



HAL
open science

Etude de deux gènes impliqués dans la biosynthèse du parfum chez le genre *Rosa* L. (Rosaceae)

Aymeric Roccia

► **To cite this version:**

Aymeric Roccia. Etude de deux gènes impliqués dans la biosynthèse du parfum chez le genre *Rosa* L. (Rosaceae). Biologie végétale. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013STET4001 . tel-00993081

HAL Id: tel-00993081

<https://theses.hal.science/tel-00993081v1>

Submitted on 19 May 2014

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

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

Université Jean Monnet - Saint-Etienne

Académie de Lyon

*Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux Plantes
Aromatiques et Médicinales (EA 3061)*

Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes (UMR5667)

Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'Université Jean Monnet :

**Etude de deux gènes impliqués dans la
biosynthèse du parfum chez le genre
Rosa L. (Rosaceae)**

Aymeric Roccia

Discipline : Biologie – Physiologie végétale

Soutenue le 22 février 2013, devant le jury composé de :

Sylvie Baudino, Professeure à l'Université de Saint-Etienne, LBVpam, Saint-Etienne : Directrice de thèse

Mohammed Bendahmane, DR2 INRA, RDP, Lyon : Codirecteur de thèse

Bilal Camara, Professeur à l'Université de Strasbourg, IBMP, Strasbourg : Rapporteur

Benoît Saint-Pierre, Professeur à l'Université de Tours, BBV, Tours : Rapporteur

Fabrice Foucher, CR INRA, IRHS, Angers : Examineur

Philippe Huguency, DR INRA, SVQV, Colmar : Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Sylvie Baudino et Mohammed Bendahmane, respectivement directrice et co-directeur de cette thèse, pour leur encadrement scientifique. Un merci à Sylvie Baudino et Jan Trass, directeurs des laboratoires de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales (BVpam) de Saint-Etienne et de Reproduction et Développement des Plantes (RDP) de Lyon respectivement, pour m'avoir permis de passer trois ans dans leurs laboratoires respectifs.

Merci à Bilal Camara et Benoît Saint-Pierre d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci aussi à Fabrice Foucher et Philippe Hugueney d'en être les examinateurs.

Je remercie également Alexis Lacroix, Isabelle Desbouchages et Yannick Rasmus pour s'être occupés si soigneusement de mes plantes en serres ainsi que des rosiers en extérieur, indispensables pour la réalisation de cette thèse. Merci aussi à Pierre Chambrier et Annick Dedieu pour leur aide technique précieuse au cours de mes expériences. Merci à Judit Szecsi et Anne-Marie Thierry pour leur aide lors de mes manip de protéines et les essais de production d'anticorps. Je remercie aussi Tatiana Thouroude et Laurence Hibrand pour leur aide dans mon travail sur la population de rosiers hybrides hébergée à l'INRA d'Angers.

¹

Je remercie chaleureusement tout le personnel du RDP au sein duquel j'ai passé trois longues mais agréables années. Merci particulièrement aux Aurélie, Ben, Coralie, Christophe, Claudya, Patrice... pour tous ces bons moments passés dans et en dehors du RDP. Sans oublier les anciens RDPistes qui ont croisé ma route, Sandrine, Amélie, Julie, Nico, Pauline... pour leur joie et leur bonne humeur.

Merci à tous...

“Les parfums sont les sentiments des fleurs” (*The Hartz Journey*, Heinrich Heine)

Résumés et mots-clés

Résumé :

Peu d'enzymes de synthèse de composés odorants sont connues chez le genre *Rosa*. Ce travail de thèse a permis l'identification de quelques-unes de ces protéines grâce à la technologie des puces à ADN, à l'analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative en temps réel (qPCR) et à l'analyse des parfums par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Une puce confrontant les ADNc d'une rose parfumée à ceux d'une rose non parfumée a permis de corréler l'expression d'un gène, codant pour une Nudix hydrolase, très fortement exprimé dans la rose parfumée, avec la présence des monoterpènes dans le parfum de nombreux cultivars de rosiers. La caractérisation d'un rosier dont l'expression de ce gène est fortement réduite par ARN interférants, a permis de confirmer le rôle de celui-ci dans la synthèse des monoterpènes. La phénylacétaldéhyde synthase (PAAS) est une autre enzyme participant à la synthèse du parfum. Trois allèles de cette protéine ont précédemment été mis en évidence. Les résultats de qPCR et de CPG dans une population hybride ont permis de montrer que l'allèle *a1* est le seul à pouvoir induire la synthèse et l'émission de 2-phényléthanol. Les activités respectives des différentes isoformes ont été testées *in vitro* chez la levure et *in planta* dans des feuilles de tabac et des cals de rosier : ces expériences montrent que les trois isoformes ont des activités comparables. L'absence de synthèse de 2-phénylméthanol chez les plantes présentant les isoformes *a2* et *a3* réside donc dans la très faible expression de leurs allèles, induisant probablement une faible concentration de l'isoforme dans les cellules.

Mots-clés :

Parfum ; rose ; biosynthèse ; Nudix hydrolase ; monoterpènes ; phénylacétaldéhyde synthase ; 2-phényléthanol.

Abstract:**Study of two genes implicated in scent biosynthesis in the genus *Rosa* L. (Rosaceae)**

Very few enzymes responsible for the biosynthesis of scent compounds in the genus *Rosa* are known so far. This PhD thesis aims to identify some of these proteins with DNA microarray technology, gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) and scent analysis by gas chromatography (GC). An array comparing cDNA from a scented rose to those of a non-scented one, showed a correlation between expression of a yet-unknown gene, encoding a Nudix hydrolase, highly expressed in the scented rose, and the presence of monoterpenes in the scent of many rose cultivars. Characterization of a rose cultivar, in which expression of this gene has been decreased by RNA interference, confirmed its role in monoterpene synthesis. The phenylacetaldehyde synthase (PAAS) is another enzyme implicated in scent biosynthesis. Three alleles of this protein had been previously described. qPCR and GC experiments in a hybrid population showed that the *a1* allele is the only one able to induce 2-phenylethanol biosynthesis. The respective activities of the different isoforms were tested *in vitro* in yeast, and *in planta* in tobacco leaves and rose calli: these experiments showed that the three isoforms have comparable activities. The lack of 2-phenylethanol production in plants having *a2* and *a3* isoforms is thus due to the very low expression of their respective alleles, probably inducing very low isoform concentration in cells.

Key words:

scent biosynthesis; rose; Nudix hydrolase; monoterpenes; phenylacetaldehyde synthase; 2-phenylethanol.

Table des matières

Remerciements.....	1
Résumés et mots-clés.....	2
Table des matières.....	4
Table des figures.....	7
Table des tableaux.....	9
Abréviations.....	10
Avant propos.....	13
Introduction.....	15
I) Regards évolutif et ethnobotanique sur le genre <i>Rosa</i>	15
A) Botanique systématique de la rose.....	15
1) Evolution des rosiers au cours des temps géologiques.....	15
2) Taxonomie du genre <i>Rosa</i>	15
3) Les rosiers sauvages en France.....	17
B) Rapports de l'homme avec les roses au cours de	
l'histoire.....	19
II) Le parfum des roses.....	22
A) Le rôle du parfum dans la pollinisation.....	22
B) La parfumerie et le parfum de rose.....	24
1) Histoire de l'industrie de la parfumerie.....	24
2) Les techniques d'extraction du parfum de la rose.....	25
a) L'hydrodistillation.....	25
b) L'extraction par solvant.....	26
3) Production et utilisations.....	27
C) Diversité des molécules du parfum de rose.....	28
1) Les terpénoïdes.....	29
2) Les composés aromatiques.....	31
3) Les dérivés d'acides gras.....	33
4) Autres molécules du parfum.....	33
5) Production et régulation de l'émission du parfum.....	34
D) Les voies de biosynthèse du parfum.....	37
1) Synthèse des terpénoïdes.....	37
a) Voie mévalonate.....	38
b) Voie non-mévalonate ou voie de Rohmer.....	40
c) Polymérisation des unités isopréniques.....	43
d) Synthèse des terpènes.....	48
e) Modifications des terpènes.....	52
f) Régulation de la synthèse et de l'émission des terpènes	54
2) Synthèse des composés aromatiques.....	55
a) Synthèse du 2-phényléthanol.....	55
b) Synthèse de l'eugénol et de l'isoeugénol.....	58
c) Autres composés synthétisés à partir de la	
phénylalanine.....	60
d) Synthèse du 1,3,5-triméthoxybenzène et du 3,5-	

diméthoxytoluène.....	61
e) Modifications des composés aromatiques.....	63
f) Régulation de la synthèse et de l'émission des composés	
aromatiques.....	64
3) Synthèse des dérivés d'acides gras : les oxylipides.....	65
III) Objectifs de la thèse.....	67
Résultats et conclusions.....	69
I) Identification et caractérisation de la Nudix hydrolase <i>RhNUDX1</i>	69
A) Introduction.....	69
B) Article soumis pour publication.....	70
C) Résultats complémentaires.....	96
1) Suivi spatial et temporel de l'expression de <i>RhNUDX1</i>	96
2) Caractérisation de la lignée ARNi pour le gène <i>RhNUDX1</i>	97
3) Greffage d'une souche sauvage sur la lignée ARNi pour le	
gène <i>RhNUDX1</i>	98
D) Conclusion.....	99
II) Caractérisation des allèles de la phénylacétaldéhyde synthase <i>PAAS</i>	99
A) Introduction.....	99
B) Identification de trois allèles de <i>PAAS</i>	100
C) Expression de <i>RhPAAS</i> au cours du développement	
floral.....	106
D) Les trois allèles ont différents niveaux d'expression selon le génotype	107
E) Détection de la protéine <i>RhPAAS</i> dans les pétales.....	110
F) Les trois isoformes sont capables de synthétiser du 2-phényléthanol...	112
G) Conclusion.....	114
Discussion générale et perspectives.....	116
I) <i>RhNUDX1</i> , une nouvelle protéine impliquée dans la synthèse du parfum de la	
rose.....	116
II) <i>RhPAAS</i> , un gène à trois allèles aux caractéristiques différentes.....	121
III) Conclusion générale et perspectives.....	125
Matériel et méthodes.....	128
I) Matériel végétal, souches et plasmides.....	128
A) Matériel végétal.....	128
1) Cultivars de rosiers et stades de développement.....	128
2) Lignée de <i>Nicotiana benthamiana</i>	130
B) Souches bactériennes et de levures.....	130
1) <i>Escherichia coli</i>	130
2) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	131
3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	131
C) Vecteurs.....	132
1) Vecteurs de séquençage.....	132
2) Vecteur de clonage GATEWAY™.....	132
3) Vecteur pour la production d'ARN interférant.....	134
4) Vecteur d'expression en levure.....	134
II) Techniques d'extraction d'acides nucléiques.....	134
A) Extraction d'ARN totaux à partir de matériel végétal.....	134
B) Extraction d'ADN génomique de bourgeons de rosier.....	135
C) Extraction de plasmides.....	135
III) Techniques d'amplification d'ADN par PCR.....	136

A) PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	136
B) PCR directe.....	137
C) PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR)	137
IV) Techniques de clonage.....	138
A) Clonage dans le vecteur StrataClone Blunt Vector pSC-B-amp/kan...	138
B) Clonage dans le vecteur hybride pYX142.....	139
C) Clonage dans le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO.....	140
D) Clonage TA dans le vecteur pCR 2.1-TOPO.....	140
E) Recombinaison GATEWAY™ dans les vecteurs d'expression.....	141
V) Techniques d'analyse des composés volatils.....	141
A) Extraction par solvant.....	141
1) Extraction de parfum à partir d'organes de rosier.....	141
2) Extraction de composés volatils de cultures de levures	142
B) Headspace dynamique sur culture liquide de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	142
C) Analyse des extraits de parfum.....	144
1) Chromatographie en phase gazeuse.....	144
2) Identification des composés organiques volatils.....	145
VI) Méthode d'analyse des corrélations gènes-parfum.....	145
VII) Techniques d'expression de protéines recombinantes.....	146
A) Conception des différentes constructions des allèles de <i>RhPAAS</i>	146
B) Expression dans <i>Escherichia coli</i>	147
C) Expression dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	148
D) Expression <i>in planta</i>	149
1) Préparation des agrobactéries compétentes.....	149
2) Expression transitoire de a1, a2 et a3 chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	149
3) Expression stable de a1, a2 et a3 chez <i>Rosa chinensis</i> cv. 'Old Blush'.....	150
VIII) Obtention et caractérisation de rosiers transgéniques.....	150
A) Obtention des plantes transgéniques.....	150
B) Southern blot.....	151
C) Greffage de rosiers.....	152
IX) Techniques d'analyse des protéines.....	152
A) Production d'anticorps anti- <i>RhPAAS</i>	153
1) Production de l'isoforme a1 de <i>RhPAAS</i>	153
2) Production d'anticorps anti- <i>RhPAAS</i>	154
B) Suivi de la présence de <i>RhPAAS</i> par western blot au cours de la floraison de la population Hw.....	154
Bibliographie.....	155
Annexes.....	187

Table des figures

Fig. 1 :	Aire de répartition géographique naturelle du genre <i>Rosa</i> à travers le monde.....	17
Fig. 2 :	Généalogie des rosiers anciens.....	19
Fig. 3 :	Généalogie des rosiers modernes.....	21
Fig. 4 :	Epiderme adaxial d'un pétale de <i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> observé en microscopie électronique environnementale (Gr. × 600).....	35
Fig. 5 :	Plaste de pétales de <i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> observé en microscopie électronique à transmission pendant la sécrétion.....	35
Fig. 6 :	Emission des composés volatils par les fleurs non coupées de <i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Honesty', exposées à une photopériode de 12h.....	36
Fig. 7 :	Synthèse du pyrophosphate d'isopentényle par les voies dépendante et indépendante du mévalonate.....	39
Fig. 8 :	Formation des terpènes par polymérisation du pyrophosphate d'isopentényle.....	44
Fig. 9 :	Synthèse des composés aromatiques du parfum.....	56
Fig. 10 :	Synthèse des "green leaf volatiles".....	66
Fig. 11 :	Expression de <i>RhNUDX1</i> dans différents organes floraux et dans les feuilles de <i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Papa Meilland'.....	96
Fig. 12 :	Expression de <i>RhNUDX1</i> dans les pétales de <i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Papa Meilland' à différents stades d'ouverture de la fleur.....	97
Fig. 13 :	Séquences nucléotidiques des différentes versions de <i>PAAS</i>	100
Fig. 14 :	Séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques du tableau 6	105
Fig. 15 :	Expression de <i>RhPAAS</i> dans les pétales de <i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Alister Stella Gray' à différents stades d'ouverture de la fleur.....	107
Fig. 16 :	Quantité de 2-phényléthanol produit par les pétales de <i>Rosa</i> × <i>wichuraiana</i> (Rw ; <i>a1/a2</i>), <i>R.</i> × <i>hybrida</i> cv. 'H190' (<i>a3/a3</i>) et quatre de leurs descendants : Hw24 et Hw530 (<i>a1/a3</i>), et Hw68 et Hw149 (<i>a2/a3</i>) à différents stades d'ouverture de la fleur.....	108
Fig. 17 :	Expression de <i>PAAS</i> dans les pétales de <i>Rosa</i> × <i>wichuraiana</i> (Rw ; <i>a1/a2</i>), <i>R.</i> × <i>hybrida</i> cv. 'H190' (<i>a3/a3</i>) et quatre de leurs descendants : Hw24 et Hw530 (<i>a1/a3</i>), et Hw68 et Hw149 (<i>a2/a3</i>) à différents stades d'ouverture de la fleur.....	110
Fig. 18 :	Analyse de la protéine recombinante purifiée à partir d' <i>E. coli</i>	111
Fig. 19 :	Analyse de l'efficacité des sérums.....	111
Fig. 20 :	Production de 2-phénylacétaldéhyde et de 2-phényléthanol par les levures transformées avec les allèles de <i>RhPAAS</i>	112
Fig. 21 :	Production de 2-phényléthanol par les feuilles de tabac infiltrées avec les allèles de <i>RhPAAS</i>	113

Fig. 22 :	Production de 2-phényléthanol par les cals de <i>Rosa chinensis</i> cv. ‘Old Blush’ transformés avec les allèles de <i>RhPAAS</i>	114
Fig. 23 :	Réaction catalysée par <i>AtNUDX1</i>	119
Fig. 24 :	Dix cultivars de rosier utilisés dans cette thèse.....	129
Fig. 25 :	Les six stades de développement floral chez <i>Rosa chinensis</i> cv. ‘Old Blush’.....	130
Fig. 26 :	Cartes des vecteurs.....	133
Fig. 27 :	Principe de la PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR).....	138
Fig. 28 :	Méthode d’extraction solide/liquide des composés volatils organiques.....	142
Fig. 29 :	Montage pour la capture de parfum par headspace dynamique.....	143
Fig. 30 :	Système d’extraction du parfum émis par des cultures de levures.....	144

Table des tableaux

Tab. 1 :	Les onze sections du sous-genre <i>Rosa</i>	18
Tab. 2 :	Exemples de terpénoïdes participant au parfum de la rose.....	30
Tab. 3 :	Exemples de cétones de rose participant au parfum de la rose.....	31
Tab. 4 :	Exemples de composés aromatiques participant au parfum de la rose.....	32
Tab. 5 :	Exemples de dérivés d'acides gras participant au parfum de la rose.....	33
Tab. 6 :	Liste des mono- et sesquiterpènes synthèses florales.....	50
Tab. 7 :	Dix cultivars de roses utilisés dans cette thèse.....	128
Tab. 8 :	Caractéristiques phénotypiques entre les deux parents de la population Hw.....	129
Tab. 9 :	Génotypes des différentes souches de bactéries, d'agrobactéries et de levures.....	131

