

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 881 143

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

②① N° d'enregistrement national :

05 00855

⑤① Int Cl⁸ : C 12 N 15/82 (2006.01), A 01 H 5/00, 5/10, C 12 P 7/
04, 7/02 // C 12 N 15/29, 9/00

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 27.01.05.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 28.07.06 Bulletin 06/30.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *LIBROPHYT Société par actions sim-
plifiée — FR.*

⑦② Inventeur(s) : TISSIER ALAIN, SALLAUD CHRISTO-
PHE et RONTEIN DENIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

⑤④ **SYSTEME DE PRODUCTION DE TERPENOIDES DANS LES PLANTES.**

⑤⑦ La présente invention se rapporte à une méthode de
production de terpènes d'intérêt dans des plantes présen-
tant des trichomes glanduleux, ainsi qu'aux plantes utiles
pour la production de ces terpènes d'intérêt. Ces plantes
comprennent une séquence codant pour une terpène syn-
thase hétérologue sous contrôle d'un promoteur permettant
son expression spécifique dans les trichomes. En outre, la
voie de production de diterpène endogène est de préféren-
ce bloquée dans les trichomes des plantes, pour augmenter
le flux dans la voie hétérologue. La sécrétion des terpènes
hétérologues est spontanée résultant en une collecte facili-
tée.

FR 2 881 143 - A1



SYSTEME DE PRODUCTION DE TERPENOIDES DANS LES PLANTES

DOMAINE DE L'INVENTION

L'invention se rapporte à une méthode de production de composés d'intérêt dans des
5 plantes et aux plantes génétiquement modifiées préparées pour être utilisées dans cette méthode.

INTRODUCTION

Les trichomes sont des organes localisés à la surface des parties aériennes des plantes
10 supérieures (cf revue Wagner *et al.*, 2004). Ils prennent des formes variées et sont classés en deux grandes catégories. La première regroupe les poils, ou trichomes tecteurs, uni- ou pluri-cellulaires. Ils ne sécrètent pas, ou tout au moins pas en quantités appréciables, de substances vers l'extérieur. La seconde rassemble tous les trichomes, qualifiés de sécréteurs ou glanduleux, qui ont une capacité accrue de synthétiser et de
15 sécréter vers l'extérieur des substances variées. Dans cette catégorie, il existe plusieurs types de trichomes sécréteurs. On distinguera notamment les trichomes peltés, de la famille des Lamiacées par exemple (menthe, basilic, lavande, thym, etc.) et les trichomes glanduleux présents entre autres dans les familles des Solanacées (tomate, tabac, pomme de terre, poivron, aubergine, etc.), des Composées (tournesol, etc.), et des
20 Cannabacées (ex: *Cannabis sativa*).

Les trichomes peltés des Lamiacées sont le siège de production de molécules volatiles, tels les monoterpènes (ex: menthol, terpéneol). Leur structure est caractérisée par une poche huileuse située entre la membrane périplasmique apicale des cellules sécrétrices
25 et une paroi, dans laquelle s'accumulent les essences volatiles (Turner *et al.*, 2000). C'est lors de la rupture de ces poches, par exemple lorsque la feuille est froissée, que les essences sont libérées.

Les trichomes qualifiés de sécréteurs synthétisent préférentiellement des molécules peu
30 ou pas volatiles à température ambiante, comme les sesquiterpènes ou les diterpènes (Wagner *et al.*, 2004). Le tabac cultivé (*Nicotiana tabacum*) par exemple, produit au niveau de ses trichomes glanduleux, une sécrétion dont plus de la moitié est composée de diterpènes appartenant à deux classes, les cembranes et les labdanes (Heemann *et al.*,

1983). Chez certaines espèces de tabac sauvage comme *Nicotiana sylvestris*, seuls les cembranoïdes, et plus particulièrement le cembratriène-diol (CBT-diol), sont présents et les quantités accumulées à la surface des feuilles sont de l'ordre de 15% de la masse sèche de la feuille (Severson *et al.*, 1985).

5

Tous les diterpènes ont pour origine le même substrat de départ, le géranylgéranyldiphosphate (GGPP). Ce qui fait la diversité des diterpènes, ce sont les diterpènes synthases qui utilisent le GGPP pour en faire une oléfine, cyclique ou non. Le GGPP est également le précurseur des tétraterpènes, parmi lesquels on trouve les pigments caroténoïdes. Parmi les diterpènes, on compte des molécules du métabolisme primaire, comme les gibbérellines, hormones nécessaires à la croissance des plantes, et des métabolites secondaires qui représentent la majorité de la diversité métabolique de ces molécules. Ce partage entre métabolites primaires et secondaires se traduit par une forte régulation de la disponibilité métabolique du GGPP. A ce titre, il est pertinent de constater que les espèces végétales qui accumulent des quantités importantes de diterpènes sont dotées d'organes spécialisés dédiés à leur synthèse, les trichomes sécréteurs. Les tabacs et en particulier *Nicotiana sylvestris*, sont un exemple caractéristique où le GGPP est hautement disponible dans les trichomes pour assurer un flux important de synthèse de cembranoïdes, et donc leur accumulation abondante à la surface des parties aériennes.

20

Les étapes conduisant à la biosynthèse du CBT-diol chez le tabac sont partiellement connues et peuvent se décomposer en deux parties distinctes:

- la biosynthèse du précurseur universel de tous les diterpènes, le géranylgéranyldiphosphate (GGPP), produit par la voie dite de « Rohmer » (Rohmer *et al.*, 1996), s'effectue dans le chloroplaste.

25

- La biosynthèse du CBT-diol s'effectue à partir du GGPP. Il a été proposé par Wang et Wagner (2003) le schéma de biosynthèse suivant :

GGPP → CBT-ol → CBT-diol

30

La première étape de cyclisation serait réalisée par une enzyme appartenant à une large famille d'enzymes connues sous le nom de terpène synthases (Bohlmann *et al.*, 1998). La diterpène synthase de tabac utiliserait le GGPP comme substrat pour former du CBT-ol. La seconde étape permettant de produire du CBT-diol à partir du CBT-ol est

une étape d'hydroxylation catalysée par une enzyme appartenant à la famille des cytochromes P450. L'équipe du Professeur G. Wagner (University of Kentucky) a identifié, par PCR soustractive, deux gènes candidats de *N. tabacum* pour chacune de ces étapes :

- 5 - une séquence présentant une forte similarité avec des séquences codant pour des terpènes synthases (CYC-2 ; N° Genbank AF401234 . NID : AY495694).
 - une séquence codant pour une enzyme de type cytochrome P450 (CYP71D16, NID : AF166332) (Wang *et al.*, 2001, Wang & Wagner 2003).
- 10 Des expériences d'extinction de l'expression de ces gènes par co-suppression et RNAi chez *N. tabacum* ont montré (i) une diminution de CBT-diol et de CBT-ol corrélée avec une diminution de l'expression du gène CYC-2, et (ii) une augmentation de l'accumulation de CBT-ol et une diminution de CBT-diol en corrélation avec une
- 15 suggéré que (i) le gène CYC-2 code pour la CBT-ol cyclase responsable de la synthèse de CBT-ol et (ii) le gène CYP71D16 code pour une CBT-ol hydroxylase responsable de la synthèse de CBT-diol à partir du CBT-ol. Par ailleurs, une séquence génomique d'un gène très proche de l'ARNm CYC-2 a été récemment déposée dans les bases de données (CYC-1, NID: AY049090), ce qui suggère l'existence non pas d'un seul mais de
- 20 plusieurs gènes de CBT-ol cyclases.

Certains diterpénoïdes sont l'objet d'une exploitation commerciale, notamment dans le secteur pharmaceutique. C'est le cas notamment des diterpénoïdes de la classe des taxanes, le paclitaxel et le docetaxel, utilisés dans le traitement des cancers du sein et de

25 l'ovaire. Le paclitaxel est une molécule naturelle extraite de l'if (*Taxus sp.*), tandis que le docetaxel est une molécule semi-synthétique, dérivée d'un précurseur du paclitaxel, la 10-déacétyl baccatine III (ou 10-DAB III), également extraite de l'if. La plupart des gènes de biosynthèse du paclitaxel de l'if ont été décrits (Jennewein & Croteau, 2001 ; Jennewein *et al.*, 2004). La production de ces molécules reste coûteuse en raison de la

30 relativement faible abondance de la 10-DAB III et surtout du paclitaxel dans les extraits d'if, et de l'absence de procédé de synthèse industrialisable, en raison de la complexité structurale des molécules.

Il existe donc une forte demande de procédés qui permettraient de produire à moindre coût des terpènes d'intérêt, mais aussi de produire des molécules dérivées de terpènes encore difficilement accessibles à la synthèse.

5 RESUME DE L'INVENTION

La présente invention décrit une nouvelle méthode de production de terpènes d'intérêt dans des plantes présentant des trichomes glanduleux, ainsi que des plantes utiles pour cette production. Cette nouvelle méthode est basée sur l'introduction dans la plante d'une terpène synthase hétérologue permettant de produire le terpène d'intérêt.

10 L'expression de cette terpène synthase hétérologue est contrôlée par un promoteur permettant une expression, de préférence spécifique, dans les trichomes glanduleux de la plante. Pour augmenter le rendement, il est préférable de rompre la voie de synthèse des diterpènes endogènes dans les trichomes de la plante.

15 Un premier objet de la présente invention concerne une méthode de production de terpène d'intérêt dans une plante présentant des trichomes glanduleux comprenant :

a) l'introduction dans une cellule de ladite plante d'une construction portant une cassette d'expression comprenant une séquence polynucléotidique codant pour une terpène synthase hétérologue permettant de synthétiser ledit terpène d'intérêt sous le

20 contrôle d'un promoteur permettant une expression, de préférence spécifique, dans les trichomes;

b) la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule et la sélection des plantes transgéniques exprimant ladite terpène synthase ; et

c) la récolte du terpène d'intérêt contenu dans les trichomes des dites plantes

25 transgéniques.

De préférence, l'expression de la terpène synthase est sous le contrôle d'un promoteur spécifique des trichomes.

30 De préférence, la récolte du terpène d'intérêt contenu dans les trichomes des dites plantes transgéniques est effectuée par la récupération du terpène d'intérêt contenu dans l'exsudat des trichomes.

Dans un mode de réalisation particulier préféré, ladite cassette d'expression comprend au moins une séquence activatrice « enhancer » liée de manière opérationnelle au promoteur. Dans un mode de réalisation particulier, la séquence activatrice comprend la séquence SEQ ID No 9.

5

De préférence, la méthode comprend en outre le blocage de la voie de production de diterpène endogène dans les trichomes. Plus particulièrement, le blocage de la voie de production de diterpène endogène peut être effectué en bloquant l'expression de la ou des diterpènes synthases endogènes. Dans un mode de réalisation particulier, une des diterpènes synthases endogènes est la cembratriène-ol synthase. De préférence, le blocage de la voie de production des diterpènes endogènes dans les trichomes est réalisé en croisant la plante transgénique sélectionnée en b) avec une plante transgénique dont la voie de production de diterpènes endogènes est bloquée dans les trichomes.

15 Dans un mode de réalisation préféré, la terpène synthase hétérologue est une diterpène synthase. De préférence, la diterpène synthase est la taxadiène synthase ou la casbène synthase.

Dans un autre mode de réalisation préféré, la terpène synthase hétérologue est une monoterpène synthase et la construction comprend en outre une séquence polynucléotidique codant pour une géranylpyrophosphate synthase sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les trichomes. Alternativement, la séquence polynucléotidique codant pour une géranylpyrophosphate synthase peut être portée par une deuxième construction distincte de la première.

25

Dans un mode de réalisation préféré supplémentaire, la terpène synthase hétérologue est une sesquiterpène synthase et la construction comprend en outre une séquence polynucléotidique codant pour une farnésylpyrophosphate synthase sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les trichomes. Alternativement, la séquence polynucléotidique codant pour une farnésylpyrophosphate synthase peut être portée par une deuxième construction distincte de la première.

30

Dans un mode de réalisation préféré additionnel, la terpène synthase hétérologue est une triterpène synthase et la construction comprend en outre des séquences polynucléotidiques codant pour une farnésylpyrophosphate synthase, une squalène synthase et une squalène époxydase sous le contrôle d'un promoteur
5 permettant son expression dans les trichomes. Alternativement, les séquences polynucléotidiques codant pour la farnésylpyrophosphate synthase, la squalène synthase et la squalène époxydase peuvent être portées par une ou plusieurs constructions distinctes de la première.

10 Dans un mode de réalisation préféré, la plante présentant des trichomes glanduleux est une plante de la famille des Asteracées, Cannabacées, Solanacées ou Lamiacées. De préférence, la plante est le tabac, et plus particulièrement *Nicotiana glauca*.

Dans un deuxième aspect, la présente invention concerne une plante ou graine d'une
15 plante transgénique présentant des trichomes glanduleux, caractérisée en ce que la voie de production de diterpène endogène est bloquée dans les trichomes. Plus particulièrement, le blocage de la voie de production de diterpène endogène peut être effectué en bloquant l'expression des diterpènes synthases endogènes. Dans un mode de réalisation particulier, la diterpène synthase endogène est la cembratriène-ol synthase.
20 De préférence, la plante présentant des trichomes glanduleux est une plante de la famille des Asteracées, Cannabacées, Solanacées ou Lamiacées. De manière encore plus préférée, la plante est le tabac, et plus particulièrement *Nicotiana glauca*.

Dans un troisième aspect, la présente invention concerne une plante ou graine
25 transgénique présentant des trichomes glanduleux caractérisée en ce qu'elle comprend une cassette d'expression contenant une séquence polynucléotidique codant pour une terpène synthase hétérologue permettant de synthétiser un terpène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression, de préférence spécifique, dans les trichomes. De préférence, l'expression de la terpène synthase est sous le contrôle d'un
30 promoteur spécifique des trichomes. Dans un mode de réalisation préféré, ladite cassette d'expression comprend au moins une séquence activatrice « enhancer » liée de manière opérationnelle au promoteur. De préférence, la voie de production de diterpènes endogènes est bloquée dans les trichomes de ladite plante. Plus particulièrement, le

blocage de la voie de production de diterpène endogène peut être effectué en bloquant l'expression de la diterpène synthase endogène. Dans un mode de réalisation particulier, la diterpène synthase endogène est la cembratriène-ol synthase. De préférence, la plante présentant des trichomes glanduleux est une plante de la famille
5 des Asteracées, Cannabacées, Solanacées ou Lamiacées. De manière encore plus préférée, la plante est le tabac, et plus particulièrement *Nicotiana sylvestris*.

Un quatrième aspect de l'invention concerne l'utilisation d'une plante selon la présente invention pour la production de terpène d'intérêt.

10

Un cinquième aspect de la présente invention concerne une méthode de récolte de terpènes hétérologues dans l'exsudat des trichomes d'une plante, comprenant a) la récolte de parties aériennes de la plante ; b) l'incubation de ces parties aériennes dans un solvant de type peu polaire ou apolaire ; et c) l'élimination du solvant.

15

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Les inventeurs ont démontré que le tabac *Nicotiana sylvestris* par ses caractéristiques métaboliques précédemment évoquées, constitue un hôte idéal pour y greffer la voie de biosynthèse du taxol sur le pool de GGPP endogène. De manière plus générale,
20 n'importe quelle terpène synthase, et plus particulièrement diterpène synthase, dès lors que sa séquence codante est connue, pourrait être intégrée dans le génome de tabac pour une production abondante des diterpénoïdes qui en sont dérivés. Ceci est généralisable aux plantes présentant des trichomes glanduleux.

25 L'invention est essentiellement constituée par trois éléments résumés ci-après.

(1) La manipulation génétique du tabac pour permettre l'expression *de novo* de la terpène synthase hétérologue dans les trichomes sécréteurs. Les exemples décrits ici sont ceux de la taxadiène synthase et de la casbène synthase afin de produire respectivement la taxadiène et la casbène. Ces exemples ne doivent pas être considérés
30 comme limitatifs des possibilités de production de diterpénoïdes par les trichomes de tabac. Par ailleurs, l'importance de l'expression de diterpènes synthases de manière spécifique dans les trichomes de tabac par rapport à une expression constitutive sera soulignée.

(2) L'augmentation de la production de diterpènes par inhibition de la synthèse de diterpènes endogènes du tabac. Afin d'augmenter le niveau de production des diterpènes par les trichomes sécréteurs, la voie endogène de production de diterpènes est bloquée à l'étape de la terpène synthase. Ceci permet de diminuer, voir d'éliminer, la
5 compétition pour le substrat commun à toutes les diterpènes synthases, le GGPP. L'inactivation des gènes codant l'activité de terpène synthase (cembre synthase dans le cas de *Nicotiana sylvestris*) est suffisante pour complètement éliminer la production de diterpènes endogènes.

