATCAATTTCTAGTGCCATTTTTATGATTGCAAAATC
 CAACAAAACAAAACAAAACCATGTTGTGGTCTAATGTTTGTGCCCCAAAACAGAAAGAGGA
 TTCACACAGTCGACATTTGCATAAGACGCAGGAAGTATAACTGGCTTATTAAGAAGATTTAA
 GGGACGCATTTAGAGATATGGTTATTGCATGAACCATGATGTAGCCATTTAAAAGTTTATGG
 30 TTAAC TTTACTATTTGCAACGATCGATATTTTATCAAACGATGCTACTGTATAAATTTCTCA
 TCATATGTCCTAATTCCTCCTTATTATCTACACCAGTTAGACCTGTCCTCCAATTTTTATGCT
 TTGCACATACAGCATTCGGCGAAAGCACATGAACCGACCATTTACACATCCTGAGACAGTGT
 CGGTCAAATAAAGTAAAGA ACTCAGCACAATACACCCACTACCACTTCTCCTCCTCAAAC
 ATTAACACACCATTATTTTATGTTTTCTTTATTACAGACGTCGTCAAACCGCCGTAATAACT

TTTTAATAAAAATAAAAATCCACTCGCATTTTTATTTTCAACATTGTGCGTACGGTGCAATTC
 AATGAACAGTGTTTACTTTTCAGTGTGTACACTTCTGCGGACTATTACAAAGTCCACGTCTTA
 TCCTACGTGTTATAATCTCATATGTTACTGTCTGAAATGGACCCCACTACGTAAAAATAAAA
 TTAAGAATCAACCACTCTTCTTCCATCACCTCTTTTGGCTTTCTCTCTACTCTCTCTACTCT
 5 CTCTACTACTCTCTCACCATCACTGAGTTAAGAGAACAAACCAAAAACAAAATTATCAAACC
 ATCACCAGCAGAATCTTAGCTGGATTCATCACTCTATTCAAAAAGTTTCTCTCTTCTCTTTT
 CTCAGATCTTGAACCTCTTGAAGAAGAAAGAAGAAGATAACACA

- le polynucléotide défini par la SEQ ID NO: 6, qui est constitué par
 une séquence de 1238 pb en amont de l'ATG du gène AtFH1 et qui comprend, outre
 10 la séquence SEQ ID N°3, une séquence 5'UTR de 78 pb (soulignée dans la
 séquence représentée ci-après) :

CCTATATATGTTGCCACCCACGAGATAAAAACAATTATTTAGTAATTAGTGTCTCCTTGGA
 TGTGTGAAGAAGTTGGACTTTTGCATATTAATTTCTCCCGCCAGTGTGCAACAAAGTCTTC
 ATGCTCAGAGTATCAGTTCACATTCGAAACCTGATCTTTCTTACTAGTCTATTGTTATGAGA
 15 TTGGTTTTTTGGAGTGAAAATGAGCTTCGTGGAACCTCATCAACCTCGTGAGAACATAACT
 TCGTGATTGTGTTCTTTGACAAGAAAAGTTGAGCTGTAGTTTTTTTTTAACAAGTTTTTGGG
 ATGACCAGTAGTAAATCAATTGTTGTAATAATTTGGTTGGTAAATATAACATTTGTTTTCTA
 CTAAACATCCAAAATGGAGGTACGTGAATGAACACATGGTGTGTTGTAACAATTAATCTCA
 ATATGGCCAAACCAAGTCTTCTCCATTTCTAGTCCCTGTCTCTACAACGAAGCTATTGCGCT
 20 ATTTGTTTTGTTTGTGTCAGTACGCTTCCTTCTTCTTATTGCCTTTCTTCTTAGGCGTCATAT
 GACTCTCTTGCATCCTCAAAAACCTATGCTGATTAATTTATGCCACACCACCATTTCTCATTG
 AAAGCTAAATCGAAATTCAAATAAAGTCCCAAAAACATGCAAAGTTTAATTGACCAAAAAG
 CTGAAAAGCTTGATGGCGTTTCAAACATAATGCACTAGTTAATTCAATTTCCATAATTACGTA
 GTAGTTTTTTTTGGAGATTATATATTTATTATTACGAAAAATGTGGATAAGACAAATAAAAG
 25 ACAAAGCATGCTGCATTGCTTGTCTACTTTTTCTTTTTCTTTTTTCAGACATTTTAGCCCAA
 CTATATACTACTCTTGATTAATTTGAATAGGATTACATAGTATTCCATAACACGAGACAAAA
 TAACAATATTTGGCAAATAGAAATGTTGTCTAGTTGTTTTCTCGTAGATAAAGATAGTAGT
 CTCGACTTTAATAATTGGTTTGCATAGAAAAGAGAAGATAGTGTTTTGTATAGTACTAGGCA
 AAAGTCAAAAAGATTCTTTTGAAAGAGAGGACCCAAATTTACTTGACGTAATTATTGCATTT
 30 CATATACGTTCTTCTTCTCTCCCTACTTGATTTTTATTCAAAAACACTAGCATTAAGTCACT
 CTTTCGTCCTCAGATAGTGCGCATTCGAGAACACAAAATCTCTACAAGAAAACCCCAAAA

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être
 préparées par les techniques usuelles connues de l'homme du métier telle que
 définie par exemple dans SAMBROOK *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1987; et INNIS *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: 5 SanDiego, 1990, ou encore par des méthodes incluant par exemple la synthèse chimique et des méthodes mixtes comme la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques d'ADN.

L'invention se rapporte également à une cassette d'expression recombinante, caractérisée en ce qu'elle comporte :

- 10 - un promoteur constitué par un polynucléotide conforme à l'invention ;
- une séquence hétérologue d'intérêt placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur, ou un ou plusieurs site(s) de restriction permettant l'insertion d'une séquence d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

15 Une séquence d'intérêt exprimée dans une cassette d'expression selon l'invention peut être notamment une séquence exprimant un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre l'infection par les nématodes, dans le sens qui améliore la résistance de la plante à l'infection jusqu'à conférer une résistance complète et plus particulièrement un gène codant pour un composé 20 toxique pour les nématodes ou pour les cellules des sites nourriciers.

Ce composé peut avoir pour effet direct la mort des nématodes (il s'agit par exemple de toxines nématocides, de lectines, de collagénases, d'inhibiteurs de protéases, d'anticorps...), ou avoir pour effet de rendre incapable les nématodes d'effectuer une étape importante dans leur développement ou leur reproduction, 25 provoquant à terme leur élimination.

