



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2005/10/12
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2006/04/20
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2014/01/28
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2007/03/26
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2005/002530
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2006/040479
(30) Priorité/Priority: 2004/10/13 (FR0410799)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/82* (2006.01),
C07K 14/415 (2006.01), *C12N 15/29* (2006.01),
C12N 5/10 (2006.01), *C12P 21/02* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
TISSIER, ALAIN, FR;
SALLAUD, CHRISTOPHE, FR;
RONTEIN, DENIS, FR

(73) Propriétaire/Owner:
PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A., CH

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROMOTEURS VEGETAUX ET UTILISATIONS
(54) Title: PLANT PROMOTERS AND USES THEREOF

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente demande concerne des outils, méthodes et compositions pour la modification de plantes et/ou l'expression de protéines dans des plantes. Elle concerne notamment des promoteurs transcriptionnels permettant une expression spécifique dans les trichomes, des constructions contenant ces promoteurs, et leurs utilisations pour modifier génétiquement des cellules, graines ou plantes. L'invention concerne également des procédés de production de plantes transgéniques exprimant des protéines ou métabolites d'intérêt. L'invention est applicable de manière générale à toute plante possédant des trichomes glanduleux, et à l'expression de toute protéine d'intérêt industriel, notamment thérapeutique ou phytosanitaire.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
20 avril 2006 (20.04.2006)(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/040479 A2(51) Classification internationale des brevets⁷ :**C08G 77/38**

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2005/002530

(22) Date de dépôt international :

12 octobre 2005 (12.10.2005)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

0410799

13 octobre 2004 (13.10.2004)

FR

(71) **Déposant** (*pour tous les États désignés sauf US*) : **LIBRO-PHYT** [FR/FR]; 24 rue Raspail, F-84120 PERTUIS (FR).(72) **Inventeurs; et**(75) **Inventeurs/Déposants** (*pour US seulement*) : **TISSIER, Alain** [FR/FR]; 24 rue Raspail, F-84120 PERTUIS (FR). **SALLAUD, Christophe** [FR/FR]; 233 avenue du Littoral, F-34070 MONTPELLIER (FR). **RONTEIN, Denis** [FR/FR]; Rue du Thor, F-04100 MANOSQUE (FR).(74) **Mandataires** : **GALLOIS, Valérie** etc.; Cabinet BECKER & ASSOCIES, 25 rue Louis Le Grand, F-75002 PARIS (FR).(81) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))***Publiée :**— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport**En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*(54) **Title:** PLANT PROMOTERS AND USES THEREOF(54) **Titre :** PROMOTEURS VEGETAUX ET UTILISATIONS(57) **Abstract:** The invention concerns tools, methods and compositions for modifying plants and/or protein expression in plants. It concerns in particular transcriptional promoters enabling specific expression in the trichomes, constructs containing said promoters, and their uses for genetically modifying cells, seeds or plants. The invention also concerns methods for producing transgenic plants expressing proteins or metabolites of interest. The invention is generally applicable to any plant having glandular trichomes, and to the expression of any protein of industrial interest, in particular therapeutic or phytosanitary.(57) **Abrégé :** La présente demande concerne des outils, méthodes et compositions pour la modification de plantes et/ou l'expression de protéines dans des plantes. Elle concerne notamment des promoteurs transcriptionnels permettant une expression spécifique dans les trichomes, des constructions contenant ces promoteurs, et leurs utilisations pour modifier génétiquement des cellules, graines ou plantes. L'invention concerne également des procédés de production de plantes transgéniques exprimant des protéines ou métabolites d'intérêt. L'invention est applicable de manière générale à toute plante possédant des trichomes glanduleux, et à l'expression de toute protéine d'intérêt industriel, notamment thérapeutique ou phytosanitaire.

WO 2006/040479 A2

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

**LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS
COMPREND PLUS D'UN TOME.**

CECI EST LE TOME __1__ DE __2__

NOTE: Pour les tomes additionels, veuillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

**THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE
THAN ONE VOLUME.**

THIS IS VOLUME __1__ OF __2__

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

PROMOTEURS VEGETAUX ET UTILISATIONS

La présente demande concerne des outils, méthodes et compositions pour la modification de plantes et/ou l'expression de protéines dans des plantes. Elle concerne notamment des promoteurs transcriptionnels permettant une expression spécifique dans les trichomes, des constructions contenant ces promoteurs, et leurs utilisations pour modifier génétiquement des cellules, graines ou plantes. L'invention concerne également des procédés de production de plantes transgéniques exprimant des protéines ou métabolites d'intérêt. L'invention est applicable de manière générale à toute plante possédant des trichomes glanduleux, et à l'expression de toute protéine d'intérêt industriel, notamment thérapeutique ou phytosanitaire.

INTRODUCTION

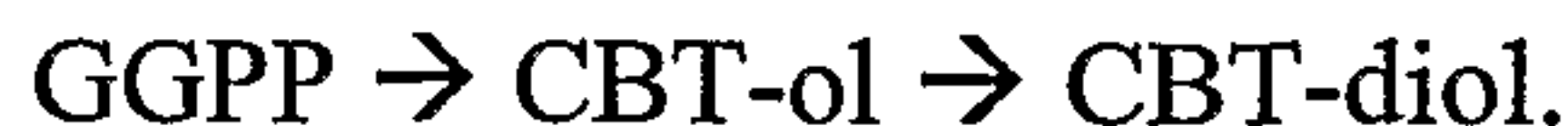
Les feuilles de certaines plantes supérieures (Angiospermes) possèdent à leur surface des organes dénommés trichomes qui, en fonction de leur anatomie, sont principalement divisés en deux types : les trichomes non sécréteurs d'une part et les trichomes sécréteurs d'autre part. Les trichomes glanduleux sécréteurs ont pour principale fonction de sécréter à la surface de la feuille des huiles ou essences composées de quelques molécules majoritaires.

Chez le tabac, les trichomes glanduleux sécréteurs sont composés d'un pied constitué d'une file de quelques cellules (3-5) et d'une tête rassemblant un nombre variable (2-20) de cellules sécrétrices. Ces cellules sécrètent majoritairement des esters de sucrose et des diterpènes. Ces derniers peuvent représenter jusqu'à 60% de l'exsudat et 10% du poids sec de la plante adulte (Wagner *et al.*, 2004). Chez les espèces cultivées de tabac (*Nicotiana tabacum*), les diterpènes produits appartiennent à deux familles distinctes, les labdanes et les cembranes. Les taux de production relatifs des deux familles sont dépendants du cultivar avec cependant une production de cembranes qui est généralement 4 à 10 fois plus forte que la production de labdanes. Chez *N. sylvestris*, l'un des progéniteurs supposés de *N. tabacum*, les labdanes sont absents et un composé appartenant à la famille des cembranes, le cembratriène-diol (CBT-diol), représente à lui seul plus de 60% des terpènes produits par la plante.

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 géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), produit par la voie dite de « Rohmer » (Rohmer *et al.*, 1996), s'effectue dans le chloroplaste.

- 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 :



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 :

- une séquence présentant une forte similarité avec des séquences codant pour des terpène-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).

Des expériences d'extinction de l'expression de ces gènes par co-suppression et RNAi chez le *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 diminution de l'expression du gène CYP71D16 dans les trichomes. Ces travaux ont 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 du mRNA 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 plusieurs gènes de CBT-ol cyclases.

L'expression de protéines dans les plantes et/ou la modification génétique des plantes pour leur conférer des propriétés particulières, représentent un attrait majeur, à la fois dans le domaine phytosanitaire et pharmaceutique. La mise à disposition d'outils capables de contrôler ou réguler l'expression de gènes dans les plantes constitue donc un

élément clé dans l'exploitation et le développement de ces systèmes. Le développement de promoteurs ou autres séquences régulatrices spécifiques de tissus, notamment des trichomes sécréteurs, constituerait à cet égard un atout très important.

Dans ce contexte, 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).

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 spécifique, avec notamment un signal dans les cellules épidermiques (cf Tableau 1).