(3) La sécrétion dans l'exsudat des trichomes des diterpènes d'intérêt et la récolte de
10 l'exsudat produit par les trichomes contenant des diterpénoïdes par un solvant de type peu polaire (chlorure de méthylène, chloroforme, etc.) ou apolaire (ex: pentane, hexane, etc.). En effet, les inventeurs ont constaté la possibilité non-évidente et imprévisible d'une sécrétion de terpènes autre que les terpènes endogènes dans l'exsudat des trichomes.

15

La présente invention consiste donc en un système de production de terpènes d'intérêt sélectionnés parmi les diterpènes, les monoterpènes, les sesquiterpènes et les triterpènes dans une plante possédant des trichomes glanduleux.

20 Dans un premier mode de réalisation, la présente invention consiste en un système de production de diterpènes d'intérêt, et plus particulièrement de taxanes, par les trichomes glanduleux.

Les expériences d'expression de diterpènes synthases dans *Nicotiana sylvestris*
25 démontrent que les trichomes de tabac constituent une plateforme naturelle adaptée pour la production *de novo* de diterpénoïdes, et en particulier de taxadiène ou de casbène. La production de taxadiène ou de casbène dans l'exsudat des trichomes démontre que le système de sécrétion des trichomes n'est pas spécifique d'une classe de diterpènes. En vue d'une culture pour la production de ces diterpènes, l'expression spécifique de
30 diterpène synthase dans les trichomes confère un avantage important sur l'expression constitutive qui est caractérisée par un retard de croissance.

Le choix du tabac et en particulier *Nicotiana sylvestris*, ainsi que les plantes présentant des trichomes glanduleux, est aussi bien adapté pour une production importante de diterpènes. En effet, l'expression de la taxadiène synthase sous un promoteur constitutif (35S) dans l'espèce *Arabidopsis thaliana* conduit à une
5 accumulation de taxadiène limitée aux feuilles et dans des quantités faibles (100 fois inférieure à celle dans *N. sylvestris*) (Besumbes et al., 2004 ; Botella-Pavia et al., 2004). Cette différence est liée à la physiologie des trichomes d'*Arabidopsis thaliana* qui ne sont pas glanduleux.

10 Comme les inventeurs l'ont démontré, la casbène et la taxadiène synthase, qui sont issues de plantes phylogénétiquement éloignées (ricin et if respectivement), sont toutes les deux fonctionnelles dans les trichomes de tabacs. Suite à ces observations, les inventeurs estiment que les trichomes de tabac constitue une usine biologique capable d'exprimer toutes sortes de diterpènes synthases, quelles que soient leurs origines.

15 L'utilisation d'une stratégie d'extinction des gènes endogènes de terpènes synthases conduit à l'augmentation significative de l'accumulation de taxadiène par les trichomes. Cette stratégie est donc particulièrement adaptée à l'augmentation des taux de productions de diterpènes par les trichomes de tabac. De manière générale, l'extinction
20 par quelque moyen que ce soit de la voie des diterpénoïdes endogènes du tabac pour augmenter la biosynthèse de la voie greffée par génie génétique, constitue un avantage évident pour une mise en production à haut rendement de diterpénoïdes d'intérêts.

De manière générale, une cassette d'expression est constituée d'un promoteur
25 permettant d'initier la transcription, d'un acide nucléique transcrit, contenant ou non des introns, et dont la traduction permet la production d'une terpène synthase hétérologue, et d'un terminateur de transcription. Les acides nucléiques transcrits peuvent être des ADN génomiques, des ADN complémentaires (ADNc) ou des ADN synthétiques. Dans le cadre de la présente invention, les acides nucléiques transcrits sont de préférence des
30 ADNc dénués d'introns. Les acides nucléiques transcrits peuvent être des molécules synthétiques ou semi-synthétiques, recombinantes, éventuellement amplifiées ou clonées dans des vecteurs, modifiées chimiquement ou comprenant des bases non-naturelles. Il s'agit typiquement de molécules d'ADN isolées, synthétisées par des

techniques recombinantes bien connues en soi de l'homme du métier. Ils sont utilisés de préférence en pleine longueur, à savoir avec le codon initiateur ATG des gènes d'origine et avec leur séquence codante pour le peptide d'adressage vers les plastes. D'une manière générale, les diterpènes synthases de plantes sont adressées vers les plastes et donc possèdent un peptide d'adressage, alors que les diterpènes synthases d'organismes qui ne possèdent pas de plastes, comme les bactéries ou les champignons, n'ont pas de peptide d'adressage vers les plastes. Pour exprimer correctement ces diterpènes synthases dans les plastes de plantes et en particulier de tabac, il sera nécessaire de réaliser une fusion avec un peptide d'adressage, tel que celui de la petite sous-unité de la Rubisco, bien connu de l'homme du métier.

Le terme cassette d'expression désigne une construction d'acide nucléique comprenant une région codante et une région régulatrice, liées de manière opérationnelle. L'expression "lié de manière opérationnelle" indique que les éléments sont combinés de manière à ce que l'expression de la séquence codante (le gène d'intérêt) et/ou le ciblage de la protéine codée soient sous contrôle du promoteur transcriptionnel et/ou du peptide de transit. Typiquement, la séquence du promoteur est placée en amont du gène d'intérêt, à une distance de celui-ci compatible avec le contrôle de l'expression. De même, la séquence du peptide de transit est généralement fusionnée en amont de la séquence du gène d'intérêt, et en phase avec celui-ci, et en aval de tout promoteur. Des séquences d'espacement peuvent être présentes, entre les éléments régulateurs et le gène, dès lors qu'elles n'empêchent pas l'expression et/ou le ciblage.

La cassette d'expression comprend un promoteur permettant une expression, de préférence spécifique, dans les trichomes de la plante. De tels promoteurs sont connus par l'homme du métier.

Au sens de l'invention, on entend par promoteur "spécifique" un promoteur principalement actif dans un tissu ou un groupe cellulaire donné. Il est entendu qu'une expression résiduelle, généralement plus faible, dans d'autres tissus ou cellules ne peut être entièrement exclue. Une caractéristique particulière de l'invention réside dans la capacité de construire des promoteurs spécifiques des cellules sécrétrices des trichomes glanduleux, permettant une modification de la composition des sécrétions foliaires de la

plante, et notamment d'y exprimer la terpène synthase permettant de préparer le terpène d'intérêt.

Par exemple, l'équipe de G. Wagner a montré qu'une séquence régulatrice de 1852 pb, située en amont de l'ATG du gène CYP71D16, permet de diriger l'expression du gène rapporteur *uidA* spécifiquement dans les cellules sécrétrices de trichomes de tabac (demande US2003/0100050 A1, Wagner et al., 2003). D'autre part, plusieurs séquences promotrices extraites de différentes espèces ont été identifiées comme étant capables de diriger l'expression d'un gène hétérologue dans les trichomes de tabac (Tableau 1).

10

Parmi ces promoteurs, celui du gène *LTP3*, codant pour une protéine du coton impliquée dans le transfert des lipides (LTP), s'exprime spécifiquement dans les cellules de fibres de coton. La séquence régulatrice du gène (1548 pb) a été étudiée chez le tabac. Cette séquence dirige de manière spécifique l'expression du gène *uidA* dans les trichomes de la feuille. La séquence de 315 pb localisée entre les positions -614 et -300 en amont de l'ATG serait responsable de la spécificité du promoteur. Le promoteur du gène *LTP6* permettrait également une expression spécifique des trichomes de coton. Sur la base des publications, il semblerait néanmoins que l'expression se localise dans les cellules de la base du trichome, et non dans les cellules sécrétrices. En outre, lorsque ces promoteurs sont introduits dans le tabac, l'expression n'est plus hautement spécifique, avec notamment un signal dans les cellules épidermiques (cf Tableau 1).

C'est pourquoi, dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, le promoteur utilisé dans la cassette est dérivé des gènes NsTPS-02a, 02b, 03, et 04 de l'espèce *Nicotiana Sylvestris* possédant une forte similarité de séquence avec CYC-2 (CBT-ol cyclase; NID : AF401234). La séquence de ces promoteurs est décrite dans les SEQ ID Nos 5-8. Ainsi, le promoteur contenu dans la cassette d'expression comprend un acide nucléique ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel dans les trichomes glanduleux, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 8 ou d'un variant fonctionnel de celles-ci. Notamment, par un variant fonctionnel de celles-ci est entendu une séquence présentant au moins 80, 85 ou 90% d'identité avec l'une d'entre-elles (obtenus par le programme d'alignement de séquences blastN (Altschul et al., 1990)), et est spécifique des trichomes glanduleux,

notamment des cellules sécrétrices des trichomes glanduleux. Ces séquences promotrices sont plus amplement décrites dans la demande de brevet FR n° 04 10799 déposée le 13 Octobre 2004.

- 5 Parmi les séquences terminateurs, on peut citer le terminateur NOS (Bevan *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res. 11(2), 369-385), et le terminateur de gène d'histone (EPO 633 317).

Dans un mode de réalisation particulier, la cassette d'expression peut comprendre une séquence permettant d'augmenter l'expression (« enhancer »), par exemple certains
10 éléments du promoteur CaMV35S et de gènes de l'octopine synthase (US 5 290 924). De préférence, les éléments activateurs du promoteur CaMV35S sont utilisés. Un exemple d'élément activateur est donné dans la séquence SEQ ID No 9.

15 L'acide nucléique transcrit code pour la terpène synthase capable de synthétiser le terpène d'intérêt.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le terpène d'intérêt est un diterpène. De préférence, le diterpène d'intérêt est un taxane. Plus particulièrement, le taxane peut être la taxadiène La terpène synthase hétérologue qui est introduite dans la
20 plante est une diterpène syntase, plus particulièrement la diterpène synthase capable de synthétiser le diterpène d'intérêt. Par exemple, pour la taxadiène, la diterpène synthase est une taxadiène synthase. Plus particulièrement, la taxadiène synthase est celle d'if. La Figure 8 illustre la stratégie de production de taxadiène dans les trichomes de tabac. De nombreuses séquences codantes et séquences protéiques sont connues pour la taxadiène
25 synthase d'if. A titre d'exemples non limitatifs, certaines références sont indiquées ci-dessous.

Réf. Séquence codante	Réf. Séquence protéique
AY365032	AAR15329.1
AY364470	AAR13861.1
AY364469	AA13860.1
AY461450	AAS18603.1
U48796	AAC49310.1

Par ailleurs, pour la casbène, la diterpène synthase est une casbène synthase. Plus particulièrement, la casbène synthase est celle de ricin. A titre d'exemple non limitatif, on peut citer la référence L32134 pour la séquence codante et la référence P59287 pour la séquence protéique.

5

Plus généralement, la présente invention couvre toute diterpène synthase connue ou dont la séquence répond aux caractéristiques de diterpènes synthases, comme indiqué ci-après.

- 10 Plusieurs diterpènes synthases ont vu leurs gènes clonés et leurs fonctions confirmées. Il s'agit de: la taxadiène synthase (Wildung and Croteau, 1996), l'abietadiène synthase (Peters *et al.*, 2000), la levopimaradiène synthase (Schepmann *et al.*, 2001), l'isopimaradiène synthase (Martin *et al.*, 2004), la casbène synthase (Mau et West, 1994), la cembratriène-ol synthase (Wang and Wagner, 2003), l'*ent*-cassadiène synthase
 15 (Cho *et al.*, 2004), la labdène synthase (Seo *et al.*, 2003), la *syn*-pimaradiène synthase (Wilderman *et al.*, 2004), l'*ent*-copalyl diphosphate synthase et l'*ent*-kaurène synthase (Sun *et al.*, 1994, Prsic *et al.*, 2004). D'autres gènes de diterpène synthases sont en cours de caractérisation chez le riz (la *syn*-stemarène synthase, la *syn*-pimaradiène synthase, la *ent*-sandaracopimaradiène synthase et la *ent*-cassadiène synthase) ou le
 20 tabac (*cis*-abienol synthase).

- Les séquences protéiques des diterpènes synthases présentent des caractéristiques communes. Les protéines non-matures possèdent toutes à l'extrémité N-terminale un peptide d'adressage vers les plastes. Toutes les diterpènes synthases possèdent 2
 25 domaines caractéristiques. Le domaine N-terminal porte le nom de *glycosyl hydrolase-like domain*; le domaine C-terminal contient le site catalytique.

- Les diterpènes synthases sont subdivisées en 3 grandes classes. Les enzymes de la classe I possèdent un motif consensus DDXXD dans le domaine C-terminal. Les
 30 enzymes de la classe II possèdent un motif consensus (D/E)XD(D/N) qui est positionné dans le domaine N-terminal (Prsic *et al.*, 2004). Les enzymes des classes I et II agissent séquentiellement pour générer des squelettes carbonés de type labdanes et sont généralement caractéristiques du métabolisme primaire (ex.: *ent*-copalyl diphosphate

synthase et *ent*-kaurène synthase), mais interviennent aussi dans le métabolisme secondaire comme chez le riz (ex.: *ent*-copalyl diphosphate synthase et *ent*-cassadiène synthase). D'autres enzymes spécifiques du métabolisme secondaires des gymnospermes, possèdent ces deux motifs et sont donc bi-fonctionnelles avec 2 sites catalytiques (ex.: abiétadiène synthase). Elles sont malgré leur bi-fonctionnalité répertoriées dans la classe I. Toutes ces enzymes (classes I et II) sont caractérisées en plus par une séquence interne au domaine N-terminal appelée CDIS pour *Conifer Diterpene Internal Sequence*. Cette séquence est généralement d'environ 215 acides aminés et est positionnée entre le peptide signal et le *glycosyl hydrolase-like domain* (Trapp et Croteau, 2001).

Chez les angiospermes, les enzymes de la classe III possèdent le consensus DDXXD en C-terminal, mais pas le CDIS des classes I et II. Ces enzymes agissent en une seule étape réactionnelle. La casbène synthase est un exemple de diterpène synthase de classe III.

Il existe dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, 21 séquences qui répondent aux critères des diterpènes synthases de classe III (Aubourg *et al.*, 2002). Leurs coordonnées sur le genome, selon la nomenclature internationale des genes d'*Arabidopsis*, sont les suivantes : At5g48110, At3g29410, At3g14490, At1g31950, At4g15870, At2g23230, At1g48800, At1g66020, At3g29110, At1g70080, At1g33750, At3g32030, At3g14520, At3g14540, At5g44630, At4g13280, At4g13300, At4g20210, At3g29190, At4g20230, At4g20200. Les protéines codées par les gènes At3g29410, At3g14540, At1g33750, At3g32030 et At1g48800, possèdent aussi un motif (D/E)EDD de type classe II dans le domaine N-terminal, ce qui les rapprochent des diterpènes synthases bi-fonctionnelles de la classe I. Ces enzymes sont donc susceptibles de produire des diterpènes de type labdanoïdes en une seule étape. Aucune des protéines codées par ces séquences n'a été authentifiée. Toutefois, les inventeurs tentent de caractériser deux protéines codées par les gènes At3g29410, At3g14540.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le terpène d'intérêt est un monoterpène. Par exemple, le monoterpène d'intérêt peut être le limonène. A titre non limitatif, ce pourrait être également le carène, le pinène, le thujène, ou le linalool. La terpène synthase hétérologue qui est introduite dans la plante est une monoterpène

synthase, plus particulièrement la monoterpène synthase capable de synthétiser le monoterpène d'intérêt. Cependant, la production de monoterpène nécessite en outre l'introduction d'une géranylpyrophosphate synthase exprimée dans les trichomes. A titre d'exemples non limitatifs, certaines références de géranylpyrophosphate synthase sont indiquées ci-dessous.

Organismes	Réf. Séquence codante	Réf. Séquence protéique
Vitis vinifera	AY351862	AAR08151
Mentha piperata	AF182828	AAF08793
Abies grandis	AF513112	AAN01134
Arabidopsis t.	Y17376	CAC16849

La Figure 9 illustre la stratégie de production de monoterpène dans les trichomes de tabac. Par exemple, pour le limonène, la monoterpène synthase est une limonène synthase. De nombreuses séquences codantes et séquences protéiques sont connues pour la limonène synthase. A titre d'exemples non limitatifs, certaines références sont indiquées ci-dessous.