Il existe de nombreux exemples de telles substances toxiques, par exemple l'endotoxine de *Bacillus thuriangiensis* (EP 0 352 052).

Les composés toxiques peuvent également être dirigés non pas vers les nématodes mais vers les cellules végétales de leurs sites nourriciers, afin de 30 perturber la formation et/ou le fonctionnement de ces structures nourricières. Dans ce cas, les composés toxiques peuvent notamment être choisis parmi les DNAses, RNAses, les inducteurs de mort cellulaire, les associations de produits d'un gène de résistance et d'un gène d'avirulence, les ARN anti-sens. A titre d'exemple non-limitatif, on citera notamment la barnase, mentionnée ci-dessus.

Ladite séquence d'intérêt peut être également associée à d'autres éléments de régulation tels que des activateurs et des séquences de terminaison de transcription (terminateurs).

D'autres éléments tels que les introns, enhancers, séquences de polyadénylation et leurs dérivées connues de l'état de l'art peuvent également être présents dans la séquence nucléique d'intérêt pour améliorer l'expression ou le fonctionnement du gène transformant. On pourra également associer à une cassette d'expression conforme à l'invention des séquences nucléotidiques régulatrices, ne faisant pas partie du promoteur, et susceptibles de moduler l'expression de la séquence d'intérêt, en particulier :

- des séquences leaders et des séquences enhancers, qui interviennent à un niveau post-transcriptionnel ou traductionnel (notamment stabilisation d'ARN et effet sur la traduction), par exemple le leader EMCV (ELROY-STEIN *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol.86(16), p.6126-30, 1989) et le leader TMV (GALLIE *et al.*, *Plant Cell*, vol.1(3), p.301-11, 1989).

- des boîtes de régulation intervenant à un niveau transcriptionnel, capables de commander au moins partiellement l'activité d'un promoteur ; ces dernières boîtes de régulation peuvent être inductibles par un facteur physiologique ou de l'environnement de la plante.

- des terminateurs de transcription ; à titre d'exemples non limitatifs on citera notamment : Le terminateur 3' Nos, terminateur de la nopaline synthase qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase provenant du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline (DEPICKER *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.*, vol.1, p.561-573, 1982), et le terminateur 3' CaMV, correspondant à la région 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (FRANCK *et al.*, *Cell*, vol.21, p.285-294, 1980 ; Gene Bank n° V 00141). De plus, le gène d'intérêt peut être placé en orientation sens ou antisens selon les besoins de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, la cassette d'expression comprend également un gène codant pour un agent de sélection (également appelé gène marqueur de sélection). Parmi ceux pouvant être utilisés, on citera notamment des gènes qui confèrent une résistance à un

antibiotique (HERRERA-ESTRELLA *et al*, *EMBO J.*, vol.2, p.987-995, 1983), tel que l'hygromycine, la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine ou à des herbicides (EP 242 246), tels que le glufosinate, le glyphosate ou le bromoxynil. Préférentiellement, ledit gène marqueur de sélection est choisi parmi le gène bar (WHITE *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, vol.18, p.1062, 1990 ; Gene Bank n° X 17220) qui confère la résistance à l'herbicide Basta® (glufosinate) et le gène NPTII qui confère la résistance à la kanamycine. Le système d'excision pour éliminer le gène codant un agent de sélection peut être un système de transposition, tel que notamment le système Ac/Ds du maïs (WO 02 101061), ou un système de recombinaison, tel que notamment le système Cre/lox du bactériophage P1, le système FLP/FRT de la levure (LYZRIK et HODGES, *Nucl. Acid. Res.*, vol.44, p.123-132, 1997), la recombinaison Gin du phage Mu, la recombinaison Pin de *E. coli* ou le système R/RS du plasmide pSR1. Un système de co-transformation (KOMARI *et al.*, *Plant J.*, vol.10, p.165-174, 1996) peut également être utilisé. Préférentiellement, le système utilisé sera le système Ac/Ds du maïs. Selon un mode préféré, ledit gène est compris à l'intérieur de l'élément transposable Ds (également appelé élément dissociant ou séquence mobilisable d'un transposon). Le transposon Ds utilisé est décrit dans la publication de YODER *et al.* (*Bio/Technology*, vol.12, p.263-292, 1993).

Selon un autre aspect, l'invention concerne un vecteur recombinant, d'expression ou de clonage, comprenant au moins un polynucléotide selon l'invention. Avantageusement, ledit vecteur est un vecteur d'expression contenant une cassette d'expression selon l'invention.

A titre d'exemples non limitatifs de vecteurs pouvant être utilisés pour l'obtention de vecteurs recombinants conformes à l'invention on citera les vecteurs suivants : vecteur pBIN19 (BEVAN *et al.*, *Nucleic Acids Research*, vol.12, p.8711-8721, 1984, commercialisé par la société CLONTECH, USA), vecteur 101 pBI221, et pBI121 (JEFFERSON, *Plant molecular Biology Reporter*, vol.5, p.387-405, 1987, commercialisé par la société CLONTECH, USA).

L'invention a également pour objet une cellule hôte transformée par un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant selon l'invention.

Les cellules hôtes préférées sont indifféremment d'origine bactérienne ou végétale. Ainsi, peuvent être notamment utilisées des cellules

bactériennes de différentes souches d'*E. coli* ou encore d'*Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizobium*.

Les cellules hôtes végétales peuvent être issues en particulier de plantes dicotylédones ou monocotylédones ; à titre d'exemples non limitatifs, on
5 citera notamment *Arabidopsis*, Colza, tabac, maïs, tomate, blé, orge, tournesol, pomme de terre, betterave et de riz.

L'invention concerne également les tissus ou parties de plantes, plantes, ou graines transformés par un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant selon l'invention. Le terme "tissu de plante" fait référence à
10 n'importe quel tissu d'une plante, dans une plante ou dans une culture. Ce terme inclut des plantes entières, des cellules de plantes, des organes de plantes, des graines de plantes, des protoplastes, des cals, des cultures de cellules et toutes autres cellules de plantes organisées en tant qu'unité fonctionnelle et/ou structurelle. Des parties de plantes régénérées telles que des fleurs, des graines, des feuilles,
15 des tiges, des fruits, du pollen, des tubercules, bois et analogues sont également dans le cadre de l'invention.

L'invention concerne en outre une plante transgénique ou partie d'une plante transgénique contenant au moins une copie d'un transgène comprenant un polynucléotide ou une cassette d'expression selon l'invention. Lesdites plantes
20 transgéniques ont la propriété, suite à une infection par un pathogène et notamment par un nématode, d'exprimer préférentiellement dans les sites nourriciers des racines le gène d'intérêt inséré dans ladite cassette d'expression.