Il existe donc aujourd'hui un besoin important de promoteurs ou séquences régulatrices de l'expression, adaptées à l'expression de gènes dans des plantes, et permettant notamment une expression forte et spécifique de tissus, en particulier des trichomes sécréteurs.

RESUME DE L'INVENTION

La présente demande décrit l'identification et la caractérisation de séquences d'acide nucléique régulatrices d'origine végétale, qui permettent de diriger de manière spécifique l'expression d'un gène d'intérêt dans les cellules sécrétrices des trichomes de plante. Ces promoteurs sont aisément manipulables, de taille raisonnable, modulables, adaptables à l'expression de gènes hétérologues, et capables de causer une expression spécifiquement dans certains tissus végétaux. La présente demande décrit ainsi des

promoteurs, cassettes d'expression et vecteurs utilisables pour la modification de plantes et l'expression de produits d'intérêt dans des cellules ou tissus végétaux.

10 Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans un acide nucléique ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel dans les trichomes glanduleux, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 et 22, un fragment de celles-ci d'au moins 100 bases consécutives ou un variant fonctionnel de celles-ci. Plus particulièrement, l'acide nucléique comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 et 22, et un fragment de celles-ci d'au moins 100 bases consécutives ou une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une d'entre-elles, et est spécifique des trichomes glanduleux, notamment des cellules sécrétrices des trichomes glanduleux.

L'invention concerne un acide nucléique ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel spécifique des cellules sécrétrices des trichomes glanduleux, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 et 22, un fragment de la séquence sélectionnée parmi les SEQ ID Nos 1, 2, 3, 4 et 22 d'au moins 100 nucléotides consécutifs ou un variant fonctionnel de la SEQ ID NO: 2 présentant au moins 80 % d'identité avec la SEQ ID NO: 2

20 Un autre objet de l'invention réside dans un peptide de transit dans le chloroplaste de cellules végétales, comprenant la séquence MSQSIPLMFHFAKFQSNIWRCNTSQLRVIHSSYASFGGRRKERVRRMNRAM DLSS (SEQ ID NO :10) ou un fragment fonctionnel de celle-ci, ainsi que dans un acide nucléique codant un tel peptide.

L'invention concerne également toute cassette d'expression recombinante comprenant un gène d'intérêt lié de manière opérationnelle à un acide nucléique tel

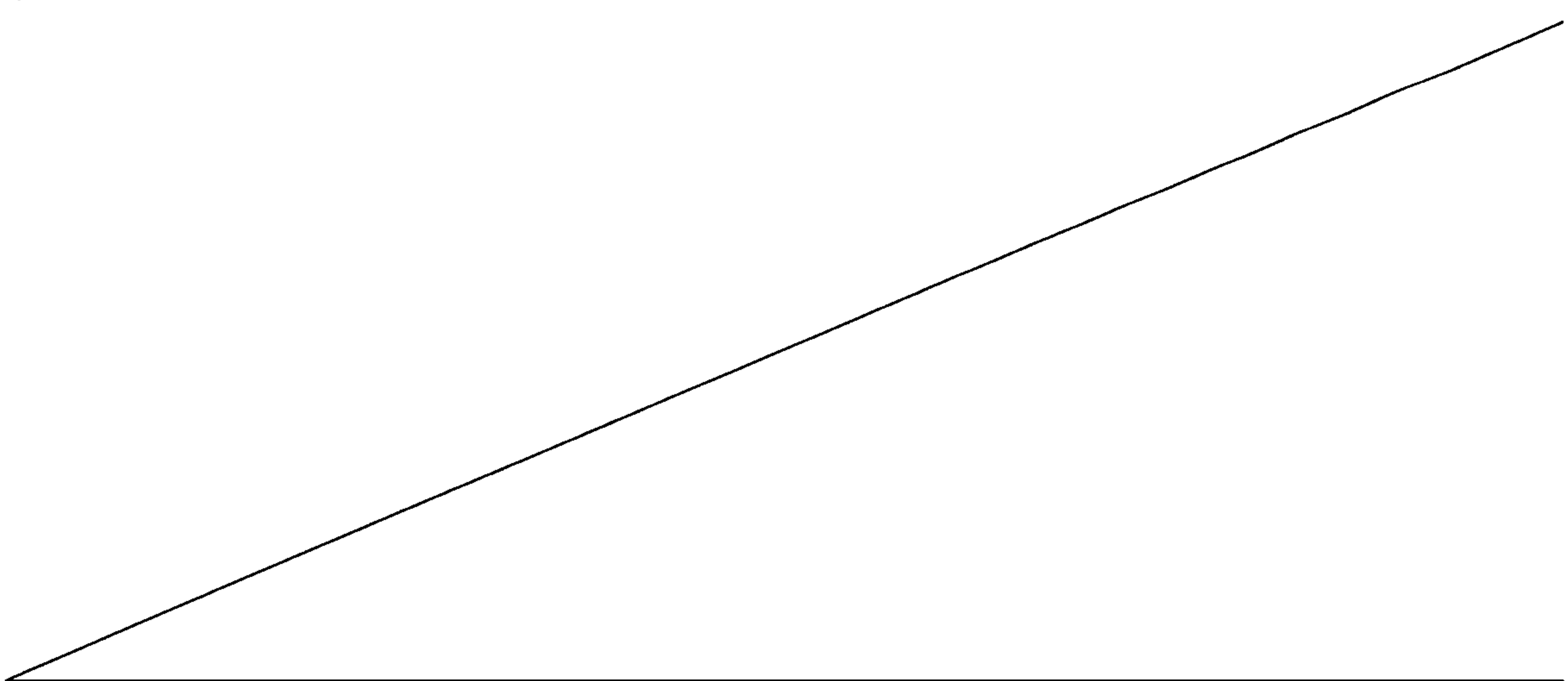
4a

que défini ci-dessus ; tout vecteur d'expression comprenant un acide nucléique ou une cassette tels que définis ci-dessus ; et toute cellule modifiée comprenant une cassette ou un vecteur tels que définis ci-dessus. De préférence, la cellule est une cellule de plante, notamment de la famille des Solanacées, Astéracées, Cannabacées ou Lamiacées.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'une protéine dans les trichomes d'une plante, comprenant l'introduction dans ladite plante d'une cassette ou d'un vecteur tels que définis ci-dessus, comprenant un gène codant ladite protéine.

- 10 Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'une protéine dans les trichomes d'une plante, comprenant l'introduction dans une cellule ou graine de plante d'une cassette ou d'un vecteur tels que définis ci-dessus, comprenant un gène codant ladite protéine, et la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule ou graine.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'une plante exprimant une protéine recombinante, comprenant l'introduction dans une cellule ou graine de _____



plante d'une cassette ou d'un vecteur tels que définis ci-dessus, comprenant un gène codant ladite protéine, et la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule ou graine. Avantageusement, ladite protéine est une enzyme dont l'activité dans les cellules sécrétrices conduit à une modification de la composition de l'exsudat.

Un autre avantage consiste en ce que la plante sécrète la protéine dans le trichome glanduleux, et la protéine est récupérée à partir de l'exsudat de la surface des feuilles.

Un autre objet de l'invention concerne toute plante ou graine comprenant une cassette d'expression ou un vecteur tels que définis ci-dessus.

L'invention vise également l'utilisation d'un acide nucléique tel que défini ci-dessus pour l'expression d'une protéine spécifiquement dans les trichomes glanduleux d'une plante. Elle concerne également des kits comprenant les acides nucléiques, vecteurs, cassettes et/ou cellules tels que décrits précédemment.

Comme il sera décrit en détails dans la suite du texte, la présente invention est applicable à l'expression de tout gène d'intérêt dans toute plante ou tissu végétal, de préférence des plantes supérieures comprenant des trichomes glanduleux, pour des applications variées, comme la production de produits d'intérêt pharmaceutique ou phytosanitaire, ou la production de plantes ayant des propriétés améliorées ou adaptées.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La présente demande décrit l'identification de promoteurs spécifiques des trichomes de plantes à partir de gènes de CBT-ol synthase de tabac. A partir de la séquence d'un ADNc codant pour une terpène synthase, i.e. CBT-ol cyclase (CYC-2 ; NID : AF401234), quatre gènes (notés NsTPS-02a, 02b, 03, et 04) possédant une forte similarité de séquence avec CYC-2 ont été identifiés à partir d'ADN génomique de l'espèce *Nicotiana Sylvestris*, en utilisant des techniques faisant appel à la PCR.