Réf. Séquence codante	Réf. Séquence protéique
AY473624	AAS47694.1
AF514289	AAM53946.1
AF514287	AAM53944.1
AF317695	AAK06663.1
AF241793	AAG31438.1
AF241792	AAG31437.1
AF241791	AAG61436.1
AF241790	AAG31435.1
AF233894	AAF65545.1
AF175323	AAD50304.1

La carène synthase, la pinène synthase, la thujène synthase, et la linalool synthase sont d'autres exemple de monoterpènes synthases.

Dans un mode de réalisation particulier supplémentaire de l'invention, le terpène d'intérêt est un sesquiterpène. Par exemple, le sesquiterpène d'intérêt peut être le valencène, le santalène, le germacrène ou l'*épi*-aristolochène.

La terpène synthase hétérologue qui est introduite dans la plante est une sesquiterpène synthase, plus particulièrement la sesquiterpène synthase capable de synthétiser le sesquiterpène d'intérêt. Cependant, la production de sesquiterpène nécessite en outre l'introduction d'une farnésylpyrophosphate synthase exprimée dans les trichomes.

Organismes	Réf. Séquence codante	Réf. Séquence protéique
Arabidopsis	<u>L46367</u>	<u>AAF44787</u>
Artemisia	<u>AY308477</u>	<u>AAP74720</u>
Mentha	<u>AF384040</u>	<u>AAK63847</u>

La Figure 10 illustre la stratégie de production de sesquiterpène dans les trichomes de tabac. Par exemple, pour le valencène, la sesquiterpène synthase est une valencène synthase. Plus particulièrement, la valencène synthase est celle d'orange douce. A titre d'exemple non limitatif, on peut citer la référence AF441124 pour la séquence codante et la référence AAG04608.1 pour la séquence protéique.

La santalène synthase, la germacrène synthase et l'*épi*-aristolochène synthase sont d'autres exemples de sesquiterpènes synthases.

Dans un mode de réalisation particulier additionnel de l'invention, le terpène d'intérêt est un triterpène. Par exemple, le triterpène d'intérêt peut être le lanosterol, le cycloartenol, le lupeol ou la beta-amyrin.

La terpène synthase hétérologue qui est introduite dans la plante est une triterpène synthase, plus particulièrement la triterpène synthase capable de synthétiser le triterpène d'intérêt. Cependant, la production de triterpène nécessite en outre l'introduction d'une farnésylpyrophosphate synthase, d'une squalène synthase, et d'une squalène époxydase exprimées dans les trichomes.

Enzyme	Réf. Séquence codante	Réf. Séquence protéique
Squalene synthase	<u>D29017</u>	<u>BAA06103</u>
Squalene epoxidase	<u>NM_104624</u>	<u>NP_564734</u>

La Figure 11 illustre la stratégie de production de triterpène dans les trichomes de tabac. Par exemple, pour le lanosterol, la triterpène synthase est une lanosterol synthase. De nombreuses séquences codantes et séquences protéiques sont connues pour la lanosterol synthase.

- 5 La lanosterol synthase, la cycloartenol synthase, la lupeol synthase et la beta-amyrin synthase sont d'autres exemples de triterpènes synthases.

La cassette d'expression ainsi constituée est insérée dans un vecteur. Le vecteur peut être un ADN ou un ARN, circulaire ou non, simple- ou double-brin. Il s'agit typiquement d'un plasmide, phage, virus, cosmide, chromosome artificiel, etc. Il s'agit
10 avantageusement d'un vecteur de plante, c'est-à-dire capable de transformer une cellule végétale. Des exemples de vecteurs de plantes sont décrits dans la littérature, parmi lesquels on peut citer notamment les plasmides T-DNA de *A. tumefaciens* pBIN19 (Bevan, 1984), pPZP100 (Hajdukewicz et al., 1994), série pCAMBIA (R. Jefferson,
15 CAMBIA, Australie). Les vecteurs de l'invention peuvent comprendre, en outre, une origine de répllication et/ou un gène de sélection et/ou une séquence de recombinaison végétale, etc. Les vecteurs peuvent être construits par des techniques classiques de biologie moléculaire, bien connues de l'homme du métier, utilisant par exemple des enzymes de restriction, de ligature, des clonages, répllication, etc.

20

Les gènes de sélection comprennent, de manière non exclusive, l'utilisation de gènes marqueurs tels que des gènes conférant des résistances à un antibiotique ou à des herbicides, ou de systèmes de sélection positive, en particulier le système basé sur une sélection sur mannose, en présence du gène de sélection de la MPI (Mannose-6-
25 phosphate isomérase) (Hansen et Wright, 1999), ou de systèmes de sélection couplés à l'élimination des gènes marqueurs après sélection (Ebinuma et al., 1997). Enfin, les plantes transformées peuvent également être sélectionnées par criblage PCR en l'absence de gènes marqueurs de sélection (McGarvey et Kaper, 1991).

30 L'introduction des constructions de l'invention dans une cellule ou un tissu végétal, y compris une graine ou plante, peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier. Les techniques de transgénèse végétale sont bien connues dans le domaine, et comprennent par exemple l'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*,

l'électroporation, le transfert conjugatif, des techniques biolistiques, transfection par un vecteur viral notamment, et toute autre technique connue de l'homme du métier .

Une technique communément utilisée repose sur l'utilisation de la bactérie
5 *Agrobacterium tumefaciens*, qui consiste essentiellement à introduire la construction d'intérêt (acide nucléique, cassette, vecteur, etc.) dans la bactérie *A. tumefaciens*, puis à mettre en contact cette bactérie transformée avec des disques de feuilles de la plante choisie. L'introduction de la cassette d'expression dans la bactérie est typiquement réalisée en utilisant comme vecteur le plasmide Ti (ou T-DNA), qui peut être transféré
10 dans la bactérie par exemple par choc thermique. L'incubation de la bactérie transformée avec les disques foliaires permet d'obtenir le transfert du plasmide Ti dans le génome des cellules des disques. Ceux-ci peuvent éventuellement être cultivés dans des conditions appropriées pour reconstituer une plante transgénique dont les cellules comprennent la construction de l'invention. Pour plus de détails ou des variantes de
15 mise en œuvre de la technique de transformation par *A. tumefaciens*, on peut se référer par exemple à Horsch et al., 1985 ou Hooykaas and Schilperoort, 1992.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, la cassette d'expression ainsi constituée est insérée entre les bordures gauche et droite de l'ADN de transfert (T-DNA) d'un
20 plasmide Ti désarmé pour le transfert dans des cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens*. Le T-DNA comprend également un gène dont l'expression confère une résistance à un antibiotique et qui permet la sélection des transformants.

Une autre technique de transformation végétale est basée sur la projection de
25 microparticules (typiquement des microbilles) auxquelles sont attachées les constructions génétiques, directement sur des cellules végétales, suivie de la culture de ces cellules pour reconstituer une plante transgénique. Les particules utilisées sont typiquement des particules d'or, qui sont projetées typiquement au moyen d'un canon à particules (voir notamment Russell *et al.*, In Vitro Cell. Dev. Biol., 1992, 28P, p. 97-
30 105).

La technique de microinjection repose essentiellement sur l'injection des constructions génétiques dans des embryons ou protoplastes végétaux, puis à cultiver ces tissus de

manière à régénérer des plantes complètes. D'autres techniques de transgénèse végétale sont bien connues, ou d'autres protocoles mettant en œuvre les techniques ci-dessus sont décrits dans l'art antérieur (Siemens, J and Schieder, 1996) et peuvent être appliqués à la présente invention.

5

La présente invention peut notamment être utilisée pour la production de terpènes d'intérêt spécifiquement dans les cellules sécrétrices de trichomes glanduleux des plantes supérieures (notamment les Angiospermes). L'invention est applicable notamment à toutes les plantes de familles possédant des trichomes glanduleux, par
 10 exemple les Astéracées (tournesol, etc...), Solanacées (tomate, tabac, pomme de terre, poivron, aubergine, etc...), Cannabacées (ex *Cannabis sativa*) et Lamiacées (menthe, basilic, lavande, thym, etc.). Elle est particulièrement adaptée aux plantes de la famille des Solanacées, telles que par exemple des genres *Solanum*, *Lycopersicon*, *Capsicum*, *Petunia*, *Datura*, *Atropa*, etc., et aux Nicotianées, par exemple le tabac, et plus
 15 particulièrement le tabac sauvage *Nicotiana sylvestris*. De manière non limitative, l'invention peut s'appliquer aux plantes des genres suivants : *Populus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Cannabis*, *Pharbitis*, *Apteria*, *Psychotria*, *Mercurialis*, *Chrysanthemum*, *Polypodium*, *Pelargonium*, *Mimulus*, *Matricaria*, *Monarda*, *Solanum*, *Achillea*, *Valeriana*, *Ocimum*, *Medicago*, *Aesculus*, *Plumbago*, *Pityrogramma*, *Phacelia*,
 20 *Avicennia*, *Tamarix*, *Frankenia*, *Limonium*, *Foeniculum*, *Thymus*, *Salvia*, *Kadsura*, *Beyeria*, *Humulus*, *Mentha*, *Artemisia*, *Nepta*, *Geraea*, *Pogostemon*, *Majorana*, *Cleome*, *Cnicus*, *Parthenium*, *Ricinocarpos*, *Hymenaea*, *Larrea*, *Primula*, *Phacelia*, *Dryopteris*, *Plectranthus*, *Cypripedium*, *Petunia*, *Datura*, *Mucuna*, *Ricinus*, *Hypericum*, *Myoporum*, *Acacia*, *Diplopeltis*, *Dodonaea*, *Halgania*, *Cyanostegia*, *Prostanthera*, *Anthocercis*,
 25 *Olearia*, *Viscaria*.

Une fois régénérées, les plantes transgéniques peuvent être testées pour l'expression de la terpène synthase hétérologue ou la production du terpène d'intérêt dans les trichomes. Ceci peut être réalisé en récoltant l'exsudat des feuilles et en testant la présence du
 30 terpène d'intérêt dans cet exsudat, lorsque le terpène d'intérêt est destiné à être sécrété. Ceci peut également être fait en analysant la présence de la terpène synthase hétérologue dans les feuilles et, plus particulièrement, dans les cellules de trichome (par exemple en analysant les ARNm ou l'ADN génomique au moyen de sondes ou

d'amorces spécifiques). Les plantes peuvent éventuellement être sélectionnées, croisées, traitées, etc. pour obtenir des plantes présentant des niveaux d'expression améliorés.

- 5 A cet égard, un autre objet de l'invention réside dans une cellule modifiée comprenant une cassette ou un vecteur tels que définis précédemment. Il peut s'agir par exemple d'une cellule de plante, notamment de la famille des Solanacées, Astéracées, Cannabacées ou Lamiacées. Les cellules peuvent être cultivées *in vitro*, et utilisées pour reconstituer des tissus ou plantes entières, pour produire des terpènes d'intérêt en
10 culture, ou encore pour étudier les propriétés de terpènes synthases hétérologues (par exemple en génomique fonctionnelle).

Un autre objet de l'invention réside également dans une plante ou graine comprenant une cassette d'expression ou un vecteur tels que définis précédemment. Plus
15 particulièrement, la présente invention concerne une plante ou graine transgénique présentant des trichomes glanduleux et comprenant une cassette d'expression contenant une séquence polynucléotidique codant pour une terpène synthase hétérologue permettant de synthétiser un terpène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression, de préférence spécifique, dans les trichomes. Lorsque la
20 terpène synthase est une monoterpène synthase, la plante ou graine transgénique comprend en outre une cassette d'expression contenant une séquence polynucléotidique codant pour une géranylpyrophosphate synthase sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les trichomes. Lorsque la terpène synthase est une sesquiterpène synthase, la plante ou graine transgénique comprend en outre une cassette
25 d'expression contenant une séquence polynucléotidique codant pour une farnésylpyrophosphate synthase sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les trichomes. Lorsque la terpène synthase est une triterpène synthase, la plante ou graine transgénique comprend en outre des cassettes d'expression contenant des séquences polynucléotidiques codant pour une farnésylpyrophosphate synthase, une
30 squalène synthase et une squalène époxydase sous le contrôle de promoteurs permettant son expression dans les trichomes.

Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, la plante présente en outre une voie de production des terpènes endogènes bloquée dans les trichomes. Dans un mode de réalisation préféré, le blocage de la voie de production des terpènes endogènes est spécifique des trichomes, c'est-à-dire qu'elle est peu ou pas affectée dans
5 les autres parties de la plante. Le blocage de la voie de production des terpènes endogènes est de préférence effectué en bloquant l'expression des terpènes synthases endogènes. Cependant, l'invention envisage également un blocage de la voie de production de terpènes endogènes à d'autre niveau.

10 L'expression des terpènes synthases endogènes peut être bloquée par de nombreuses techniques disponibles et connues par l'homme du métier. Les gènes des terpènes synthases peuvent être délétés, mutés ou interrompus. Par ailleurs, le blocage de l'expression des terpènes synthases endogènes peut également être réalisé par extinction de gènes en exprimant un transcrit inhibiteur. Le transcrit inhibiteur est un ARN qui
15 peut se présenter sous la forme d'un ARN double brin, d'un ARN antisens, d'un ribozyme, d'un ARN capable de former une triple hélice, et qui a une certaine complémentarité ou spécificité avec le transcrit de la diterpène endogène.

Selon un mode particulier de réalisation de la présente invention, le transcrit inhibiteur
20 se présente sous la forme d'un ARN antisens. Ce dernier comprend généralement une séquence nucléotidique complémentaire d'au moins une partie du transcrit des terpènes synthases endogènes, et s'hybride de manière sélective à ces transcrits par des interactions de type Watson-Crick classique. Le ou les transcrits inhibiteurs de type ARN antisens peuvent donc se fixer aux transcrits des terpènes synthases et par exemple
25 bloquer l'accès à la machinerie cellulaire de traduction à l'extrémité 5' du transcrit d'intérêt lorsque ce dernier est un ARNm, gêner sa traduction en protéine, et permettre la suppression de l'expression du transgène d'intérêt in vivo (Kumar *et al.*, Microbiol. Mol. Biol. Rev, 62 (1993) 1415-1434). De tels polynucléotides ont été par exemple décrits dans les brevets EP 92574 et EP 140308. Lorsque le transcrit inhibiteur est de
30 type ARN antisens, il peut couvrir toute ou partie de la séquence codante du transcrit de la diterpène synthase, ou toute ou partie de la séquence non codante en 3' ou en 5'. De préférence, le transcrit inhibiteur antisens est complémentaire de la séquence de fixation du ribosome et d'initiation de la traduction (Coleman J et al., Nature 315 (1990) 601-

603). De préférence, le transcrit inhibiteur a une longueur d'au moins 10 ribonucléotides.

Dans un mode de réalisation préféré, le transcrit inhibiteur met en jeu le mécanisme des
5 ARN interférents (cf. revue de Baulcombe, 2004). De préférence, cette extinction est effectuée par la technique des *intron-spliced hairpin RNA* ou ihpRNA (Smith *et al.*, 2000). Elle consiste à produire un ARN double brin du ou des gènes ciblés via une construction comprenant un fragment sens et ce même fragment en orientation antisens, les deux étant séparés par un intron (Wesley *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, demande de
10 brevet, 1999). Cette construction est de préférence sous contrôle d'un promoteur permettant une expression spécifique dans les trichomes.

Cependant, la présente invention considère également tout moyen connu de l'homme du métier pour bloquer la voie de production des terpènes endogènes dans les trichomes.
15 En effet, il est important de préciser que le procédé d'extinction des gènes TPS peut faire l'objet d'autres approches. Par exemple, elle peut consister en la réalisation d'une collection de mutants de délétions par irradiation, par exemple par rayons gamma ou fast-neutrons. Les délétions affectant un locus donné peuvent être repérées par diverses méthodes sur l'ADN extrait des mutants (Tissier & Montané, 1999). Un avantage de la
20 mutagenèse par rayonnement est la possibilité d'isoler des délétions couvrant la totalité d'un cluster de gènes. Ceci est particulièrement pertinent dans le cas des cembranes synthèses de *Nicotiana*, puisque les gènes codant pour ces enzymes constituent une famille de gènes très similaires et clustérisés sur un locus (Tissier *et al.*, 2004 ; Sallaud *et coll.*, données non publiées).