Abréviations

AAT	<u>A</u> lcool <u>a</u> cétyl <u>t</u> ransférase
AACT	<u>A</u> cétyl- <u>C</u> oA <u>a</u> cétyl <u>t</u> ransférase
AADC	Acide <u>a</u> miné <u>a</u> romatique <u>d</u> écarboxylase
AcAcCoA	<u>A</u> céto <u>a</u> cétyl <u>c</u> oenzyme <u>A</u>
AcCoA	<u>A</u> cétyl <u>c</u> oenzyme <u>A</u>
ADP	<u>A</u> dénosine-5' - <u>d</u> iphosphate
AFLP	<u>A</u> mplified <u>f</u> ragment- <u>l</u> ength <u>p</u> olymorphism
ATP	<u>A</u> dénosine-5' - <u>t</u> riphosphate
BAMT	<i>S</i> -adénosyl-L-méthionine :acide <u>b</u> enzoïque carboxyl <u>m</u> éthyl <u>t</u> ransférase
BEAT	Acétyl-CoA :alcool <u>b</u> enzylique <u>a</u> cétyl <u>t</u> ransférase
BEBT	Benzoyl-CoA :alcool <u>b</u> enzylique <u>b</u> enzoyl <u>t</u> ransférase
BF	<u>B</u> outon <u>f</u> ermé
BJO	<u>B</u> outon <u>j</u> uste <u>o</u> uvert
BO	<u>B</u> outon <u>o</u> uvert
BSMT	<i>S</i> -adénosyl-L-méthionine :acide <u>b</u> enzoïque/acide <u>s</u> alicylique carboxyl <u>m</u> éthyl <u>t</u> ransférase
BTO	<u>B</u> outon <u>t</u> rès <u>o</u> uvert
CES	<u>C</u> havicol/ <u>e</u> ugénol <u>s</u> ynthase
CFAT	Alcool de <u>c</u> oniféryle <u>a</u> cétyl <u>t</u> ransférase
CHAT	Acétyl-CoA : <u>c</u> is-3- <u>h</u> exèn-1-ol <u>a</u> cétyl <u>t</u> ransférase
CMK	4-diphosphocytidyl-2- <u>C</u> - <u>m</u> éthyl-D-érythritol <u>k</u> inase
CoA	<u>C</u> oenzyme <u>A</u>
COMT	<i>S</i> -adénosyl-L-méthionine :acide <u>c</u> aféique O- <u>m</u> éthyl <u>t</u> ransférase
COV	<u>C</u> omposés <u>o</u> rganiques <u>v</u> olatils
CPG	<u>C</u> hromatographie en <u>p</u> hase <u>g</u> azeuse
DAHPh	3- <u>d</u> ésoxy-D- <u>a</u> rabino- <u>h</u> eptulose 7- <u>p</u> hosphate
DHNTp	<u>D</u> ihydro <u>n</u> éoptérine <u>t</u> riphosphate
FID	<u>D</u> étecteur à <u>i</u> onisation de <u>f</u> lamme (Flame Ionisation Detector)
DMAPP	Pyrophosphate de <u>d</u> iméthyl <u>l</u> allyle
DMT	3,5- <u>d</u> iméthoxytoluène
EGS	<u>E</u> ugénol <u>s</u> ynthase
EOBII	<u>E</u> mission <u>d</u> e <u>b</u> enzénoïdes <u>I</u>
EPSP	5- <u>é</u> noypyruvyl <u>sh</u> ikimate 3- <u>p</u> hosphate
ESTs	<u>E</u> xpressed <u>s</u> equences <u>t</u> ags
FE	<u>F</u> leur <u>é</u> panouie
FPP	<u>F</u> arnésyl pyrophosphate
FPPS	<u>F</u> PP <u>s</u> ynthase
FS	<u>F</u> leur <u>s</u> énescente
GAP	<u>G</u> lycéraldéhyde_5- <u>p</u> hosphate

GFP	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GGPP	<u>G</u> éranylgéranyl <u>p</u> yro <u>p</u> hosphate
GGPPS	<u>G</u> GPP <u>s</u> ynthase
GLV	<u>G</u> reen <u>l</u> ea <u>f</u> <u>v</u> olatiles
GPP	<u>P</u> yro <u>p</u> hosphate de géranyle
GPPS	<u>G</u> PP <u>s</u> ynthase
HDR	Isopentényl pyrophosphate synthase (ou <u>h</u> ydroxyméthylbutényl 4- <u>d</u> iphosphate <u>r</u> éductase)
HDS	<u>H</u> ydroxyméthylbutényl 4- <u>d</u> iphosphate <u>s</u> ynthase
HMG	<u>G</u> lutarate de 3- <u>h</u> ydroxy-3- <u>m</u> éthyle
HPL	<u>H</u> ydroperoxyde <u>l</u> yase
HRM	Courbe de <u>f</u> usion à <u>h</u> aute <u>r</u> ésolution (<u>h</u> igh <u>r</u> esolution <u>m</u> elting)
IDI	<u>I</u> PP <u>i</u> somérase
IDS	<u>I</u> PP <u>s</u> ynthase
IEMT	<i>S</i> -adénosyl-L-méthionine :(<u>i</u> so) <u>e</u> ugénol <i>O</i> - <u>m</u> éthyl <u>t</u> ransfêrase
IGS	<u>I</u> soeugénol <u>s</u> ynthase
IPP	<u>P</u> yro <u>p</u> hosphate d' <u>i</u> sopentényle
LOX	<u>L</u> ipo <u>x</u> ygénase
MCT	4-diphosphocytidyl-2- <u>C</u> - <u>m</u> éthyl-D-érythritol synthase
MDS	2- <u>C</u> - <u>m</u> éthyl-D-érythritol 2,4-cyclod <u>i</u> phosphate <u>s</u> ynthase
MVA	<u>M</u> évalonate
MVAP	<u>M</u> évalonate-5- <u>p</u> hosphate
MVAPP	<u>M</u> évalonate-5- <u>p</u> yro <u>p</u> hosphate
NADH	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> dénine <u>d</u> inucléotide sous forme réduite
NaDi	Mélange de 1- <u>n</u> aphthol et de <i>N,N</i> - <u>d</u> iméthyl- <i>p</i> -phénylène diamine
NADP ⁺	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> dénine <u>d</u> inucléotide <u>p</u> hosphate
NADPH,H ⁺	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> dénine <u>d</u> inucléotide <u>p</u> hosphate sous forme réduite
Nudix	<u>N</u> ucleoside <u>d</u> iphosphate linked to some other moiety <u>X</u>
OOMT	<u>O</u> rcinol- <u>O</u> - <u>m</u> éthyl <u>t</u> ransfêrase
PAA	<u>P</u> hénylacétal <u>d</u> éhyde
PAAS	<u>P</u> hénylacétal <u>d</u> éhyde <u>s</u> ynthase
PAL	<u>P</u> hényl <u>a</u> mmonia <u>l</u> yase
PAR	<u>P</u> hénylacétal <u>d</u> éhyde <u>r</u> éductase
PCR	<u>R</u> éaction en <u>ç</u> aine par <u>p</u> olymérase
2-PE	2- <u>p</u> hényl <u>é</u> thanol
PEP	<u>P</u> hospho <u>é</u> no <u>l</u> pyruvate
KAT1	3- <u>c</u> éto <u>a</u> cyl- CoA <u>t</u> hiolase
Pi	<u>P</u> hosphate <u>i</u> norganique
PLP	<u>P</u> yridoxal 5'- <u>p</u> hosphate
POMT	<u>P</u> hloroglucinol <u>O</u> - <u>m</u> éthyl <u>t</u> ransfêrase
qPCR	<u>P</u> CR <u>q</u> uantitative

QTL	<u>Q</u> uantitative <u>t</u> rait <u>l</u> ocus (locus à effets quantitatifs)
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>t</u> ranscriptase <u>P</u> CR
Rw	<u>R</u> osa x <u>w</u> ichuraiana
SAMT	S-adénosyl-L-méthyl : <u>a</u> cide <u>s</u> alicylique carboxyl <u>m</u> éthyl <u>t</u> ransférase
SM	<u>S</u> pectrométrie de <u>m</u> asse
SPP	<u>P</u> rophosphate de <u>s</u> olanésyle
SSR	<u>S</u> imple <u>s</u> equance <u>r</u> epet
TAIL-PCR	<u>P</u> CR à <u>a</u> symétrie <u>t</u> hermique <u>e</u> ntrelacée
TAL	<u>T</u> yrosine <u>a</u> mmonia <u>l</u> yase
TEV	<u>V</u> irus de la gravure du <u>t</u> abac (tobacco <u>e</u> tch <u>v</u> irus)
TMB	1,3,5- <u>t</u> riméthoxy <u>b</u> enzène
TPS	<u>T</u> erpène <u>s</u> ynthase
UTR	<u>R</u> égion <u>n</u> on <u>t</u> raduite (<u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion)

Avant propos

La qualité des roses coupées a longtemps été jugée sur leur esthétique et leur tenue en vase. La recherche de ces caractères par sélection variétale a probablement mené à une contre-sélection involontaire du parfum dont les mécanismes sont encore largement inconnus (Dudareva & Pichersky, 2000 ; Channelière *et al.*, 2002 ; Schulz, 2003 ; Verhoeven *et al.*, 2003 ; Shalit *et al.*, 2004). Dans un marché de plusieurs milliards d'euros annuels, dominé par les roses hollandaises, kenyanes, françaises et équatoriennes, la demande en roses parfumées émanant des consommateurs pousse les producteurs et la recherche à s'intéresser à nouveau au parfum de la rose.

D'un point de vue scientifique, bien que cette recherche soit très concurrentielle, peu d'enzymes de synthèse de composés odorants sont connues chez le genre *Rosa*. Les recherches menées au sein des laboratoires de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales (BVpam) de Saint-Etienne et de Reproduction et Développement des Plantes (RDP) de Lyon se placent dans cette thématique. Ce travail de thèse se propose d'identifier quelques-unes des protéines impliquées dans la production de parfum, grâce à la technologie des puces à ADN, à l'analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative en temps réel (qPCR) et à l'analyse des parfums par chromatographie en phase gazeuse. En effet, une puce confrontant les ADNc d'une rose parfumée à ceux d'une rose non parfumée avait été réalisée avant mon arrivée au laboratoire. Cette démarche avait permis de corrélérer l'expression d'un gène, jusqu'alors inconnu, très fortement exprimé dans la rose parfumée, avec la présence d'une classe de molécules odorantes, les monoterpènes, dans le parfum de nombreux cultivars de rosiers. La caractérisation d'un rosier dont l'expression de ce gène est fortement réduite par la méthode des ARN interférants, a permis de confirmer le rôle de celui-ci dans la synthèse des monoterpènes. Le laboratoire BVpam est aussi impliqué dans la caractérisation de la phénylacétaldéhyde synthase (PAAS), une autre enzyme participant à la biosynthèse du parfum. Avant mon arrivée au laboratoire, trois allèles de cette protéine avaient été mis en évidence (thèse Jana Machenaud, 2010 ; collaboration INRA Angers). Des études préliminaires sur une population hybride (expérience de coségrégation) montraient que l'allèle *a1* semblait être le seul à pouvoir induire la synthèse et l'émission de 2-phényléthanol. Ces résultats ont pu être confirmés par la quantification de l'expression des allèles et l'analyse des parfums par chromatographie en phase gazeuse dans cette population. Les activités respectives des différents isoformes codées par ces allèles, ont ici été testées *in*

vitro chez la levure, mais aussi *in planta* dans les feuilles de tabac et des cals de rosier : ces expériences montrent que les trois isoformes ont des activités comparables. Le blocage de l'activité des isoformes a2 et a3 réside donc dans la très faible expression de leurs allèles, induisant probablement ainsi une faible concentration de l'isoforme dans les cellules. Cette présence de l'enzyme sera à terme testée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la phénylacétaldéhyde synthase, qui est à l'heure actuelle en cours de production.

Une étude de l'évolution et de la domestication des roses en regard de leurs enzymes de synthèse permettrait, à long terme, de guider les obtenteurs dans le choix de leur croisements pour une sélection variétale orientée vers le caractère "rose parfumée". La mise en œuvre de la sélection assistée par marqueurs est un objectif à très long terme chez la rose. Cependant, déterminer où se situent les freins à la production et/ou émission de parfum chez les différentes variétés de roses, comme nous nous proposons de le faire, est une première étape obligée vers des croisements raisonnés. Il va sans dire que les industries de la parfumerie et de la cosmétique, engagées dans la production de molécules odorantes à forte valeur ajoutée, voient également un intérêt certain dans la poursuite de ces recherches.

Introduction

I) Regards évolutif et ethnobotanique sur le genre *Rosa*

A) Botanique systématique de la rose

1) Evolution des rosiers au cours des temps géologiques

Le genre *Rosa* est un taxon végétal apparu au cours de l'ère tertiaire. Les premières archives fossiles découvertes avaient été datées de -12 à -15 millions d'années (Krüssmann, 1981). Cependant, à la fin du XX^e siècle, de nouveaux fossiles furent trouvés aux Etats-Unis et rattachés avec certitude au genre *Rosa*, faisant reculer son apparition à -35 (Weiss, 1997), voire -40 millions d'années (Guoliang, 2003). Enfin, d'autres restes fossiles datant de -60 millions d'années et présentant une forte similarité avec les rosiers ont été découverts en 1904 et 1910 dans des formations du paléocène en Alaska (Etats-Unis) et décrits en 1936 par Hollick sous les noms de *R. confirmata* et *R. cetera* (Hollick, 1936). Néanmoins, l'ensemble de ces tissus préservés se limite le plus souvent à des folioles, voire à des feuilles, des morceaux de tiges ou des épines. Les fossiles de calice et de boutons floraux sont extrêmement rares et aucune fleur entière n'est parvenue jusqu'à nous pour le moment (Krüssmann, 1981).

D'un point de vue phylogénique, l'étude comparative de l'anatomie de la fleur laisse penser que le genre *Rosa* serait proche des potentilles (*Potentilla* spp.) ou des fraisiers (*Fragaria* spp.). Le sous-genre *Hesperodos* aurait conservé le plus de caractères primitifs chez les rosiers, les calices et les réceptacles de ces espèces étant morphologiquement proches de ceux des potentilles (Erlanson, 1938). De récentes analyses phylogénétiques sur des séquences nucléotidiques nucléaires et plastidiales ont permis de placer le genre *Rosa* à proximité des *Potentilla* et des *Fragaria*, confortant ainsi la place déjà établie des rosiers dans la phylogénie de la famille des Rosacées (Eriksson *et al.*, 2003 ; Potter *et al.*, 2007).

2) Taxonomie du genre *Rosa*

Les rosiers (*Rosa* spp.) sont des angiospermes eudicotylédones appartenant au clade des Eurosidiées I et à l'ordre des Rosales. Ils donnent leur nom à la famille des Rosacées à laquelle ils appartiennent. Celle-ci regroupe nombre d'espèces fruitières : pommier (*Malus pumila* Mill.), poirier (*Pyrus communis* L.), fraisier (*Fragaria vesca* L.), prunier (*Prunus*

domestica L.), cerisier (*Prunus avium* (L.) L.), pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch), abricotier (*Prunus armeniaca* L.), framboisier (*Rubus idaeus* L.), ronces (*Rubus* spp.), ainsi que des espèces ornementales : rosiers (*Rosa* spp.), potentilles (*Potentilla* spp.), laurier-cerise (*Prunus laurocerasus* L.) par exemple.

Le genre *Rosa* a une répartition typiquement holarctique (Amérique du nord jusqu'en Basse Californie et altiplano mexicain, côte sud de l'Islande, Europe, Afrique du Nord, Abyssinie, Proche Orient et Asie jusqu'aux montagnes iraniennes, Himalaya et moitié nord de la péninsule du Siam) à l'exception des régions polaires, et fait une incursion dans le règne paléotropical au niveau de la pointe sud de l'Inde et du Sri Lanka (Fig. 1) (Rehder, 1940 ; Krüssmann, 1981 ; Gudin, 2000). Il se compose d'environ 150 espèces avec deux centres de diversité : l'Europe et la Chine. La classification de Rehder, bien que datant de 1940, est encore largement utilisée de nos jours, avec de légères modifications (Wissemann & Ritz, 2005). Le genre est aujourd'hui divisé en quatre sous-genres :

- subgenus *Hesperodos* Cockerell : sous-genre ayant le plus de caractères archaïques chez les rosiers, il était considéré auparavant comme un genre à part entière. Il rassemble deux espèces et deux sous-espèces, toutes originaires du sud-ouest des Etat-Unis et du Mexique : *R. stellata* Wooton subsp. *stellata*, *R. stellata* Wooton subsp. *mirifica* (Greene) Cockerell et *R. minutifolia* Engelman.
- subgenus *Hulthemia* (Dumort.) Focke : autrefois considéré comme un genre à part entière, il est aujourd'hui réintégré dans le genre *Rosa* et compte une espèce originaire des régions arides d'Iran, caractérisée par sa feuille à foliole unique et un réceptacle en coupe : *R. persica* Michx. Ex Juss.
- subgenus *Platyrrhodon* (Hurst) Rehder : autre sous-genre monospécifique poussant naturellement en Chine et au Japon : *R. roxburghii* Tratt.
- subgenus *Rosa* (anciennement *Eurosa* Focke) : il contient la très grande majorité des espèces de rosiers. Il est à son tour divisé en 11 sections (tableau 1).

Du fait d'une biologie particulière de la reproduction (nombreux cas d'hybridations, d'introgessions, d'hémi-apomixie) (DeCock, 2008) et d'une grande variabilité morphologique (Rehder, 1940), il existe de très nombreux synonymes et les classifications peuvent diverger selon les opinions des auteurs.



Figure 1 : Aire de répartition géographique naturelle du genre *Rosa* à travers le monde. Les lignes rouges délimitent les zones de présence autochtone des rosiers. Les noms de sections figurant sur la carte indiquent leurs aires d'occurrence respectives.

Le nombre de chromosomes de base chez le rosier est de $x=7$. La plupart des espèces sont diploïdes mais certaines sont triploïdes, tétraploïdes, pentaploïdes ou hexaploïdes. Quelques espèces peuvent même présenter plusieurs niveaux de ploïdie. Néanmoins, une seule espèce est octoploïde : *R. acicularis* Lindl. avec $2n = 8x = 56$. Ce nombre de chromosomes augmente selon un gradient sud-nord avec la rudesse du climat, *R. acicularis* poussant aux confins des régions arctiques (Krüssmann, 1981).

3) Les rosiers sauvages en France

La France compte sur son territoire 33 espèces de rosiers poussant à l'état sauvage. Si la majorité est autochtone, il existe au moins trois espèces échappées de jardin, tendant le plus souvent à se naturaliser (*R. banksiae* W. T. Aiton, *R. multiflora* Thunb. et *R. rugosa* Thunb.). Toutes appartiennent au sous-genre *Rosa* et occupent des habitats thermophiles ouverts (coteaux, garrigues...) ou semi ouverts (haies, fourrés...), sauf *R. banksiae* W. T. Aiton, d'origine chinoise, qui s'est naturalisée en ripisylve. Il est à noter qu'une espèce endémique de France, *R. seraphini* Viv., pousse exclusivement dans le massif corse (Fournier, 2000).