Une analyse de l'expression a montré que ces gènes (notamment NsTPS-02a, 02b, et 03) s'expriment dans les trichomes de tabac.

Les séquences promotrices, inconnues à ce jour, situées en amont de l'ATG de chacun de ces quatre gènes, ont été identifiées et caractérisées. La taille de chacune des séquences est d'environ 1 kb. Leurs séquences sont représentées dans les SEQ ID NO: 1

à 4. L'alignement des quatre séquences montre qu'elles possèdent plus de 93% d'identité entre elles (Figure 1, Tableau 2). En outre, cet alignement permet d'identifier des régions identiques, certainement impliquées dans la spécificité d'expression.

La construction de cassettes d'expression recombinantes utilisant ces promoteurs a permis de montrer, de manière inattendue, un profil d'expression restreint et spécifique des cellules des trichomes sécréteurs. Un tel profil était inattendu dans la mesure où les caractéristiques d'expression des terpène-synthases n'étaient nullement documentées dans l'art antérieur. D'ailleurs, les résultats obtenus par les demandeurs montrent même que le gène CYC-1 (NID : AY049090) dont la séquence génomique avait été déposée par G. Wagner, est peu exprimé dans les trichomes de *N. tabacum*.

La présente demande fournit donc des promoteurs nouveaux, particulièrement avantageux pour l'expression de protéines dans des plantes ou tissus végétaux, notamment pour l'expression spécifique dans les cellules des trichomes glanduleux. De tels promoteurs sont particulièrement avantageux puisqu'ils permettent la production de produits recombinants directement dans l'exsudat sécrété par les feuilles, permettant ainsi une récupération très aisée des produits recombinants, le cas échéant.

Un objet particulier de l'invention réside donc dans tout acide nucléique ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel dans les trichomes glanduleux, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 et 22, un fragment de celles-ci d'au moins 100 bases consécutives ou un variant fonctionnel de celles-ci (ou de leur brin complémentaire).

Dans un mode de mise en œuvre particulier, l'invention concerne tout acide nucléique tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 et 22, un fragment de celles-ci d'au moins 100 bases consécutives ou une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une d'entre-elles, et en ce qu'il possède une activité de promoteur transcriptionnel spécifique des trichomes glanduleux.

Dans un mode de réalisation spécifique de l'invention, l'acide nucléique comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 et 22, de préférence de la séquence SEQ ID NO: 2.

Comme illustré dans les exemples, la séquence de 1065 paires de bases du promoteur du gène TPS-02b (SEQ ID NO: 2) a été fusionnée en amont d'un gène rapporteur *uidA* (la séquence de la fusion du promoteur TPS02b avec le gène *uidA* est représentée dans SEQ ID NO: 5). Cette construction (cassette N°1) a été introduite dans un vecteur T-DNA (pBI121) possédant un gène de résistance pour la kanamycine sous la dépendance du promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium Tumefaciens* (nos). Ce T-DNA a été introduit dans *N. sylvestris* par transformation génétique en utilisant la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1993). L'expression du gène *uidA* dans plusieurs transformants a été détectée. Les résultats présentés sur la figure 2 montrent une expression dans les cellules sécrétrices, mais pas dans les cellules constituant le pied des trichomes. En outre, aucune expression du gène *uidA* n'a été trouvée dans les autres organes de la plante. Ces résultats démontrent que la séquence étudiée permet de diriger l'expression d'un gène hétérologue dans les cellules sécrétrices des trichomes glanduleux de manière très spécifique.

Au sens de l'invention, on entend par « acide nucléique » toute molécule à base d'ADN ou d'ARN. Il peut s'agir de 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.

Au sens de l'invention, on entend par promoteur "spécifique" un promoteur principalement actif dans un tissu ou groupe cellulaire donné. Il est entendu qu'une expression résiduelle, généralement plus faible, dans d'autres tissus ou cellules ne peut être entièrement exclue. Par exemple, l'expression résiduelle dans d'autres tissus ou cellules ne dépasse pas 30 % de l'expression observée dans les trichomes glanduleux, de préférence ne dépasse pas 20 %, 10% ou 5 %. 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 des produits d'intérêt.

Un "fragment" d'un acide nucléique selon l'invention désigne avantageusement un fragment comprenant au moins 10 bases consécutives, plus généralement au moins 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100. Des "fragments" d'un acide nucléique sont typiquement des fragments de 100, 200, 300, 400 ou 500 nucléotides consécutifs de la séquence ou plus. Des "fragments" d'un acide nucléique sont de préférence des

fragments d'au moins 100, 200, 300, 400 ou 500 nucléotides consécutifs de la séquence. Les "fragments" d'un acide nucléique peuvent être utilisés seuls, ou combinés à d'autres régions transcriptionnelles, pour constituer des promoteurs chimériques ayant une spécificité pour les trichomes glanduleux. Un promoteur selon l'invention est typiquement une région de la séquence possédant une activité de promoteur.

La figure 1 montre que les promoteurs de l'invention possèdent un pourcentage d'identité très élevé entre eux. A cet égard, l'analyse de ces séquences a permis aux inventeurs d'identifier des parties de ces séquences comme des motifs conservés nécessaires à l'expression spécifique dans les cellules sécrétrices des trichomes. L'élimination de ces motifs entraîne une diminution significative de l'expression ou une perte de la spécificité de l'expression. Ces motifs, au nombre de trois, sont définis par les séquences consensus suivantes, où les lettres K, W et Y représentent des bases d'acides nucléiques suivant le code de la nomenclature internationale avec K = G ou T, W = A ou T, et Y = C ou T :

- Motif 1 : 5'-KKTCGTWGCAT-3' (SEQ ID NO : 6)
- Motif 2 : 5'-AGTAATWTY-3' (SEQ ID NO : 7)
- Motif 3 : 5'-TTGTAGCWAW-3' (SEQ ID NO : 8)

Dans un mode de réalisation préféré, un fragment au sens de l'invention comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 6, 7 ou 8. De même, un objet particulier de l'invention concerne tout acide nucléique comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 6, 7 ou 8 ou un variant fonctionnel de celles-ci. De tels acides nucléiques sont typiquement des acides nucléiques recombinants ayant une activité de promoteur transcriptionnel. Il peut s'agir notamment de promoteurs chimériques, c'est-à-dire comprenant une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 6, 7 ou 8 ou un variant fonctionnel de celles-ci, liée de manière opérationnelle à un promoteur minimum.

Le terme "variant fonctionnel" désigne tout acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications (c'est-à-dire par exemple une mutation, délétion, ou addition d'une ou plusieurs bases) par rapport aux séquences parentes décrites dans la présente demande, et conservant une activité, soit de promoteur transcriptionnel, soit de signal spécificité d'expression, soit de transit. Les variants fonctionnels peuvent correspondre par exemple aux promoteurs issus des gènes correspondants dans d'autres espèces végétales. Ainsi, les travaux décrits dans les exemples de la présente demande ont porté sur des séquences de l'espèce *Nicotiana glauca*, un des parents diploïdes présumés du tabac

cultivé, *N. tabacum*. Il est connu que les séquences de *N. sylvestris* et *N. tabacum* sont extrêmement proches (identité parfois de l'ordre de 99% entre les séquences de *N. tabacum* et *N. sylvestris*), de sorte que les promoteurs des gènes correspondants de *N. tabacum* constituent des variants fonctionnels au sens de l'invention, et peuvent être aisément préparés par des techniques classiques (hybridation, amplification, etc.). D'autres variants fonctionnels sont des acides nucléiques, synthétiques, recombinants ou naturels, dont la séquence hybride, en condition de stringence élevée, avec une des séquences SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 22 ou un fragment d'au moins 100 nucléotides consécutifs et qui possèdent une activité de promoteur transcriptionnel, notamment spécifique des trichomes glanduleux.