25 L'invention concerne également une plante intermédiaire importante pour la préparation de la plante finale capable de produire le terpène d'intérêt et dont la voie de synthèse des diterpènes endogènes est bloquée dans les trichomes. En effet, cette plante peut être obtenue par croisement d'une plante capable de produire le terpène d'intérêt avec une
30 plante dont la voie de synthèse des diterpènes endogènes est bloquée dans les trichomes. L'invention concerne donc tout particulièrement une plante dont la voie de synthèse des diterpènes endogènes est bloquée dans les trichomes.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention de plantes transformées caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : a) obtention d'une cellule hôte recombinante végétale comprenant une cassette d'expression selon l'invention ; b) régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte recombinante obtenue à l'étape a) ; c) sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré une cassette d'expression telle que définie dans la présente description.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'une plante transformée caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : a) obtention d'une cellule hôte recombinante d'*Agrobacterium tumefaciens* selon l'invention ; b) transformation d'une plante d'intérêt par infection avec les cellules hôtes recombinantes d'*Agrobacterium tumefaciens* obtenues à l'étape a) ; c) sélection des plantes ayant intégré dans leur génome une cassette d'expression telle que définie dans la présente description.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'une plante transformée caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : a) transfecter au moins une cellule de plante avec une cassette d'expression ou avec un vecteur recombinant selon l'invention ; b) régénérer une plante entière à partir de la cellule de plante recombinante obtenue à l'étape a) ; c) sélectionner les plantes ayant intégré dans leur génome une cassette d'expression selon l'invention.

L'un quelconque des procédés d'obtention d'une plante transformée décrit ci-dessus peut en outre comporter les étapes additionnelles suivantes : d) croisement entre elles de deux plantes transformées telles qu'obtenues à l'étape c) avec une plante de la même espèce ; e) sélection des plantes homozygotes pour le transgène.

Dans un second mode de réalisation particulier, l'un quelconque des procédés d'obtention d'une plante transgénique décrit ci-dessus peut en outre comporter les étapes additionnelles suivantes : f) croisement d'une plante transformée obtenue à l'étape c) avec une plante de la même espèce ; g) sélection des plantes issues du croisement de l'étape f) ayant conservé le transgène.

Les plantes transgéniques hybrides, obtenues par le croisement d'au moins une plante selon l'invention avec une autre, font également partie de l'invention.

- Enfin, la présente invention concerne une méthode de récolte de terpènes hétérologues ou d'intérêt dans l'exsudat des trichomes d'une plante, comprenant a) la récolte de parties aériennes de la plante ; b) l'incubation de ces parties aériennes dans un solvant de type peu polaire ou apolaire ; et c) l'élimination du solvant. De préférence, ladite plante est une plante transgénique selon la présente invention et notamment le tabac. Par parties aériennes sont entendues de préférence les feuilles et les tiges. Le solvant peu polaire peut être le chlorure de méthylène ou le chloroforme. Dans un mode de réalisation particulier, le solvant est apolaire, de préférence très apolaire. Par exemple, le solvant peut être le pentane ou l'hexane ou tout solvant présentant la même polarité, de préférence le pentane. L'étape d'incubation peut durer de quelques secondes sous agitation à plusieurs heures dans un bain non agité. De préférence, le solvant choisi est volatile à température ambiante et présente une totale innocuité chimique à l'égard des terpènes d'intérêt. De préférence, l'élimination du solvant est effectuée par évaporation de celui-ci. Cependant, toute technique permettant d'éliminer le solvant est considérée dans la présente invention.
- D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Cassette d'expression non spécifique de la taxadiène synthase dans les cellules de tabac.

Figure 2 : Cassette d'expression dans les trichomes de tabac de la taxadiène synthase.

Figure 3 : RNAi construction pour l'extinction des gènes *NsTPS*.

Figure 4 : Cassette d'expression dans les trichomes de tabac de la casbène synthase.

Figure 5 : Sécrétion de la taxadiène dans les lignées exprimant la taxadiène synthase sous le contrôle de promoteurs 35S ou *NsTPS-02a*. Les constructions avec le promoteur 35S ou *NsTPS-02a* contrôlant l'expression de la taxadiène synthase, ont été introduites dans le génome de *Nicotiana sylvestris*. La taxadiène sécrétée dans l'exsudat de plantes contenant une seule copie du transgène a été extraite avec du pentane et quantifiée par

analyses GC-MS. La quantité de taxadiène est exprimée en µg/g de matière fraîche. Le nombre de plantes analysées est N=12 et 5 pour les constructions avec le promoteur 35S et *NsTPS-02a* respectivement. (TS: Taxadiène Synthase, WT: Wild Type)

Figure 6 : Quantité de CBT-diol sécrétée dans les plantes exprimant le RNAi *ihpTPS*.

- 5 Le CBT-diol a été extrait de l'exsudat de *Nicotiana sylvestris* en utilisant le pentane, et quantifié par GC-MS. La quantité de CBT-diol est associée à 100% pour le WT. Les plantes (T1) issue de la descendance des transformants, sont représentées par *ihpTPS*.

- Figure 7 :** Effet d'éléments activateurs du promoteur 35S sur l'expression dans les trichomes. Les ARN totaux de feuilles de tabac (*N. Sylvestris*) sont extraits et convertis en ADN complémentaires par transcription reverse. Le rapport d'expression est mesuré par PCR quantitative réalisée en duplex (fluorophore VIC pour le CYP71D16 et FAM pour le transgène). Le nombre de plante analysées est N=5. (e35S: éléments activateurs du promoteur 35S, p: promoteur).
- 10

- Figure 8 :** Schéma récapitulant les étapes conduisant à la production de taxadiène dans les trichomes de tabac (*Nicotiana sylvestris*). GGPP : géranylgeranyl pyrophosphate ; CBT-ol : cembratriène-ol ; CBT-diol : cembratriène-diol ; CBTS : cembratriène-ol synthase ; CBTol-OH : cembratriène-ol hydroxylase. Prom : désigne un promoteur qui permet l'expression dans les trichomes, de préférence de manière spécifique. TS : taxadiène synthase ; term : élément permettant la terminaison de la transcription. CBTS RNAi : désigne une plante de tabac dans laquelle les gènes permettant la synthèse de CBTS sont éteints par une construction de type *ihpRNA* (cf exemple).
- 15
- 20

- Figure 9 :** schéma récapitulant les étapes conduisant à la production de monoterpène dans les trichomes de tabac (*Nicotiana sylvestris*). Légende : GGS : géranylgeranylpyrophosphate synthase ; GS : géranylpyrophosphate synthase et idem Figure 7.
- 25

Figure 10 : schéma récapitulant les étapes conduisant à la production de sesquiterpène dans les trichomes de tabac (*Nicotiana sylvestris*). Légende : FS : farnésylpyrophosphate synthase et idem Figures 7 et 8.

- Figure 11 :** schéma récapitulant les étapes conduisant à la production de triterpènes dans les trichomes de tabac (*Nicotiana sylvestris*).
- 30

EXEMPLES

Production de taxadiène dans le plant de tabac *Nicotiana sylvestris* par expression de la taxadiène synthase sous le contrôle d'un promoteur non spécifique.

- 5 Les constructions décrites ci-dessous ont permis une expression dans l'ensemble des cellules de la plante, y compris dans les trichomes. Cette expression est qualifiée de non spécifique des trichomes.

Vecteur d'expression

- 10 La construction de la cassette d'expression a été comme suit (Figure 1 : schéma) :
Un promoteur constitutif de type 35S (extrait du virus de la mosaïque du Chou-fleur) bien connu de l'homme du métier.
L'ADNc de la taxadiène synthase.
Le terminateur OCS (extrait du gène codant pour l'octopine synthase d'un plasmide Ti
15 d'*Agrobacterium tumefaciens*) bien connu de l'homme du métier.
La séquence de cette construction est décrite dans la séquence SEQ ID No 1.

Analyse des plantes transformées

- Le processus de régénération a conduit à isoler des plantes transgéniques exprimant la
20 taxadiène synthase. Les plantes contenant une seule copie du transgène ont été sélectionnées et soumises à l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS). L'exsudat de ces plantes contenait une quantité de 14 ± 3 µg/g de MF (matière fraîche) (Figure 5). La croissance de ces plantes était retardée par rapport au contrôle sauvage (non transformé) rendant celle-ci peu
25 adaptée à la culture. Ces effets ont déjà été observés lors de la surexpression de diterpènes synthases chez la tomate ou *Arabidopsis thaliana* et ont été attribués à la diminution du pool de GGPP disponible dans les plantes transgéniques (Fray *et al.*, 1995 ; Besumbes *et al.*, 2004). Le GGPP est un métabolite important qui sert à la synthèse d'hormones telles que les gibbérellines et l'acide abscissique.

Production de taxadiène spécifiquement dans les trichomes de tabac *Nicotiana sylvestris*.

Dans cet exemple, la taxadiène synthase a été placée sous contrôle du promoteur *NsTPS-02a* spécifique des trichomes (Tissier et coll., 2004 ; Brevet n° FR 0410799) afin

5 de restreindre la production de taxadiène aux trichomes.

Vecteur d'expression

La cassette d'expression a été comme suit (Figure 2 : schéma):

Le promoteur *NsTPS-02a* d'une taille de 1 kilobase.

10 L'ADNc de la taxadiène synthase.

Le terminateur du gène *NsTPS-02a*.

La séquence de cette construction est décrite dans la séquence SEQ ID No 2.

Analyse des plantes transformées

15 Le processus de régénération a conduit à régénérer des plants de tabac transgénique exprimant la taxadiène synthase spécifiquement dans les cellules sécrétrices de trichomes. Les plantes contenant une seule copie du transgène ont été sélectionnées. L'analyse GC-MS de l'exsudat a révélé une teneur en taxadiène similaire à celle mesurée avec l'expression non-spécifique de la taxadiène synthase sous le promoteur

20 35S (10 ± 1 µg/g de MF, Fig. 5). La croissance de ces plantes était identique à celle des plantes sauvages (non transformées). De plus, les fleurs ont été normalement fertiles. Ceci démontre que la synthèse spécifique de la taxadiène dans les trichomes ne provoque aucun effet délétère pour la plante, et donc la supériorité de l'expression spécifique des trichomes par rapport à l'expression non-spécifique.

25

Augmentation de la production de taxadiène par les trichomes de *Nicotiana sylvestris* en inhibant l'expression des gènes *NsTPS*

L'inactivation des gènes *NsTPS* a été réalisée par extinction des gènes, qui mettait en jeu le mécanisme des ARN interférents (cf. revue de Baulcombe, 2004). Cette

30 extinction a été effectuée par la technique des *intron-spliced hairpin RNA* ou ihpRNA (Smith *et al.*, 2000). Elle consiste à produire un ARN double brin du ou des gènes ciblés via une construction comprenant un fragment sens et ce même fragment en orientation antisens, les deux étant séparés par un intron (Wesley *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*,

demande de brevet 1999). Plus précisément la cassette a été organisée comme suit (Figure 3):

Un fragment du promoteur *NsTP-02a* de 1,7 kb (brevet n° FR 0410799).

- Un fragment comprenant l'exon 2 et l'intron 2 du gène *NsTPS-02a* suivis de l'exon 2 de ce même gène en orientation anti-sens.
- Le terminateur NOS.

- La transformation de cette cassette par *Agrobacterium tumefaciens* a permis d'obtenir des plantes transgéniques exprimant la construction ihpRNA pour les gènes *TPS*. Les plantes contenant une seule copie du transgène ont été sélectionnées. La descendance de ces plantes a été analysée pour déterminer la quantité de CBT-diol. La Figure 6 indique que la sécrétion de CBT-diol est totalement interrompue dans les plantes ihp*TPS* (0% du WT).

- Ces plantes ont ensuite été croisées aux plantes exprimant la taxadiène synthase spécifiquement dans les trichomes (cf ci-dessus). Dans la descendance du croisement, les plantes portant les deux constructions ont été sélectionnées sur milieux sélectifs et analysées pour leur contenu en taxadiène par GC-MS.

- La production de taxadiène dans ces plantes est environ 30 fois supérieure à celle des plantes exprimant seulement la cassette d'expression de la taxadiène sous le contrôle du promoteur trichome spécifique. L'ensemble des opérations ayant conduit à cette production est résumé de manière schématique dans la Figure 7.

- Production de casbène spécifiquement dans les trichomes de tabac *Nicotiana sylvestris*.**

Vecteur d'expression

- L'expression spécifique de la casbène synthase dans les trichomes a nécessité l'utilisation du promoteur spécifique *NsTPS-02a* dans une cassette d'expression comme suit (Figure 4 : schéma et séquence) :

Le promoteur *NsTPS-02a* de 1 kilobase.

L'ADNc complet de la casbène synthase.

Le terminateur du gène *NsTPS-02a*.

Analyse des plantes transformées

Le processus de régénérations a conduit à isoler des plantes transgéniques exprimant la casbène synthase spécifiquement dans les cellules de trichomes. L'analyse GC-MS des plantes contenant une seule copie du transgène a révélé une teneur en casbène de l'ordre de 15 µg/g de MF. La croissance de ces plantes était identique à celle des plantes sauvages (non transformée). Ceci confirme, comme pour la taxadiène, que la synthèse spécifique de la casbène synthase dans les trichomes ne provoque aucun effet délétère pour la plante.

Augmentation de l'expression d'un transgène par utilisation d'un activateur (*enhancer*) de transcription 35S

L'expression de la taxadiène synthase sous le contrôle du promoteur 1.8 kb du gène CYP71D16 a été comparée avec l'expression du gène codant pour taxadiène-5α-hydroxylase sous contrôle du même promoteur mais précédé par un élément activateur du promoteur 35S (SEQ ID No 9). L'analyse quantitative de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et avec l'utilisation de sondes TaqMan® spécifiques des gènes.

Les résultats présentés figure 7 indiquent que l'expression du gène taxadiène-5α-hydroxylase est 1000 fois supérieur à l'expression du gène de la taxadiène synthase. Nous pouvons donc en déduire que les éléments activateurs du promoteur 35S sont à l'origine de cette activation puisque les promoteurs sont par ailleurs identiques.

25 REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J (2002), Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics.* 267: 730-745.

Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:4126-33.

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.

5

Besumbes O, Sauret-Gueto S, Phillips MA, Imperial S, Rodriguez-Concepcion M, Boronat A (2004) Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol. Bioeng.* 88:168-75.

10

Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2004) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J*. 40:188-99.

15

Cho EM, Okada A, Kenmoku H, Otomo K, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Sassa T, Yajima A, Yabuta G, Mori K, Oikawa H, Toshima H, Shibuya N, Nojiri H, Omori T, Nishiyama M, Yamane H (2004) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding ent-cassa-12,15-diene synthase, a putative diterpenoid phytoalexin biosynthetic enzyme, from suspension-cultured rice cells treated with a chitin elicitor. *Plant J*. 37:1-8.

20

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 18;94(6):2117-2121.

25

Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J*. 8:693-701.

30

Hansen G, Wright MS (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci*. 4: 226-231.

- Heemann V, Brümmer U, Paulsen C, Seehofer F (1983) Composition of the leaf surface gum of some *Nicotiana* species and *Nicotiana tabacum* cultivars. *Phytochem.* 22:133-135.
- 5
- Hooykaas PJ, Schilperoort RA (1992) Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* 20: 175
- Horsch RB, Rogers SG, Fraley RT (1985) Transgenic plants. *Cold Spring Harb Symp*
- 10 *Quant Biol.* 50: 433-7
- Jennewein S, Croteau R (2001) Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:13-9.
- 15 Jennewein S, Wildung MR, Chau M, Walker K, Croteau R (2004) Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9149-9154.
- Martin DM, Faldt J, Bohlmann J (2004) Functional characterization of nine Norway
- 20 Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol.* 135:1908-1927.
- Mau CJ, West C (1994) Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
- 25 91:8497-8501.
- McGarvey P, Kaper JM. (1991) A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques.* Oct;11(4):428-32.
- 30 Peters RJ, Flory JE, Jetter R, Ravn MM, Lee HJ, Coates RM, Croteau RB (2000) Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*): characterization and mechanism of action of the "pseudomature" recombinant enzyme. *Biochemistry* 39:15592-15602.