Des plantes transgéniques selon l'invention peuvent notamment être générées à partir des cellules végétales transformées conformes à l'invention.

25 Les techniques pour cultiver et régénérer des plantes entières à partir de cellules ou tissus transformés sont connues de l'homme du métier, cf. par exemple HANSEN et WRIGHT (Trends Plant Sci., vol.4(6), p.226-231, 1999) ou KOMARI *et al.* (Curr. Opin. Plant. Biol., vol.1(2), p.161-5, 1998).

Une plante transgénique selon l'invention peut être obtenue à partir
30 de toute plante que l'on souhaite pouvoir protéger contre une infection par des nématodes. Il peut s'agir, à titre d'exemples non-limitatifs, du Colza, du blé, de l'orge, du tournesol, du tabac, du maïs, ou encore d'*Arabidopsis thaliana*.

L'invention englobe également tout procédé d'obtention de plantes transgéniques conformes à l'invention.

Pour la mise en œuvre d'un procédé conforme à l'invention on peut utiliser toute technique de transgénèse végétale convenant au type de plante que l'on souhaite protéger. Généralement, on transforme des cellules de plantes (isolées, sous forme de protoplastes, ou sous forme d'un tissu ou organe végétal) par une cassette d'expression conforme à l'invention, et on régénère des plantes entières à partir des cellules transformées.

La transformation en question peut se faire soit directement, soit indirectement, au moyen d'un vecteur comprenant une cassette d'expression conforme à l'invention.

Par transformation directe, on entend toute transformation d'une cellule de plante réalisée directement par un vecteur selon les techniques connues de l'homme du métier telles qu'au moyen d'une micropipette pour assurer le transfert mécanique de l'ADN, à l'aide du polyéthylène glycol, par pénétration biolistique à haute vitesse au moyen de petites particules contenant soit à l'intérieur soit à leur surface l'acide nucléique à faire pénétrer dans la cellule de plante, par fusion de protoplastes avec d'autres entités, cellules, lysosomes, ou autre corps de surfaces lipidiques susceptible de fusionner, ou par électroporation. La transformation de cellules de plantes peut également être réalisée par l'insertion de la séquence nucléique d'intérêt au sein d'un plasmide recombinant par exemple d'origine bactérienne dans lequel a été préalablement inséré le génome d'un ADN viral tel que celui du virus de la mosaïque du chou-fleur, le plasmide résultant étant utilisé pour transformer les cellules de plantes.

Par transformation indirecte, on entend une transformation consistant par exemple à transformer un microorganisme tel qu'*Agrobacterium tumefaciens* au moyen de la susdite séquence nucléique, ledit microorganisme étant ensuite utilisé pour transformer les cellules de plantes.

Selon un mode de mise en œuvre d'un procédé conforme à l'invention, il comprend les étapes suivantes :

a) obtention d'une cellule végétale transformée conforme à l'invention ;

b) régénération, à partir de ladite cellule, d'une plante entière contenant dans son génome au moins une copie d'une cassette d'expression conforme à l'invention.

Selon un autre mode de mise en œuvre d'un procédé conforme à l'invention, il comprend les étapes suivantes :

a) obtention d'une cellule transformée d'*Agrobacterium tumefaciens* conforme à l'invention,

5 b) transformation d'une plante d'intérêt par infection avec la cellule transformée d'*Agrobacterium tumefaciens* obtenue à l'étape a).

Avantageusement, un procédé conforme à l'invention peut en outre comporter une étape de croisement de plantes transgéniques obtenues, et une étape de sélection, parmi les plantes issues de ce croisement, de celles qui comprennent
10 au moins une copie d'une cassette d'expression conforme à l'invention.

L'invention a également pour objet les graines ou semences obtenues à partir d'une plante transgénique selon l'invention.

L'invention porte aussi sur l'utilisation d'au moins une cassette d'expression selon l'invention pour obtenir une plante résistante à l'infection par les
15 nématodes.

L'invention porte également sur une méthode pour protéger une plante d'une infection par un nématode comprenant les étapes de transformation de plantes avec une cassette d'expression selon l'invention et la sélection des plantes ayant intégré la séquence nucléotidique d'intérêt.

20 L'invention a également trait à une méthode pour identifier un promoteur spécifique des sites nourriciers comprenant les étapes d'identification des homologues des gènes de formine dans les espèces autre qu'*Arabidopsis thaliana* comme par exemple le blé et/ou le maïs par comparaison de séquences desdites espèces avec les séquences des gènes de formine d'*Arabidopsis thaliana*, et
25 l'identification des promoteurs des séquences homologues issues de cette comparaison par les techniques usuelles connues de l'homme du métier.

De plus l'invention a également pour objet un kit de transformation de plantes comprenant une cassette d'expression selon l'invention ou un vecteur de clonage et/ou d'expression selon l'invention.

30 Enfin l'invention concerne toute utilisation d'une séquence nucléotidique promotrice selon l'invention pour exprimer un gène dans une plante infectée par des nématodes, au niveau des sites nourriciers desdits nématodes.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant

l'inductibilité et le profil d'expression des promoteurs des gènes AtFH6, AtFH1 et AtFH10.

EXEMPLES

Exemple 1 : Profil d'expression du gène AtFH6 chez A. thaliana

5 Le profil d'expression de AtFH6 chez *A. thaliana* a été analysé par RT-PCR, à partir d'ARNm isolé de racines non infectées, de fragments non-méristématiques de racines non infectées, de plantules âgées de 5 jours, de parties aériennes et de feuilles isolées de plantes âgées de 10 jours, et de galls 7 et 14 jours après infection par *M. incognita*.

10 Des ADNc simples brins ont été préparés à partir de 500 ng d'ARN poly(A)⁺ en utilisant la «Superscript II reverse transcriptase» (Invitrogen) avec l'amorce oligo(dT). Les réactions PCR ont été réalisées avec les amorces AtFH6 F3for (5'-AGA TCG AGC CAC TGT TTG GG-3', SEQ ID NO :7) et AtFH6 3R avec 200 µM dNTP, 1X tampon PCR, 0,5 U Taq DNA polymérase (Qbiogene) en suivant les
15 conditions de température suivante, 3 min dénaturation à 94°C et 35 cycles de 40 s à 94°, 40s à 55°C, 1 min à 72°C.