D'une manière générale, les variants fonctionnels sont des acides nucléiques présentant au moins 80, 85 ou 90% d'identité avec les séquences SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 ou 22, ou avec leurs fragments d'au moins 100 nucléotides consécutifs, encore plus préférentiellement, plus de 95% d'identité obtenus par le programme d'alignement de séquences blastN (Altschul et al., 1990).

Le pourcentage d'identité est déterminé en comparant deux séquences dont un alignement optimal a été réalisé. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions pour lesquelles un résidu identique apparaît sur les deux séquences à la même position divisé par le nombre de positions totales et multiplié par 100. L'alignement optimal des deux séquences peut être obtenu par exemple avec un algorithme de recherche d'homologie local (Smith & Watherman, 1981) ou des systèmes équivalents connus de l'homme du métier,

Les gènes identifiés ont également permis la caractérisation d'un peptide de transit, capable de cibler ou diriger une protéine hétérologue dans le compartiment chloroplastique des cellules végétales, notamment des trichomes. Ainsi, il est connu que les diterpène synthases possèdent, à leur extrémité N terminale, une séquence signal peptidique nécessaire à leur localisation dans le compartiment chloroplastique, lieu de biosynthèse du géranylgéarnylpyrophosphate (GGPP) (Trapp et Croteau, 2001). En utilisant le programme ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 2000, Nielsen *et al.*, 1997), un peptide de transit putatif de 51 acides aminés (AA) a été identifié à partir de la séquence codante du gène TPS-02a. Ce peptide de transit (plus les 6 AA suivants) a été introduit dans la cassette N°1, en amont du gène *uidA* et en aval du promoteur TPS-02b. De cette façon, une fusion traductionnelle du peptide de transit avec la protéine GUS a été réalisée. Cette construction (cassette N°2) a été introduite dans un vecteur T-DNA

(pBI121) possédant un gène de résistance pour la kanamycine sous la dépendance du promoteur du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV 35S). Ce T-DNA a été introduit dans *N. sylvestris* par transformation génétique en utilisant la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema *et al.*, 1993).

Comme pour la cassette N°1, l'expression du gène *uidA* chez plusieurs transformants a été uniquement détectée dans les cellules sécrétrices des trichomes glanduleux. De plus, sous microscope, il a été mis en évidence que l'activité GUS était localisée dans les plastes, indiquant que la protéine GUS a été correctement ciblée dans le compartiment chloroplastique. Ces résultats ont démontré que la séquence étudiée, correspondant au peptide transit de la CBT-ol cyclase de *N. sylvestris* (TPS-02b), permet de diriger la localisation d'une protéine hétérologue dans le compartiment chloroplastique.

Un autre objet de la présente demande réside donc dans un peptide de transit dans le chloroplaste de cellules végétales, comprenant la séquence en acides aminés suivante MSQSIPLMFSHFAKFQSNIWRCNTSQLRVIHSSYASFGGRRKERVRRMNRAM DLSS (SEQ ID NO : 10) ou tout fragment ou variant fonctionnel de celle-ci, ainsi que dans un acide nucléique codant un peptide de transit dans le chloroplaste de cellules végétales, comprenant la séquence nucléotidique :

« ATGAGTCAATCAATTTCTCCATTAATGTTTTCTCACTTTGCAAAATTTTCAGT CGAATATTTGGAGATGCAATACTTCTCAACTCAGAGTTATACACTCATCATA TGCCTCTTTTGGAGGGAGAAGAAAAGAGAGAGTAAGAAGAATGAATCGAG CAATGGATCTTTCTTCA » (SEQ ID NO : 9), ou tout fragment variant fonctionnel de celle-ci.

L'invention concerne également toute cassette d'expression recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend un gène et/ou un promoteur d'intérêt lié(s) de manière opérationnelle à un acide nucléique tel que défini ci-dessus.

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.

Le gène d'intérêt peut être tout acide nucléique (par exemple un ADN ou un ARN) comportant une région codant un produit d'expression (par exemple un ARNm ou une protéine). Dans un mode de mise en œuvre préféré, le gène d'intérêt code une protéine thérapeutique ou phytosanitaire, une enzyme, une protéine de résistance, un activateur de transcription ou un génome viral.

Un autre objet de l'invention concerne tout vecteur (d'expression) comprenant un acide nucléique ou une cassette tels que définis précédemment. 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 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, CAMBIA, Australie), . Les vecteurs de l'invention peuvent comprendre, en outre, une origine de réplication 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, réplication, etc. Des exemples spécifiques de vecteurs au sens de l'invention sont fournis dans la partie expérimentale, et incluent notamment pLIBRO-01 et pLIBRO-02.

Les constructions génétiques de l'invention peuvent être utilisées pour la modification génétique de plantes, et notamment pour l'introduction et l'expression de protéines dans des tissus végétaux, y compris des plantes entières.

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 transgénése 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, etc.

Une technique communément utilisée repose sur l'utilisation de la bactérie *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 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 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.

Une autre technique de transformation végétale est basée sur la projection de 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. 97-105).

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.

Une fois régénérées, les plantes transgéniques peuvent être testées pour l'expression du produit d'intérêt dans les trichomes. Ceci peut être réalisé en récoltant l'exsudat des feuilles et en testant la présence du produit dans cet exsudat, lorsque le produit est destiné à être sécrété. Ceci peut également être fait en analysant la présence de produit d'expression du gène d'intérêt 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.

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 protéines en culture, ou encore pour étudier les propriétés de gènes ou protéines d'intérêt (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.

L'invention concerne encore un procédé de production d'une protéine dans une plante, notamment dans le trichome glanduleux d'une plante, comprenant l'introduction dans ladite plante d'une cassette ou d'un vecteur tels que définis précédemment, comprenant un gène codant ladite protéine.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé de production d'une protéine dans une plante, notamment dans le trichome glanduleux d'une plante, comprenant l'introduction dans une cellule ou graine de plante d'une cassette ou d'un vecteur tels que définis précédemment, comprenant un gène codant ladite protéine, et la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule ou graine.

L'invention concerne encore tout procédé de production d'une plante exprimant une protéine recombinante, comprenant l'introduction dans une cellule ou graine de plante d'une cassette ou d'un vecteur tels que définis précédemment, comprenant un gène codant ladite protéine, et la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule ou graine.

Avantageusement, la protéine recombinante exprimée dans le trichome conduit à la production par les cellules sécrétrices d'une molécule sécrétée dans l'exsudat de la surface des feuilles et/ou à une modification de la composition de l'exsudat.

Avantageusement, la plante sécrète la protéine dans le trichome glanduleux, et la protéine est récupérée à partir de l'exsudat de la surface des feuilles.

L'invention peut ainsi être utilisée pour modifier des plantes, cellules ou tissus végétaux, pour leur faire exprimer différents produits d'intérêt.

Elle peut notamment être utilisée pour l'expression de produits 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 exemple les Astéracées, Solanacées, Cannabacées et Lamiacées. 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 *Nicotiana glauca* et *N. tabacum*.

Le produit d'intérêt peut être toute protéine recombinante, y compris des peptides, enzymes, anticorps, etc. Il peut s'agir notamment d'une protéine présentant une activité biologique d'intérêt industriel, par exemple médical ou phytosanitaire. Il peut également s'agir d'une protéine destinée à conférer à la plante des propriétés particulières (notamment une modification de la composition de la sécrétion (exsudat)), comme la résistance à des pathogènes (insectes ravageurs, champignons, bactéries, virus, etc.), une meilleure croissance, une teneur modifiée en métabolite ou une voie de synthèse modifiée, etc.