- Prisic S, Xu M, Wilderman PR, Peters RJ (2004) Rice Contains Two Disparate ent-Copalyl Diphosphate Synthases with Distinct Metabolic Functions. *Plant Physiol.* 136:4228-4236.
- 5
- Schepmann HG, Pang J, Matsuda SP (2001) Cloning and characterization of Ginkgo biloba levopimaradiene synthase which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 392:263-269.
- 10
- Seo S, Seto H, Koshino H, Yoshida S, Ohashi Y (2003) A diterpene as an endogenous signal for the activation of defense responses to infection with tobacco mosaic virus and wounding in tobacco. *Plant Cell.* 15:863-873.
- Severson RF, Johnson AW, Jackson DM (1985) Cuticular constituents of tobacco:
- 15
- factors affecting their production and their role in insect and disease resistance and smoke quality. *Recent Advances in Tobacco Science* 11:105-173.
- Siemens J, and Schieder A (1996) *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 2:66-75
- 20
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407:319-20.
- Sun TP, Kamiya Y (1994) The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell.* 6:1509-1518.
- 25
- Tissier A, Montané M-H (1999) Méthodes pour la production d'une banque de mutants et ses applications. Brevet Français n° 9913515.
- Tissier A, Sallaud C, Rontein D (2004) Promoteurs végétaux et utilisations. Demande
- 30
- de brevet en France n° FR 0410799.
- Trapp SC, Croteau RB (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics.* 158:811-832.

- Turner GW, Gershenzon J, Croteau R (2000) Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Phys.* 124:665-680.
- 5 Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93:3-11
- Wang E, Wang R, DeParasis J, Loughrin JH, Gan S, Wagner GJ (2001) Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid
10 resistance. *Nat Biotechnol.* 19: 371-374.
- Wang E, Wagner GJ (2003) Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing. *Planta*
15 216:686-691.
- Wang M-B, Graham MW, Waterhouse PM (1999) Methods and means for obtaining modified phenotypes. Demande de brevet WO9953050.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh
20 SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27:581-90.
- Wilderman PR, Xu M, Jin Y, Coates RM, Peters RJ (2004) Identification of syn-
25 pimara-7,15-diene synthase reveals functional clustering of terpene synthases involved in rice phytoalexin/allelochemical biosynthesis. *Plant Physiol.* 135:2098-2105.
- Wildung MR, Croteau R (1994) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyses the committed step of taxol biosynthesis. *J. Biol. Chem.*
30 271:9201-9204.

Tableau 1

Gène Abréviation	Nom du gène	Plantes	Promoteur (bp)	Plante transformée	Expression	Références
LTP3	Lipid transfer protein	Cotton	1548 1143 614	Tabac	Trichomes, épiderme périphérique des feuilles et tissus vasculaires	Liu et al., 2000, BBA, 1487:106111
LTP6	Lipid transfer protein	Cotton	447 272	Tabac	trichomes et cellules de garde des stomates	Hsu et al., 1999, Plant science, 143:6370
wax9D	Lipid transfer protein	Brassica oleracea	972	Tabac	Epidermes de feuilles, tiges et fleurs, pétales, sépales, ovules, et trichomes	Pyee and Kolattukudy, 1995, Plant J. 7:4559
LTP1	Lipid transfer protein	Arabidopsis	1149	Arabidopsis	Cellules épidermiques de tissus divers	Thoma et al., 1994, Plant Physiol. 105 3545
CYC71D16	CBTol hydroxylase	Tobacco	1852	Tabac	Trichomes	Wang et al., 2002, J.of Exp. Bot. 189:11897

REVENDECATIONS

- 1- Méthode de production de terpène d'intérêt dans une plante présentant des trichomes glanduleux comprenant :
- 5 a) l'introduction dans une cellule de ladite plante d'une construction portant une cassette d'expression comprenant une séquence polynucléotidique codant pour une terpène synthase hétérologue permettant de synthétiser ledit terpène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression dans les trichomes;
- 10 b) la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule et la sélection des plantes transgéniques exprimant ladite terpène synthase ; et
- c) la récolte du terpène d'intérêt contenu dans les trichomes des dites plantes transgéniques.
- 15 2- Méthode selon la revendication 1, dans laquelle l'expression de la terpène synthase est sous le contrôle d'un promoteur spécifique des trichomes.
- 3- Méthode selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle ladite cassette d'expression comprend au moins une séquence activatrice « enhancer » liée de manière
- 20 opérationnelle au promoteur.
- 4- Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle la récolte du terpène d'intérêt contenu dans les trichomes des dites plantes transgéniques est effectuée par la récupération du terpène d'intérêt contenu dans l'exsudat des trichomes.
- 25 5- Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, comprenant en outre le blocage de la voie de production de terpènes endogènes dans les trichomes.
- 6- Méthode selon la revendication 5, dans laquelle le blocage de la voie de production
- 30 de terpènes endogènes est effectué en bloquant l'expression des terpènes synthases endogènes.
- 7- Méthode selon la revendication 5 ou 6, dans laquelle la plante transgénique sélectionnée en b) est croisée avec une plante transgénique dont la voie de production

de terpènes endogènes est bloquée dans les trichomes.

8- Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite terpène synthase hétérologue est une diterpène synthase.

5

9- Méthode selon la revendication 8, dans laquelle ladite diterpène synthase est la taxadiène synthase ou la casbène synthase.

10- Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite terpène synthase hétérologue est une monoterpène synthase et la construction comprend en outre une séquence polynucléotidique codant pour une géranylpyrophosphate synthase sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les trichomes.

11- Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite terpène synthase hétérologue est une sesquiterpène synthase et la construction comprend en outre une séquence polynucléotidique codant pour une farnésylpyrophosphate synthase sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression dans les trichomes.

12- Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite terpène synthase hétérologue est une triterpène synthase et la construction comprend en outre des séquences polynucléotidiques codant pour une farnésylpyrophosphate synthase, une squalène synthase et une squalène époxydase sous le contrôle d'un promoteur permettant leur expression dans les trichomes.

13- Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, dans laquelle la plante est une plante de la famille des Asteracées, Cannabacées, Solanacées ou Lamiacées.

14- Méthode selon la revendication 13, dans laquelle la plante est le tabac, de préférence *Nicotiana sylvestris*.

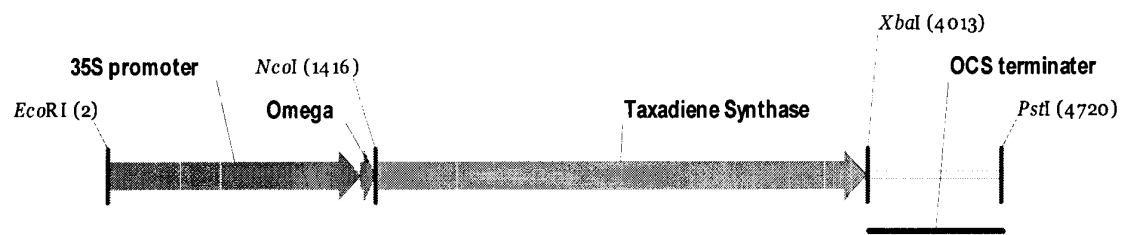
30

15- Plante ou graine transgénique présentant des trichomes glanduleux caractérisée en ce qu'elle comprend une cassette d'expression contenant une séquence polynucléotidique codant pour une terpène synthase hétérologue permettant de synthétiser un terpène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur permettant une

expression dans les trichomes.

- 16- Plante ou graine transgénique selon la revendication 15, dans laquelle l'expression de la terpène synthase est sous le contrôle d'un promoteur spécifique des trichomes.
- 5
- 17- Plante ou graine transgénique selon la revendication 15 ou 16, dans laquelle ladite cassette d'expression comprend au moins une séquence activatrice « enhancer » liée de manière opérationnelle au promoteur
- 10
- 18- Plante ou graine transgénique selon l'une des revendications 15 à 17, dans laquelle la voie de production de terpènes endogènes est bloquée dans les trichomes.
- 19- Plante ou graine transgénique selon l'une des revendications 15-18, caractérisée en ce que la plante est une plante de la famille des Asteracées, Cannabacées, Solanacées ou
- 15
- Lamiacées.
- 20- Plante ou graine transgénique selon la revendication 19, caractérisée en ce que la plante est du genre Nicotiana.
- 20
- 21- Utilisation d'une plante ou graine transgénique selon l'une des revendications 15-20 pour la production de terpène d'intérêt.
- 22- Méthode de récolte de terpènes hétérologues dans l'exsudat des trichomes d'une plante selon l'une des revendications 15 à 20, comprenant a) la récolte de parties aériennes de la plante ; b) l'incubation de ces parties aériennes dans un solvant de type
- 25
- peu polaire ou apolaire ; et c) l'élimination du solvant.