Section	Caractéristiques	Répartition	Exemples d'espèces
<i>Banksianae</i> Lindl.	Arbrisseaux grimpants, très longues tiges inermes pouvant atteindre 10 m.	Chine	<i>Rosa banksiae</i> Ait. <i>Rosa cymosa</i> Tratt.
<i>Bracteatae</i> Thory	Feuillage persistant et brillant, fleurs blanches.	Asie du sud-est	<i>Rosa bracteata</i> Wendl <i>Rosa clinophylla</i> Thory
<i>Caninae</i> (DC.) Ser.	Arbustes dressés ou retombants, aiguillons gros, recourbés, feuilles à 5 ou 7 folioles, fleurs roses ou blanches.	Afrique du nord Asie mineure Europe	<i>Rosa canina</i> L. <i>Rosa agrestis</i> Savi <i>Rosa montana</i> Chaix <i>Rosa villosa</i> L.
<i>Carolinae</i> Crép.	Arbustes bas, feuillage souvent brillant, sépales caducs, fruits habituellement globuleux aplatis, akènes insérés seulement au fond du réceptacle	Amérique du nord	<i>Rosa carolina</i> L. <i>Rosa nitida</i> Willd. <i>Rosa palustris</i> Marsh
<i>Cinnamomeae</i> (DC.) Ser.	Buissons dressés assez hauts, souvent drageonnants, aiguillons droits avec des gradients de densité sur la tige, fleurs rose vif à rouge, sépales persistants et dressés à la fructification, fruits en général allongés.	Amérique du Nord Asie Europe	<i>Rosa majalis</i> Herm. <i>Rosa acicularis</i> Lindl. <i>Rosa pendulina</i> L. <i>Rosa rugosa</i> Thunb.
<i>Gymnocarpae</i> Crép.	Non reconnue par tous les auteurs et alors incluse dans la section <i>Cinnamomae</i> . Sépales caducs, unis à leur base, 5-9 folioles.	Amérique du nord Asie centrale	<i>Rosa gymnocarpa</i> Nutt. <i>Rosa begeriana</i> Schrenk
<i>Indicae</i> Thory (= <i>Chinenses</i> DC.)	Tiges droites ou retombantes, aiguillons épars et recourbés, sépales entiers ou faiblement lobés, réfléchis après la floraison.	Chine	<i>Rosa chinensis</i> Jacq. <i>Rosa gigantea</i> Collet ex Crép. <i>Rosa odorata</i> (Andrews) Sweet
<i>Laevigatae</i> Thory	Grimpante peu rustique, tiges à aiguillons recourbés, feuilles à 3 folioles luisantes, grandes fleurs blanches.	Chine	<i>Rosa laevigata</i> Michx.
<i>Pimpinellifoliae</i> (DC.) Ser.	Buissons bas, drageonnants, densément pourvus d'aiguillons droits de taille variée, feuilles à folioles nombreuses (7-9), fleurs roses blanches ou jaunes, sépales entiers et persistants.	Asie Europe	<i>Rosa spinosissima</i> L. <i>Rosa hugonis</i> Hemsl. <i>Rosa foetida</i> J. Herm.
<i>Rosa</i> (= <i>Gallicanae</i> (DC.) Ser.	Buissons pas très élevés, dressés, drageonnants, aiguillons recourbés de taille variable, généralement mêlés de cils, grandes fleurs roses, sépales caducs.	Asie mineure Europe	<i>Rosa gallica</i> L. <i>Rosa</i> × <i>centifolia</i> L. <i>Rosa</i> × <i>damascena</i> Mill.
<i>Synstylae</i> DC.	Rosiers grimpants ou rampants, fleurs blanches, calice rapidement caduc, styles soudés en colonne.	Afrique du nord Amérique du Nord Asie Europe	<i>Rosa arvensis</i> Huds. <i>Rosa moschata</i> Herm. <i>Rosa wichuraiana</i> Crép.

Tableau 1 : les onze sections du sous-genre *Rosa* (d'après Krüssmann, 1981 ; Tarbouriech, 2001 ; Wissemann, 2003).

B) Rapports de l'homme avec les roses au cours de l'histoire

Aux prémices de l'agriculture, les rosiers, buissons denses et épineux étaient déjà utilisés en haies défensives autour des habitations et des cultures et les cynorrhodons ont aussi pu servir de nourriture dès 2500 av. J.-C. comme le suggèrent Casparie *et al.* (1977).

Traditionnellement, il est admis que la culture de la rose commença en Chine durant le règne de l'Empereur Chin-Nun (2737-2697 av. J.-C.). Elle fut cependant bien plus tardive en Europe et en Asie mineure. Nous devons probablement aux romains notre goût immodéré pour ses couleurs et son parfum. La chute de l'Empire Romain entraîna avec elle la perte de la culture de la rose en Europe occidentale. Elle resta le plus souvent limitée aux monastères pour un usage majoritairement médicinal. Cependant, les Arabes la conservèrent et il faudra attendre la fin du VIII^e siècle pour que la rose de Damas, *Rosa × damascena* Mill., retrouve une place de choix dans les jardins royaux de Charlemagne, probablement ramenée de Syrie par les chrétiens. A la Renaissance commencèrent en Europe et plus particulièrement en France les grands travaux de sélection et d'hybridation pour donner le socle des roses que l'on appelle "anciennes" (Fig. 2) (Krüssmann, 1981). La généalogie de ces rosiers anciens fait l'objet de travaux récents (Itwata *et al.*, 2000) mais les résultats sont encore controversés.

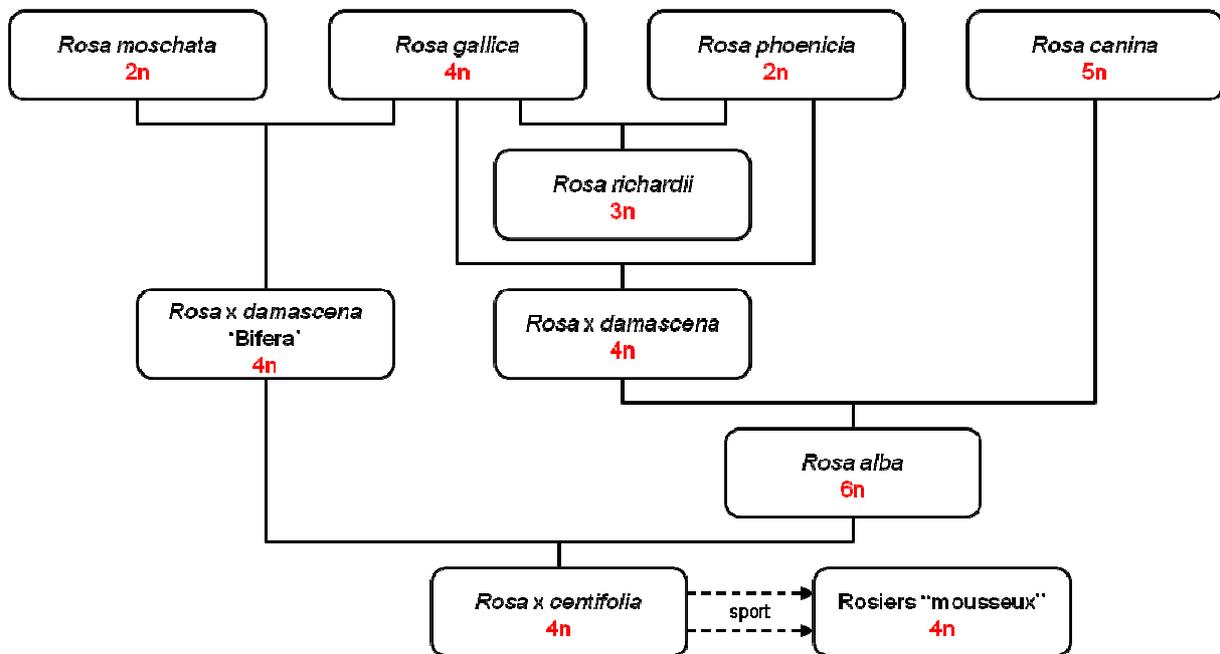


Figure 2 : Généalogie des rosiers anciens. Les nombres en rouge indiquent les niveaux de ploïdie (d'après Krüssmann, 1981).

La sélection variétale s'accéléra au XVIII^e siècle suite à l'introduction des roses chinoises en culture en Angleterre (Krüssmann, 1981). Ces rosiers orientaux permirent d'importer par croisement des caractères jusque-là inconnus en Europe tels que l'odeur de thé et la remontance (floraison continue) (Nakamura, 1987). Cette rupture amorça l'ère des roses dites "modernes" à partir de 1867 (Fig. 3). Cette date correspond à la création du cultivar 'La France', le tout premier "Hybride de Thé" créé par le rosiériste lyonnais Jean-Baptiste Guillot.

L'impératrice Joséphine de Beauharnais, férue de botanique, avait un goût particulier pour les roses et encouragea de nombreux horticulteurs à créer de nouvelles variétés dont le nombre explosa au début du XIX^e siècle (Fig. 3) (Krüssmann, 1981). De cette époque date la longue tradition française des obtenteurs de roses reconnus mondialement. A Louis Claude Noisette (1772-1849), Jean-Pierre Vibert (1777-1866), Jean Baptiste Guillot (1827-1893) ou encore Jean Claude Pernet père (1832-1896) qui leur ont ouvert la voie, ont succédé aujourd'hui les André Eve, Georges Delbard et Alain Meilland. Ils ont habilement su jouer avec la remontance des roses chinoises et la rusticité des rosiers européens, tout en important la couleur jaune de *R. foetida*, afin de créer des fleurs toujours plus belles, des plantes toujours plus résistantes et proposer un éventail toujours plus large de roses avec une palette de parfum et de couleur infinie.

Avec plus de 30 000 cultivars disponibles aujourd'hui (et probablement tout autant de variétés horticoles disparues), la rose occupe une place prépondérante en horticulture (Sheperd *et al.*, 1958). Elle représente en 2010 67,4% des fleurs coupées à la pièce chez les fleuristes français, ce qui témoigne de l'attachement que lui porte le consommateur, (FranceAgriMer, 2011). La production mondiale s'oriente aujourd'hui essentiellement autour de trois grands axes : i) les fleurs coupées sélectionnées pour leurs qualités esthétiques, et de plus en plus parfumées, ii) les rosiers de jardins aux fleurs d'une très bonne qualité esthétique, parfumées, et iii) la parfumerie centrée autour des rosiers de Damas (*R. × damascena* Mill.) et à cent feuilles (*R. × centifolia* L.).

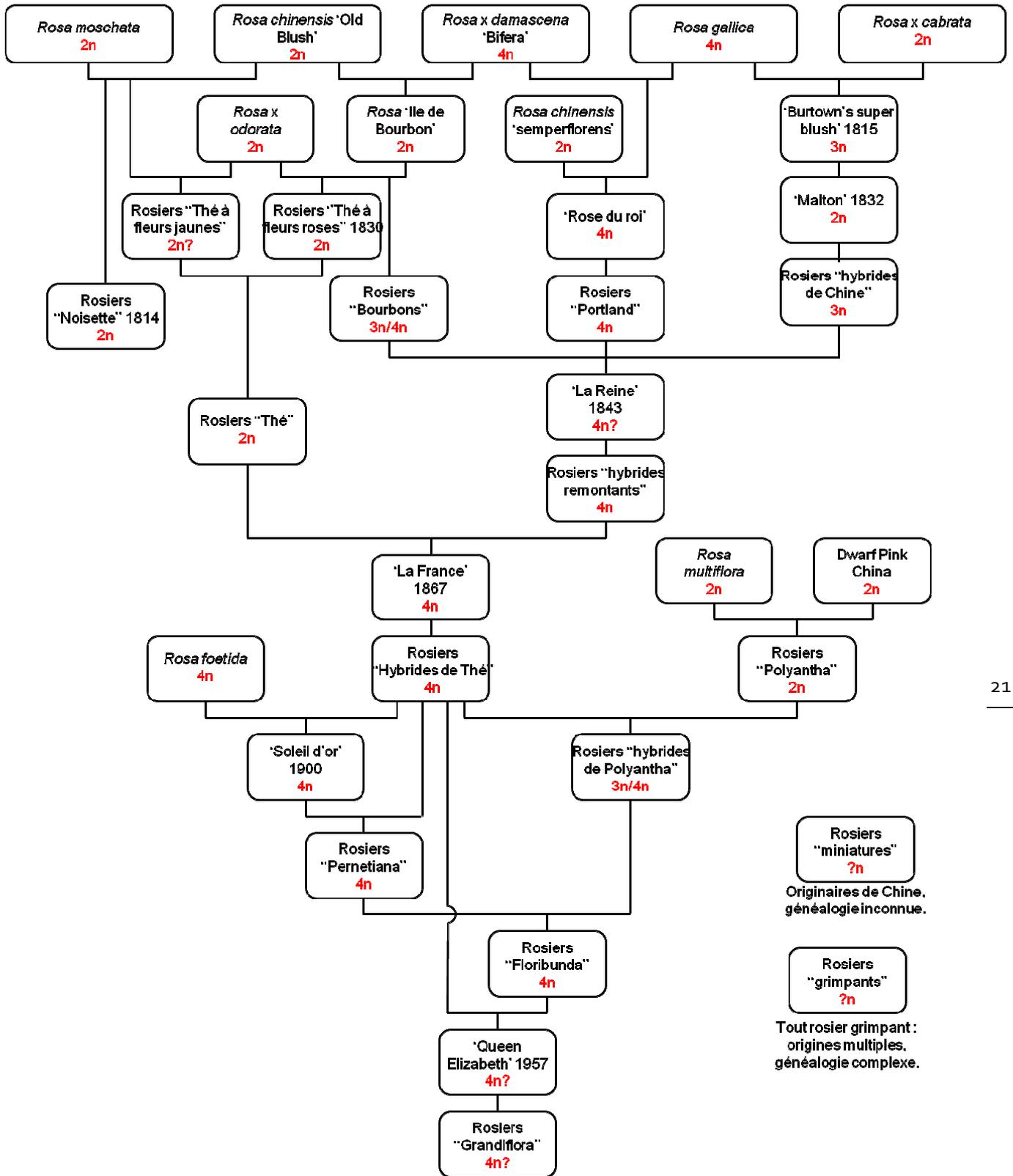


Figure 3 : Généalogie des rosiers modernes. Les nombres en rouge indiquent les niveaux de ploïdie (d'après Maia & Vénard, 1976 ; Krüssmann, 1981).

II) Le parfum des roses

La rose prend donc une place importante dans notre culture. En particulier, son odeur est depuis longtemps très prisée et le prix des parfums contenant de l'huile essentielle de rose peut atteindre des sommes considérables, jusqu'à 3 000 \$ l'once (~28 g) (Banay, 2006 ; McCormack, 2008). Mais les plantes n'ont pas acquis au cours de l'évolution des fleurs parfumées dans le but de plaire aux hommes, le parfum permet avant tout d'attirer les insectes pollinisateurs (Dudareva & Pichersky, 2000). D'ailleurs, certains composés organiques volatils émis par les fleurs, tel l'orcinol diméthyléther, sont détectés et utilisés par les abeilles pour repérer les fleurs, mais le nez humain y est souvent peu sensible (Shalit *et al.*, 2004).

A) Le rôle du parfum dans la pollinisation

Les composés volatils et odorants jouent un rôle particulier dans la communication chez les plantes. Par exemple, l'éthylène, le jasmonate et le méthylsalicylate sont des molécules volatiles bien connues pour intervenir dans les interactions plante/plante, plante/insecte ou plante/pathogène. Certains composés sont relargués par les feuilles dans l'air ambiant lors de l'attaque de la plante par un herbivore : ils servent alors soit de répulsifs pour faire stopper cette agression, soit ils attirent des parasitoïdes de ces herbivores. La diversité des composés odorants émis par les fleurs est encore plus grande. Le parfum floral joue un rôle clé dans l'attraction des pollinisateurs et donc dans la reproduction des plantes (Piechulla & Pott, 2003).

Comme la plupart des plantes émettant leur parfum en journée, les roses sont essentiellement pollinisées par des insectes généralistes parmi lesquels les abeilles et les bourdons occupent une place prépondérante (annexes 1 et 2). Certains composés volatils sont capables d'attirer des insectes particuliers : le linalol, les esters et les composés azotés attirent par exemple les papillons de nuit (Piechulla & Pott, 2003). Les insectes généralistes, à l'instar des abeilles, fourragent en s'orientant à partir de l'intensité totale du parfum des fleurs ; il a été montré par des expériences chez *Antirrhinum majus* qu'elles sont capables de distinguer des différences subtiles de parfum entre les fleurs (Wright *et al.*, 2005). Afin d'économiser leurs ressources énergétiques, la plupart des fleurs changent la composition, voire stoppent

leur production de parfum après la pollinisation, permettant aux insectes de faire la différence entre fleurs pollinisées et non pollinisées (Piechulla & Pott, 2003).

La comparaison des compositions des parfums émis par les différentes parties de la fleur chez *R. rugosa* montre de fortes disparités entre les organes floraux. Si les pétales sont responsables de la majorité du parfum d'une fleur, les étamines et en particulier le pollen, possèdent une signature chimique particulière (Dobson *et al.*, 1987 ; Dobson *et al.*, 1990). L'eugénol et le méthyleugénol, ainsi que certains aldéhydes, cétones, ou esters à longues chaînes, sont quasiment exclusivement produits par la partie mâle de la fleur. Le pollenkitt, une couche lipidique recouvrant les grains de pollen, est responsable de la majorité des émissions de composés organiques volatils du pollen (Dobson *et al.*, 1987 ; Dobson, 1988). La composition de ces odeurs polliniques est spécifique à chaque espèce de plante et permet aux abeilles solitaires de faire la différence entre celles-ci (Dobson, 1987). En particulier, l'eugénol possède un fort pouvoir d'attraction sur les bourdons. Cette odeur spécifique au pollen pourrait aussi permettre aux pollinisateurs d'évaluer la quantité de pollen encore présente dans les étamines et de choisir une fleur "appétissante" avant d'y atterrir, limitant ainsi les visites inutiles (Dobson & Bergström, 2000). Chez *R. rugosa*, bien que le parfum émis par le pollen soit le principal stimulus utilisé lors du fourragement, les bourdons utilisent aussi la couleur des pétales, le contraste formé par les étamines avec les pétales, ainsi que l'odeur émise par la corolle (Dobson *et al.*, 1999). L'odeur pollinique étant faible, il est probable qu'elle ne soit perçue par les insectes qu'à faible distance pour l'atterrissage et que ceux-ci soient guidés à longue distance vers la fleur par la couleur et le parfum de la corolle, mais ces interactions dépendent bien entendu du couple plante-insecte (Dobson & Bergström, 2000).

Il est à noter que le pollen de *R. rugosa* émet aussi de la 2-tridécanone et de la 2-undécanone, deux α -méthylcétones répulsives pour les insectes, dont les bourdons (Dobson *et al.*, 1990). Cet effet est néanmoins contrebalancé par l'émission d'eugénol fortement attractif, permettant ainsi aux rosiers d'être toutefois pollinisés par ces hyménoptères. En plus de leur effet répulsif contre les insectes herbivores ou pollinivores, les α -méthylcétones représentent aussi une protection contre les pathogènes du pollen (Dobson & Bergström, 2000).

B) La parfumerie et le parfum de rose

L'homme n'a bien entendu pas la même perception des odeurs que les insectes. Son odorat est même moins développé que chez la plupart des mammifères (Rouquier *et al.*, 2000). Cependant, l'homme apprécie en particulier les odeurs recherchées par les abeilles et les papillons de nuit, celles-ci ont une note sucrée pour le nez humain (Dudareva & Pichersky, 2000).