La Figure 1 illustre les résultats de l'analyse par RT-PCR du profil d'expression de AtFH6 chez *A. thaliana*. Les ARNs ont été isolés de galls 7 et 14 jours après infection par *M. incognita* (G7 and G14), racines non infectées (Ro),
20 fragments non-méristématiques de racines non infectées (RnM), plantules âgées de 5 jours (Se), partie aérienne (Ap) et feuilles isolées (Le) de plantes âgées de 10 jours.

Exemple 2 : Construction des fusions promoteur GFP-GUS/GFP et transformation des plants d'Arabidopsis

25 Le vecteur pKGWFS7 compatible GATEWAY (KARIMI *et al.*, *Trends Plant Sci.*, vol.7(5), p.193-5, 2002) a été utilisé pour l'analyse de la fonctionnalité des promoteurs des gènes AtFH1, AtFH6 et AtFH10 chez *A. thaliana*. Ce vecteur binaire porte le gène de résistance à la spectinomycine et un ADN-T qui sera transféré au génome de la plante. L'ADN-T porte le gène conférant la résistance à la kanamycine
30 sous contrôle du promoteur constitutif et du terminateur du gène de la nopaline synthase ainsi que la séquence codante du gène de l'eGFP (« enhanced Green Fluorescent Protein » ; Clontech) fusionné au gène GUS avec le terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV). Les promoteurs et la partie 5'UTR des gènes AtFH1, AtFH6 et AtFH10 ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique

d'*A. thaliana* écotype WS à l'aide des amorces spécifiques Gwp5AFH6 (5'-AAA AAG CAG GCT TCG TCT TTT GAA GTT TGG AAT TGT TGG C-3', SEQ ID NO :8) et Gwp3AFH6 (5'-AGA AAG CTG GGT GGG CGA ATC GTG ATA AAC TAT TTT AC-3', SEQ ID NO :9) pour le promoteur de *AtFH6* ; Gwp5AFH1 (5'-AAA AAG CAG GCT TCT GTC GGT GGT TTC CTG ATA CT-3', SEQ ID NO :10) et Gwp3AFH1 (5'-AGA AAG CTG GGT GTG TGT TAT CTT CTT CTT TCT TCT TC-3', SEQ ID NO :11) pour le promoteur de *AtFH1* ; Gwp5AFH10 (5'-AAA AAG CAG GCT TCC CTA TAT ATG TTG CCC ACC CAC G-3', SEQ ID NO :12) et Gwp3AFH10 (5'-AGA AAG CTG GGT GTT TTG GGG TTT TCT TGT AGA GAT TTT G-3', SEQ ID NO :13) pour le promoteur de *AtFH10*. Les réactions PCR ont été réalisées avec 50 ng d'ADN génomique, 200 µM dNTP, 1X tampon PCR, 0,5 U *Pwo* DNA polymerase en suivant les conditions de température suivante, 3 min dénaturation à 94°C et 10 cycles de 40 s à 94°, 40s à 55°C, 1 min à 72°C. Les séquences soulignées permettent une réamplification du produit PCR et la création de l'adaptateur GATEWAY à l'aide des amorces adaptateur_attB1 (5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT-3', SEQ ID NO :14) et adaptateur_attB2 (5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3', SEQ ID NO :15). Ces réactions PCR ont été réalisées en suivant les conditions indiquées ci-dessus durant 20 cycles.

Les fragments PCR obtenus ont été séquencés puis clonés dans le vecteur d'entrée GATEWAY pDON207 puis introduit dans le vecteur pKGWFS7 au niveau du site de recombinaison attR1-attR2 situé en amont de la fusion eGFP-GUS conformément aux indications du fabricant du système GATEWAY (Invitrogen).

Les constructions réalisées dans les vecteurs binaires ont été transférées à la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* par électroporation. Cette souche est résistante à la rifampicine et au chloramphénicol. Les cultures d'*A. tumefaciens* ont été effectuées à 28°C dans un milieu LB contenant les antibiotiques appropriés.

Les plants d'*Arabidopsis* cultivés en chambre climatisée, âgés d'environ 4 à 6 semaines (premières siliques développées), ont été transformés par trempage des fleurs dans la suspension d'*A. tumefaciens* selon la méthode décrite par CLOUGH et BENT (*Plant J.*, vol.16(6), p.735-43, 1998). Après traitement, les plantes (T0) ont été repiquées dans du terreau et recouvertes d'une mini-serre pendant deux à trois jours afin d'éviter la déshydratation des plants et favoriser l'enracinement. Après 4 à 6 semaines de culture, la descendance de ces plantes (T1)

a été récoltée. Les transformants ont été sélectionnés *in vitro* puis transférés en terre. Les semences (T2) issues de l'autofécondation des plantes T1 ont été utilisées pour les analyses histologiques.

Exemple 3 : Analyse fonctionnelle des promoteurs de AtFH6, AtFH1 et AtFH10

5 Expression du gène rapporteur GUS sous contrôle des promoteurs AtFH1, AtFH6 et AtFH10.

Les régions promotrices (environ 1 kb en amont du +1 de transcription) des gènes AtFH6, AtFH1 et AtFH10 ont été clonées en fusion avec les gènes rapporteurs GUS et GFP, et utilisées pour réaliser des transformations stables
10 d'*A. thaliana* comme décrit à l'exemple 2 ci-dessus. Les transformants sélectionnés ont été inoculés avec des larves de *Meloidogyne incognita* ou *Heterodera schachtii*.

Promoteur AtFH6

L'expression GUS a été observée dès le 3^{ème} jour après infection, chez 3 transformants indépendants exprimant ce gène sous contrôle du promoteur
15 AtFH6 (Figure 2).

Dans le cas de *Meloidogyne incognita* cette expression est localisée au niveau des galles contenant le parasite (figure 2A). La coupe d'une galle examinée en microscopie à fond noir (figure 2B) montre que l'expression GUS est limitée aux cellules géantes (*) et aux cellules entourant les cellules géantes et le
20 nématode (n).

Dans le cas de *Heterodera schachtii*, l'expression GUS est également limitée au syncytium et aux cellules entourant ce syncytium.

L'expression GUS au cours du développement de la plante a également été observée chez les mêmes transformants (Figure 3).

25 On observe une expression faible au niveau de l'apex racinaire (A et B), ainsi qu'aux sites d'initiation des racines latérales (C et D). Dans les jeunes plantules, on observe une expression GUS (flèche) à la base des feuilles émergentes 4 jours (E) et 6 jours (F et G) après germination. Dans les jeunes plantules cultivées 7 jours à l'obscurité, l'expression GUS est observée au niveau du
30 cylindre vasculaire (H et I).