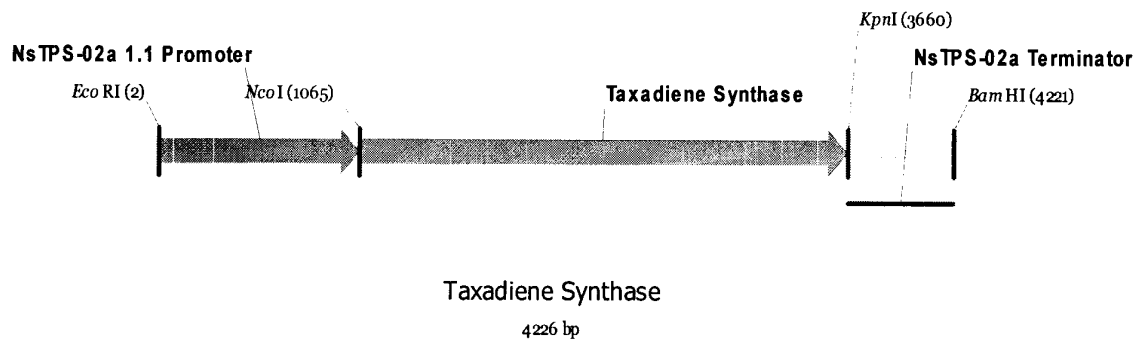
1/ 11



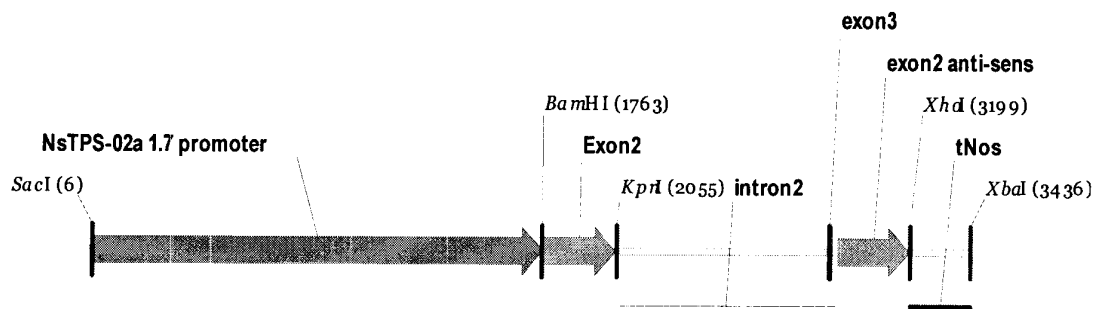
35S Taxadiene Synthase
4726 bp

FIGURE 1

2/ 11

**FIGURE 2**

3/ 11

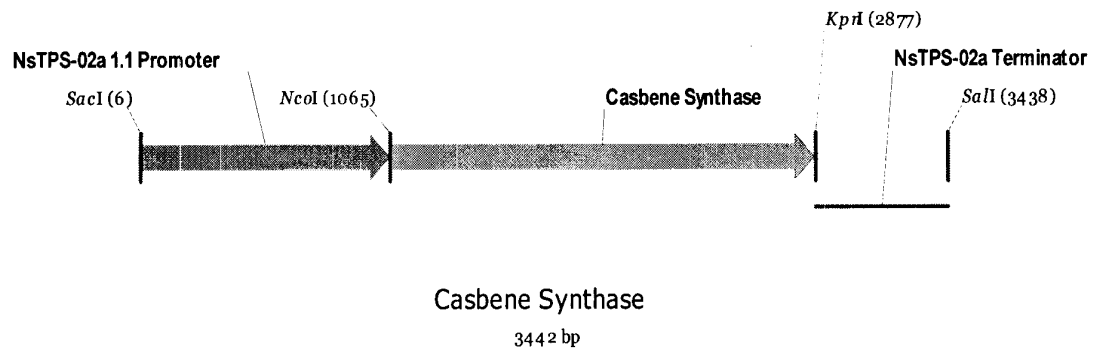


NsTPS-02a-ihpTPS

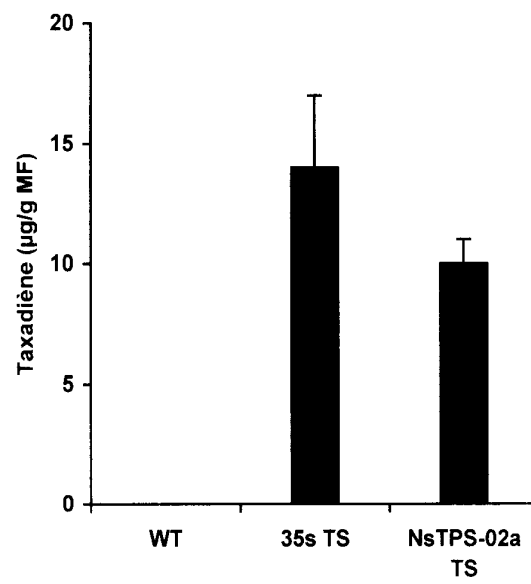
3440 bp

FIGURE 3

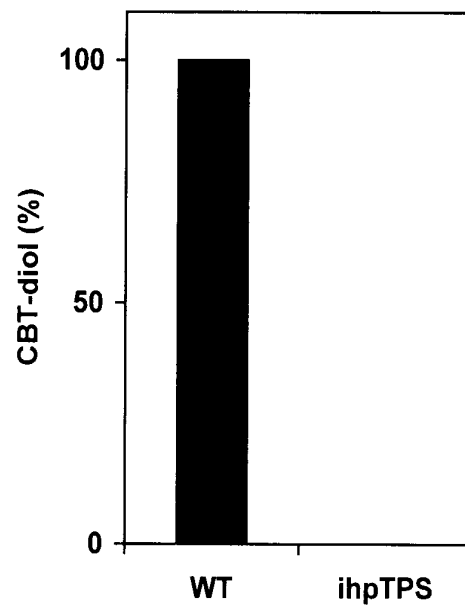
4/ 11

**FIGURE 4**

5/ 11

**FIGURE 5**

6/ 11

**FIGURE 6**

7/ 11

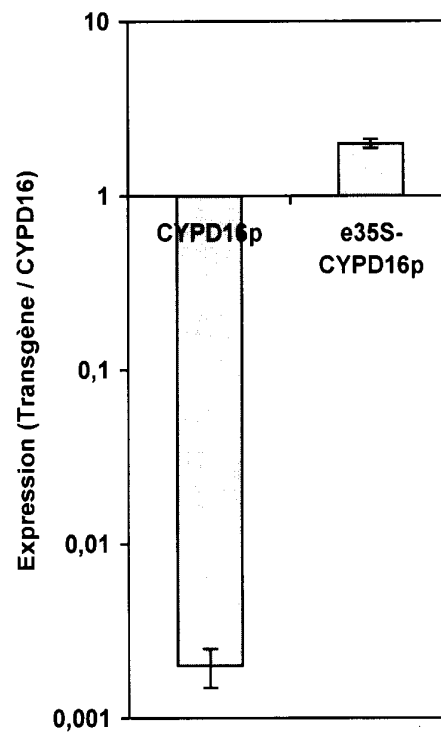
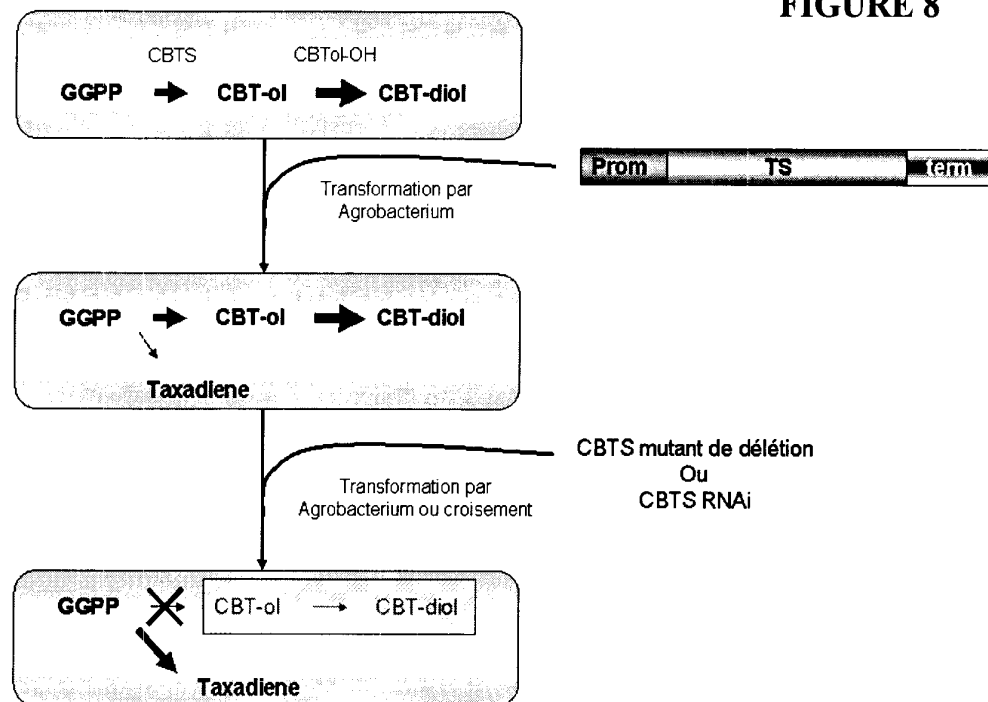
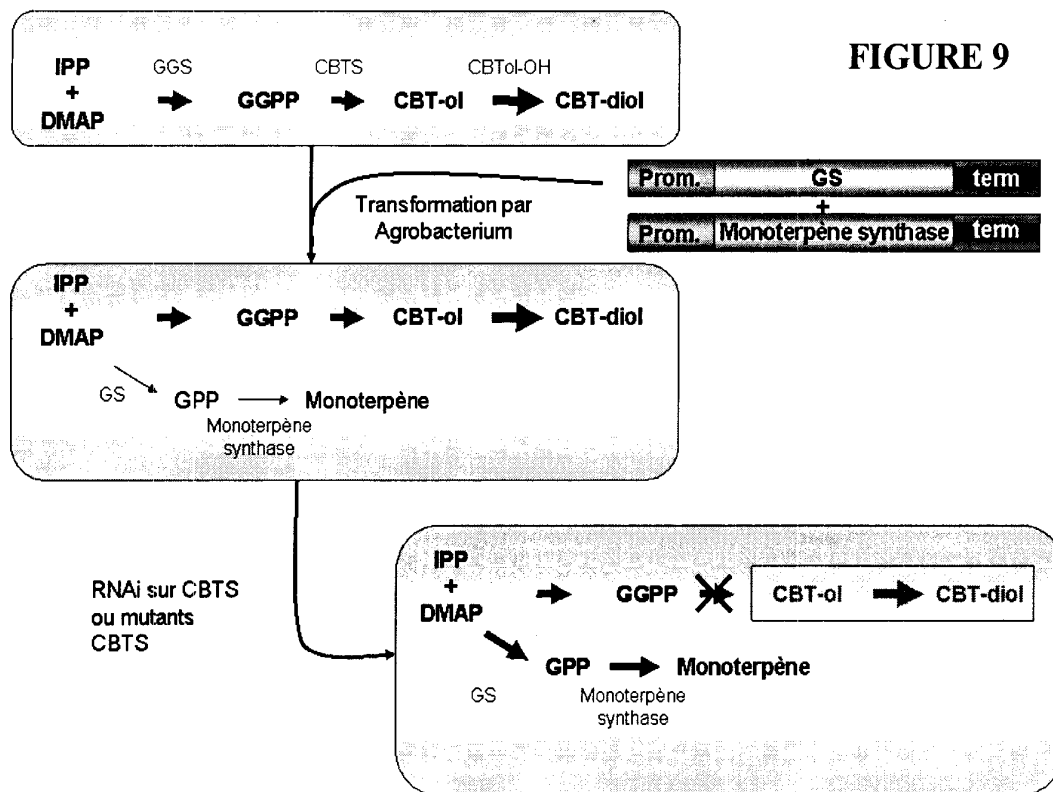
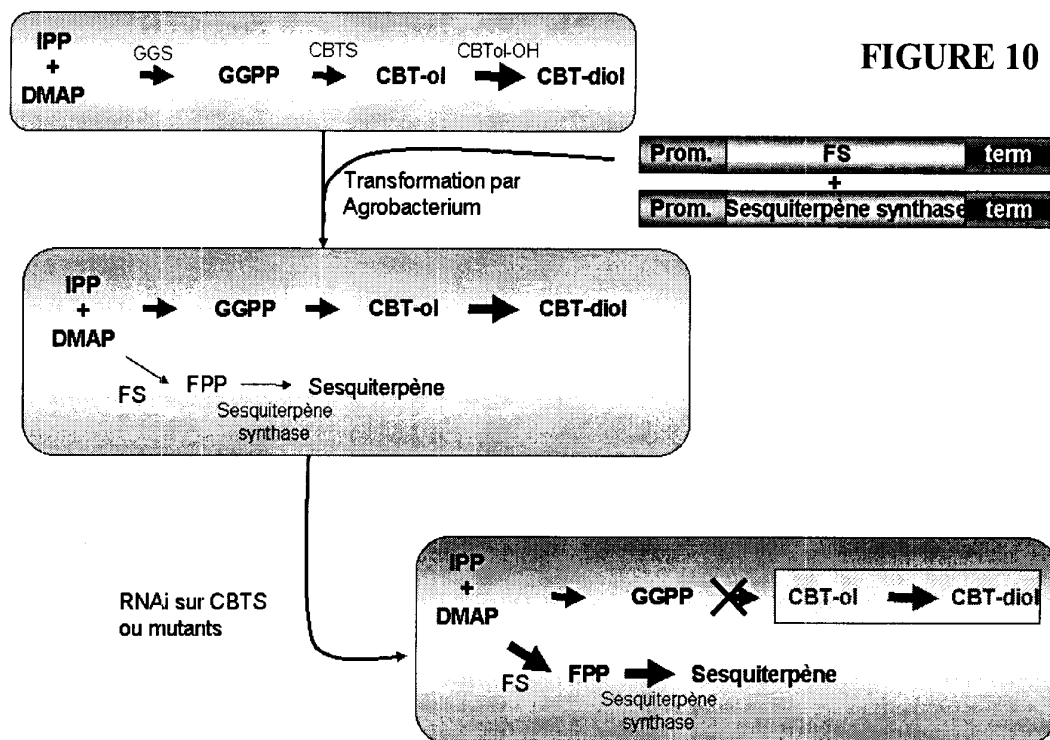
**FIGURE 7**

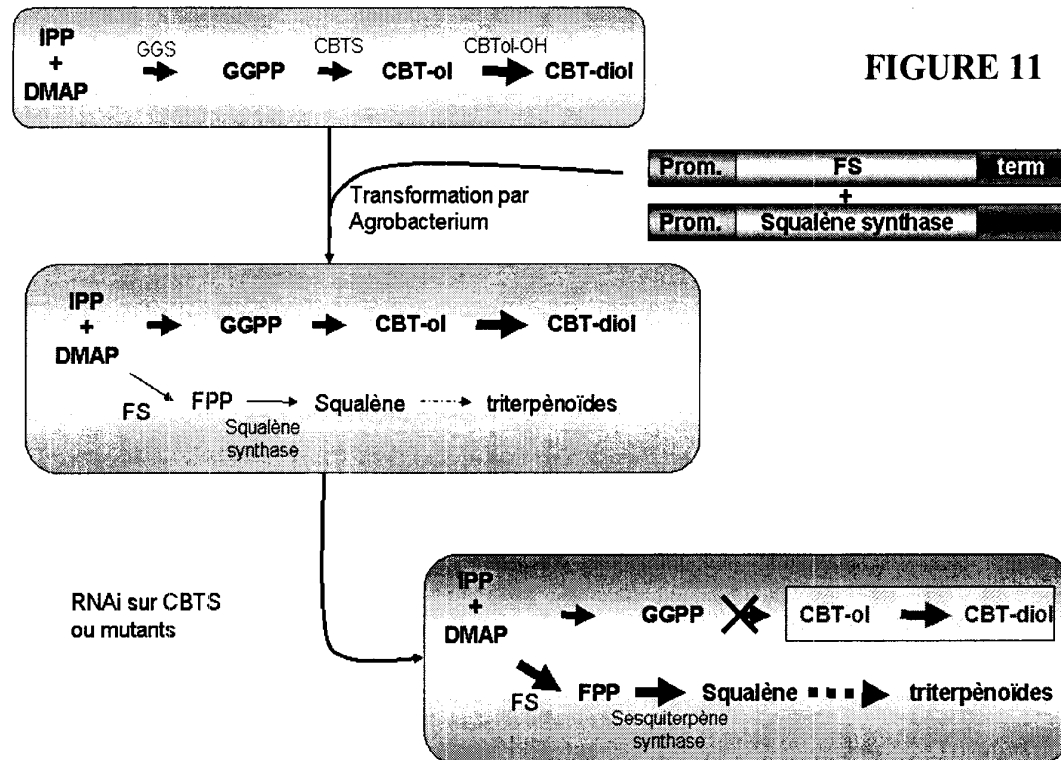
FIGURE 8







11/11



1
SEQUENCE LISTING

<110> LIBROPHYT

<120> SYSTEME DE PRODUCTION DE TERPENOIDES DANS LES PLANTES

<130> B0334FR

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4720

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Construction de la Figure 1

<400> 1
gaattccaat cccacaaaaa tctgagctta acagcacagt tgctcctctc agagcagaat 60
cgggtattca acaccctcat atcaactact acgttgtgta taacgggtcca catgccggta 120
tatacgatga ctggggttgt acaaaggcag caacaaacgg cggtcccga gttgcacaca 180
agaaatttgc cactattaca gaggcaagag cagcagctga cgcgtataca acaagtcagc 240
aaacagatag gttgaacttc atcccaaag gagaagctca actcaagccc aagagctttg 300
ctaaggccct aacaagccca ccaaagcaaa aagcccactg gctcacgcta ggaaccaaaa 360
ggcccagcag tgatctagcc caaaagaga tctcctttgc cccggagatt acaatggacg 420
acttcctcta tctctacgat ctaggaagaa agttcgacgg tgaaggtgac gacaccatgt 480
tcaccactga taatgagaag attagcctct tcaatttcag aaagaatgct gaccacaga 540
tggttagaga ggcctacgca gcaggcctca tcaagacgat ctacccgagt aacaatctcc 600
aggagatcaa ataccttccc aagaagggtta aagatgcagt caaaagattc aggactaact 660
gcatcaagaa cacagagaaa gatatatattc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga 720
cgattcaagg cttgcttcat aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaaaaagg 780
tagttcctac tgaatcaaag gccatggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac 840
tcgccgtgaa aactggcgaa cagttcatatc agagtctttt acgactcaat gacaagaaga 900

aaatcttcgt caacatggtg gagcacgaca ctcttgtcta ctccaaaaat atcaaagata 960
 cagtctcaga agaccaaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggtaatt tcgggaaacc 1020
 tccttggatt ccattgcca gctatctgtc acttcatcga aaggacagta gaaaaggaag 1080
 gtggctccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctctg 1140
 ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg 1200
 ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgacat ctccactgac gtaagggatg 1260
 acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt 1320
 tggagaggac acgctcgagt ataagagctc tatttttaca acaattacca acaacaacaa 1380
 acaacaacaa acattacaat tacatttaca attaccatgg ctacagctctc atttaatgca 1440
 gcgctgaaga tgaacgcatt ggggaacaag gcaatccacg atccaacgaa ttgcagagcc 1500
 aaatctgagc gccaaatgat gtgggtttgc tccagatcag ggcgaaccag agtaaaaatg 1560
 tcgagaggaa gtggtggtcc tggtcctgtc gtaatgatga gcagcagcac tggcactagc 1620
 aaggtggttt ccgagacttc cagtaccatt gtggatgata tccctcgact ctccgccaat 1680
 tatcatggcg atctgtggca ccacaatgtt atacaaactc tggagacacc gtttcgtgag 1740
 agttctactt accaagaacg ggcagatgag ctggttgtga aaattaaaga tatgttcaat 1800
 gcgctcggag acggagatat cagtccgtct gcatacgaca ctgcgtgggt ggcgaggctg 1860
 gcgaccattt cctctgatgg atctgagaag ccacggtttc ctacggccct caactgggtt 1920
 ttcaacaacc agctccagga tggatcgtgg ggtatcgaat cgcactttag tttatgcgat 1980
 cgattgctta acacgaccaa ttctgttatc gccctctcgg tttggaaaac agggcacagc 2040
 caagtacaac aaggtgctga gtttattgca gagaatctaa gattactcaa tgaggaagat 2100
 gagttgtccc cggattttcca aataatcttt cctgctctgc tgcaaaaggc aaaagcgttg 2160
 gggatcaatc ttccttacga tcttccattt atcaaataat tgtcgacaac acgggaagcc 2220
 aggtttacag atgtttctgc ggcagcagac aatattccag ccaacatgtt gaatgcgttg 2280
 gaaggtctcg aggaagttat tgactggaac aagattatga ggtttcaaag taaagatgga 2340
 tctttcctga gctcccctgc ctccactgcc tgtgtactga tgaatacagg ggacgaaaaa 2400
 tgtttcactt ttctcaacaa tctgctcgac aaattcggcg gctgcgtgcc ctgtatgtat 2460
 tccatcgatc tgctggaacg ctttctcgtg gttgataaca ttgagcatct cggaatcgg 2520
 cgccatttca aacaagaaat caaaggagct cttgattatg tctacagaca ttggagtga 2580
 aggggcatcg gttggggcag agacagcctt gttccagatc tcaacaccac agccctcggc 2640
 ctgcgaactc ttcgcatgca cggatacaat gtttcttcag acgttttgaa taatttcaaa 2700
 gatgaaaacg ggcggttctt ctctctcgtg ggccaaaccc atgtcgaatt gagaagcgtg 2760
 gtgaatcttt tcagagcttc cgaccttgca tttcctgacg aaagagctat ggacgatgct 2820
 agaaaatttg cagaaccata tcttagagag gcacttgcaa cgaaaatctc aaccaatata 2880
 aaactattca aagagattga gtacgtggtg gagtaccctt ggcacatgag tatcccacgc 2940
 ttagaagcca gaagttatat tgattcatat gacgacaatt atgtatggca gaggaagact 3000

```

ctatatagaa tgccatcttt gagtaattca aaatgttttag aattggcaaa attggacttc 3060
aatatcgtac aatctttgca tcaagaggag ttgaagcttc taacaagatg gtggaaggaa 3120
tccggcatgg cagatataaa tttcactcga caccgagtg cggaggttta tttttcatca 3180
gctacatttg aacccgaata ttctgccact agaattgcct tcacaaaaat tggttgttta 3240
caagtccttt ttgatgatat ggctgacatc tttgcaacac tagatgaatt gaaaagtttc 3300
actgagggag taaagagatg ggatacatct ttgctacatg agattccaga gtgtatgcaa 3360
acttgcttta aagtttggtt caaattaatg gaagaagtaa ataatgatgt ggttaaggta 3420
caaggacgtg acatgctcgc tcacataaga aaaccctggg agttgtactt caattgttat 3480
gtacaagaaa gggagtggct tgaagccggg tatataccaa cttttgaaga gtacttaaaag 3540
acttatgcta tatcagtagg ctttgaccg tgtaccctac aaccaatact actaatgggt 3600
gagcttgtga aagatgatgt tgttgagaaa gtgcactatc cctcaaata gtttgagctt 3660
gtatccttga gctggcgact aacaaacgac accaaaacat atcaggctga aaaggctcga 3720
ggacaacaag cctcaggcat agcatgctat atgaaggata atccaggagc aactgaggaa 3780
gatgccatta agcacatatg tcgtgttgtt gatcgggcct tgaaagaagc aagctttgaa 3840
tatttcaaac catccaatga tatccaatg ggttgcaagt cttttatttt taacctaga 3900
ttgtgtgtcc aaatctttta caagtttata gatgggtacg gaatcgccaa tgaggagatt 3960
aaggactata taagaaaagt ttatatgat ccaattcaag tatgaggatc ctctagagtc 4020
ctgctttaat gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt 4080
gtgcacgttg taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg gtttcggttc 4140
attctaata atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa 4200
tttactgatt gtaccctact acttatatgt acaatattaa aatgaaaaca atatattgtg 4260
ctgaataggt ttatagcgac atctatgata gagcgccaca ataacaaaca attgcgtttt 4320
attattacaa atccaatttt aaaaaagcg gcagaaccgg tcaaacctaa aagactgatt 4380
acataaatct tattcaaatt tcaaaagtgc cccaggggct agtatctacg acacaccgag 4440
cggcgaacta ataacgctca ctgaagggaa ctccgggttc ccgccggcgc gcatgggtga 4500
gattccttga agttgagtat tggccgtccg ctctaccgaa agttacgggc accattcaac 4560
ccggtccagc acggcgggcg ggtaaccgac ttgctgcccc gagaattatg cagcattttt 4620
ttggtgtatg tgggccccaa atgaagtgca ggtcaaacct tgacagtgc gacaaatcgt 4680
tgggcgggtc cagggcgaat tttgcgacaa cagtctgcag 4720