1) Histoire de l'industrie de la parfumerie

La rose de Damas (*R. × damascena* Mill.) est l'espèce la plus utilisée pour la production dans l'industrie de la parfumerie (Shalit *et al.*, 2004). Sa culture a commencé dans la région de Kazanlik en Bulgarie au XVII^e siècle, alors sous domination de l'Empire Ottoman. Plantes, systèmes de culture et techniques d'extraction furent importés d'Anatolie (Van de Pol, 2003). C'est à cette localité que l'on doit le nom du fameux cultivar utilisé aujourd'hui pour la production des meilleures huiles essentielles et eau de rose : *R. × damascena* cv. 'Kazanlik'. Nichée au pied des Balkans, cette plaine porte le nom de "Vallée des Roses", nom qu'elle tire des immenses champs et coteaux dédiés à la culture de la rose. Le climat et la nature du sol y sont tels que la production bulgare surpassa vite la production anatolienne. La Bulgarie reste le plus important producteur d'huile essentielle de rose (Van de Pol, 2003). A la fin du XIX^e siècle, plantes et techniques bulgares furent rapatriées en Anatolie dans les régions du Burdur et d'Isparta faisant de la Turquie l'autre principal centre de production de parfum de rose (Widrlechner, 1981). Mais *R. × damascena* Mill. n'est pas la seule espèce utilisée. *R. × alba* L. est utilisée pour délimiter les parcelles de *R. × damascena* Mill. en Bulgarie et en Turquie ; ses fleurs, moins concentrées en huile essentielle, sont récoltées pour produire une huile de moins bonne qualité (Widrlechner, 1981 ; Collin, 2003 ; Schulz, 2003). Bien que son rendement soit deux fois inférieur à celui de *R. × damascena* Mill. (Garnero, 1976), *R. × centifolia* L. est cultivée non pas pour son huile essentielle mais pour son essence concrète, dans la région de Grasse en France et au Maroc, les deux autres importants centres de production de parfum dans le monde (Collin, 2003 ; Schulz, 2003). Plus localement, *R. moschata* Herm. (Europe méridionale, Afrique du nord, Asie), *R. gallica* L., *R. rugosa* Thunb. et *R. bourboniana* L. (Turquie, Bulgarie, Russie) sont aussi cultivées pour la production d'huile essentielle, d'eau de rose ou d'autres formes de parfum (Van de Pol, 2003 ; Schulz, 2003).

2) Les techniques d'extraction du parfum de rose

L'enfleurage, méthode demandant beaucoup de main d'œuvre, a été abandonné, à l'exception de quelques rares fabriques, au même titre que la macération, au profit de l'hydrodistillation (Collin, 2003).

a) L'hydrodistillation

L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau sont les procédés les plus courants pour l'obtention des huiles essentielles. Cependant, l'injection de vapeur dans une masse de pétales entraîne leur agglutination, rendant le processus inefficace. L'entraînement à la vapeur n'est donc pas utilisé pour les fleurs de roses pour lesquelles on privilégie l'hydrodistillation. Dans cette technique, les pétales sont plongés dans un grand volume d'eau porté à ébullition et flottent à la surface. (Collin, 2003). Les composés volatils sont ensuite entraînés par la vapeur d'eau.

Cette extraction demande beaucoup de main d'œuvre et s'est d'abord organisée en petites exploitations familiales disposant d'alambics portatifs. Par la suite, les paysans se sont organisés en coopérative et des alambics de grande capacité ont commencé à remplacer les alambics portatifs. Ils sont capables de distiller 500 kg de fleurs dans 1500 L d'eau. La chauffe de l'eau dure 30 min et la distillation 1 h 30. Une grille dans le fond de la cuve empêche les pétales d'accéder aux couches d'eau les plus chaudes, ce qui pourrait dénaturer les parfums, et le réfrigérant est maintenu à 35-40°C pour que les stéaroptènes ne se solidifient pas et bouchent le conduit. Cinq cents litres de condensat sont recueillis de la distillation des fleurs. Une couche "d'huile directe" (environ 20% du volume final d'huile) se forme par décantation sur la première eau de rose. Mille deux cents litres de cette première eau de rose sont redistillés pendant 1 h pour obtenir 140 L de seconde eau de rose surmontée d'une couche "d'huile d'eau" après décantation (environ 80% du volume final d'huile). L'huile directe est laissée plusieurs jours au soleil pour précipiter les impuretés et décanter l'eau. L'huile d'eau est brièvement filtrée puis les deux huiles sont mélangées. On obtient ainsi l'huile essentielle de rose. Toutes les eaux sont récupérées et mélangées pour être redistillées afin de ne perdre aucune goutte d'huile (Collin, 2003). Une innovation importante a consisté à injecter de la vapeur directement dans le mélange eau/pétales. Ceci permet une distillation plus rapide, un brassage permanent des pétales permettant une meilleure extraction et un contrôle plus fin de tout le processus (Collin, 2003).

La production de 500 g d'huile essentielle de rose nécessite la distillation de 2 tonnes de roses, soit l'équivalent de 100 millions de pétales (Van de Pol, 2003). Un champ de $R. \times$

damascena produit environ 1500 kg de fleurs par hectare dès la troisième année de plantation (Collin, 2003) puis jusqu'à 5000 kg.ha⁻¹ les années suivantes, pendant une trentaine d'années s'il est bien entretenu, avant le remplacement des pieds (Garnero, 1976 ; Widrlechner, 1981). Autrefois, la production d'un kg d'huile essentielle de rose nécessitait environ 2000 kg de bois de chauffage pour alimenter le foyer de l'alambic, entraînant la déforestation et des problèmes d'érosion dans les zones alentours (Widrlechner, 1981). Aujourd'hui, les chaudières sont alimentées avec des combustibles fossiles.

L'huile essentielle de rose porte aussi souvent le nom d'essence de rose ou encore d'attar de rose. Attar vient du turc *attar*, lui-même dérivé du farsi *aettr* qui désigne un corps gras (Widrlechner, 1981 ; Van de Pol, 2003). Bien qu'ayant été et étant toujours très utilisée en Bulgarie et en Turquie, l'hydrodistillation est désormais surpassée en terme de volume de production par l'extraction par solvant. Cependant, l'hydrodistillation ayant un rendement très inférieur, les volumes de fleurs traitées pour la fabrication d'huile essentielle restent supérieurs à ceux utilisés pour l'extraction au solvant.

b) L'extraction par solvant

La plupart des composés du parfum sont solubles à température ambiante dans les solvants organiques. Pour la rose, l'hexane est le plus courant, le benzène ayant été interdit à cause de sa grande toxicité. L'extraction par solvant a l'avantage de mieux extraire le parfum en pénétrant plus profondément dans les pétales et de se faire à basse température (60-70°C) évitant ainsi de dénaturer certaines molécules sensibles à la dégradation thermique. Cependant l'hydrodistillation est un procédé plus simple à mettre en œuvre, avec une machinerie plus rudimentaire et donc un personnel demandant moins de formation. Aujourd'hui, les deux techniques coexistent car elles donnent des produits aux caractéristiques différentes (Collin, 2003).

Il existe deux procédés d'extraction par solvant, stationnaire ou dynamique. Dans les deux mécanismes, les fleurs, brassées ou non, sont lavées trois fois avec du solvant. En fin d'extraction, celui-ci est éliminé par une pompe à vide, ne laissant dans l'évaporateur que la concrète de rose. L'extraction complète dure environ 5 h (Collin, 2003). La concrète, concentrée en parfums mais aussi en pigments et en cires nécessite d'être traitée par un alcool tiède afin de les éliminer. L'alcool est ensuite refroidi à 0-10°C pour précipiter les cires puis filtré. On obtient ainsi l'absolue de rose (Collin, 2003).

L'extraction par solvant et l'hydrodistillation sont toutes les deux utilisées en Bulgarie pour la production d'huile essentielle de *R. × damascena* cv. 'Kazanlik'. Cependant, seule

l'extraction par solvant est utilisée en France et au Maroc où est majoritairement cultivée *R. × centifolia*. En effet, ses fleurs sont moins adaptées à la distillation et donnent un faible rendement par cette technique (Widrlechner, 1981 ; Collin, 2003). L'extraction par solvant présente le désavantage de pouvoir laisser des traces de solvants dans l'huile essentielle. Ses produits ne peuvent être qualifiés de "biologiques" au contraire de ceux de l'hydrodistillation. Des recherches sur d'autres procédés d'extraction, par exemple avec des fluides supercritiques, notamment l'eau et le dioxyde de carbone CO₂ sont en cours d'évaluation (Collin, 2003). Il s'agit là aussi d'extraction par solvant. Mais traiter des pétales frais, et donc contenant beaucoup d'eau, avec du CO₂ supercritique s'avère difficile et ces techniques ne sont pas appliquées industriellement.

3) Production et utilisations

Les produits obtenus par les différentes méthodes décrites ci-dessus sont quasi-exclusivement utilisés dans la parfumerie. Les conditions de ramassage des fleurs de rosiers (les pétales doivent être ramassés à la main entre 5 et 9 heures du matin et immédiatement distillés) ainsi que le faible rendement d'extraction de l'huile essentielle (environ 3 à 5 tonnes de pétales sont nécessaires pour obtenir 1 kg d'huile de rose) en font des produits de luxe (Schulz, 2003 ; Baydar & Baydar, 2005).

L'attar de rose représente la forme la plus chère : l'huile essentielle de rose d'origine bulgare se vend aujourd'hui 5000 euros/kg (Rusanov *et al.*, 2009). Du fait de sa forte concentration et de son prix prohibitif, l'attar est utilisé quasiment exclusivement pour la parfumerie de luxe (Widrlechner, 1981).

L'huile essentielle de rose est toutefois aussi utilisée comme arôme dans l'industrie agroalimentaire ou dans l'industrie pharmaceutique pour ses propriétés médicinales (Collin, 2003). Ainsi, les extraits de *R. × damascena* ont prouvé leur efficacité contre le VIH (Mahmood *et al.*, 1996) ainsi que leurs activités antibactérienne (Basim & Basim, 2003 ; Ozkan *et al.* 2004), antioxydante (Achuthan *et al.*, 2003 ; Ozkan *et al.* 2004) et hépatoprotectrice (Achuthan *et al.*, 2003). L'industrie cosmétique utilise aussi de nombreux parfums (Collin, 2003). Cependant, pour de telles applications, les produits d'extraction par solvant, moins coûteux, sont d'avantage utilisés que les produits de l'hydrodistillation. Il est à noter que tous ces produits extraits des pétales de roses sont progressivement substitués par les molécules synthétiques issues de l'industrie chimique, souvent très peu onéreuses en fabrication (Widrlechner, 1981).

La première trace écrite d'exportation de parfum de l'ère moderne date de 1860. A cette époque, l'Empire Ottoman, qui comprenait aussi l'actuelle Bulgarie, expédiait 1 100 kg d'attar de rose vers la France et l'Angleterre (Widrlechner, 1981 ; Van de Pol, 2003). La Turquie est aujourd'hui le deuxième producteur d'huile essentielle de rose après la Bulgarie. Bien que les quantités produites soient moindres, la Chine, l'Égypte, la France, l'Inde et le Maroc sont aussi des acteurs majeurs du secteur (Van de Pol, 2003). La production mondiale d'huile essentielle et de concrète était estimée au début des années 2000 à environ 20 tonnes (Schulz, 2003).

Aujourd'hui, la qualité de l'huile essentielle de *R. × damascena* Mill. répond aux normes AFNOR NF T 75-345:1986 et ISO 9842:2003. Cependant, chacun des pays producteurs présentant des conditions environnementales (pluviométrie, sol, ensoleillement, etc...) et de culture (irrigation, souche de rosier, etc...) variables, les huiles essentielles de rose provenant de chacun d'eux varient en termes de composition chimique (Baydar & Baydar, 2005) et les rendements sont eux aussi différents (Tabaei-Aghdaei *et al.*, 2007 ; Farooq *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que la date de récolte, la durée de fermentation (temps de latence entre la récolte et la distillation) et la méthode d'extraction ont aussi une influence sur la composition des huiles essentielles de rose (Baydar & Baydar, 2005). Tous ces facteurs font de chacun de ces attars un produit unique avec une composition chimique originale et donc un parfum particulier propre à chaque région et même à chaque producteur.

C) Diversité des molécules du parfum de rose

Les composés du parfum sont généralement de petites molécules ayant un poids moléculaire compris entre 100 et 250 Da (Dudareva & Pichersky, 2000), une polarité faible ainsi qu'une pression de vapeur élevée, ceci facilitant leur volatilité (Piechulla & Pott, 2003). Au total, quelques 400 composés volatils sont connus pour contribuer potentiellement au parfum de la rose (Schulz, 2003 ; Shalit *et al.*, 2003 ; Shalit *et al.*, 2004).

Cependant, les organes floraux de la rose n'émettent pas tous les mêmes composés et chaque verticille participe différemment au parfum global d'une fleur entière. L'étude par headspace de chacune des parties constituant la fleur de *R. rugosa* montre que les pétales émettent essentiellement des terpénoïdes et des alcools benzyliques, composés dominant l'odeur globale de la fleur entière. Les sépales émettent aussi un peu de ces molécules mais surtout des sesquiterpènes. Les anthères et le pollen produisent quant à eux une odeur

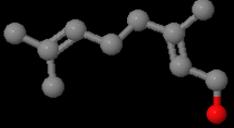
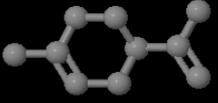
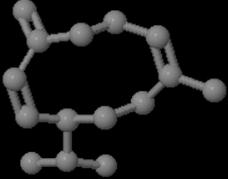
complètement différente de celles des pétales et des sépales, dominée par les dérivés d'acides gras, l'eugénol, le méthyleugénol, la 2-tridécanone, le tétradécanal et l'acétate de tétradécyle (Dobson *et al.*, 1990).

Le parfum des roses est un mélange complexe, composé de molécules que l'on regroupe traditionnellement en 3 familles : les terpénoïdes, les composés aromatiques et les dérivés d'acides gras (Vainstein *et al.*, 2001 ; Schulz, 2003). Les composés les plus abondants émis par une rose ne sont pas forcément ceux détectés le plus efficacement par le nez humain. Certaines molécules minoritaires ont un seuil de détection olfactif très bas et leur faible quantité suffit à imposer leurs odeurs sur le reste des molécules odorantes (Vainstein *et al.*, 2001 ; Schulz, 2003). Nous allons voir ici les principaux composants du parfum ainsi que l'odeur qui leur est associée.

1) Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, ou isoprénoïdes sont des molécules issues de l'assemblage d'unités isoprène (C_5H_8). Selon le nombre d'isoprènes impliqués, on parlera de monoterpènes (2 unités), sesquiterpènes (3 unités), diterpènes (4 unités), sesterterpènes (5 unités), triterpènes (6 unités), tétraterpènes (8 unités) ou polyterpènes (9 unités et plus). Au-delà de 400 g.mol^{-1} (soit 6 unités isoprènes), les composés ne sont que très peu, voire pas du tout volatils et ne participent donc pas directement au parfum (Croteau & Karp, 1991). On les retrouve par exemple en tant que constituants des membranes (les phytostérols sont des triterpènes) ou comme photorécepteurs grâce à l'enchaînement de doubles liaisons que forme l'enchaînement d'unités isopréniques (les caroténoïdes sont des tétraterpènes) (Bouvier *et al.*, 2005). Par contre, les produits de la dégradation des caroténoïdes sont des précurseurs des damascénones, des damascones et des ionones, et ces pigments ont donc un rôle indirect dans la synthèse du parfum (Schulz, 2003).

Les terpènes (Tab. 2) sont issus d'une néosynthèse. Certains d'entre eux donnent aux roses leur odeur typique, en particulier le géraniol (Baydar & Baydar, 2005) dont la présence dans les "hybrides de thé" modernes trahit une introgression des rosiers botaniques européens (Joichi *et al.*, 2005). D'autres composés encore viennent agrémenter cette odeur, tels que le citronellol qui, comme son nom l'indique, donne une note citronnée. Le ratio citronellol/géraniol permet d'évaluer la qualité odorante de l'huile essentielle, celui-ci devant être compris entre 1,25 et 1,30 (Baydar & Baydar, 2005).

		Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
monoterpènes	aliphatique	géraniol		sucré, floral, fruité, rose, cireux, citron	Nakamura, 1987 Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Baydar & Baydar, 2005 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Won <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010
	cyclique	limonène		citron, orange, frais, sucré	Flament <i>et al.</i> , 1993 Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Won <i>et al.</i> , 2009
sesquiterpène		germacrène D		boisé, épicé	Flament <i>et al.</i> , 1993 Guterman <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Hendel-Rahmanim <i>et al.</i> , 2007

30

Tableau 2 : Exemples de terpènes participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentscompany.com). Une liste plus complète se trouve en annexe 3.

Les cétones de rose (rose ketones) (Tab. 3) forment un groupe de terpènes à part. Elles ne résultent pas d'une néosynthèse comme les terpènes vus ci-dessus, mais proviennent de la dégradation enzymatique et de l'oxydation des caroténoïdes (Schulz, 2003). Les ionones et les théaspiranes sont donc principalement trouvés dans le parfum des cultivars de rosiers dont les fleurs sont fortement colorées par ces pigments, ainsi que par les flavonoïdes et les anthocyanes (Schulz, 2003). Les damascénones, les damascones et leurs oxydes n'apparaissent pas dans les extraits de parfum de rose et sont donc probablement des produits de réarrangement de molécules sensibles à la chaleur (3,7-diméthyl-5-octène-1,7-diol et autres monoterpénoïdes hydroxylés) lors de l'hydrodistillation (Schulz, 2003).

La β -damascénone tient une place toute particulière dans cette liste. Bien que n'étant pas synthétisée par la plante mais provenant d'une dégradation de composés au cours du processus de distillation (Schulz, 2003), elle joue un rôle important dans l'odeur de l'attar de rose et est un gage de qualité des huiles essentielles de roses (Ohloff & Demole, 1987).

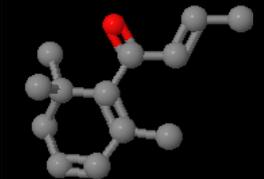
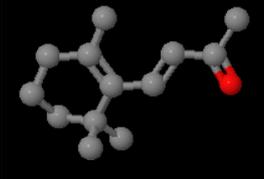
Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
β -damascénone		naturel, sucré, fruité rose, prune, raisin, framboise, sucre	Ohloff & Demole, 1987 Schulz, 2003 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010
β -ionone		floral, boisé, sucré, fruité, fruits rouges, tropical, cire d'abeille	Flament <i>et al.</i> , 1993 Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010

Tableau 3 : Exemples de cétones de roses participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentscompany.com). Une liste plus complète se trouve en annexe 4.