L'invention peut également être utilisée pour exprimer, dans une cellule végétale ou une plante, un activateur de la transcription. Dans ce cas, l'activateur transcriptionnel produit permettra de contrôler l'expression d'une protéine d'intérêt placée sous contrôle d'un promoteur répondant à cet activateur. Un tel système binaire, utilisant deux cassettes (présentes sur un même vecteur ou sur des vecteurs distincts), permet d'amplifier l'expression spécifique obtenue grâce à l'invention. On peut citer à titre d'exemple un système comprenant une première cassette avec le gène codant pour un activateur de transcription (exemple GAL4) sous le contrôle du promoteur trichome spécifique, et une autre cassette comprenant le gène codant pour la protéine d'intérêt sous le contrôle d'éléments régulateurs reconnus par le facteur de transcription (Gal4).

Un autre système d'amplification consiste à utiliser un vecteur viral à ARN. Certains virus de plantes à ARN codent en effet pour une ARN-polymérase ARN-dépendante qui permet l'amplification de transcrits d'un gène donné. Dans ce mode de réalisation, le gène d'intérêt est cloné en aval du promoteur de cette ARN polymérase, en lieu et place

de la phase de lecture codant pour la protéine du manteau ("*coat protein*") du virus. Le virus est lui-même placé sous le contrôle du promoteur spécifique. L'expression du virus est donc restreinte aux cellules sécrétrices des trichomes, permettant ainsi une amplification sélective de l'expression du gène dans ces cellules.

D'autres aspect et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1: Alignement des séquences de promoteurs de l'invention : Les séquences des 4 promoteurs TPS d'une longueur d'environ 1 kb ont été alignées avec le programme d'alignement AlignX (VectorNTI suite, InformaxInc®). Les motifs nécessaires à l'activité trichome spécifique sont encadrés en gris.

Figure 2: Visualisation sous microscope (A et B) et loupe binoculaire (B et D) des cellules glandulaires des trichomes de différents organes après coloration histochimique des tissus avec le substrat X-Gluc. L'expression du gène rapporteur *uidA*, visualisée par une coloration bleue, est uniquement détectée dans les cellules glandulaires du trichome. Les cellules de la base du trichome ne montrent aucune coloration. Les colorations ont été réalisées sur deux lignées de tabac transformées avec la construction pLIBRO-01. A et C : trichomes de feuilles, B : trichomes de tiges, D : trichomes de sépales.

EXEMPLES

1. Isolement et caractérisation des séquences

L'ADN génomique a été extrait à partir de feuilles de tabac (*N. sylvestris* ou *N. tabacum*) à l'aide d'un kit commercial de Qiagen® (DNeasy Plant Maxi Kit). Le clonage des régions promotrices des différents gènes TPS (TPS02a, 02b, 03, et 04) a été réalisé par la technique de « adaptater-anchor PCR (Siebert et al., 1995) ». Brièvement l'ADN génomique a été digéré séparément par différentes enzymes de restriction générant des bouts francs (DraI, SspI, NaeI....) et ligaturé à un adaptateur composé des amorces suivantes :

ADPR1 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGGAGGT (SEQ ID No 14) et ADPR2 5'-ACCTCCCC (SEQ ID No 15). L'identification de la région promotrice du gène TPS02 a ensuite été obtenue en réalisant successivement deux réactions de PCR (PCR1 puis PCR2) avec les primers complémentaires de

l'adaptateur (AP1 & AP2) et différentes amorces de la séquence codante du gène CYC-2 publié (N° Genbank AF401234, NID : AY495694). Pour identifier les séquences promotrices d'environ 1 kb, la réaction de PCR1 a été réalisée avec l'amorce AP1 (5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC, SEQ ID No 16) et l'amorce externe 2A04 (5'-AGAGGCATATGATGAGTGTATAACTC, SEQ ID No 17). Une fraction de la réaction de PCR1 a été utilisée pour réaliser la réaction de PCR2 avec l'amorce AP2 (5'-CTATAGGGCTCGAGCGGC, SEQ ID No 18) et l'amorce interne 2A02 (5'-ACCTCCAAATATTCGACTGAAATTT, SEQ ID No 19). Les fragments obtenus par cette méthode ont une taille qui varie entre 200 et 1000 pb. Afin d'isoler des séquences plus importantes, le même processus a été répété à partir des séquences nouvellement identifiées. Par exemple, pour identifier la séquence promotrice de 1,7 kb correspondante au gène TPS02b, la réaction de PCR1 a été réalisée sur le même matériel génomique et dans les mêmes conditions PCR mais en utilisant l'amorce externe 2G07 (5'-GTCATGTGCTTGAAGTTACCATATC, SEQ ID No 20) et l'amorce interne 2G08 (5'-GTTACCATATCAATATTATTACCAT, SEQ ID No 21). Les amplifications PCR ont toutes été réalisées dans les mêmes conditions standard de PCR avec 0.25 unité de l'enzyme Taq (fournisseur Eppendorf) dans 25 µl de mélange de réaction dans les conditions suivantes : 1 cycle à 94°C pendant 2 min, puis 35 cycles à 94°C 30 sec, 68°C 30 sec et 1 cycle à 72°C 5 min en utilisant 50 ng d'ADN génomique. Pour le clonage du promoteur TPS-02b (PromTPS02b) dans le vecteur binaire, une nouvelle amplification par PCR a été réalisée à partir d'ADN génomique avec l'amorce sens, 3A04 (séquence 5'-CTAAAGCTTAATTTATTTTGTAAACTTC, SEQ ID NO: 11) qui possède un site HindIII en 5' et l'amorce antisens, 3A03 (séquence 5'-ATGGATCCCTCTTTCTCTCGCCAAACGAGT, SEQ ID NO: 12) qui possède un site BamHI en 5'. Pour le clonage du promoteur TPS-02b comprenant le peptide transit (promTPS02b-TP), l'amorce sens 3A04 a été utilisée avec l'amorce antisens 4C01 (5'-TGGATCCTGAAGAAAGATCCATTGCTCGA, SEQ ID NO: 13), comprenant un site HindIII en 5'. Pour le clonage du promoteur TPS-02b_1.7kb (PromTPS02b_1.7, SEQ ID No 22), l'amorce sens 4E07 qui possède un site SacI en 5' (séquence 5'-TGAGCTCAAAGAGGTGAAACCTAATCTAGTATGCAA 3', SEQ ID No 23) a été utilisé avec l'amorce 3A03. Les amplifications ont été réalisées avec de l'enzyme Taq (Eppendorf®) dans les conditions suivantes : 1 cycle à 94°C pendant 2 min, et 35 cycles à 94°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min et 1 cycle à 72°C 5 min en utilisant 50 ng d'ADN génomique pour une réaction de 25 µl. Les produits PCR ont été purifiés sur une colonne Qiaquick (Qiagen®) et clonés dans le vecteur pGEM-T (Promega®). Les plasmides ainsi obtenus ont été nommés respectivement pPromTPS02b et pPromTPS02b-TP. Les clones ont été séquencés, et la séquences des régions

promotrices de 1 kb obtenues est représentée dans SEQ ID NO: 1-4. Les séquences ont été alignées (Figure 1), faisant apparaître une identité de 93% ou plus. Un alignement avec les séquences de 1,7 kb donne des pourcentages d'identité supérieurs à 90%.

2. Construction des cassettes et vecteurs de transformation

Le promoteur CaMV 35S situé en amont du gène *uidA* du vecteur binaire pBI121 (AF485783) a été éliminé par digestion enzymatique avec les enzymes HindIII et BamHI et purifié sur gel d'agarose sur une colonne Qiaquick (Qiagen®). Les séquences promotrices PromTPS02b et PromTPS02b-TP ont été purifiées sur une colonne Qiaquick (Qiagen®) après digestion des plasmides pPromTPS02b et pPromTPS02b-TP par les enzymes HindIII et BamHI. Les séquences promotrices ont été introduites dans le vecteur pBI121 au niveau des sites HindIII et BamHI en remplacement du promoteur CaMV 35S générant ainsi une fusion transcriptionnelle avec le gène *uidA*. Les constructions sont nommées pLIBRO-18 et pLIBRO-19 respectivement. Les deux vecteurs binaires pLIBRO-01 et 02 ont été introduits dans la souche d'*Agrobacterium* LBA4404 par électroporation.