Promoteurs AtFH1, et AtFH10.

L'expression du gène rapporteur GUS a été observée 7 jours après infection par *Meloidogyne incognita*, chez 2 transformants indépendants exprimant

ce gène sous contrôle du promoteur *AtFH1* et 2 transformants indépendants exprimant ce gène sous contrôle du promoteur *AtFH10* (Figure 4).

L'expression GUS est observable dans les galles (figure 4A et 4D) mais également

- 5 - pour *AtFH1* dans le cylindre vasculaire et les bourgeons floraux (figure 4B et 4C).
 - pour *AtFH10* dans le cylindre vasculaire (figure 4E)

Ces résultats sont en accord avec les expériences de RT-PCR indiquant, pour *AtFH1* et *AtFH10*, l'expression au niveau des racines dans les zones
 10 non méristématiques et dans les galles.

Analyse par PCR quantitative

L'activation transcriptionnelle des gènes *AtFH1*, *AtFH6* et *AtFH10* a été également étudiée par PCR quantitative.

Les résultats obtenus confirment les observations concernant
 15 l'expression du gène rapporteur GUS. L'ensemble de ces résultats est résumé dans le Tableau I ci-après.

TABLEAU I

Promoteur	Profil d'expression			Tests réalisés	
	Après infection	Pendant le développement de la plante (sans infection par le nématode)		Détection GUS	RT-PCR quantitative
		Galles	Racine		
<i>AtFH6</i>	Oui	Apex racinaires et sites d'initiation des racines latérales : dans zone de différenciation précoce des vaisseaux	Cylindre vasculaire (uniquement jeune plantule) + Stipule	Oui	Oui
<i>AtFH1</i>	Oui	cylindre vasculaire	Bourgeons floraux	Oui	Oui
<i>AtFH10</i>	Oui	cylindre vasculaire	Non	Oui	Oui

REVENDEICATIONS

1. Polynucléotide isolé constituant un promoteur inductible chez une plante par l'infection par un nématode, caractérisé en ce qu'il comprend les séquences de régulation du promoteur du gène de formine *AtFH6* d'*Arabidopsis thaliana*, représenté par la séquence SEQ ID NO: 1.
2. Polynucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :
- a) un polynucléotide défini par la séquence SEQ ID N° 1, ou la séquence SEQ ID NO: 4 ;
 - b) un polynucléotide comprenant une séquence présentant au moins 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID N° 1.
3. Cassette d'expression recombinante, caractérisée en ce qu'elle comporte :
- un promoteur constitué par un polynucléotide selon une quelconque des revendications 1 ou 2 ;
 - une séquence hétérologue d'intérêt placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur, ou un ou plusieurs site(s) de restriction permettant l'insertion d'une séquence d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.
4. Cassette d'expression selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt exprime un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre l'infection par les nématodes.
5. Vecteur recombinant comprenant au moins une cassette d'expression selon l'une des revendications 3 ou 4.
6. Cellule hôte transformée par une cassette d'expression selon l'une des revendications 3 ou 4.
7. Cellule transformée selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule végétale.
8. Plante transgénique ou partie d'une plante transgénique contenant au moins une copie d'un transgène comprenant une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4.
9. Plante transgénique selon la revendication 7 ou 8 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les plantes des espèces suivantes : *Arabidopsis thaliana*, Colza, tabac, maïs, blé, orge, tournesol.

10. Procédé d'obtention d'une plante transgénique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) Obtention d'une cellule végétale transformée selon la revendication 7,

5 b) régénération, à partir de ladite cellule, d'une plante entière contenant dans son génome au moins une copie d'une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 3 ou 4.

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de croisement de plantes transgéniques obtenues à l'étape b), et une étape de sélection, parmi les plantes issues de ce croisement, de celles qui comprennent au moins une copie d'une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 3 ou 4.

12. Graine obtenue à partir d'une plante transgénique selon la revendication 8.

15 13. Méthode pour protéger une plante d'une infection par un nématode caractérisée en ce qu'elle comprend la transformation de ladite plante avec une cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4.

14. Méthode pour identifier un promoteur spécifique des sites nourriciers de nématodes comprenant les étapes suivantes :

20 a) Identification des homologues des gènes de formine dans les espèces autres qu'*Arabidopsis thaliana* par comparaison de séquences desdites espèces avec celles des gènes de formine.

b) Identification des promoteurs des gènes homologues identifiés à l'étape a).

25 15. Utilisation d'au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 pour exprimer un gène dans les sites nourriciers de nématodes.

30 16. Utilisation d'au moins un polynucléotide selon l'une des revendications 1 ou 2 pour obtenir une plante résistante à l'infection par les nématodes.

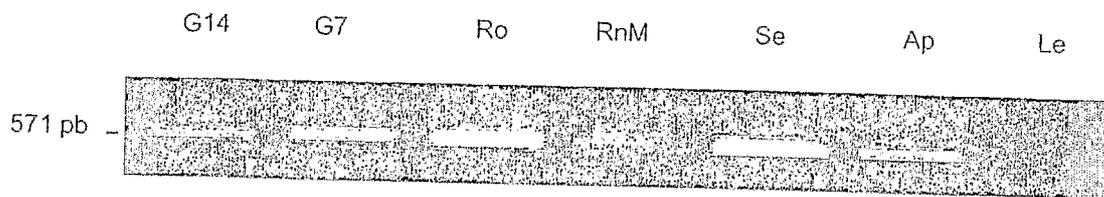


Figure 1.

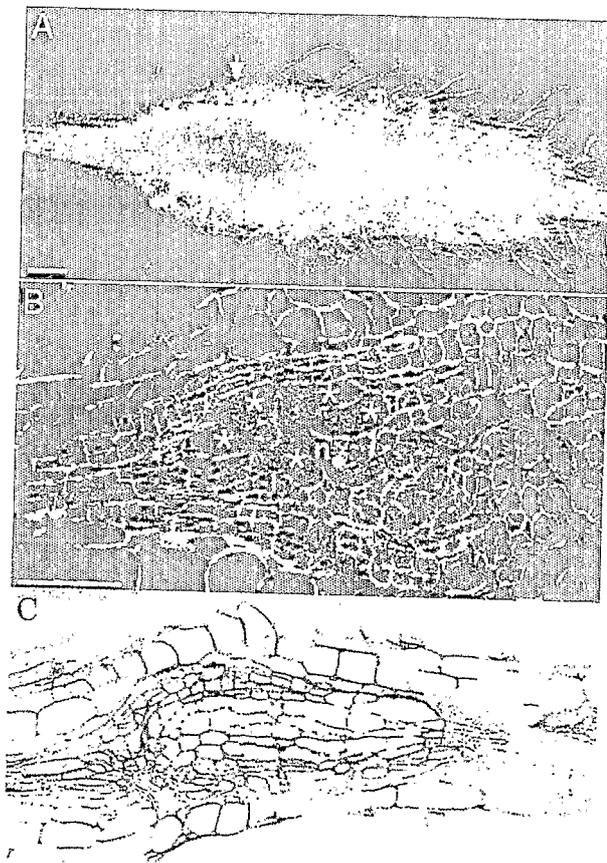


Figure 2.