Un composé cyclique, le 2,4,6-mégastigmatriène, a récemment fait son apparition dans les listes de composés du parfum (Joichi *et al.*, 2005). Il s'agirait d'un produit de dégradation enzymatique des caroténoïdes, avec pour intermédiaire la "cétone de sauterelle" (en anglais "grasshoper ketone"). Son produit hydroxylé, le mégastigma-6,7-diène-3,5,9-triol, pourrait être alors transformé en β -damascénone et 3-hydroxy- β -damascénone en conditions acides au cours de la distillation (Suzuki *et al.*, 2002).

2) Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont de première importance chez les végétaux, ils comprennent trois des acides aminés essentiels (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) ainsi que des composés structuraux des parois végétales, les lignines (Maeda & Dudareva, 2012). La formation des aminoacides aromatiques emprunte la voie du shikimate. La métabolisation de ces acides aminés ou de leurs précurseurs (shikimate et chorismate essentiellement) permet de produire une grande diversité de métabolites secondaires : tannins, coumarines, flavonoïdes, anthocyanes... En particulier, la désamination de la phénylalanine mène au cinnamate, véritable "plaque tournante" pour la synthèse de ces composés (Croteau & Krap, 1991). Certaines huiles essentielles sont particulièrement riches en composés aromatiques odorants : anéthole et aldéhyde anisique pour l'anis, apiole pour le persil, vanilline pour la vanille, asarone pour l'asaret, eugénol pour le giroflier, etc... L'huile essentielle de rose

contient une forte quantité de 2-phényléthanol. Cependant, une grande variété de composés aromatiques participe au parfum d'une rose (Tab. 4).

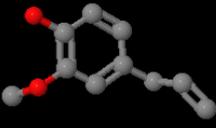
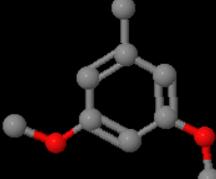
Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
eugénol		sucré, épicé, clou de girofle, boisé	Naves, 1949 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009
orcinol diméthyléther (3,5-diméthoxytoluène ; 1,3-diméthoxy-5-méthyl benzène)		Note verte fraîche et humide avec un caractère phénolique et épicé	Nakamura, 1987 Mookherjee <i>et al.</i> , 1989 Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Lavid <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
2-phényléthanol		floral, rose, rose fanée, eau de rose	Nakamura, 1987 Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Oka <i>et al.</i> , 1999 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Verhoeven <i>et al.</i> , 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Baydar & Baydar, 2005 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Won <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010

Tableau 4 : Exemples de composés aromatiques participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentscompany.com). Une liste plus complète se trouve en annexe 5.

Tout comme le géraniol, le 2-phényléthanol est aussi responsable de l'odeur typique de la rose. Sa présence dans les "hybrides de thé" modernes proviendrait à la fois de leur ascendances européenne et chinoise (de *R. multiflora* Thunb.) (Joichi *et al.*, 2005). On peut aussi noter la présence dans cette liste de l'eugénol et de ces dérivés. Nous l'avons vu plus haut, cette molécule est importante pour l'attraction des bourdons au cours de la pollinisation.

Mais son odeur épicée, typique du clou de girofle, vient aussi relever le parfum d'une rose et est donc souvent recherchée par les sélectionneurs.

3) Les dérivés d'acides gras

Les dérivés d'acides gras sont issus de la métabolisation des chaînes aliphatiques à nombreux carbones contenues dans les lipides (Croteau & Karp, 1991). Les acides gras sont coupés en fragments plus petits, oxydés et décarboxylés, menant à une diversité d'alcools, de cétones, d'aldéhydes et d'acides à chaînes plus ou moins longues, comportant ou non une ou plusieurs insaturation(s) (Tab. 5) (Croteau & Karp, 1991).

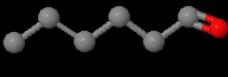
Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
hexanal		frais, vert, aldéhyde gras, herbe, feuille, fruité sueur	Flament <i>et al.</i> , 1993 Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>cis</i> -3-hexénoïl (<i>Z</i>)-3-hexénoïl		frais, vert, herbe coupée, feuillage, légume, herbeux, huileux	Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
tétradécanoïl		Graisseux, cireux, ambré, encens, citron sec, épluchures, musc	Dobson & Bergström, 2000

Tableau 5 : Exemples de dérivés d'acides gras participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentscompany.com). Une liste plus complète se trouve en annexe 6.

Les dérivés d'acides gras apportent souvent une note herbacée au parfum de la rose (Tab. 5). C'est le cas du (*Z*)-3-hexénoïl à l'odeur caractéristique d'herbe fraîchement tondu (Caissard *et al.*, 2009).

4) Autres molécules du parfum

Outre les molécules appartenant aux trois familles décrites ci-dessus, il existe d'autres molécules dans le parfum et l'huile essentielle de rose, en particulier des dérivés de furane (*cis* et *trans*-2-(3-méthyl-2-butényl)-3-méthyltétrahydrofurane (Ohloff & Demole, 1987 ; Schulz, 2003)). Les buténolides de monoterpènes sont des lactones elles aussi considérées comme des dérivés oxydés des furanes (3-(4-méthyl-3-pentényl)-2-butén-4-olide et 3-méthyl-4-(3-méthyl-2-butényl)-2-butén-4-olide ; Ohloff & Demole, 1987 ; Schulz, 2003). Le soufre, atome présent dans de nombreuses molécules odorantes, est peu représenté dans le parfum des roses. Pourtant, avec leurs seuils de détection très bas, les sulfure et disulfure de diméthyle et

le benzothiophène et ses dérivés participent activement au parfum des roses et apportent une note épicée (Schulz, 2003). Omata *et al.* identifient en 1991 seize nouvelles molécules soufrées contribuant significativement à l'odeur de l'attar de rose, plusieurs de ces composés étant par ailleurs des dérivés de monoterpènes.

5) Production et régulation de l'émission du parfum

Déterminer le lieu de production du parfum est une question difficile. Certaines techniques colorimétriques comme la coloration au NaDi (David & Carde, 1964) permettent de visualiser les composés chimiques odorants dans le pétale, sans toutefois les différencier. Quelques réactifs permettent néanmoins de distinguer les lipides acides des lipides neutres (Caissard *et al.*, 2004). Cependant, ils colorent les zones de concentration des composés, qui ne correspondent pas forcément aux zones de production où les concentrations peuvent être plus faibles.

Les rosiers "hybrides de thé" modernes ont souvent des fleurs à nombreux pétales, qui peuvent représenter plus de 90% du poids de la fleur. Même si les étamines de ces fleurs peuvent renfermer une grande concentration de composés volatils, les pétales sont donc le lieu principal de synthèse du parfum chez la plupart des cultivars modernes (Bergougnoux *et al.*, 2007). L'épiderme adaxial des pétales est constitué d'une couche de cellules coniques (Fig. 4) dont la forme permet une réflexion maximale de la lumière. Ces cellules forment des amas, appelés osmophores, chez certains groupes de plantes tel que les Orchidacées, mais recouvrent la plus grande partie du pétale chez la majorité des plantes (Caissard *et al.*, 2004). C'est le cas de la rose. Chez celle-ci, la surface abaxiale ne présente, à l'inverse, pas ces cellules coniques. Les deux surfaces du pétale, bien que différentes, sont toutes deux capables d'émettre des composés volatils (Bergougnoux *et al.*, 2007). De plus, certaines enzymes de synthèse de composés odorants se retrouvent dans les deux épidermes du pétale de rose (Scalliet *et al.*, 2006 ; Bergougnoux *et al.*, 2007). La cuticule à la surface des pétales pourrait représenter une barrière à l'émission du parfum. Cependant, son épaisseur n'explique pas la différence d'émission entre une rose parfumée et une rose non parfumée. Celle-ci résiderait plutôt au niveau de la synthèse des composés (Bergougnoux *et al.*, 2007). Chez les rosiers "mousseux", les sépales portent des trichomes qui sécrètent une résine odorante. La composition en composés organiques volatils de cette résine est différente de celle des pétales (Caissard *et al.*, 2006).

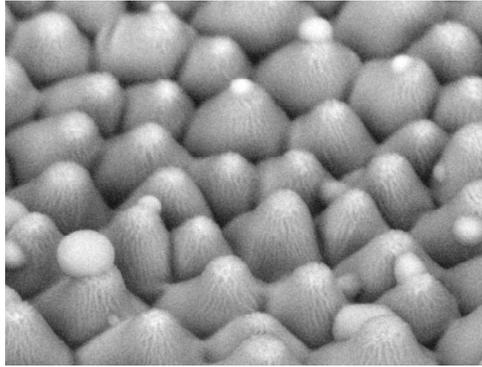


Figure 4 : Epiderme adaxial d'un pétale de *Rosa × hybrida* observé en microscopie électronique environnementale (Gr. × 600). D'après Caissard *et al.*, 2004.

Traditionnellement, on distingue deux modes de sécrétion des composés organiques volatils : la sécrétion “eccrine” durant laquelle les molécules diffusent ou sont transportées directement à travers la membrane plasmique, et la sécrétion “granulocrine” correspondant à une exocytose des composés contenus dans des vésicules spécifiques (Caissard *et al.*, 2004). Chez la rose, des gouttelettes lipidiques ont pu être observées et pourraient être impliquées dans les sécrétions des monoterpènes par le pétale (Machenaud, 2010 ; Fig. 5). Cependant, l'intervention de protéines de transport, tels les transporteurs ABC, ne peut pas être exclue. Une fois sécrétées, les molécules sont directement volatilisées à la surface du pétale de rose et non stockées sous la cuticule comme chez les Lamiacées par exemple (Caissard *et al.*, 2004).

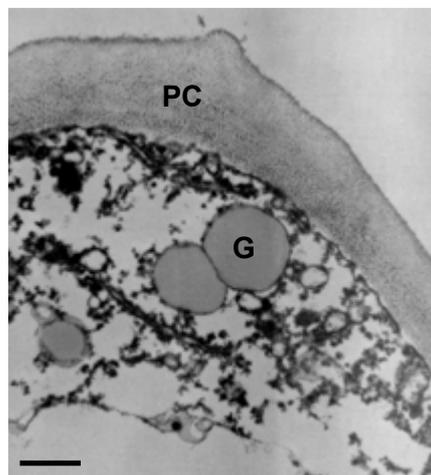


Figure 5 : Cellule épidermique de pétale de *Rosa × hybrida* observée en microscopie électronique à transmission pendant la sécrétion. GL : gouttelette lipidique ; PC : paroi cellulaire. Barre = 0,5µm. D'après Bergougnoux *et al.*, 2007.

Chez les plantes attirant des pollinisateurs diurnes, un pic d'émission de parfum peut être observé en journée (Vainstein *et al.*, 2001). D'autre part, la composition peut aussi évoluer au cours de la journée. Ces deux caractéristiques représentent un avantage pour la plante en termes d'économie d'énergie mais aussi pour attirer les pollinisateurs au moment de

la journée où ceux-ci sont actifs (Dudareva & Pichersky, 2000). Chez la rose, la grande majorité des composés, qu'ils soient terpéniques, aromatiques ou dérivés d'acides gras, sont émis au cours de la journée (Helsper *et al.*, 1998 ; Picone *et al.*, 2004). La plupart des émissions suivent l'horloge circadienne biologique de la plante, tandis que pour quelques composés (monoterpènes oxydés, β -caryophyllène, et dihydro- β -ionone), celles-ci sont directement dépendantes de l'exposition de la fleur à la lumière (Helsper *et al.*, 1998 ; Fig. 6). Il a été montré que ce cycle d'émission dépend à la fois de la disponibilité du substrat mais aussi de l'expression des gènes de synthèse. Ainsi, la forme glycosylée du 2-phényléthanol serait la source de rythmicité dans l'émission de cette molécule (Picone *et al.*, 2004). L'acétate de géranyle montre un pic d'émission au cours de la journée. Ce pic correspond au pic d'expression du gène de l'enzyme synthétisant cette molécule, l'alcool acétyltransférase *RhAAT*, directement dépendante du cycle circadien endogène (Hendel-Rahmanim *et al.*, 2007). L'émission de l'acétate de géranyle dépend donc directement de l'expression de son gène de synthèse. Le germacrène D montre aussi un pic d'émission au cours de la journée, mais directement lié à l'exposition de la fleur à la lumière et non au cycle circadien.

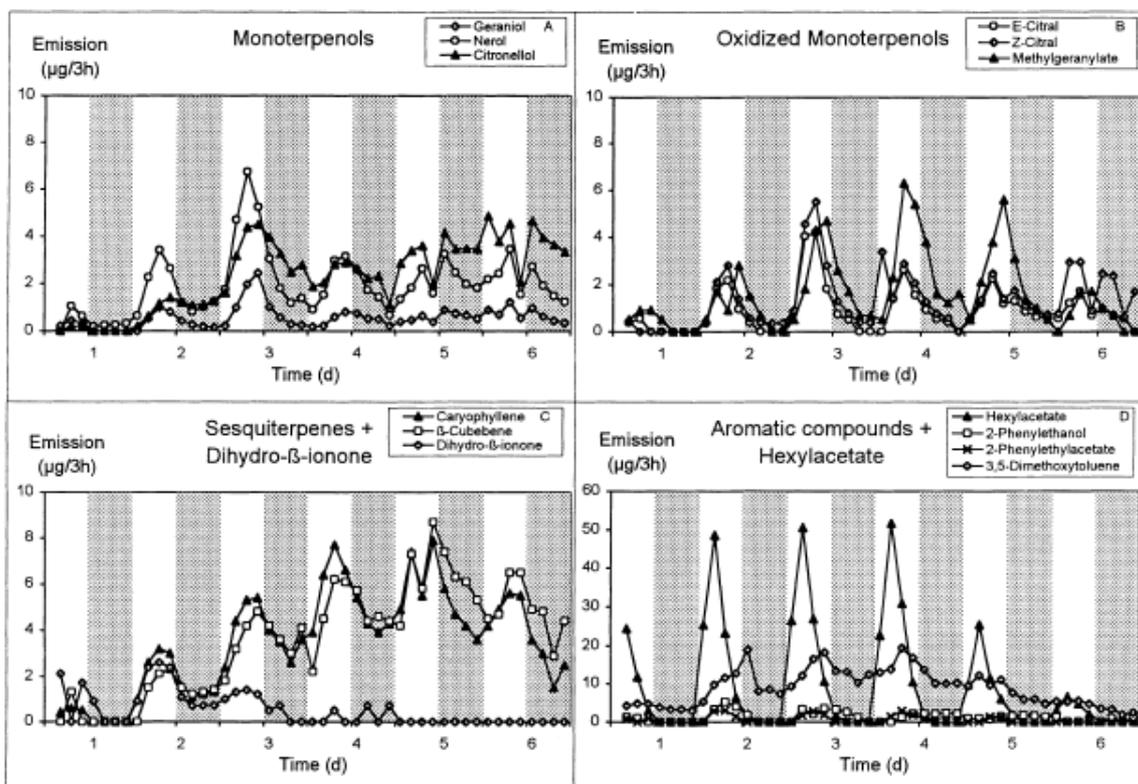


Figure 6 : Emission de composés volatils par les fleurs non coupées de *Rosa* \times *hybrida* cv. 'Honesty', exposées à une photopériode de 12h. Les zones blanches et grises correspondent respectivement aux périodes d'éclairage et d'obscurité. D'après Helsper *et al.*, 2004.

Cependant, l'expression du gène de la germacrène D synthase et la concentration en germacrène D dans les cellules de pétales sont constantes au cours de la journée. L'émission est donc directement régulée par la lumière et est indépendante des gènes de synthèse et du stock intracellulaire en germacrène D (Hendel-Rahmanim *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la quantité et la composition du parfum sont aussi influencées par le stade d'ouverture de la fleur du rosier (Helsper *et al.*, 1998 ; Picone *et al.*, 2004). D'autres facteurs pourraient aussi influencer sur le parfum d'une rose. En particulier, les facteurs climatiques, et notamment la température, sont connus pour affecter la quantité de parfum émise par les fleurs de *Trifolium repens* L. (Jakobsen & Olsen, 1994).

D) Les voies de biosynthèse du parfum

Le parfum d'un rose est un mélange complexe d'un nombre très important de molécules. Mais paradoxalement, l'ensemble de ces composés est synthétisé par un petit nombre de voies métaboliques (Vainstein *et al.*, 2001).

La première enzyme florale impliquée dans la synthèse d'un composé parfumé a été identifiée en 1994 (Pichersky *et al.* 1994). Il s'agit de la linalol synthase de *Clarkia breweri* (A.Gray) Greene (Onagraceae). Si les voies de biosynthèse sont désormais bien élucidées grâce à la recherche des intermédiaires réactionnels et à leur étude dans les parties végétatives, les enzymes en charge de ces réactions dans la fleur sont relativement moins connues (Dudareva & Pichersky, 2000). L'étude des voies métaboliques du parfum des fleurs s'est faite pour l'essentiel chez *Clarkia breweri*, chez l'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.), chez le pétunia (*Petunia* spp.) et chez le muflier (*Antirrhinum majus* L.). La rose (*Rosa* spp.) est un autre modèle d'étude. Nous allons détailler ici quelques enzymes connues comme étant impliquées dans la synthèse du parfum en mettant l'accent sur celles identifiées chez la rose.