Le promoteur promTPS02b_1.7 a été cloné dans le site EcoRI du vecteur pCAMBIA1391Z (NID : AF234312) donnant ainsi le vecteur pLIBRO-32.

3. Transformation génétique

Des lignées de tabacs transgéniques (*N. sylvestris*) portant les constructions pLIBRO-01, pLIBRO-02 et pLIBRO-32 ont été obtenues par transformation génétique avec les souches d'*Agrobacterium* correspondantes en utilisant la méthode des disques foliaires (Horsch et al., 1985). La sélection des lignées transformées a été réalisée avec 100 mg/L de sulfate de kanamycine et l'élimination de la souche d'*Agrobacterium* avec 250 mg/L de Carbenicilline.

4. Analyse de l'expression du gène uidA

La visualisation de l'expression du gène *uidA* a été réalisée par un test histochimique GUS selon le protocole décrit par Jefferson *et al.*, (1987). La visualisation de la coloration obtenue a été réalisée sous une loupe binoculaire.

5. Mise en évidence d'une expression spécifique des trichomes

L'expression du gène *uidA* dans plusieurs lignées de tabac transgéniques (*N. sylvestris*) portant la construction pLIBRO-01 et pLIBRO-32 a été déterminée. Les résultats obtenus pour la construction pLIBRO-01 sont présentés sur la Figure 2 (voir légende plus haut).

Ces résultats montrent une expression dans les cellules sécrétrices, mais pas dans les cellules constituant le pied des trichomes. En outre, aucune expression du gène *uidA* n'a été trouvée dans les autres organes de la plante. Ces résultats démontrent que la séquence étudiée permet de diriger l'expression d'un gène hétérologue dans les cellules sécrétrices des trichomes glanduleux de manière très spécifique. Des résultats identiques ont été obtenus avec la construction pLIBRO-32 (résultats non présentés).

6. Mise en évidence d'un ciblage dans le chloroplaste

L'expression du gène *uidA* dans plusieurs lignées de tabac transgéniques (*N. sylvestris*) portant la construction pLIBRO-02 a été déterminée.

Comme pour la cassette N°1, l'expression du gène *uidA* chez plusieurs transformants a été uniquement détectée dans les cellules sécrétrices des trichomes glanduleux. De plus, sous microscope, il a été mis en évidence que l'activité GUS était localisée dans les cellules chloroplastiques, indiquant que la protéine GUS a été correctement ciblée dans le compartiment chloroplastique. Ces résultats ont démontré que la séquence du peptide de transit de l'invention permet de diriger la localisation d'une protéine hétérologue dans le compartiment chloroplastique.

Tableau 1

Gène Abréviation	Nom du gène	Plantes	Promoteur (bp)	Plante transformée	Expression	Références
LTP3	Lipid transfer protein	Cotton	1548	Tabac	Trichomes, épiderme périphérique des feuilles et tissus vasculaires	Liu et al., 2000, BBA, 1487:106111
			1143			
			614			
LTP6	Lipid transfer protein	Cotton	447	Tabac	trichomes et cellules de garde des stomates	Hsu et al., 1999, Plant science, 143:6370
			272			
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. 18911897

Tableau 2

	NsTPS02a- Prom1kb	NsTPS02b- Prom1kb	NsTPS03- Prom1kb	NsTPS04- Prom1Kb
NsTPS02a- Prom1kb	100	96	93	94
NsTPS02b-Prom1kb		100	93	93
NsTPS03- Prom1kb			100	93
NsTPS04- Prom1Kb				100

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410
- Bevan M (1984) Nuc. Acid. Res. 12 : 8711-8721.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:4126-4133.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S and Von Heijne G (2000) J. Mol. Biol. 300, 1005-1016
- Jefferson RA. (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994) Plant Mol. Biol. 25: 989-994.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, and Von Heijne G (1997) Prot. Eng. 10: 1-6
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ and Schilperoort RA (1983) Nature 303:179-180
- Hooykaas PJJ and Schilperoort RA (1992) Plant Mol. Biol. 19:15-38
- Horsch RB, Fry J, Hoffmann NL, Wallroth M, Eichholtz D, Rogers SG, and Fraley RT (1985) Science 227:1229-1231
- Rohmer M, Seeman M, Horbach S, Bringer-Meryer S, and Sahm H (1996) J. Am. Chem. Soc. 118:2564-2566
- Siebert PD, Chenchick A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995) Nucleic Acids Res. 23 : 1087-1088
- Siemens J, and Schieder A (1996) Plant Tiss. Cult. Biotechnol. 2:66-75
- Smith TF, and Wathernan MS (1981) Add. Appl. Math. 2 :482
- Trapp SC, and Croteau RB (2001) Genetics 158: 811-832
- Wagner GJ, Gan S, Wang E, Wang R., 2003 BREVET US 2003/0100050 A1
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW (2004) Annals of Botany 93:3-11
- Wang E, Wang R, DeParasis J, Loughrin J, Gan S, and Wagner GJ (2001) Nature 391:371-374
- Wang E, Gan S, and Wagner GJ (2002) J. Exp. 53:1891-1897
- Wang E and Wagner GJ (2003) Planta 216:686-691

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

**LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS
COMPREND PLUS D'UN TOME.**

CECI EST LE TOME __1__ DE __2__

NOTE: Pour les tomes additionels, veuillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

**THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE
THAN ONE VOLUME.**

THIS IS VOLUME __1__ OF __2__

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique ayant une activité de promoteur transcriptionnel fonctionnel spécifique des cellules sécrétrices des trichomes glanduleux, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4 et 22, un fragment de la séquence sélectionnée parmi les SEQ ID Nos 1, 2, 3, 4 et 22 d'au moins 100 nucléotides consécutifs ou un variant fonctionnel de la SEQ ID NO: 2 présentant au moins 80 % d'identité avec la SEQ ID NO: 2.
- 10 2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant au moins 90% d'identité avec la SEQ ID No: 2.
3. Acide nucléique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence sélectionnée parmi les SEQ ID Nos 1, 3, 4 et 22.
4. Acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 6, 7 et 8.
- 20 5. Cassette d'expression recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend un gène d'intérêt lié de manière opérationnelle à un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Cassette d'expression selon la revendication 5, caractérisée en ce que le gène d'intérêt code une enzyme conduisant à la modification de la composition de l'exsudat sécrété par les trichomes.
7. Cassette d'expression selon la revendication 5, caractérisée en ce que le gène d'intérêt code une protéine thérapeutique ou phytosanitaire, une enzyme, une protéine de résistance, un activateur de transcription ou un génome viral.

8. Cassette d'expression selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un acide nucléique codant un peptide de transit dans le chloroplaste de cellules végétales, comprenant la séquence MSQSIPLMFSHFQAKFQSNIWRCNTSQLRVIHSSYASFGGRRKERVRRMNRAMDLSS (SEQ ID NO : 10).

10

9. Vecteur d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou une cassette selon l'une quelconque des revendications 5 à 8.

10. Cellule modifiée comprenant une cassette selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 ou un vecteur selon la revendication 9.

11. Cellule selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de plante.

12. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de plante de la famille des Solanacées, Astéracées, Cannabacées ou Lamiacées.

20

13. Procédé de production d'une protéine dans une plante, comprenant l'introduction dans ladite plante d'une cassette selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 ou d'un vecteur selon la revendication 9, comprenant un gène codant ladite protéine.

14. Procédé de production d'une protéine dans une plante, comprenant l'introduction dans une cellule ou graine de plante d'une cassette selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 ou d'un vecteur selon la revendication 9,

comprenant un gène codant ladite protéine, et la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule ou graine.

15. Procédé de production d'une plante exprimant une protéine recombinante, comprenant l'introduction dans une cellule ou graine de plante d'une cassette selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 ou d'un vecteur selon la revendication 9, comprenant un gène codant ladite protéine, et la reconstitution d'une plante à partir de ladite cellule ou graine.