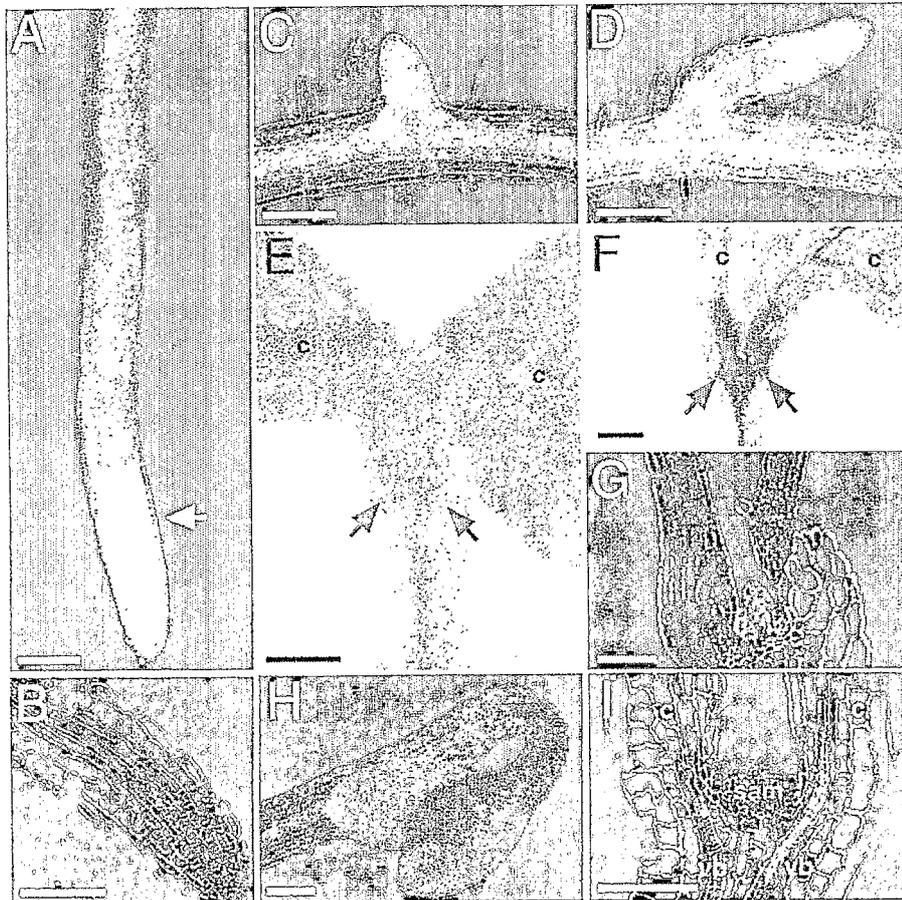


Figure 3.

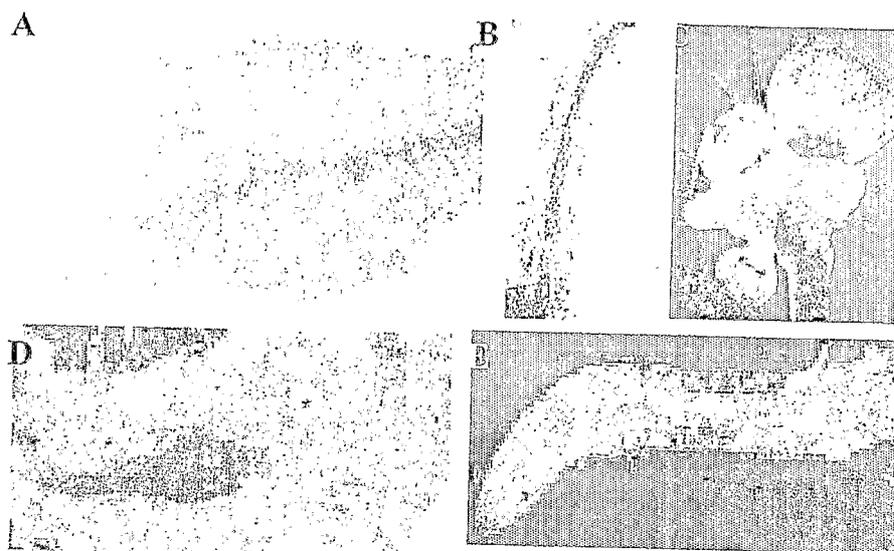


Figure 4.

SEQUENCE LISTING

<110> GENOPLANTE

<120> SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES PROMOTRICES INDUCTIBLES PAR L'INFECTION PAR LES PATHOGENES