1) Synthèse des terpénoïdes

Les terpènes sont un assemblage d'unités isoprénoïdes. Cette molécule est disponible dans la cellule sous forme de pyrophosphate d'isopentényle (IPP). Sa synthèse peut s'effectuer *via* deux voies qui coexistent dans la cellule : la voie mévalonate cytosolique et la voie non-mévalonate plastidiale. Ces deux voies sont au final interconnectées et l'IPP peut migrer du cytosol vers le plaste ou même la mitochondrie (Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Rodríguez-Concepción, 2006 ; Pulido *et al.* 2012). En aval, l'utilisation de l'IPP aboutit à des

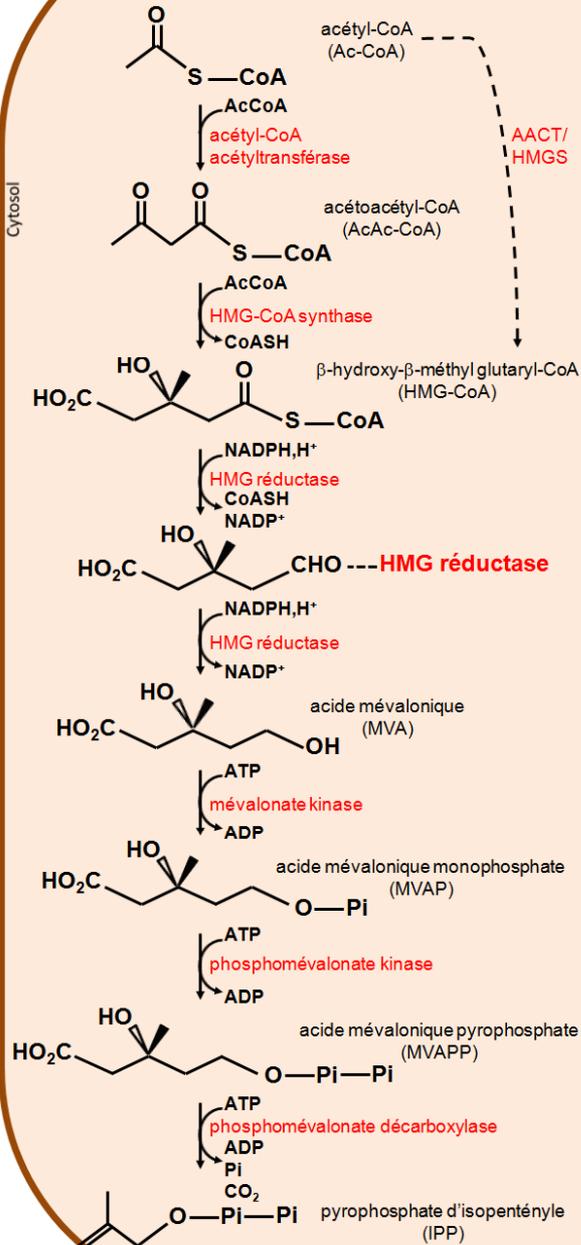
produits différents : i) les mono-, di- et tétraterpènes (synthétisés dans le plaste), ii) les sesqui- et triterpènes (synthétisés dans le cytosol), et iii) les polyterpènes (synthétisés dans le réticulum endoplasmique). Les ionones qui découlent de la métabolisation des caroténoïdes sont quant à elles fabriquées dans le plaste (Bouvier *et al.*, 2005).

a) Voie mévalonate cytosolique

Nous allons voir dans un premier temps la voie mévalonate dans le cytosol. L'IPP y est synthétisé par polymérisation d'acétyl coenzyme A (AcCoA) (Fig. 7). Deux molécules d'AcCoA sont liées entre elles par une β -cétolyase, l'acétyl-CoA acétyltransférase AACT, formant ainsi l'acétoacétyl coenzyme A (AcAcCoA). Une troisième molécule d'AcCoA vient se condenser sur celle-ci, donnant le β -hydroxy- β -méthyl glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) (McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Pulido *et al.*, 2012). Chez les plantes, ces deux réactions semblent catalysées par une seule et même enzyme monomérique possédant les deux domaines et nommée AACT/HMGS (Bach *et al.*, 1991 ; Weber & Bach, 1994). Le HMG est ensuite réduit par l'HMG réductase en aldéhyde, qui reste d'abord lié à l'enzyme, puis en l'alcool correspondant, l'acide mévalonique MVA. Le mévalonate est alors doublement phosphorylé par les mévalonate et phosphomévalonate kinases en présence d'ATP, en mévalonate pyrophosphate MVAPP qui va se réarranger en présence d'un nouvel ATP et en perdant un carbone sous l'action de la pyrophosphomévalonate décarboxylase pour finalement aboutir à l'IPP (McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Pulido *et al.*, 2012). L'utilisation de mévinoline, un inhibiteur spécifique de l'HMG réductase, montre que la réduction de l'HMG est l'étape limitante dans cette voie de biosynthèse (Bach & Lichtenthaler, 1982a ; 1982b) alors que le mévalonate n'est pas un facteur limitant (Bach & Lichtenthaler, 1982a).

Deux HMG synthases putatives ont été trouvées chez le tournesol (Dyer *et al.*, 2009), le pin (Wegener *et al.*, 1997), l'hévéa (Suwanmanee *et al.*, 2002), la moutarde (Nagegowda *et al.*, 2005), l'if (Kai *et al.*, 2006) et une orchidée (Teh *et al.*, 2012), mais cette enzyme n'a été caractérisée que chez l'arabette (Montamat *et al.*, 1995). Certaines espèces présentent plusieurs ARNm différents, c'est le cas dans la fleur de la moutarde avec deux ARNm s'exprimant dans le cytosol des stigmates et des ovules (Nagegowda *et al.*, 2005).

Voie mévalonate



Voie non-mévalonate

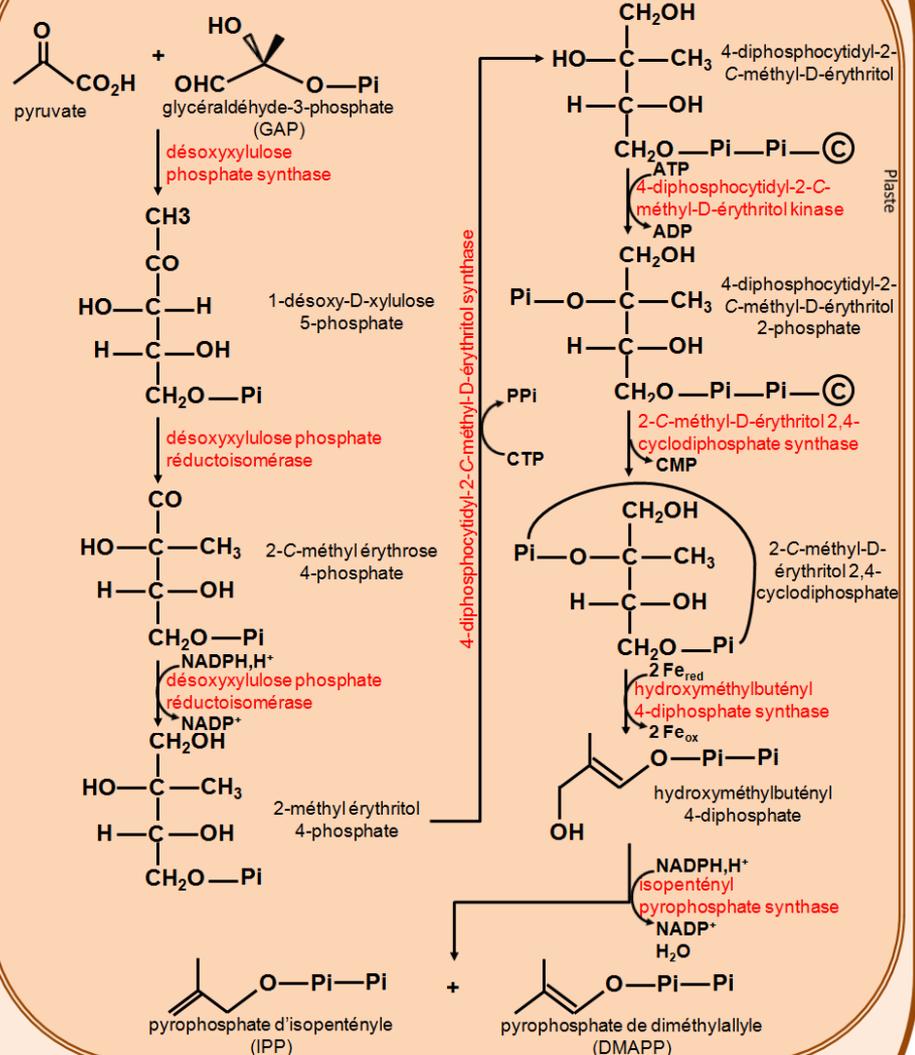


Figure 7 : Synthèse du pyrophosphate d'isopentényle par les voies dépendante et indépendante du mévalonate. A gauche : la voie du mévalonate a lieu dans le cytosol ; à droite : la voie non mévalonate se déroule dans le plaste. En rouge sont notées les enzymes assurant les réactions (d'après McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Pulido *et al.*, 2012).

La HMG réductase a été identifiée chez un grand nombre d'espèces végétales, dont beaucoup ont un intérêt agronomique et médicinal : le riz (Nelson *et al.*, 1994) ou le melon (Kato-Emori *et al.*, 2001) par exemple. Contrairement aux animaux, la HMG réductase est

codée chez les plantes par plusieurs gènes et possède plusieurs isoformes chez la majorité des végétaux (Friesen & Rodwell, 2004 ; Ma *et al.*, 2012), chacune étant différentiellement exprimée dans les tissus (Enjuto *et al.*, 1994 ; Enjuto *et al.*, 1995 ; Ma *et al.*, 2012). De plus, on connaît chez le pois deux isoformes de l'enzyme, une dans le plaste et une dans le cytosol, ayant chacune des propriétés différentes (Wong *et al.*, 1982). Enfin, différentes isoformes sont activées chez la pomme de terre en réponse aux stress biotique ou abiotique (Choi *et al.*, 1992). Etant donné leur position basale dans la synthèse des isoprénoïdes et le rôle important de ces derniers dans le métabolisme primaire et dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques, les HMG réductases sont régulées par de nombreux signaux : développementaux, environnementaux, par les stress biotiques... Cette régulation se place aussi bien au niveau transcriptionnel que post-traductionnel (phosphorylation, dégradation, compartimentation intracellulaire) (Stermer *et al.*, 1994).

Toutes les HMG réductases de plantes possèdent en commun un motif MDXRRR (où X = V, I, L ou S) dans la partie N-terminale de la protéine. Bien que son rôle n'ait pas été encore précisé, il pourrait représenter une séquence d'ancrage au réticulum endoplasmique (Lumbreras *et al.*, 1995). En effet, la HMG réductase est une protéine liée essentiellement à la membrane du réticulum endoplasmique avec un domaine catalytique tourné vers le cytosol (Leivar *et al.*, 2004) bien que des activités HMG réductases aient aussi parfois été détectées dans la mitochondrie du radis (Suzuki & Uritani, 1976) et dans les plastes du guayule et du haricot (Reddy & Das, 1987).

Si les enzymes de cette voie de biosynthèse n'ont pas été étudiées dans les pétales de rose, la voie du mévalonate et ses intermédiaires ont tout de même été mis en évidence dans ce tissu (Dunphy, 2006). De plus, la HMG réductase est connue dans les fleurs et surtout le pollen de la pomme de terre (Choi *et al.*, 1992) et le pollen et le gynécée de l'arabette (Enjuto *et al.*, 1995) et pourrait donc participer à la production de composés volatils dans les fleurs de ces espèces. Les autres enzymes de la voie mévalonate ne sont pas encore caractérisées dans les fleurs.

b) Voie non-mévalonate plastidiale ou voie de Rohmer

Cette seconde voie de synthèse de l'IPP se rencontre presque exclusivement dans le plaste des végétaux et chez les Eubactéries (Lichtenthaler *et al.*, 1997). Chez les plantes, elle tient son origine de l'endosymbiose de la bactérie ayant conduit au chloroplaste (Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005). Elle est aussi parfois appelée voie de Rohmer, du nom de son découvreur (Rohmer, 1999), ou voie du MEP pour faire référence au 2-méthylérythritol 4-

phosphate. Ici la réaction ne débute pas avec un AcCo mais avec une molécule de pyruvate et une de glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) (Fig. 7). La transacétylation entre les deux, conduit à un sucre, le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Pulido *et al.*, 2012). Cette condensation est catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), une enzyme immunolocalisée dans le plaste chez *Arabidopsis thaliana* (Bouvier *et al.*, 2000). Elle a aussi été identifiée chez de nombreuses plantes, dont beaucoup ont un intérêt agronomique et médicinal : le poivron (Bouvier *et al.*, 1998) ou le *Ginkgo biloba* (Kim *et al.*, 2006a) par exemple.

Chez de nombreuses plantes comme la luzerne, le riz, le palmier à huile et l'épicéa, il existe plusieurs cDNA de la DXS, chacun étant exprimé et induit différemment (Walter *et al.*, 2002 ; Khemvong & Suvachittanont, 2005 ; Kim *et al.*, 2005 ; Phillips *et al.*, 2007). Chez la sauge, ces ADNc sont codés par plusieurs gènes et sont différemment exprimés dans les tissus et les compartiments cellulaires, les uns participant au métabolisme primaire et d'autres au métabolisme des terpénoïdes (Ma *et al.*, 2012). Ces isoformes sont adressées au chloroplaste (Lange *et al.*, 1998 ; Lois *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2009). En outre, cette enzyme catalyse l'étape limitante dans cette voie mévalonate-indépendante (Estévez *et al.*, 2001).

Le 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate subit ensuite un réarrangement et une réduction par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) pour donner un autre sucre, le 2-méthylérythritol 4-phosphate (MEP). Cette enzyme a été identifiée chez plusieurs espèces d'intérêt agronomique et médicinal : la menthe (Lange & Croteau, 1999) ou l'hévéa (Seetang-Nun *et al.*, 2008) par exemple. Jusqu'à très récemment, il n'avait été trouvé qu'un seul gène de cette protéine chez toutes les plantes étudiées (Schwender *et al.*, 1999 ; Carretero-Paulet *et al.*, 2002 ; Hans *et al.*, 2004). Cependant, il a été détecté deux ADNc distincts chez l'hévéa, chacun ayant un profil d'expression tissulaire différent (Seetang-Nun *et al.*, 2008). Toutes ces séquences possèdent un peptide d'adressage au plaste, à l'exception d'une séquence d'orchidée (Chan *et al.*, 2009). Des expériences d'immunolocalisation (Carretero-Paulet *et al.*, 2002 ; Hans *et al.*, 2004) et de fusion à la GFP (Yoonram *et al.*, 2008) ont effectivement prouvé la position plastidiale de la DXR. Il s'agit d'une protéine homodimérique nécessitant un cofacteur, le NADPH, et un cation divalent, Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} , pour son bon fonctionnement (Proteau, 2004). Elle possède deux domaines conservés chez toutes les plantes étudiées ci-dessus : un domaine GSTGSIG de fixation du NADPH et un domaine PPPPAWPGRA riche en proline, spécifique aux plantes, dont le rôle n'est pas élucidé (Zhang *et al.*, 2009). Démontrée comme une enzyme-clé de la voie de Rohmer par

certaines expériences, elle partage cependant cette place avec l'enzyme précédente, la DXS (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001 ; Carretero-Paulet *et al.*, 2002). Jusqu'à maintenant, sa présence dans les fleurs n'a été étudiée que chez une seule espèce d'orchidée, *Vanda* sp., dans laquelle son niveau d'expression est fort et elle pourrait donc participer à la production du parfum dans la fleur (Chan *et al.*, 2009). Son ADNc a aussi été identifié dans les fleurs de rose mais elle montre aussi une faible expression dans les fleurs (Bergougnoux, 2005).

Enfin, une série de réactions encore assez mal élucidées chez les plantes permet de fabriquer l'IPP (Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Pulido *et al.*, 2012). Seuls quelques orthologues des protéines bactériennes sont aujourd'hui connus. Chez *Escherichia coli*, le 2-méthylérythritol 4-phosphate est transformé en isopentényl pyrophosphate par cinq enzymes successives : la 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol synthase (MCT), la 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (CMK), la 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MDS), l'hydroxyméthylbutényl 4-diphosphate synthase (HDS) et l'isopentényl pyrophosphate synthase (HDR) (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002 ; Pulido *et al.*, 2012). Les orthologues de ces enzymes peuvent se retrouver dans le génome d'*A. thaliana*, chacun ayant une séquence d'adressage au chloroplaste (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). Cependant, seul un orthologue des MCT, CMK, HDS et HDR et deux de la MDS, ont été caractérisés chez les plantes : MCT chez l'arabette (Rohdich *et al.*, 2000a), CMK chez la tomate (Rohdich *et al.*, 2000b) et putativement chez une orchidée (Mohd-Hairul *et al.*, 2011), MDS chez le ginkgo (Gao *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2006b ; Meifang *et al.*, 2008) et l'arabette (Hsieh & Goodman, 2006), HDS chez l'arabette (Seemann *et al.*, 2005) et HDR chez l'arabette (Hsieh & Goodman, 2005). Un ADNc homologue à la séquence de la MDS de *E. coli* a été aussi identifié chez la pervenche de Madagascar (Veau *et al.*, 2000) et elle a été localisée dans les plastes du ginkgo par fusion à la GFP (Kim *et al.*, 2006b). L'HDR a été immunolocalisée dans le stroma des plastes (Hsieh & Goodman, 2005) et contrairement à la voie mévalonate, elle synthétise un mélange d'IPP et de DMAPP (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). Chez la sauge, la HDR est encodée par plusieurs gènes différentiellement exprimés dans les tissus et les compartiments cellulaires (Ma *et al.*, 2012). En conclusion, les cinq dernières enzymes de la voie de Rohmer sont encore assez mal connues chez les plantes.

La question d'un échange d'IPP (ou DMAPP) entre les deux voies métaboliques n'est pas clairement élucidée. Si un transfert d'IPP du plaste au cytosol a longtemps semblé exclu, le transfert dans le sens inverse n'a quant à lui jamais paru totalement impossible (Lichtenthaler *et al.*, 1997). Le plaste semble en effet perméable à l'IPP et pourrait donc

utiliser une source externe de cette molécule (Ramos-Valdivia *et al.*, 1997). L'incorporation en petite quantité du mévalonate radioactif dans les monoterpènes (synthétisés dans le plaste, voir ci-dessous) dans les pétales de roses et les feuilles de pélargonium est en faveur d'un tel échange d'IPP du cytosol vers le plaste (Banthorpe *et al.*, 1972 ; Dunphy, 2006). Mais sa plus forte incorporation dans les pétales que dans les feuilles (Banthorpe *et al.*, 1972) semble indiquer un transfert ayant lieu préférentiellement dans certains tissus. De plus, il a été mis en évidence un transport actif par une protéine de l'IPP du cytosol vers le plaste chez la vigne (Soler *et al.*, 1993). L'IPP du cytosol peut par contre migrer vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie où il n'existe pas de voie de synthèse et y être utilisé pour la production de polyterpènes (Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Rodríguez-Concepción, 2006 ; Pulido *et al.*, 2012). Aujourd'hui, le transfert d'unités isopréniques du plaste vers le cytosol n'est plus exclu. Des expériences de marquage avec du 1-désoxy-D-xylulose et de la mévalolactone radioactifs montrent que les sesquiterpènes sont synthétisés dans les pétales de mufliers uniquement à partir d'IPP de la voie non-mévalonate plastidiale, alors qu'ils sont normalement synthétisés à partir d'IPP de la voie mévalonate (voir paragraphes suivants). L'étude de la cinétique de formation tend à montrer que, dans ce cas, l'IPP est transféré du plaste vers le cytosol (Dudareva *et al.*, 2005). Le même phénomène a pu être observé dans les fruits et les feuilles de fraisier (Hampel *et al.*, 2006). Cependant, le transfert d'IPP n'est que peu documenté et ce transfert d'unités en C₅ est plutôt envisagé sous la forme de pyrophosphate de prényle, un assemblage de deux, trois ou quatre isoprènes (Rodríguez-Concepción, 2006).

c) Polymérisation des unités isopréniques

Qu'il soit d'origine cytosolique ou plastidiale, l'IPP s'isomérisé en pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP) par l'action d'une IPP isomérase (McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Pulido *et al.*, 2012) (Fig. 8). Cette enzyme a été identifiée chez plusieurs espèces végétales d'intérêt agronomique et médicinal : le poivron (Dogbo & Camara, 1987) ou le tabac (Nakamura *et al.*, 2001) par exemple.