10 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que la plante sécrète la protéine dans le trichome glanduleux, et en ce que la protéine est récupérée à partir de l'exsudat de la surface des feuilles.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que la plante est une plante de la famille des Solanacées, Asteracées, Cannabacées ou Lamiacées.

20 18. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour l'expression d'une protéine spécifiquement dans les trichomes glanduleux d'une plante.

1/4

NsTPS02a-Prom1kb	1	AATTTATTTTCATAAACTTCTCTAATTTTGAACAAAATCTTATATTGATTTTTT.AAT
NsTPS02b-Prom1kb	1	AATTTATTTTGTAAACTTCTCTAATTTTGGACAAACTCTTATATTGATTTTTT.AAT
NsTPS04-Prom1Kb	1	AATTTATTTTCGTAAAATTTCTCTAATTTTGGACAAACTCTTATATTGGTTTTT.AAT
NsTPS03-Prom1kb	1	AATTTATTTTCGTAAAATTTCTCTAATTT.GGACAAACTCTTATATTGATTTTTTTAAT
Consensus	1	AATTTATTTTCGTAAACTTCTCTAATTTTGGACAAACTCTTATATTGATTTTTT.AAT
NsTPS02a-Prom1kb	60	CAAAGCCAAAATATTTATTTAACTATGAAAATTTTTT.AACAACATAATTTATTATGGTAA
NsTPS02b-Prom1kb	60	CAAAGCCAAAATATTTATTTAACTATGAAAAATTTTT.AACAACATAATTTATTATGGTAA
NsTPS04-Prom1Kb	60	CAAAGCCAAAATATTTATTTAACTATGAAATTTTGTTGAACAACATAATTTATTATGGTAA
NsTPS03-Prom1kb	59	CAAAGCCAAAATATTTATTTAACTATGAAAATTTTTT.AACAACATAATTTATTATGGTAA
Consensus	60	CAAAGCCAAAATATTTATTTAACTATGAAAATTTTTT.AACAACATAATTTATTATGGTAA
NsTPS02a-Prom1kb	119	ATAATATTGATATGGTAACTTCAAGCACATGACAAAAATTATAACTAACTGCAGAAGTTT
NsTPS02b-Prom1kb	119	ATAATATTGATATGGTAACTTCAAGCACATGACAAAAATTATAACTAACTGCAGAAGTTT
NsTPS04-Prom1Kb	120	ATAATATTGATATGGTAACTTCAAGCACATGACAAAAATTATAACTAACTGCAGAAGTTT
NsTPS03-Prom1kb	118	ATAATATTGATATGGTAACTTCAAGCACATGATAAAAATTATAACTAACTGCAGAAGTTT
Consensus	119	ATAATATTGATATGGTAACTTCAAGCACATGACAAAAATTATAACTAACTGCAGAAGTTT
NsTPS02a-Prom1kb	179	ACTGTCTCTCTGAATCTTGTGGCTATGTCATTCTATCATAACAAATACTTGTAGCTAATA
NsTPS02b-Prom1kb	179	ATTGTCTCTCTGAATCTTGTGGCTAT.....ATCATAACAAATACTTGTAGCTAATA
NsTPS04-Prom1Kb	180	ACTGTCTCTCTGAATCTTGTGGCTATATCATTCTAT.ATAACAAATACTTGTAGCTAATA
NsTPS03-Prom1kb	178	ACTGTCTCTTTGAATCTTGTGGTTATATCATTCTATCATAACAAATACTTGTAGCTAATA
Consensus	179	ACTGTCTCTCTGAATCTTGTGGCTATATCATTCTATCATAACAAATACTTGTAGCTAATA
Motif_3		
NsTPS02a-Prom1kb	239	CGCCAACGATGTTCTCGATTTTCATATAATTTGAATTTTAAAATAGCTTTTAAATTTAATA
NsTPS02b-Prom1kb	231	AGCCAACGATGTTCTCGGTTTCATATAATTTGAATTTTAAAATAGTTTTTAAATTTAATA
NsTPS04-Prom1Kb	239	AGCCAACGATGTTCTCGGTTTCATATAATTTGAATTTTAAAATAGTTTTTAAATTTAATA
NsTPS03-Prom1kb	238	AGCCAACGATGTTCTCGGTTTCATATAATTTGAATTTTAAAATAGTTTTTAAATTTAATA
Consensus	239	AGCCAACGATGTTCTCGGTTTCATATAATTTGAATTTTAAAATAGTTTTTAAATTTAATA
NsTPS02a-Prom1kb	299	TTTATTTCAAATCATTATTGTGACTAACATGTTATAACCGCAGTAATATTTGGAGATGCA
NsTPS02b-Prom1kb	291	TTTATTTCAAATCATTATTGTGGCTAACATGTTATAATCGCAGTAATATTTGGAGATGCA
NsTPS04-Prom1Kb	299	TTTATTTCAAATCATTATTGTGGCTAGCATGTTATAACCGCAGTAATATTTGGAGATGCA
NsTPS03-Prom1kb	298	TTTATTTCAAATTATTATTGTGGCTAACATGTTATAACCGCAGTAATATTTGGAGATGCA
Consensus	299	TTTATTTCAAATCATTATTGTGGCTAACATGTTATAACCGCAGTAATATTTGGAGATGCA
Motif_2		
NsTPS02a-Prom1kb	359	ATACTTATATTTAGCTACAAAATTTTATTGTATCATAATAAGTTTGTAGCTATTAAGTTA
NsTPS02b-Prom1kb	351	ATACTTATATTTAGCTACAAAATTTTATTGTATCAGAATAAGTTTGTAGCTATTAAGTTA
NsTPS04-Prom1Kb	359	ATACTTATATTTAGCTACAAAATTTTATTGTATCAGAATAAGTTTGTAACTATTAAGTTA
NsTPS03-Prom1kb	358	ATACTTATATTTAGCTTGAAAATTTTATTGTATCAGAACAGTTTGTAGCTATTAAGTTA
Consensus	359	ATACTTATATTTAGCTACAAAATTTTATTGTATCAGAATAAGTTTGTAGCTATTAAGTTA
Motif_3		
Motif_3		