<130> MJP/bv-1516/16

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1007

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

gtcttttgaa gtttgaatt gttggcccat attatgttgt aggtaatatg gaatcagccg      60
gtacactgga ccacagagga ttgtctttcc gtctacagtc tacagaatca gccggactag      120
ttttgtaact tttgtttaaa agagctatatt attatattgta atcttagttt ttaagtttta      180
actaaaagaa tgaagaaaat gtagacaaaa tcgaaaagtc gatggtggag gtatgtacgt      240
gtctttttcc tttgtccgtc ttgaaaccaa cgaaacaaaa tcggaaattg tctacgttaa      300
aggacaatca cattcttagt taattaatac tccataccaa gggacattta cgtctttaag      360
caccaaaacc atagtattgg attggcgaat ctcacgtggc gaaaatttcc aaatttccaa      420
agcaacaaga ccatgagagt ccatccataa tcatttttat tataaactta atagtcaatt      480
tccatgaagc tggacttgaa tagttaggct gtctattctt cgtttttatg tcttttacgt      540
gaacaactcg taattcttta tctgtttttc tgaacatatg tttgttgtcg cacacgtata      600
atacaattat acaaatacat ttgttttttag tctaaaacca tctacattgg gatattttat      660
aagagttttt tacaataaaa aaaataaaaa taataaaaat gaaagaaaga aagtgaataa      720
ttaaattata atataatatt aatatttttt ttgtttgaaa aactttgtgg gtttctgtcc      780
taagttattt ttttaatcat tttattaagt actggtaatt actaattaac ggatagttta      840
aaataagcag attaaacgat cccggaatgc tgacgtcagc atcataaatc tcagatctcg      900
atacgaaacg aatttctcac tgcagcagct attactttcc ctttttcacc tttttttccc      960
tttctttttc tttctttttt ccatttctta attttttctt cccattg                    1007

```

<210> 2

<211> 1189

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

tgtcgggtgtt ttccctgatac tcttgtactc ttacattttc agtagctttc ccacgtgacc	60
aattatntta ctccctttct lsgtccaatt atggttttct agcacctctt tttatntttaa	120
cttttatatg aactattaat agttcacttt atagtntttc ttaacattca caggcccaca	180
aatntttaca gaatcagaca ttatnttgctt taaatnttgat aaatntttgca gtcctagtcc	240
tggtaaattc agtattntcty tcatalntcaa taccatcaat ttctagtgcc atntnttatga	300
ttgcaaaatc caacaaaaac aaacaaaacc atgttgtggc ctaatgnttg ttgccccaaa	360
acagaaagag gattcacaca gtcgacattt gcataagacg caggaagtat aactggctta	420
ttaagaagat ttaagggacg cattntagaga tatggnttatt goatgaacca tgatgtagcc	480
atntaaaagt ttatggntaa ctttactatt tgcaacgacg gatattnttat caaacgatgc	540
tactgtataa atntctcacc atagtctcta attcctcctt attatctaca ccagnttagac	600
ctgtcctcca atnttatgct tngcacatac agcattcggc gaaagcacat gaaccgacca	660
tttacacacc ctgagacagt gtcggntcaaa ataaagntaa gaactcagca caatacacc	720
actaccactt cctcctcctc aaacattaac acaccattat tnttatgnttt cttntattaca	780
gacgtcgtca aaccgcccga ataaactnttt aataaaataa aatccactc gcatntnttat	840
tttcaacatt gtgogntacgg tgcaatntcaa tgaacagtgt ttactnttcag tgtgtacact	900
tctgcccact attacaaagt ccacgtctta tctacgtgt tataatctca tatgnttactg	960
tctgaaatgg accccactac gtaaaaataa aattaagaat caaccactct tcttccatca	1020
cctcctnttg ctttctctct actctctcta ctctctctac tactctctca ccatcactga	1080
gntaagagaa caaaccaaaa acaaaattat caaacatca ccagcagaat cttagctgga	1140
ttcatcactc tnttcaaaaa gnttctctct tctcctnttct cagatcttg	1189

<210> 3
 <211> 1160
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3	
cctatatatg ttgcccaccc acgagataaa aacaattatt tagtaattag tgtctccttg	60
gatgnttgtga agaagnttga cttntgcata ttaattctcc cgccagtgtc gcaacaaagt	120
cttcatgctc agagtatcag ttccattcgg aaacctgacc tnttctacta gtctatntgtt	180
atgagattgg tntnttggag tgaaaatgag ctctcgtggaa ctctcatcaa cctcgtgaga	240
acataacttc gtgattgtgt tctntgacaa gaaaagntga gctgtagntt tntnttaaca	300
aggntnttgg atgaccagta gntaatcaat tnttntgntaa atntgnttgg taaatataac	360
atntgntntt tactaaacat ccaaaaatgg aggtacgtga atgaacacat gntgntgntgt	420

aacaattaat ctcaatatgg ccaaaccaag tcttctccat ttctagtcct tgtctctaca	480
acgaagctat tgcgctatth gttttgthtg tgcagtagcg ttcctttcttc ttattgcctt	540
tcttcttagg cgtcatatga ctctcttgca tcttcaaaaa ctatgctgat taatttatgc	600
cacaccacca tttctcattg aaagctaaat cgaaattcaa ataaagtccc aaaaacatgc	660
aaaagthtaa ttgacaaaa agctgaaaag cttgatggcg tttcaacta atgcactagt	720
taattcaatt tccataatta cgtagtagtt tttttggaga ttatatattt attattcaag	780
aaaaatgtgg ataagacaaa taaaagacaa agcatgctgc attgcttggt ctactttttc	840
tttttctttt tcagacattt tagcccaact atatactact cttgattaat ttgaatagga	900
ttacatagta tccataaca cgagacaaaa taacaatatt tggcaaatag aaatgthgth	960
tagthgthtt cctcgtagat aaagatagta gtctcgactt taataattgg tthgcataga	1020
aaagagaaga tagthgthttg tatagtacta ggcaaaagtc aaaaagattc tthtgaaaga	1080
gaggaccaa atttacttga cgtaattatt gcatttcata tacgthcttc tctctctcct	1140
acttgatttt tattcaaaaa	1160

<210> 4
 <211> 1129
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4	
gtcttttgaa gthtggaatt gthggcccat attatgthgt aggtaatatg gaatcagccg	60
gtacactgga ccacagagga thgtctttcc gtctacagtc tacagaatca gccggactag	120
thtttgtaact thtgthtaaa agagctatth attatthgta atcttagthtt thagththta	180
actaaaagaa tgaagaaaat gtagacaaaa tcgaaaagtc gatggtggag gtatgtacgt	240
gtctthttcc thtgthcgtc thgaaaccaa cgaaacaaaa tcggaaattg tctacgttaa	300
aggacaatca cattcttagt taattaatac tccataccaa gggacattta cgtctthtaag	360
cacaaaaacc atagtattgg attggcgaat ctacagtggc gaaaatttcc aaatttccaa	420
agcaacaaga ccatgagagt ccatccataa tcattthttat tataaactta atagtcaatt	480
tccatgaagc tggacttgaa tagthtaggt gtctattctt cgtthttatg tctthtacgt	540
gaacaactcg taattctthta tctgththtc tgaacatatg thtgthgthg cacacgtata	600
atacaattat acaatacat thgtthtttag tctaaaacca tctacattgg gatathttat	660
aagagthttt tacaataaaa aaataaaaa taataaaaat gaaagaaaga aagtgaataa	720
thaaattata atataatatt aataththtt thgtthgaaa aactthgthg thttctgtcc	780