Deux enzymes florales, et donc potentiellement impliquées dans la production de parfum, ont été isolées jusque là : il s'agit de l'IPP isomérase de *Clarkia breweri* (Blanc & Pichersky, 1995) et de *Catharanthus roseus* (Guirimand *et al.*, 2012). Elle a aussi été identifiée dans les chromoplastes du narcisse (Lützow & Beyer, 1988). Il a été démontré l'existence de plusieurs cDNAs de cette enzyme dans une même espèce (Campbell *et al.*, 1997 ; Cunningham & Gantt, 2000 ; Oh *et al.*, 2000 ; Nakamura *et al.*, 2001 ; Guirimand *et al.*, 2012). Les isoformes qui en résultent se répartissent alors entre les compartiments

cellulaires : les unes dans le cytosol, les autres dans le plaste, la mitochondrie ou les peroxysomes (Nakamura *et al.*, 2001 ; Phillips *et al.*, 2008 ; Guirimand *et al.*, 2012). L'épissage alternatif a été proposé pour expliquer l'adressage de l'IPP isomérase au cytosol ou au plaste (Cunningham & Gantt, 2000 ; Guirimand *et al.*, 2012). De plus, chacune de ces isoformes peut être induite différemment par des stress environnementaux (Nakamura *et al.*, 2001).

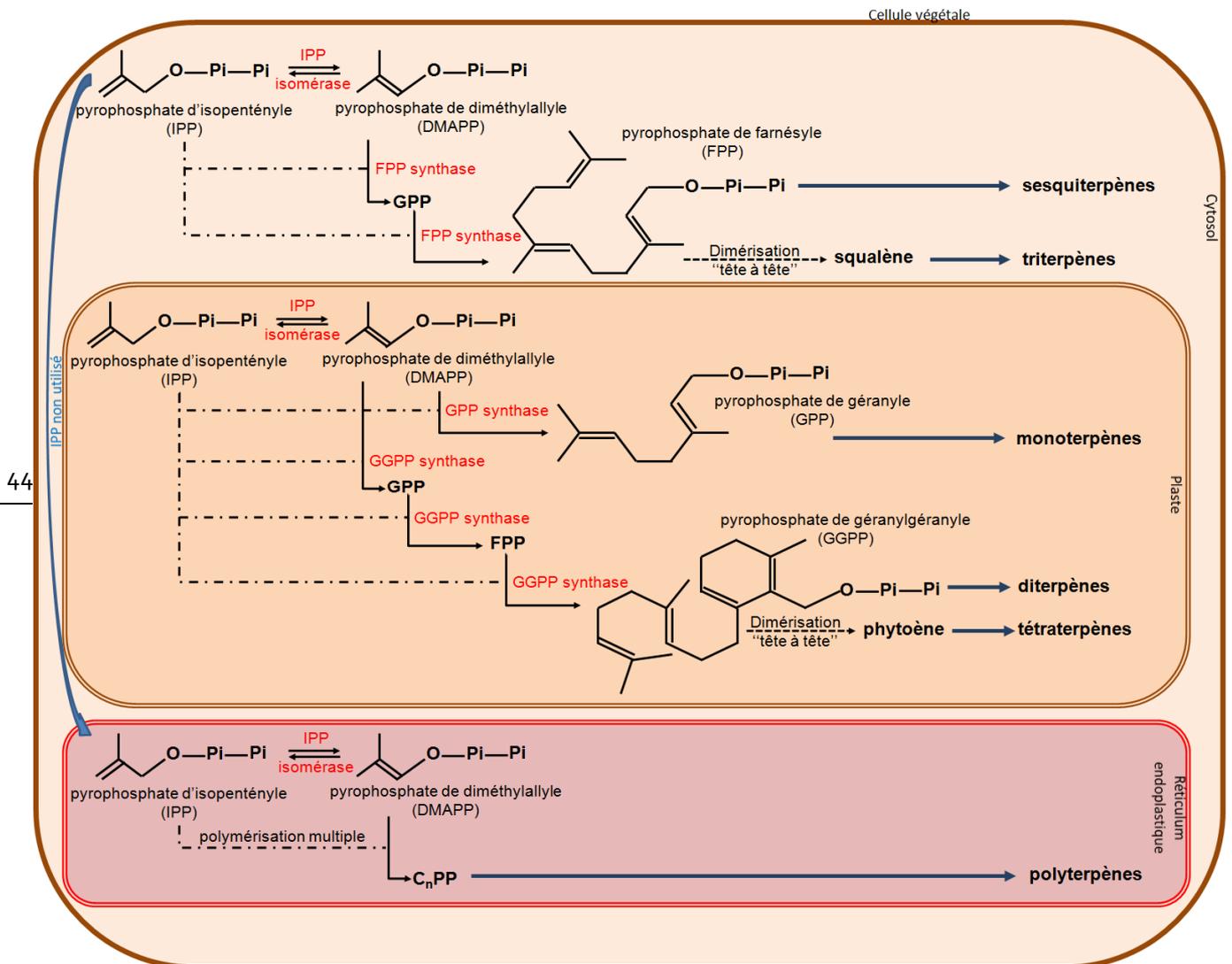


Figure 8 : Formation des terpènes par polymérisation du pyrophosphate d'isopentényle. La synthèse est compartimentée, les mono-, di- et tétraterpènes sont produits dans le plaste, les sesqui- et triterpènes dans le cytosol et les polyterpènes dans le réticulum endoplasmique. En rouge sont notées les enzymes assurant les réactions (d'après McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Pulido *et al.*, 2012).

Le DMAPP constitue alors le point de départ de l'isomérisation des isoprényles. Sur une molécule de DMAPP vient se condenser une molécule d'IPP donnant une molécule en

C₁₀, le pyrophosphate de géranyle (GPP). Sur le GPP peut se condenser un nouvel IPP pour donner le pyrophosphate de farnésyle (FPP) en C₁₅. Une nouvelle condensation d'IPP sur le FPP conduit au pyrophosphate de géranylgeranyle (GGPP) en C₂₀. De nouvelles molécules d'IPP peuvent se condenser sur le GGPP pour donner des pyrophosphates de terpénoïdes à nombreux carbones. Le GPP est à la base des monoterpènes. Le FPP donnera les sesquiterpènes, mais aussi par dimérisation le squalène qui est à l'origine des triterpènes. De la même façon, le GGPP conduit aux diterpènes et par dimérisation au phytoène et donc aux tétraterpènes. Ces tétraterpènes, dont font partie les caroténoïdes, aboutissent par métabolisation en ionones comme nous avons pu le voir plus haut. Enfin, les pyrophosphates de terpénoïdes à nombreux carbones sont la base des polyterpènes (McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005). Les polyterpènes sont synthétisés par une polymérisation multiple de l'IPP. Par exemple, il a été caractérisé chez l'arabette, l'hévéa et le riz, la SPP synthase, une enzyme synthétisant, à partir de GPP, FPP ou GGPP mais non d'IPP ou de DMAPP, le pyrophosphate de solanésyle (SPP), un terpénoïde à neuf unités isopréniques (Hirooka *et al.*, 2003 ; Hirooka *et al.*, 2005). Chez l'hévéa, il semble que la FPP synthase soit aussi elle-même capable de rajouter des unités isoprènes sur des terpènes déjà existants au cours de la production du latex (Adiwilaga & Kush, 1996). Mais ces enzymes synthétisant de grosses molécules non volatiles et ne servant pas de précurseurs aux composés du parfum, nous ne détaillerons pas plus en avant ces prényltransférases.

Toutes ces réactions n'ont pas lieu à la fois dans le cytosol et le plaste. Elles sont compartimentées (Fig. 8). En effet, les mono-, di- et tétraterpènes ne sont synthétisés que dans le plaste. Les sesqui- et triterpènes sont quant à eux produits uniquement dans le cytosol. Enfin, l'IPP non utilisé par le plaste et le cytosol est exporté vers le réticulum endoplasmique et sa polymérisation mène jusqu'aux polyterpènes (McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Rodríguez-Concepción, 2006 ; Pulido *et al.*, 2012). La diversité des terpènes ainsi obtenus est immense et les plantes sont capables d'en synthétiser plus de 22 000 différents (McGarvey & Croteau, 1995 ; Lichtenthaler *et al.*, 1997). Cette compartimentation de la synthèse reflète la localisation des enzymes correspondantes : la FPP synthase (FPPS) qui permet de polymériser trois unités isopréniques en deux étapes (le GPP intermédiaire restant lié à l'enzyme), semble restreinte au cytoplasme (Feron *et al.*, 1990) alors que la GPP synthase (GPPS), condensant un IPP sur un DMAPP et la GGPP synthase (GGPPS) (polymérisation en chaîne de quatre IPP) ont été immunolocalisées dans le stroma (Kuntz *et al.*, 1992, Bouvier *et al.*, 2000) ou sur les membranes tubuleuses des plastes (Turner & Croteau, 2004). Cette position plastidiale de la GGPPS semble là encore avoir été

acquise lors de l'endosymbiose de cette organite (Chen *et al.*, 1994). Etrangement, une étude par immunodétection et activité enzymatique dans des fractions cellulaires de grémil montre une GPPS cytosolique, probablement liée à une synthèse spécifique dans le cytosol d'un pigment rouge, la shikonine, dont l'un des précurseurs est le géraniol (Sommer *et al.*, 1995). Deux autres études montrent quant à elles l'existence d'une FPPS (Cunillera *et al.*, 1997) et d'une GGPPS (Zhu *et al.*, 1997) adressées à la mitochondrie chez l'arabette alors qu'une troisième étude met en évidence une localisation chloroplastique de la FPPS chez le riz, le blé et le tabac (Sanmiya *et al.*, 1999).

Cependant, malgré la compartimentation de leurs synthèses, les GPP, FPP et GGPP ne sont pas parfaitement séquestrés dans les plastes ou le cytosol. FaNES1, une nérolidol synthase de fraisier, est capable de produire à la fois du nérolidol (un sesquiterpène) et du linalol (un monoterpène), deux composés du fruit de *Fragaria vesca* (Aharoni *et al.*, 2004). Cependant, cette enzyme cytosolique, intégrée par transformation génétique dans l'arabette avec une séquence d'adressage au plaste, produit du linalol mais aussi un peu de nérolidol, ce qui suggère que du FPP est exporté du cytosol vers le plaste (Aharoni *et al.*, 2003). Au contraire, deux nérolidol synthases bifonctionnelles ont aussi été trouvées chez le mufler, mais l'une est localisée dans le cytosol où elle produit du nérolidol et l'autre est adressée au plaste où elle produit du linalol, reproduisant ainsi la compartimentation (Nagegowda *et al.*, 2008).

Les prényltransférases (GPP, FPP et GGPP synthases) ont été caractérisées chez de nombreuses plantes d'intérêt agronomique et médicinal : la GPPS chez la vigne (Feron *et al.*, 1990 ; Soler *et al.*, 1992 ; Clastre *et al.*, 1993) ou l'arabette (Bouvier *et al.*, 2000), la FPPS chez le poivron (Huguency & Camara, 1990) ou le maïs (Li & Larkins, 1996), et la GGPPS chez le poivron (Dogbo & Camara, 1987) et le *Ginkgo biloba* (Liao *et al.*, 2004) par exemple.

Les GPP-, FPP- et GGPP synthases sont le plus souvent homodimériques (McGarvey & Croteau, 1995). Cependant, il a été caractérisé une GPPS hétérodimérique dans les glandes à huile essentielle de la menthe (Burke *et al.*, 1999) et du houblon (Wang & Dixon, 2009) et dans les pétales du mufler et de *Clarkia breweri* (Tholl *et al.*, 2004). *Salvia miltiorrhiza* présente la particularité d'avoir à la fois une GPPS homo- et une GPPS hétérodimérique (Ma *et al.*, 2012). La GPPS existe chez le sapin en deux gènes appartenant à des familles différentes (Schmidt & Gershenzon, 2008) et en trois ADNc (Burke & Croteau, 2002a). La FPPS possède en outre la particularité d'avoir plusieurs isoformes dans la même espèce (Attucci *et al.*, 1995b ; Cunillera *et al.*, 1996 ; Cunillera *et al.*, 1997 ; Li & Larkins, 1996 ; Pan

et al., 1996), destinées probablement à des tissus différents (Cunillera *et al.*, 1996). De même, la GGPPS est encodée par une petite famille de cinq gènes chez l'arabette, et ces cinq isoformes portent chacune un peptide d'adressage et ont été localisées par fusion à la GFP dans des tissus et des compartiments subcellulaires différents (Okada *et al.*, 2000). La même chose a été observée chez la sauge (Ma *et al.*, 2012).

Toutes ces prényltransférases (GPP-, FPP- et GGPP synthases), issues probablement d'un même ancêtre au cours de l'évolution (Chen *et al.*, 1994), possèdent en commun deux domaines catalytiques DDXX(XX)D, dénommés FARM et SARM, riches en aspartate et hautement conservés (Chen *et al.*, 1994 ; Attucci *et al.*, 1995a, b). Des expériences de mutagenèse dirigée dans ces domaines chez la FPPS de rat (Marrero *et al.*, 1992 ; Joly & Edwards, 1993) et de levure (Song & Poulter, 1994) montrent que ces aspartates sont essentiels pour la catalyse de la réaction. La mutagenèse des acides aminés autour du premier domaine DDXX(XX)D (FARM) permet de changer la sélectivité de l'enzyme, passant ainsi d'une GGPPS à une FPPS par exemple (Sitthithaworn *et al.*, 2001). De plus, la petite sous-unité des protéines hétérodimériques de la GPPS, qui ne possède pas les domaines FARM et SARM, est capable de changer la longueur des chaînes synthétisées par la grande sous-unité (Burke & Croteau, 2002b ; Wang & Dixon, 2009). Le mécanisme n'est pas encore élucidé mais fait probablement intervenir une modification de l'environnement des domaines DDXX(XX)D. Quant au domaine SARM, il serait essentiel pour la fixation de l'IPP (Tarshis *et al.*, 1996). Récemment, il a été identifié des prényltransférases capables de synthétiser plusieurs produits à la fois : chez le maïs, une FPPS produit aussi du GGPP (Cervantes-Cervantes *et al.*, 2006). Chez une orchidée, une GPPS ne possédant pas le premier domaine FARM, est capable de produire aussi du FPP (Hsiao *et al.*, 2008). Chez l'épicéa et le houblon, une enzyme est capable de synthétiser du GPP et du GGPP (Schmidt *et al.*, 2009 ; Wang & Dixon, 2009). Ces changements de spécificités correspondent là aussi à des changements dans l'environnement du domaines FARM essentiellement (Cervantes-Cervantes *et al.*, 2006 ; Schmidt *et al.*, 2009).

Très récemment, de nouvelles voies de synthèse ont été mises en évidence. Jusque là, les prényltransférases n'étaient connues pour ne synthétiser que des isomères (*E*) des pyrophosphates de prényle. Il a été découvert chez différentes espèces de tomate, des enzymes capables de synthétiser du *Z,Z*-farnésyl pyrophosphate (Sallaud *et al.*, 2009) et du néryl pyrophosphate, l'isomère (*Z*) du géranylpyrophosphate (Schilmiller *et al.*, 2009). Par ailleurs, les terpènes synthases utilisant ces isomères (*Z*) ont aussi été caractérisées, montrant bien

l'existence de toute une voie métabolique dédiée à cette configuration peu commune des GPP et FPP dans le plaste.

A contrario, ces enzymes sont assez peu connues dans les organes floraux et donc dans la synthèse du parfum par les fleurs. La GPPS a été caractérisée dans les fleurs de muflier et de *Clarkia breweri* où elle a été montrée comme étant hétérodimérique (Tholl *et al.*, 2004). Dans les pétales de rose, des ESTs analogues à la GGPPS, à l'IPP isomérase et à la phytoène synthase ont été trouvés mais leurs activités n'ont pas été testées (Channelière *et al.*, 2002). Une GPPS homodimérique constitutive a également été identifiée dans les fleurs de la rose (Bergougnoux, 2005). Une GPPS, capable de produire du FPP et spécifique de la fleur, a été identifiée chez un *Phalaenopsis* (Hsiao *et al.*, 2008).

d) Synthèse des terpènes

La diversité des terpènes trouvés chez les plantes suppose un nombre conséquent d'enzymes de synthèse. Paradoxalement, le nombre de protéines étudiées est encore très faible. Si les terpène synthases (TPS) sont assez bien connues dans les parties végétatives, seul un petit nombre est connu dans la fleur et donc susceptible de participer à la synthèse du parfum. Le tableau 6 présente une liste des TPS qui ont été caractérisées dans les organes floraux.

La première enzyme florale découverte fut la S-linalol synthase, purifiée et caractérisée chez *Clarkia breweri* (Pichersky *et al.*, 1995). Elle utilise le GPP afin de produire un monoterpène, le S-linalol. Un second gène de cette enzyme a par la suite été isolé des fleurs de cette même espèce (Cseke *et al.*, 1998). Cette enzyme a aussi été caractérisée chez la lavande (Landmann *et al.*, 2007). Une autre monoterpène synthase, la 1,8-cinéole synthase a été caractérisée dans la fleur d'une espèce de tabac, *Nicotiana suaveolens* (Roeder *et al.*, 2007). Sa faible spécificité fait qu'elle produit au moins six monoterpènes différents : le 1,8-cinéole, le β -myrcène, le limonène, le sabinène, le (E)- β -ocimène, l' α -terpinéole et l' α -pinène. La limonène synthase de la lavande est elle aussi capable de produire six terpènes : le limonène, le terpinolène, le camphène, l' α -pinène, le β -myrcène et l' α -phellandrène (Landmann *et al.*, 2007). Deux myrcène synthases et une (E)- β -ocimène synthase ont été identifiées dans les fleurs de muflier : si la seconde est capable de produire aussi du (Z)- β -ocimène et du myrcène, les premières ne synthétisent que du myrcène (Dudareva *et al.*, 2003). Une myrcène synthase a par ailleurs été caractérisée chez *Alstroemeria* (Aros *et al.*, 2012). La (E)- β -ocimène synthase et la 1,8-cinéole synthase ont aussi été retrouvées dans les fleurs du mandarinier satsuma, *Citrus unshiu* (Shimada *et al.*, 2005), de même qu'une limonène

synthase, une β -pinène synthase et deux γ -terpinène synthases (Shimada *et al.*, 2004). Une limonène synthase a aussi été caractérisée dans les fleurs de *Schizonepeta tenuifolia* (Maruyama *et al.*, 2001). Il a été trouvé deux monoterpènes synthases chez l'arabette, exclusivement dans les fleurs. La première synthétise de l' α -pinène, du β -pinène, du sabinène, du β -myrcène, du limonène et du (*E*)- β -ocimène et la seconde uniquement du *S*-linalol, toutes deux ayant comme substrat le GPP (Chen *et al.*, 2003).