```

<210> 2

<211> 4225

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Construction de la Figure 2

<220>

<221> misc_feature

<222> (4028)..(4028)

<223> n = a, t, g or c

```

<400>  2
gaattcaatt tatttttgta aaacttctct aatttttgga caaactctta tattgatttt      60
ttaatcgaag ccaaaatatt tatttaacta tgaaaaaatt ttaacaacta atttattatg      120
gtaaataata ttgatatggt aacttcaagc acatgacaaa aattataact aactgcagaa      180
gtttattgtc tctctgaatc ttgtggctat atcataacaa atacttgtag ctaataagcc      240
aacgatgttc tcggtttcat ataatttgaa ttttaaaata gtttttaaat ttaatattta      300
tttcaaatca ttattgtggc taacatgtta taatcgcagt aatatttgga gatgcaatac      360
ttatatattag ctacaaaatt ttattgtatc agaataagtt tgtagctatt aagttagttt      420
ttgccacaaa tttttataat tgaagcaaaa atacttattc agctacagta tttgtatcgc      480
agtaatattt tgtgactaga agattaatat tgctacagta atttcagacg tgtggcaaaa      540
actcataatt agctacaaaa tattgtcgta gcaataattt tttatatcta ttaatgcaat      600
tattactaca tgcttttata acttgaggca aaaatatcta atagctataa cattttgtta      660
gaagtaattt ttgtggctat aaaattggta ttgctacagt aatttcaaat gcgtggcaaa      720
aaaatacgat taactacgaa attttattgt agcaataact ttgtagctat ttgggtaata      780
ttgctacgac agttagcaat tatagcaaaa atgccaaatc agctttgtca atttaatttt      840
gtagctaatt tttttatgaa attgtaaata gctatgaaat ttttaatttt gtggctattg      900
tcagggtatta gccacatata gctaagaatt tgtagctata tatacataat gttgtagtgg      960
caaattctaa cattgtacgc ttggctgccc tttttttttt ttttggtac aaaactctaa     1020
agtaaaggaa ctagaaaact cgtttggcga gagaaagaga gagccatggc tcagctctca     1080
tttaatgcag cgctgaagat gaacgcattg gggaacaagg caatccacga tccaacgaat     1140
tgcagagcca aatctgagcg ccaaagatg tggttttgcct ccagatcagg gcgaaccaga     1200
gtaaaaatgt cgagaggaag tgggtggcct ggtcctgtcg taatgatgag cagcagcact     1260
ggcactagca aggtggtttc cgagacttcc agtaccattg tggatgatat ccctcgactc     1320
tccgccaaat atcatggcga tctgtggcac cacaatgtta taaaactctt ggagacaccg     1380
tttcgtgaga gttctactta ccaagaacgg gcagatgagc tggttgtgaa aattaaagat     1440
atgttcaatg cgctcggaga cggagatatc agtccgtctg catacgacac tgcgtgggtg     1500
gcgaggctgg cgaccatttc ctctgatgga tctgagaagc cacggtttcc tcaggccctc     1560
aactgggttt tcaacaacca gctccaggat ggatcgtggg gtatcgaatc gcactttagt     1620

```

ttatgcgatc gattgcttaa cacgaccaat tctgttatcg ccctctcggt ttggaaaaca	1680
gggcacagcc aagtacaaca aggtgctgag tttattgcag agaactaag attactcaat	1740
gaggaagatg agttgtcccc ggatttccaa ataacttttc ctgctctgct gcaaaaggca	1800
aaagcgttgg ggatcaatct tccttacgat cttccattta tcaaataattt gtcgacaaca	1860
cgggaagcca ggcttacaga tgtttctgcg gcagcagaca atattccagc caacatgttg	1920
aatgcgttgg aaggctctga ggaagttatt gactggaaca agattatgag gtttcaaagt	1980
aaagatggat ctttctgag ctcccctgcc tccactgcct gtgtactgat gaatacaggg	2040
gacgaaaaat gtttcacttt tctcaacaat ctgctcgaca aattcggcgg ctgctgccc	2100
tgtatgtatt ccatcgatct gctggaacgc ctttctgctg ttgataacat tgagcatctc	2160
ggaatcggtc gccatttcaa acaagaaatc aaaggagctc ttgattatgt ctacagacat	2220
tggagtgaag ggggcatcgg ttggggcaga gacagccttg ttccagatct caacaccaca	2280
gccctcggcc tgcgaactct tcgcatgcac ggatacaatg tttcttcaga cgttttgaat	2340
aatttcaaag atgaaaacgg gcggttcttc tcctctgcgg gccaaaccca tgtcgaattg	2400
agaagcgtag tgaatctttt cagagcttcc gaccttgcat ttcctgacga aagagctatg	2460
gacgatgcta gaaaatttgc agaaccatat cttagagagg cacttgcaac gaaaatctca	2520
accaatacaa aactattcaa agagattgag tacgtggtgg agtacccttg gcacatgagt	2580
atcccacgct tagaagccag aagttatatt gattcatatg acgacaatta tgtatggcag	2640
aggaagactc tatatagaat gccatctttg agtaattcaa aatgtttaga attggcaaaa	2700
ttggacttca atatcgtaga atctttgcat caagaggagt tgaagcttct aacaagatgg	2760
tggaaggaat ccggcatggc agatataaat ttcactcgac accgagtggc ggaggtttat	2820
ttttcatcag ctacatttga acccgaatat tctgccacta gaattgcctt cacaaaaatt	2880
ggttgtttac aagtcctttt tgatgatatg gctgacatct ttgcaacact agatgaattg	2940
aaaagtttca ctgagggagt aaagagatgg gatacatctt tgctacatga gattccagag	3000
tgtatgcaaa cttgctttta agtttggttc aaattaatgg aagaagtaaa taatgatgtg	3060
gttaaggtac aaggacgtga catgctcgct cacataagaa aaccctggga gttgtacttc	3120
aattgttatg tacaagaaag ggagtggcctt gaagccgggt atataccaac ttttgaagag	3180
tacttaaaga cttatgctat atcagtaggc cttggaccgt gtaccctaca accaatacta	3240
ctaaggggtg agcttgtaga agatgatgtt gttgagaaag tgcactatcc ctcaaatag	3300
tttgagcttg tatccttgag ctggcgacta acaaacgaca ccaaaacata tcaggctgaa	3360
aaggctcgag gacaacaagc ctcaggcata gcatgctata tgaaggataa tccaggagca	3420
actgaggaag atgccattaa gcacatatgt cgtgtgtgtg atcgggcctt gaaagaagca	3480
agctttgaat atttcaaacc atccaatgat atcccaatgg gttgcaagtc ctttattttt	3540
aaccttagat tgtgtgtcca aatcttttac aagtttatag atgggtacgg aatcgccaat	3600
gaggagatta aggactatat aagaaaagtt tatattgatc caattcaagt atgaggtacc	3660

6

ttatatataa caatgcagac acaccttcaa agctgagtat ttggagcaaa tatggaagca	3720
ttttgtattg tccatgtaac ctataagtca cgtgtttggg caatggcaac atttactaat	3780
atttgcatta tggtaggttg tttacatcac acctatcggg ggcgaccctt cctaaacctg	3840
acatgaatgt gtgatgctty gtgcacctgg cggtcattt ttactatttc actgttacia	3900
cttatttgga cggttgttac ctattgaatc atgtagtatt gttacttgaa tacaatgttt	3960
attttaatta ttacttaa at tttattctat catatcgta aatccatcat tacgtaacia	4020
tgaagagngt cactttatgg aatgacggat ttagtggtgt ggtgtcattt ccttgcattt	4080
ttctctcatc ttgaccttcc ttattattag ataatcatct tttatcattt atcctacttt	4140
ttatacaata attctactcc atatcctatt ttttcttagt aatgttgcaa gtttattctt	4200
catattgtta gtgcgtattg gatcc	4225

<210> 3

<211> 3440

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Construction de la Figure 3

<400> 3

gagctcaaag aggtgaaacc taatctagta tgcaaaccat gttaaattct caattgtttt	60
gatagataat gagttttctg ataattaata aattattaga taattaaagg accaaattta	120
tatgactttt gttttttatc atcttgatca tatatacaat gtaatggata caagcttata	180
gttgataaaa ttctatataa ttagttattc atacattaat tagatatatt caattgttct	240
ttataaatat aattcaaacc tgaaagcaat acttattttg taagaattgc aatattgtta	300
ttttgttatg gacttaaata ttaaccatgt tataatctta agtttatatt attagaaaaa	360
cttagttttt gaaagactaa tatgaacatt agtacttatt tcaaaaataa gcgcttagat	420
atatgaaatt actttaagta cttattttaa ataattaagt accacacata catacatatc	480
tctacaaact gttaaagttt tctatatgag tacttatttt aaaataagag cataaatata	540
ataaattatg ttaaattctt attttaaata ataaaggacc aaacatgcat aaaataaagt	600
atgagcttaa taagtcaaga agctaattga taagcattga tgccaaatgc acttactaac	660
tgttctatat tgtaggaaaa atctaacttt tatattaaaa atttattttc ataaaacttc	720
cctaattttt gaacaaaatc ttatattgat tttttaatca aagccaaaat atttatttaa	780
ctatgaaaat tttttaacia ctaatttatt atggtaaata atattgatat ggtaactttc	840
agcacatgac aaaaattata actaactgca gaagtttact gtctctctga atcttgtggc	900
tatgtcattc tatcataaca aatacttgta gctaatacgc caacgatgtt ctcgatttca	960
tataatttga attttaaaat agctttttaa tttaatattt atttcaaac attattgtga	1020

ctaacatggtt ataaccgcag taatatatttg agatgcaata cttatatatta gctacaaaat	1080
tttattgtat cataataagt ttgtagctat taagttagtt ttggccaca atttttataa	1140
ttgaagcaaa aatacctatt caactacaat attttgtatc gagtaatatt ttgtgactag	1200
aagattaata ttattacagt aattttctgac gtgtggcaaa aactcataat tatctacaaa	1260
atattgtcgt agcaataatt ttttatatct attaatccaa ttattgctac atgcttttat	1320
aacttgaggc aaaaatatct atttagctat aacattttgt tagaagtaat ttttgtgact	1380
ataaagttgt tattgctaca gtaatttcaa atgcgtggca aaaaaatac gattagctac	1440
gaaattttat tgtagcaata aatttgtagc tatttgggta atattgctac gacagttagc	1500
aattatagca aaaatgctaa atcagctttg tcgatttaat tttgtagcta atttttttat	1560
gaatttgtaa atagctatga aattttaatt tttgtggcta ttgttaggta ttagccacat	1620
atagctaaga atttgtagct atatatacat aatgtttagt tggcaaattc taacattgta	1680
agcttggctg cctttttttt ttttgggct acaaaactct aaagtaaagg aactagaaaa	1740
ctcgtttggc gagagaaaga gggatccctg caggaaatta ctaccaaga gaaaaatgaa	1800
catgaaatgc taaaagaaat agttcggaaa atgttggtag aaactccaga taatagtaca	1860
caaaaactag tcttgattga cacaattcaa agattgggat tagcatatca tttcaatgat	1920
gagattgaaa actccattca aaacatcttt aatttgtctc aaaatagtga agatgacgat	1980
gaacacaacc tttatgttgc tgctcttcgt tttcgacttg cgaggcaaca aggatattac	2040
atgtcttcag gtaccttaca tttctgccct ttccgcaca gcttcatttt tttcgttgt	2100
taaaagacag ttcggcgcat aaaatatctc atgtatacgc agggtcagga cgaaccgccc	2160
ccaaggggtg taaagtatgc aacttaccct aataactaaat atctcgtgta tacacaggg	2220
caggacaagt cgcaccaag ggggtgaatg tagacaactt atcctaatgc tattagtaac	2280
tgattttatg gctcgaacac ataaattata ggtcacacag taacaacttt accgttgctc	2340
aaagactcgc cttcctcttt ttttagttat cgcaccttat ttgtgcagag aatagcaagt	2400
ttcgagatct gcttctatat agaagacttc tgtattatac ttttttattt tgtccttctg	2460
cttaaaaata gtaaaaaact atagtgtgga aattgtaaat ttcttaacta gctgtgaaat	2520
caaatagtta ttataggaat attattttaag actccactta tggaaaacca ctgggttggt	2580
gttgttattg tcaataataa cttgggggtac gatttacttc tttttccatg gcttgccac	2640
gactatattc ctattaacaa tgttgtgact atgctttctt tgagtcgagg gtctattgat	2700
aacaggctct cgatctttac aaggtaaaag taatgtctgc gtacacactc tactccgcag	2760
actccacttg taggatttca ctgaatatat tttgttgttg ttgttgttgt aataacttag	2820
ggtttaattt cttgatgcta atgaaattca tttctttcaa aatataaaca tgggtgttcaa	2880
ccagatgtgt tcaagcaatt cactaaccat gagtacttac ctgaagacat gtaatatcct	2940
tgttgccctg caagtcgaaa acgaagagca gcaacataaa gggtgtgttc atcgtcatct	3000
tcactatttt gagacaaatt aaagatgttt tgaatggagt tttcaatctc atcattgaaa	3060

8

tgatatgcta atcccaatct ttgaattgtg tcaatcaaga ctagtttttg tgtactatta	3120
tctggagttt ctaccaacat tttccgaact atttctttta gcatttcacg ttcatttttc	3180
tcttgggtag taatttcctc gaggtttcctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcgat	3240
gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat	3300
gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatacgc	3360
gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat	3420
gttactagat cgggtctaga	3440

<210> 4

<211> 3442

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Construction de la Figure 4

<220>

<221> misc_feature

<222> (3245)..(3245)

<223> n = a, t, g or c

<400> 4

gagctcaatt ttttttgta aaacttctct aatttttggg caaactctta tattgatttt	60
ttaatcgaag ccaaaatatt tatttaacta tgaaaaaatt ttaacaacta atttattatg	120
gtaaataata ttgatatggg aacttcaagc acatgacaaa aattataact aactgcagaa	180
gtttattgtc tctctgaatc ttgtggctat atcataacaa atacttgtag ctaataagcc	240
aacgatgttc tcggtttcat ataatttgaa ttttaaaata gtttttaaat ttaatattta	300
tttcaaacta ttattgtggc taacatgtta taatcgcagt aatatttggg gatgcaatac	360
ttatatttag ctacaaaatt ttattgtatc agaataagtt tgtagctatt aagttagttt	420
ttgccacaaa tttttataat tgaagcaaaa atacttattc agctacagta ttttgtatcg	480
agtaatatatt tgtgactaga agattaatat tgctacagta atttcagacg tgtggcaaaa	540
actcataatt agctacaaaa tattgtcgta gcaataattt tttatatcta ttaatgcaat	600
tattactaca tgcttttata acttgaggca aaaatatcta atagctataa cattttgtta	660
gaagtaattt ttgtggctat aaaattggta ttgctacagt aatttcaaat gcgtggcaaa	720
aaaatacgat taactacgaa attttattgt agcaataact ttgtagctat ttgggtaata	780
ttgctacgac agtttagcaat tatagcaaaa atgccaaatc agctttgtca atttaatttt	840
gtagctaatt tttttatgaa attgtaaata gctatgaaat ttttaatttt gtggctattg	900