taagthttt ththaatcat thththtagt actgthtaatt actaattaac ggatagthta	840

aaataagcag attaaacgat cccggaatgc tgacgtcagc atcataaate tcagatctcg 900
 atacgaaaag aattttctcac tgcagcagct attactttcc ctttttcacc ttttttttcc 960
 tttctttttc tttctttttt ccatttctta attttttctt cccattgaag attactctac 1020
 gatctgacga acaaggcaac caaaaaaagg gcaaagaaca gagagagagc aaaaagcaga 1080
 agaagatgaa tttagacgag aattgtaaaa tagtttatca cgattcgcc 1129

<210> 5
 <211> 1221
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5
 tgtcgggtggg ttcttgatac tcttgtactc ttacattttc agtagcttcc ccacgtgacc 60
 aattatttta ctccctttct tagtccaatt atggttttct agcacctctt tttatttgaa 120
 cttttatatg aactattaat agttcacttt atagtttttc ttaacattca caggcccaca 180
 aattttacaa gaatcagaca ttatttgctt taaatttgat aaattttgca gtcctagtcc 240
 tggtaaattc agtatttctg tcatattcaa taccatcaat ttctagtgcc atttttatga 300
 ttgcaaaatc caacaaaaac aaacaaaacc atgttgtggg ctaatgtttg ttgccccaaa 360
 acagaaagag gattcacaca gtogacattt gcataagacg caggaagtat aactggctta 420
 ttaagaagat ttaagggacg catttagaga tatggttatt gcatgaacca tgatgtagcc 480
 atttaaaagt ttatggtaa ctttactatt tgcaacgacg gatattttat caaacgatgc 540
 tactgtataa atttctcacc atatgtccta attcctcctt attatctaca ccagttagac 600
 ctgtcctcca attttatgct ttgcacatac agcattcggc gaaagcacat gaaccgacca 660
 tttacacatc ctgagacagt gtcgggtcaaa ataaagtaaa gaactcagca caatacacc 720
 actaccactt cctcctcctc aacattaac acaccattat tttatgtttt ctttattaca 780
 gacgtcgtca aaccgccgta ataacttttt aataaaataa aaatccactc gcatttttat 840
 tttcaacatt gtgogtacgg tgcaattcaa tgaacagtgt ttactttcag tgtgtacact 900
 tctgocggact attacaaagt ccacgtctta tctacgtgt tataatctca tatgttactg 960
 totgaaatgg accccactac gtaaaaataa aattaagaat caaccactct tcttccatca 1020
 cctcttttgg ctttctctct actctctcta ctctctctac tactctctca ccatcactga 1080
 gttaagagaa caaaccaaaa acaaaattat caaacatca ccagcagaat cttagctgga 1140
 ttcacactc tattcaaaaa gtttctctct tctcttttct cagatcttga actcttgaag 1200
 aagaaagaag aagataacac a 1221

<210> 6
 <211> 1238
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6
 cctatatatg ttgcccaccc acgagataaa aacaattatt tagtaattag tgtctccttg 60
 gatgttgtga agaagttgga cttttgcata ttaattctcc cgccagtgtc gcaacaaagt 120
 cttcatgtc agagtatcag ttcacattcg aaacctgatc tttcttacta gtctattggt 180
 atgagattgg ttttttggag tgaaaatgag cttcgtggaa ctctcatcaa cctcgtgaga 240
 acataacttc gtgatttgtt tctttgacaa gaaaagttga gctgtagttt ttttttaaca 300
 aggttttggg atgaccagta gtaaataaat tgttgtaata atttggttgg taaatataac 360
 atttgttttc tactaaacat ccaaaaatgg aggtacgtga atgaacacat ggtgtgttgt 420
 aacaattaat ctcaatatgg ccaaaccaag tcttctccat ttctagtctt tgtctctaca 480
 acgaagctat tgcgctatct gttttgtttg tgcagtagc ttccttcttc ttattgcctt 540
 tcttcttagg cgtcatatga ctctcttgca tctcaaaaa ctatgctgat taatttatgc 600
 cacaccacca tttctcattg aaagctaaat cgaaattcaa ataaagtccc aaaaacatgc 660
 aaaagtttaa ttgaccacaaa agctgaaaag cttgatggcg tttcaaacta atgcactagt 720
 taattcaatt tccataatta cgtagtagtt tttttggaga ttatatattt attatcactg 780
 aaaaatgtgg ataagacaaa taaaagacaa agcatgctgc attgottggt ctactttttc 840
 tttttctttt tcagacattt tagcccaact atatactact cttgattaat ttgaatagga 900
 ttacatagta ttccataaca cgagacacaaa taacaatatt tggcaaatag aaatgttgtc 960
 tagttgtttt cctcgtagat aaagatagta gtctcgactt taataattgg tttgcataga 1020
 aaagagaaga tagtgttttg tatagtacta ggcaaaagtc aaaaagattc ttttgaaaga 1080
 gaggacccaa atttacttga cgtaattatt gcatttcata tacgttcttc ttctctccct 1140
 acttgatttt tattcaaaaa cactagcatt aagtcactct ttcgtcctca gatagtgcgc 1200
 attgcagaac acaaaatctc tacaagaaaa ccccaaaa 1238

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR

<400> 7
 agatcagacc actgtttggg 20

<210> 8
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR

<400> 8
 aaaaagcagg cttcgtcttt tgaagtttgg aattgttggc 40

<210> 9
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR

<400> 9
 agaaagctgg gtgggcgaat cgtgataaac tattttac 38

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR

<400> 10
 aaaaagcagg cttctgtcgg tggtttcctg atact 35

<210> 11
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR

<400> 11
 agaaagctgg gtgtgtgta tcttcttctt tcttcttc 38

<210> 12
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> amorce PCR

<400> 12
 aaaaagcagg cttccctata tatgttgccc aaccaag 37



<210> 13
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 13
agaaagctgg gtgttttggg gttttcttgt agagattttg 40

<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 14
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct 29

<210> 15
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR

<400> 15
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt 29



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

09 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv1516/16
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0315314
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES PROMOTRICES INDUCTIBLES PAR INFECTION PAR LES PATHOGENES.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
GENOPLANTE-VALOR 93, rue Henri Rochefort 91025 EVRY Cedex		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	FAVERY
	Prénoms	Bruno
Adresse	Rue	18 Bd Dugommier
	Code postal et ville	06100 ANTIBES
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ABAD
	Prénoms	Pierre
Adresse	Rue	99 chemin de la Maure
	Code postal et ville	06100 CAGNES-SUR-MER
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
ORES, Béatrice (n° 92-4046)		