FIGURE 1

2/4

NsTPS02a-Prom1kb	419	GTTTTTGCCACAAATTTTATAATTGAAGCAAAAATACCTATTCAACTACAATATTTTGT
NsTPS02b-Prom1kb	411	GTTTTTGCCACAAATTTTATAATTGAAGCAAAAATAC TTATT CAGCTACAGTATTTTGT
NsTPS04-Prom1Kb	419	GTTTTTGCCACAAATTTTATAATTGAAGCAAAAATACCTATT CAGCTAC GATATTTTGT
NsTPS03-Prom1kb	418	GTTTTTGCCACAAATTTTATAATTGAAGCAAAAATACCTATT CAGCTAC GTATTTTGT
Consensus	419	GTTTTTGCCACAAATTTTATAATTGAAGCAAAAATACCTATT CAGCTACA ATATTTTGT
NsTPS02a-Prom1kb	479	ATCGAGTAATATTTTGTGACTAGAAAGATTAATATTAT T TACAGTAATTT CAGACGTGTGGC
NsTPS02b-Prom1kb	471	ATCGAGTAATATTTTGTGACTAGAAAGATTAATATTGCTACAGTAATTT CAGACGTGTGGC
NsTPS04-Prom1Kb	479	ATCGAGTAATATTTTGTGACTAGAAAGATTAATATTGCTAGAGTAATTT CAGACGTGTGGC
NsTPS03-Prom1kb	478	ATCGAGTAATATTTTGTGACTAGAAAGATTAATATTGCTACAGTAATTT CAGACGTGTGGC
Consensus	479	ATCG AGTAATATTT TGTGACTAGAAAGATTAATATTGCTAC AGTAATTT CAGACGTGTGGC
		Motif_2 Motif_2
NsTPS02a-Prom1kb	539	AAAAACTCATAATTAT TCTAC AAAATATTGTCGTAGCAATAATTTTTTATATCTATTAATC
NsTPS02b-Prom1kb	531	AAAAACTCATAATTAGCTACAAAATATTGTCGTAGCAATAATTTTTTATATCTATTAAT G
NsTPS04-Prom1Kb	539	AAAAACTCATAATTAGCTACAAAATATTGTCGTAGCAATAAT GTTT TATATCTATTAATC
NsTPS03-Prom1kb	538	AAAAACTCATAATTAGCTACAAAATATTGTCGTAGCAATAATTTTTTATATCTATTAATC
Consensus	539	AAAAACTCATAATTAGCTACAAAATAT TGTCGTAGCAATA ATTTTTTATATCTATTAATC
		Motif_1
NsTPS02a-Prom1kb	599	CAATTATTGCTACATGCTTTTATAACTTGAGGCAAAAATATCTATTTAGCTATAACATTT
NsTPS02b-Prom1kb	591	CAATTATT ACTACATGCTTT TATAACTTGAGGCAAAAATATCTAAT.AGCTATAACATTT
NsTPS04-Prom1Kb	599	CAATTATTGCTAT TATGCTTT TATAACTTGAGGCAAAAATAT TTATT TTAGCTATAACATTT
NsTPS03-Prom1kb	598	CAATTATTGCTACATGCTTTTATAACTTGAGGCAAAAATATCTATTTAGCTATAACATTT
Consensus	599	CAATT ATTGCTACATGCTTT TATAACTTGAGGCAAAAATATCTATTTAGCTATAACATTT
		Motif_3
NsTPS02a-Prom1kb	659	TGTTAGAAGTAATTTTGTGACTATAAAAGTTGTTATTGCTACAGTAATTTCAAATGCGTG
NsTPS02b-Prom1kb	650	TGTTAGAAGTAATTTTGTGGCTATAAAATTG G TATTGCTACAGTAATTTCAAATGCGTG
NsTPS04-Prom1Kb	659	TGTTAGAAGTAATTTTGTGGCTATAAAAGTTGTTATTGCTAC G GTAATTTCAAATGCGTG
NsTPS03-Prom1kb	658	TATTA AAAGTAATTTT GTGGCTATAAAAGTTGTTATTGCTACAGTAATTTCAAATGCGTG
Consensus	659	TGTTAGA AGTAATTTT GTGGCTATAAAAGTTGTTAT TGCTACAGTAATTT CAAATGCGTG
		Motif_2 Motif_3 Motif_2
NsTPS02a-Prom1kb	719	GCAAAAAAAATACGATTAGCTACGAAATTTTATTGTAGCAATAAAATTTGTAGCTATTTGG
NsTPS02b-Prom1kb	710	GCAAAAAAA.TACGATTAA CTACG AAATTTTATTGTAGCAATAA CTTT GTAGCTATTTGG
NsTPS04-Prom1Kb	719	GCAAA CAAA .TACGATTAGCTACGAAATTTTATTGTAGCAATAAAATTTGTAGCTATTTGG
NsTPS03-Prom1kb	718	GCAAAAAAAATACGATTAGCTACGAAATTTTATTGTAGCAATAAAATTTGTAGCTATTTGG
Consensus	719	GCAAAAAAA.TACGA TTAGCTACG AAATTTTAT TGTAGCAATAAAATTTGTAGCTAT TTGG
		Motif_3 Motif_3 Motif_3
NsTPS02a-Prom1kb	779	GTAATATTGCTACGACAGTTAGCAATTATAGCAAAAATGCTAAATCAGCTTTGTCAATTT
NsTPS02b-Prom1kb	769	GTAATATTGCTACGACAGTTAGCAATTATAGCAAAAATGCTAAATCAGCTTTGTCAATTT
NsTPS04-Prom1Kb	778	GTAATATTGCTACGACAGTTAGCAATTATAGCAAAAATGCTAAAT TAGCTTT GTCAATTT
NsTPS03-Prom1kb	778	GTAATATTGCTACGACAGTTAGCAATTATAGCAAAAATGCTAAAT TAGCTTT GT TAATTT
Consensus	778	GTAAT ATTGCTACGACAGTT AGCAATTATAGCAAAAATGCTAAATCAGCTTTGTCAATTT
		Motif_1

FIGURE 1 (suite)

3/4

NsTPS02a-Prom1kb	839	AATTTTGTAGCTAA.TTTTTTTATGAA TTT GTAAATAGCTATGAAATTTTAATTTTTGTG
NsTPS02b-Prom1kb	829	AATTTTGTAGCTAA.TTTTTTTATGAAATTGTAAATAGCTATGAAATTTTAATTTTTGTG
NsTPS04-Prom1Kb	838	AATTTT TT AGCTAAATTTTTTTATA AAA ATTGTAAATAG CC ATGAAATTTTAATTTTTGTG
NsTPS03-Prom1kb	838	AATTTTGTAGCTAA ACT TTTTTTAT.....GAAATTTTAATTTTTGTG
Consensus	838	AATTT TTGTAGCTAA .TTTTTTTATGAAATTGTAAATAGCTATGAAATTTTAATTTTTGTG
		Motif_3
NsTPS02a-Prom1kb	898	GCTATTGTTAGGTATTAGCCACA.....TATAGCTAAGAATTTGTAGCTATATA
NsTPS02b-Prom1kb	888	GCTATTGTTAGGTATTAGCCACA.....TATAGCTAAGAATTTGTAGCTATATA
NsTPS04-Prom1Kb	898	GCTATTGTTAGGTATTAGCCACAATTTTCATATAT GTAT CTAAGAATTTGTAGCTATATA
NsTPS03-Prom1kb	880	GCTATT GAT AGGTATTAG CT ACAATTTTCATATAT GT AGCTAAGAATTTGTAGCTATATA
Consensus	897	GCTATTGTTAGGTATTAGCCACA.....TATAGCTAAGAATTT GTAGCT ATATA
		Motif_3
NsTPS02a-Prom1kb	947	TACATAATGTTGTAGTGGCAAATTC T AACATTGT A AGCTTGGCTGCCCTTTTTTTTTTTT
NsTPS02b-Prom1kb	937	TACATAATGTTGTAGTGGCAAATTC T AACATTGT A AGCTTGGCTGCCCTTTTTTTTTTTT
NsTPS04-Prom1Kb	958	TACATAATGTTGTAGTGGCAAATTC T AACATTGT A AGCTT AG CTGCCCTTTTTTTTTTTT
NsTPS03-Prom1kb	940	TACATAATGTTGTAGTGGCAAATTC T AACATTGT A AGCTTGGCTGCCCTTTTTTTTTT...
Consensus	946	TACATAATGTTGTAGTGGCAAATTC T AACATTGT A AGCTTGGCTGCCCTTTTTTTTTTTT
NsTPS02a-Prom1kb	1007	GGCTACAAA ACT CTAAAGTAAAGGA ACT AGAAA ACT CGTTTGGCGAGAGAAAGA
NsTPS02b-Prom1kb	997	TT....GGCTACAAA ACT CTAAAGTAAAGGA ACT AGAAA ACT CGTTTGGCGAGAGAAAGA
NsTPS04-Prom1Kb	1018	TTTTTTGGCTACAAA ACT CTAAAGTAAAGGA ACT AGAAA ACT CGTTTGGCGAGAGAAAGA
NsTPS03-Prom1kb	997	GGCTACAAA ACT CTAAAGTAAAGGA ACT AGAAA ACT CGTTTGGCGAGAGAAAGA
Consensus	1006	 GGCTACAAA ACT CTAAAGTAAAGGA ACT AGAAA ACT CGTTTGGCGAGAGAAAGA
		Motif_3
NsTPS02a-Prom1kb	1061	GAGAG ATG
NsTPS02b-Prom1kb	1053	GAGAG ATG
NsTPS04-Prom1Kb	1078	GGGAT CC ATG
NsTPS03-Prom1kb	1051	GAGAGAGATG
Consensus	1060	GAGAG ATG

FIGURE 1 (fin)

4/4