tcagggtatta gccacatata gctaagaatt tgtagctata tatacataat gttgtagtgg 960
 caaattctaa cattgtacgc ttggctgccc tttttttttt ttttggctac aaaactctaa 1020
 agtaaaggaa ctagaaaact cgtttggcga gagaaagaga gagccatggc attgccatca 1080
 gctgctatgc aatccaaccc tgaaaagcct aacttatttc acagattgtc aagcttacct 1140
 accactagct tggaatatgg caataatcgc ttccctttct tttcctcatc tgccaagtca 1200
 cactttaaaa aaccaactca agcatgttta tcctcaacaa cccaccaaga agttcgtcca 1260
 ttagcatact ttctcctac tgtctggggc aatcgctttg cttccttgac cttcaatcca 1320
 tcggaatttg aatcgatga tgaacgggta attgtgtga agaaaaagt taaggacata 1380
 ttaatttcat ctacaagtga ttcagtggag accgttattt taatcgactt attatgtcgg 1440
 cttggcgtat catatcactt tgaaaatgat attgaagagc tactaagtaa aatcttcaac 1500
 tcccagcctg accttgctga tgaaaaagaa tgtgatctct aactgcggc aattgtattc 1560
 cgagttttca gacagcatgg ttttaaaatg tcttcggatg tgtttagcaa attcaaggac 1620
 agtgatggta agttcaagga atccctacgg ggtgatgcta agggatgct cagccttttt 1680
 gaagcttccc atctaagtgt gcatggagaa gacattcttg aagaagcctt tgctttcacc 1740
 aaggattact tacagtcctc tgcagttgag ttattcccta atctcaaaag gcatataacg 1800
 aacgccctag agcagccttt ccacagtggc gtgccgaggc tagaggccag gaaattcatc 1860
 gatctatacg aagctgatat tgaatgccgg aatgaaactc tgctcgagtt tgcaaagttg 1920
 gattataata gagttcagtt attgcaccaa caagagctgt gccagttctc aaagtgggtg 1980
 aaagacctga atcttgcttc ggatattcct tatgcaagag acagaatggc agagattttc 2040
 ttttgggcag tcgcatgta ctttgagcct gactatgcac acacccgaat gattattgcg 2100
 aaggttgtat tgcttatatc actaatagat gatacaattg atgcgtatgc aacaatggag 2160
 gaaactcata ttcttgctga agcagtcgca aggtgggaca tgagctgcct cgagaagctg 2220
 ccagattaca tgaaagttat ttataaacta ttgctaaaca ctttctctga attcgagaaa 2280
 gaattgacgg cggaaggcaa gtcctacagc gtcaaatacg gaagggaagc gtttcaagaa 2340
 ctagtgagag gttactacct ggaggctgta tggcgcgacg agggtaaaat accatcgttc 2400
 gatgactact tgtataatgg atccatgacc accggattgc ctctcgtctc aacagcttct 2460
 ttcatgggag ttcaagaaat tacaggtctc aacgaattcc aatggctgga aactaatccc 2520
 aaattaagt atgcttccgg tgcattcatc cgacttgta acgacttaac ttctcatgtg 2580
 actgaacaac aaagaggaca cgttgcatct tgcacgact gctatatgaa ccaacatgga 2640
 gtttccaaag acgaagcagt caaaatactt caaaaaatgg ctacagattg ttggaaagaa 2700
 attaatgaag aatgtatgag gcagagtcaa gtgtcagtgg gtcacctaag gagaatagtt 2760
 aatctggcac gtcttacgga tgtgagttac aagtatggag acggttacac tgattcccag 2820
 caattgaaac aatttgtaa gggattgttc gttgatccaa tttctatttg aggtacctta 2880
 tatataacaa tgcagacaca cttcaaagc tgagtatttg gagcaaatat ggaagcattt 2940

10

tgtattgtcc atgtaaccta taagtcacgt gtttgggcaa tggcaacatt tactaatatt	3000
tgcattatgg taggttggtt acatcacacc tatcgggggc gacccttcct aaacctgaca	3060
tgaatgtgtg atgcttygtg cacctggcgg ctcatTTTTa ctatttcact gttacaactt	3120
atTTggacgg ttgttaccta ttgaatcatg tagtattggtt acttgaatac aatgtttatt	3180
ttaattatta cttaaatttt attctatcat atcgTTaaat ccatcattac gtaacaatga	3240
aaagngtcac tttatggaat gacggattta gtgtggTggt gtcatttcct tgcatttttc	3300
tctcatcttg accttcctta ttattagata atcatctttt atcattttatc ctacttttta	3360
tacaataatt ctactccata tcctatTTTT tcttagtaat gttgcaagtt tattcttcat	3420
attgttagtg cgtattgtcg ac	3442

<210> 5

<211> 1068

<212> DNA

<213> *Nicotiana sylvestris*

<400> 5

aattttatttt cataaaactt ctctaatttt tgaacaaaat cttatatattga ttttttaatc	60
aaagccaaaa tattttattta actatgaaaa ttttttaaca actaatttat tatggtaa	120
aatattgata tggtaacttc aagcacatga caaaaattat aactaactgc agaagtttac	180
tgtctctctg aatcttTgtg ctatgtcatt ctatcataac aaatacttgt agctaatacg	240
ccaacgatgt tctcgatttc atataatttg aatttttaaaa tagcttttaa atttaatat	300
tattttcaa	360
acttatattt agctacaaaa ttttattgta tcataataag tttgtagcta ttaagttagt	420
ttttgccaca aatttttata attgaagcaa aaatacctat tcaactacaa tattttgtat	480
cgagtaatat tttgtgacta gaagattaat attattacag taatttcaga cgtgtggcaa	540
aaactcataa ttatctacaa aatattgtcg tagcaataat tttttatatc tattaatcca	600
attattgcta catgctttta taacttgagg caaaaatatac tatttagcta taacattttg	660
ttagaagtaa tttttgtgac tataaagttg ttattgctac agtaatttca aatgcgtggc	720
aaaaaaaata cgattagcta cgaaatttta ttgtagcaat aaatttgtag ctatttgggt	780
aatattgcta cgacagttag caattatagc aaaaatgcta aatcagcttt gtcgatttaa	840
ttttgtagct aattttttta tgaatttgta aatagctatg aaattttaat ttttTggct	900
attgttaggt attagccaca tatagctaag aatttgtagc tatatatatac taatgttgta	960
gtggcaaatt ctaacattgt aagcttggct gccttttttt ttttttggct acaaaaactct	1020
aaagtaaagg aactagaaaa ctcgtttggc gagagaaaga gagagatg	1068

<210> 6

11

<211> 1060

<212> DNA

<213> *Nicotiana sylvestris*

<400> 6

```

aattttat tttt tgtaaaactt ctctaatttt tggacaaact cttatatga ttttttaatc      60
aaagccaaaa tatttattta actatgaaaa aattttaaca actaatttat tatggtaaata      120
aatattgata tggtaacttc aagcacatga caaaaattat aactaactgc agaagtttat      180
tgtctctctg aatcttgtgg ctatatcata acaaatactt gtagctaata agccaacgat      240
gttctcgggt tcatataaatt tgaattttta aatagttttt aaatttaata tttatttcaa      300
atcattattg tggctaacat gttataatcg cagtaatat tggagatgca atacttatat      360
ttagctacaa aattttattg tatcagaata agttttagc tattaagtta gtttttgcca      420
caaatTTTTT taattgaagc aaaaatactt attcagctac agtattttgt atcgagtaat      480
atTTTgtgac tagaagatta atattgctac agtaatttca gacgtgtggc aaaaactcat      540
aattagctac aaaatattgt cgtagcaata atTTTTtata tctattaatg caattattac      600
tacatgcttt tataacttga ggcaaaaata tctaatagct ataacatttt gttagaagta      660
atTTTTgtgg ctataaaatt ggtattgcta cagtaatttc aaatgcgtgg caaaaaaata      720
cgattaacta cgaaatttta ttgtagcaat aactttgtag ctatttggtt aatattgcta      780
cgacagttag caattatagc aaaaatgcta aatcagcttt gtcaatttaa tttttagct      840
aattttttta tgaaattgta aatagctatg aaattttaat ttttgtggct attgttaggt      900
attagccaca tatagctaag aattttagc tatatatata taatgttgta gtggcaaat      960
ctaacattgt acgcttggct gccctttttt ttttttttgg ctacaaaact ctaaagtaaa     1020
ggaactagaa aactcgtttg gcgagagaaa gagagagatg                               1060

```

<210> 7

<211> 1060

<212> DNA

<213> *Nicotiana sylvestris*

<400> 7

```

aattttat tttt cgtaaaattt ctctaatttg gacaaactct tatattgatt tttttaatca      60
aagccaaaat atttatttta ctatgaaaat tttttaacaa ctaatttatt atggtaaata      120
atattgatat ggtaacttca agcacatgat aaaaattata actaactgca gaagtttact      180
gtctctttga atcttgtggg tatatcattc tatcataaca aatacttgta gctaataagc      240
caacgatgtt ctcggtttca tataatttga attttaaaat agttttttaa tttaatatTT      300
atttcaaatt attattgtgg ctaacatggt ataaccgcag taatatttgg agatgcaata      360

```

12

cttatattta gcttgaaaat tttattgtat cagaacaagt ttgtagctat taagttagtt	420
tttgccacaa atttttataa ttgaagcaaa aataacctatt cagctacagt attttgtatc	480
gagtaatatt ttgtgactag aagattaata ttgctacagt aatttcagac gtgtggcaaa	540
aactcataat tagctacaaa atattgtcgt agcaataatt tttatatctt attaatacaa	600
ttattgctac atgcttttat aacttgaggc aaaaatatct atttagctat aacattttat	660
taaaagtaat ttttgtggct ataaagttgt tattgctaca gtaatttcaa atgctgtggc	720
aaaaaaatac gatttagctac gaaattttat tgtagcaata aattttagc tatttgggta	780
atattgctac gacagttagc aattatagca aaaatgctaa attagctttg ttaatttaat	840
ttttagctca aactttttta tgaaatttta atttttgtgg ctattgatag gtattagcta	900
caattttcat atatgtagct aagaatttgt agctatatat acataatgtt gtagtggcaa	960
attctaacat tgtacgcttg gctgcccttt ttttttggct acaaaaactct aaagtaaagg	1020
aactagaaaa ctcgtttggc gagagaaaga gagagagatg	1060

<210> 8

<211> 1087

<212> DNA

<213> *Nicotiana sylvestris*

<400> 8

aattttatttt cgtaaaattt ctctaatttt tggacaaact cttatatattgg ttttttaatc	60
aaagccaaaa tattttattta actatgaaat tttgttgaac aactaattta ttatggtaaa	120
taatattgat atggtaactt caagcacatg acaaaaatta taactaactg cagaagtta	180
ctgtctctct gaatcttgtg gctatatcat tctatataac aaatacttgt agctaataag	240
ccaacgatgt tctcggtttc atataatttg aatttttaaa tagtttttaa atttaattat	300
tatttcaaat cattattgtg gctagcatgt tataaccgca gtaatatttg gagatgcaat	360
acttatattt agctacaaaa ttttattgta tcagaataag tttgtaacta ttaagttagt	420
ttttgccaca aatttttata attgaagcaa aaataacctat tcagctacga tattttgtat	480
cgagtaatat tttgtgacta gaagattaat attgctagag taatttcaga cgtgtggcaa	540
aaactcataa ttagctacaa aatattgtcg tagcaataat tgtttatatc tattaatcca	600
attattgcta tatgctttta taacttgagg caaaaatatt tatttagcta taacattttg	660
ttagaagtaa tttttgtggc tataaagttg ttattgctac ggtaatttca aatgcgtggc	720
aaacaaatac gatttagctac gaaattttat tgtagcaata aattttagc tatttgggta	780
atattgctac gacagttagc aattatagca aaaatgctaa attagctttg tcaatttaat	840
tttttagcta aattttttta taaaattgta aatagccatg aaattttaat ttttgtggct	900
attgttaggt attagccaca attttcatat atgtatctaa gaattttag ctatatatac	960
ataatgttgt agtggcaaat tctaacattg taagcttagc tgcccttttt tttttttttt	1020

13

tttggtaca aaactctaaa gtaaaggaac tagaaaactc gtttggcgag agaaagaggg 1080
atccatg 1087

<210> 9

<211> 630

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> enhancer

<400> 9

tacagtctca gaagaccaa gggctattga gacttttcaa caaagggtaa tatcgggaaa 60
cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcacttcac aaaaggacag tagaaaagga 120
aggtggcacc tacaatgcc atcattgcga taaaggaaag gctatcggtc aagatgcctc 180
tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga 240
cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtggg ttgatgtgaa catggtggag cactgacactc 300
tcgtctactc caagaatata aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct attgagactt 360
ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact 420
tcatcaaaag gacagtagaa aaggaagggtg gcacctacaa atgccatcat tgcgataaag 480
gaaaggctat cggtcaagat gcctctgccg acagtgtgcc caaagatgga cccccacca 540
cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat 600
gtgatatctc cactgacgta agggatgacg 630



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 662752
FR 0500855

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	WO 99/38957 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION; THE REGENTS OF THE UN) 5 août 1999 (1999-08-05)	1-5, 13-17, 19-21	C12N15/82 A01H5/00 A01H5/10
Y	* page 5, ligne 28 - ligne 36; revendications 1-12; figures 1,3 * * page 6, ligne 26 - page 7, ligne 8 * * page 16, ligne 11 - page 17, ligne 24 * * page 11, ligne 9 - ligne 14 *	6-10,18, 22	C12P7/04 C12P7/02
Y	MAHMOUD S S ET AL: "Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 98, no. 15, 17 juillet 2001 (2001-07-17), pages 8915-8920, XP002965001 ISSN: 0027-8424	6,7,10, 18,22	
A	* abrégé; figures 1,2 *	1-3, 13-16, 19-21	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12N
	* page 8918, colonne de droite, alinéa 2 - page 8919, colonne de droite, alinéa 3 *		
Y	AHARONI A ET AL: "Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 15, no. 12, décembre 2003 (2003-12), pages 2866-2884, XP002322003 ISSN: 1040-4651 * abrégé; figures 6,7 *	10	
	----- -/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 septembre 2005		Gurdjian, D	
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			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 662752
FR 0500855

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		
D,Y	BESUMBES OSCAR ET AL: "Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. 20 OCT 2004, vol. 88, no. 2, 20 octobre 2004 (2004-10-20), pages 168-175, XP002347300 ISSN: 0006-3592 * abrégé; figures 1,2 *	8,9	
D,Y	WANG E ET AL: "Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing" PLANTA, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 216, no. 4, février 2003 (2003-02), pages 686-691, XP002318258 ISSN: 0032-0935 * abrégé; figure 1 *	6,7,18	
A	IIJIMA YOKO ET AL: "The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 136, no. 3, novembre 2004 (2004-11), pages 3724-3736, XP002347301 ISSN: 0032-0889 * abrégé; figures 1-3 *	1,6,10, 11,15, 18,21,22	
----- -/--			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 septembre 2005		Gurdjian, D	
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			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 662752
FR 0500855

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	WO 01/20008 A (UNIVERSITEIT LEIDEN; HOGE-MEPPELINK, ANNEKE HF; SCARPELLA, ENRICO; MEI) 22 mars 2001 (2001-03-22) * page 22, alinéa 3; revendications 1-25; figure 3 * * page 4, ligne 23 - ligne 26 *	1-22	
A	WO 99/19460 A (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION; CROTEAU, RODNEY, B; W) 22 avril 1999 (1999-04-22) * abrégé; exemples 1,2 *	10-12	
A	HERMANN S R ET AL: "Promoters derived from Banana bunchy top virus-associated components S1 and S2 drive transgene expression in both tobacco and banana" PLANT CELL REPORTS, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 20, no. 7, octobre 2001 (2001-10), pages 642-646, XP002309599 ISSN: 0721-7714	1,15,21, 22	
A,D	LIU^A H-C ET AL: "Cloning and promoter analysis of the cotton lipid transfer protein gene Ltp3<1>" BIOCHIMICA AND BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1487, no. 1, 24 août 2000 (2000-08-24), pages 106-111, XP004277398 ISSN: 1388-1981	1,15,21, 22	
A	WO 00/17327 A (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH DEPARTMENT; THE SALK INSTITUTE FOR BIO) 30 mars 2000 (2000-03-30) * revendications 138-162 *	1-22	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 septembre 2005		Gurdjian, D	
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 0500855 FA 662752**

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 29-09-2005

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9938957 A	05-08-1999	AU 2490399 A	16-08-1999
WO 0120008 A	22-03-2001	AU 5824400 A	17-04-2001
WO 9919460 A	22-04-1999	AU 741393 B2	29-11-2001
		AU 1089099 A	03-05-1999
		CA 2306207 A1	22-04-1999
		EP 1023436 A1	02-08-2000
		JP 2001520004 T	30-10-2001
		NZ 503964 A	25-05-2001
		US 6303330 B1	16-10-2001
		US 5876964 A	02-03-1999
WO 0017327 A	30-03-2000	AU 776690 B2	16-09-2004
		AU 6045899 A	10-04-2000
		AU 2004242423 A1	20-01-2005
		BR 9913878 A	12-06-2001
		CA 2342053 A1	30-03-2000
		EP 1121422 A2	08-08-2001
		JP 2002526066 T	20-08-2002
		MX PA01002805 A	04-06-2002
		NO 20011359 A	15-05-2001
		PL 347308 A1	25-03-2002