Toutes les monoterpène synthases possèdent en commun un peptide d'adressage, des séquences arginine en tandem (RR) et des motifs DDxxD (Shimada *et al.*, 2004 ; Shimada *et al.*, 2005). Le peptide d'adressage permet à ces enzymes nucléaires d'être exportées vers le plaste (Williams *et al.*, 1998). Des peptides tronqués de la limonène synthase et dépourvus de la paire d'arginine RR ont permis de mettre en évidence le rôle de cette séquence dans la migration du pyrophosphate sur le GPP afin d'activer celui-ci (Williams *et al.*, 1998).

Le germacrène-D est un sesquiterpène synthétisé à partir de FPP par la germacrène-D synthase. Celle-ci a été découverte dans une banque d'EST conçue à partir de pétales de roses puis caractérisée (Guterman *et al.*, 2002) et un orthologue putatif a été trouvé chez une orchidée (Chan *et al.*, 2011). Une germacrène D-synthase a aussi été caractérisée dans la fleur de kiwi, ainsi qu'une farnésène synthase aussi capable de synthétiser un monoterpène, le β -ocimène (Nieuwenhuizen *et al.*, 2009). De même, la bergamotène synthase de la lavande est aussi capable d'accepter comme substrat le GPP pour synthétiser des monoterpènes (Landmann *et al.*, 2007). Chez l'arabette, deux sesquiterpène synthases, exclusivement florales, ont été caractérisées : la première produit du *E*- β -caryophyllène, de l' α -humulène, de l' α -copaène et du β -élémane (Chen *et al.*, 2003) et la seconde le reste des sesquiterpènes émis par la fleur, soit quinze composés (Tholl *et al.*, 2005). Chacune de ces deux sesquiterpène synthases est exprimée dans des parties différentes de la fleur, la première dans le stigmate, la seconde dans les nectaires, et les terpènes synthétisés par ces enzymes pourraient servir à empêcher les infections de ces organes floraux vulnérables et pourraient aussi constituer des signaux olfactifs de repérage pour les insectes. Quatre autres gènes de TPS sont responsables des autres terpènes émis par cette fleur (Chen *et al.*, 2011a). Une famille de δ -cadinène synthases a été mise en évidence chez le coton avec une expression dans tous les organes de la fleur (Chen *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1996) Une EST analogue à une sesquiterpène cyclase et une autre analogue à une sesquiterpène synthase ont aussi été trouvées dans les pétales de rose (Channelière *et al.*, 2002) et d'une orchidée (Chan *et al.*, 2011) respectivement, mais leurs activités n'ont pas été testées.

Enzyme	Espèce	Produits	Référence
Bergamotène synthase	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	<i>trans</i> - α -bergamotène (monoterpènes)	Landmann <i>et al.</i> , 2007
β -caryophyllène/ α -humulène synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>E</i> - β -caryophyllène α -humulène α -copaène β -élémente	Chen <i>et al.</i> , 2003
δ -cadinène synthase	<i>Gossypium arboreum</i> L.	(+)- δ -cadinène	Chen <i>et al.</i> , 1995 Chen <i>et al.</i> , 1996
1,8-cinéole synthase	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	1,8-cinéole	Shimada <i>et al.</i> , 2005
1,8-cinéole synthase	<i>Nicotiana suaveolens</i> Lehm.	1,8-cinéole β -myrcène Limonène Sabinène (<i>E</i>)- β -ocimène α -terpinéole α -pinène	Roeder <i>et al.</i> , 2007
Farnésène synthase	<i>Actinidia deliciosa</i> (A.Chev) C.F.Liang A.R.Ferguson	Farnésène Ocimène	Nieuwenhuizen <i>et al.</i> , 2009
Germacrène-D synthase	<i>Rosa</i> \times <i>hybrida</i> cv. 'Fragrant Cloud'	Germacrène-D	Guterman <i>et al.</i> , 2002
Germacrène-D synthase	<i>Vanda</i> cv. 'Mimi Palmer'	Germacrène-D	Chan <i>et al.</i> , 2011
Germacrène-D synthase	<i>Actinidia deliciosa</i> (A.Chev) C.F.Liang A.R.Ferguson	Germacrène-D	Nieuwenhuizen <i>et al.</i> , 2009
Limonène synthase	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	Limonène	Maruyama <i>et al.</i> , 2001
Limonène synthase	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	limonène	Shimada <i>et al.</i> , 2004
Limonène synthase	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Limonène Terpinolène (1 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-(+)-camphène (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-(+)- α -pinène β -myrcène α -phellandrène	Landmann <i>et al.</i> , 2007
Linalol synthase	<i>Clarkia breweri</i> (A.Gray) Green	S-linalol	Pichersky <i>et al.</i> , 1995 Cseke <i>et al.</i> , 2003
Linalol synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	S-linalol (nérolidol)	Chen <i>et al.</i> , 2003
Linalol synthase	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	S-linalol	Landmann <i>et al.</i> , 2007
Sesquiterpène synthase multi-produits	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	(+)- α -barbatène (+)-thujopsène Isobazzanène (+)- β -barbatène <i>E</i> - β -farnésène β -acoradiène (+)- β -chamigrène α -zingibérène α -cuprénène α -chamigrène (-)-cuparène (-)- β -bisabolène γ -sesquiphellandrène δ -cuprénène β -élémente	Tholl <i>et al.</i> , 2005

Terpène synthase multi-produits	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	α -pinène β -pinène Sabinène β -myrcène Limonène (<i>E</i>)- β -ocimène ((<i>E,E</i>)- α -farnésène (<i>E</i>)- β -farnésène <i>trans</i> - α -bergamotène)	Chen <i>et al.</i> , 2003
Myrcène synthases	<i>Antirrhinum majus</i> L.	myrcène	Dudareva <i>et al.</i> , 2003
Myrcène synthase	<i>Alstroemeria</i> cv. 'Sucre, Laura'	myrcène	Aros <i>et al.</i> , 2012
Nérolidol/linalol synthases	<i>Antirrhinum majus</i> L.	Nérolidol Linalol	Nagegowda <i>et al.</i> , 2008
(<i>E</i>)- β -ocimène synthase	<i>Antirrhinum majus</i> L.	(<i>E</i>)- β -ocimène (<i>Z</i>)- β -ocimène Myrcène	Dudareva <i>et al.</i> , 2003
(<i>E</i>)- β -ocimène synthase	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	(<i>E</i>)- β -ocimène	Shimada <i>et al.</i> , 2005
β -pinène synthase	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	β -pinène (α -pinène sabinène α -thujène Limonène γ -terpinène)	Shimada <i>et al.</i> , 2004
Sesquiterpène cyclase	<i>Rosa chinensis</i> cv. 'Old Blush'		Channelière <i>et al.</i> , 2002
Sesquiterpène synthase	<i>Vanda</i> cv. 'Mimi Palmer'		Chan <i>et al.</i> , 2011
γ -terpinène synthases	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	γ -terpinène (α -pinène β -pinène α -thujène limonène)	Shimada <i>et al.</i> , 2004

Tableau 6 : Liste des mono- et sesquiterpène synthases florales avec les espèces dans lesquelles elles ont été identifiées et les composés qu'elles produisent.

Récemment, une TPS bifonctionnelle a été identifiée et caractérisée dans les fleurs de muflier. Cette enzyme uniquement florale est capable de synthétiser du linalol et du nérolidol à partir du GPP et du FPP respectivement. Cependant, deux isoformes existent, la première est localisée dans le cytosol et ne peut donc que produire du nérolidol alors que la seconde se trouve dans le plaste et ne peut synthétiser que du linalol (Nagegowda *et al.*, 2008). Cela montre encore une fois toute l'importance de la compartimentation dans la synthèse des terpènes. Bien que ces enzymes soient proches des monoterpène synthases, la paire d'arginine RR est remplacée chez les sesqui- et diterpène synthases par une paire arginine/proline RP ou arginine/alanine RA (Williams *et al.*, 1998).

De nombreuses autres TPS ont été identifiées et participent à la production de résine, de latex ou d'huile essentielle, dans les feuilles, la tige ou les racines, et participent pour

beaucoup à la protection contre les insectes, les champignons ou les bactéries s'attaquant à la plante. Une liste de ces enzymes peut être trouvée dans Degenhardt *et al.* (2009).

e) Modifications des terpènes

Tous les monoterpènes ne sont pas synthétisés à partir du GPP. Certains résultent de l'interconversion d'un terpène en un autre. Ainsi, une monoterpène réductase a été isolée de pétales de rose et permet la réduction du géraniol et du nérol en citronellol (Dunphy & Allcock, 1972).

Une fois synthétisés, les terpènes peuvent subir des modifications. Beaucoup de composés odorants se retrouvent sous forme acétylée. RhAAT1 est une alcool acétyltransférase de rose transformant le géraniol en acétate de géranyle en lui transférant l'acétate d'une molécule d'acétyl-coenzyme A, mais sa sélectivité étant relativement faible, elle accepte aussi le citronellol comme substrat (Guterman *et al.*, 2002 ; Shalit *et al.*, 2003) .

Alternativement, certains terpènes peuvent se retrouver glycosylés dans les pétales de roses, ce qui fait penser qu'il pourrait exister un stockage des molécules odorantes sous une forme soluble et hydrophile, traversant difficilement les membranes (Dunphy, 2006). Les molécules odorantes peuvent ensuite être relarguées par l'action de glycosidases (Verhoeven *et al.*, 2003). Chez les roses, c'est le cas pour le citronellol (Francis & Allcock, 1969 ; Oka *et al.*, 1998 ; Oka *et al.*, 1999), le géraniol (Francis & Allcock, 1969 ; Banthorpe *et al.*, 1972 ; Oka *et al.*, 1997 ; Oka *et al.*, 1999) et le nérol (Francis & Allcock, 1969 ; Banthorpe *et al.*, 1972) par exemple. Les cétones de rose sont elles aussi susceptibles d'être pyranosylées : le 3-hydroxy-7,8-dideshydro- β -ionol, le 3-hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol (Straubinger *et al.*, 1997), et le mégastigma-6,7-dièn-3,5,9-triol, précurseur de la damascénone et de la 3-hydroxy- β -damascone peuvent aussi se trouver sous forme glycosylée (Suzuki *et al.*, 2002). Ces formes glycosylées représentent, après hydrolyse, plus de 40% de l'huile essentielle contenue dans les pétales de roses (Staikov & Zolotovitch, 1960). De plus, la surexpression de la S-linalol synthase chez le pétunia entraîne la formation de linalol, non sous forme libre mais sous la forme d'un glucopyranoside non volatil et probablement moins toxique pour la plante (Lücker *et al.*, 2001). Mais la glycosylation ne serait pas la seule forme de stockage dans les pétales de rose. L'acylation d'acides gras, en C16 :0, C18 :0 et C20 :0 essentiellement, sur le géraniol, le nérol et le citronellol provoquerait la formation d'esters non volatils et liposolubles, ce qui permettrait de séquestrer ces monoterpènes dans la cuticule à la surface des pétales (Dunphy, 2006). Cependant, les glycosides transférases, les glycosidases, les acyl transférases et les acyl estérases ou lipases intervenant dans ces phénomènes ne sont pas connues. Ces formes

glycosylées et acylées pourraient représenter des formes de stockages de molécules odorantes afin de constituer un réservoir rapidement mobilisable par l'action d'enzymes. Les formes glycosylées, solubles et moins nombreuses en terme de quantité que les formes acylées, pourraient en outre représenter une forme transportable de terpènes (Dunphy, 2006).

Bien que les cétones de rose (β -damascénone, β -damascone et β -ionone) soient issues pour la plupart de la dégradation par la chaleur de dérivés des caroténoïdes lors du processus d'extraction du parfum par hydrodistillation, deux enzymes participant en amont à la métabolisation de ces pigments terpénoïdes ont été mises en évidence. La caroténoïde dioxygénase *RdCCD1* a été isolée de pétales de *R. × damascena* et caractérisée (Huang *et al.*, 2009a). Son ADNc est détecté dans tous les organes mais surtout dans les fleurs. Son expression dans des bactéries produisant du *cis*- ζ -, du β -carotène, du lycopène ou de la zéaxanthine et son activité *in vitro* sur tout un panel de caroténoïdes montre une enzyme capable de produire un grand nombre cétones de roses (β -ionone, pseudoionone, 3-hydroxy- α -ionone, 3-hydroxy- β -ionone, 5,6-époxy-3-hydroxy- β -ionone, 4-oxo- β -ionone, 3-hydroxy-4-oxo- β -ionone) ainsi que de la géranylacétone et de la "cétone de sauterelle" (Huang *et al.*, 2009a). Cette dernière molécule est particulièrement importante puisqu'il s'agirait de l'un des précurseurs de la β -damascénone (la cétone est réduite en alcool puis glycosylée, et par chauffage en condition acide, ce glycosyle donnerait la β -damascénone) (Suzuki *et al.*, 2002 ; Huang *et al.*, 2009a). Une enzyme voisine chez le pétunia, *PhCCD1*, est elle aussi capable de synthétiser de la β -ionone et l'expression de son gène dans la fleur est fortement corrélée à l'émission de cette molécule qui participe au parfum de cette plante (Simkin *et al.*, 2004). La caroténoïde dioxygénase *CCD4* a été caractérisée dans les fleurs de rosier (*RdCCD4*), d'*Osmanthus* (*OfCCD4*), de pommier (*MdCCD4*) et de chrysanthème (*CmCCD4*) (Huang *et al.*, 2009b). Si les quatre enzymes sont toutes capables de synthétiser de la β -ionone, elles n'utilisent cependant pas le même substrat. *MdCC4*, *OfCCD4* et *CmCCD4* métabolisent le β -carotène alors que le substrat de *RdCCD4* est le 8'-apo- β -carotène-8'-al (Huang *et al.*, 2009b). *RdCCD4* est par ailleurs spécifique des fleurs et semble donc jouer un rôle dans la synthèse du parfum (Huang *et al.*, 2009b). *CCD1* et *CCD4* ont aussi été trouvées dans le stigmate de *Crocus sativus*, avec deux gènes présents pour chaque protéine (Rubio *et al.*, 2008). Les quatre isoformes ont été testées et toutes sont capables de cliver le β -carotène en β -ionone, une molécule participant à l'odeur de la fleur mais aussi au goût du safran. De plus, les *CsCCD4* ont été localisées par fusion à la GFP dans les plastoglobules des plastes, et l'expression de leurs gènes est prépondérante dans l'apex des stigmates à l'anthèse, moment

de plus forte émission de β -ionone, contrairement aux CsCCD1 constitutives. CsCCD4 est donc probablement l'enzyme régulant l'émission de ce composé dans la fleur du crocus (Rubio *et al.*, 2008).

f) Régulation de la synthèse et de l'émission des terpènes

L'émission des composés organiques volatils du parfum est soumise chez la rose au cycle circadien (Helsper *et al.*, 1998 ; Picone *et al.*, 2004). Le germacrène-D et l'acétate de géranyle, deux terpènes, suivent ce rythme avec un pic au début de la journée (Hendel-Rahmanim *et al.*, 2007). L'émission du germacrène-D est directement liée à l'exposition à la lumière tandis que l'émission de l'acétate de géranyle est dépendante de la disponibilité du substrat, le géraniol. D'autre part, certains ARNm de gènes de synthèse du parfum s'accumulent avant l'émission des terpènes chez *Clarkia breweri*, *Antirrhinum majus* et *R. × hybrida* (van Schie *et al.*, 2006). Ceci suggère une régulation de l'émission directement par la présence/absence des protéines de synthèse.

D'autre part, cette synthèse peut être régulée plus en amont. Les enzymes clés des voies mévalonate et non-mévalonate (DXS, DXR et HMGR notamment) sont elles-mêmes influencées par la lumière et le changement d'équilibre dans la balance entre ces deux voies permet de réguler les différences d'émission entre les différents terpènes (van Schie *et al.*, 2006). Le dialogue entre les deux voies ainsi que l'échange d'IPP ou de pyrophosphates de prényle entre les compartiments permettraient là aussi de réguler la synthèse des terpénoïdes (Rodríguez-Concepción, 2006). La coordination entre cette synthèse et la voie non-mévalonate assure que suffisamment de précurseur soit disponible et constitue une autre forme de régulation.

La question de la régulation de la production et/ou de l'émission de parfum à un niveau transcriptionnel commence tout juste à être étudiée. Un facteur de transcription, *GaWRKY1*, a été mis en évidence chez le coton où il régule le gène de la δ -cadinène synthase (Xu *et al.*, 2004). La transformation de rosier avec le facteur de transcription *PAPI* (pour *production of anthocyanin pigment*) entraîne, en plus de la surproduction attendue de pigments, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des mono- et sesquiterpènes, ainsi que de l'émission de certains des composés correspondant dans la fleur (Ben Zvi *et al.*, 2012). Mais les terpénoïdes ne sont pas les seules molécules du parfum touchées lors de cette expérience, l'émission des composés aromatiques est aussi augmentée ainsi que l'expression des gènes participant à leur synthèse. Nous allons donc maintenant nous intéresser à ces voies de synthèse fondamentalement différentes.

2) Synthèse des composés aromatiques

Les composés aromatiques sont constitués d'un noyau aromatique sur lequel sont greffés différents groupements fonctionnels. La biosynthèse de ce noyau est un processus fondamental de la biochimie de la cellule puisqu'il est aussi à la base des trois acides aminés aromatiques essentiels : la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. L'un deux, la phénylalanine, nous intéresse ici tout particulièrement puisqu'il est le précurseur des principaux composés aromatiques participant au parfum des roses. La formation du cycle aromatique de ces trois acides aminés s'opère par la voie des shikimates, du nom d'un intermédiaire important dans cette biosynthèse, lui-même empruntant son nom au *shikimi*, la badiane du Japon, chez laquelle il a été découvert (Maeda & Dudareva, 2012). Les composés aromatiques du parfum sont pour la plupart issus de la transformation de la phénylalanine. A partir de cet acide aminé aromatique, plusieurs voies de synthèse sont possibles (Fig. 9).

a) Synthèse du 2-phényléthanol

La première voie de synthèse amène directement à deux molécules importantes pour le parfum de la rose : le 2-phénylacétaldéhyde et le 2-phényléthanol. Cette biosynthèse a été particulièrement bien caractérisée chez la rose. Initialement, il a été postulé que, chimiquement, la synthèse du 2-phényléthanol à partir de la phénylalanine pouvait se faire par quatre chemins différents. Le marquage au deutérium de cet acide aminé dans les pétales de roses a permis de révéler l'existence certaine de deux d'entre eux, avec la 2-phényléthylamine ou l'acide 2-phénylpyruvique, puis le 2-phénylacétaldéhyde comme intermédiaires (Fig. 9) (Watanabe *et al.*, 2002). En 2006, Kaminaga *et al.* parviennent à isoler à partir du pétunia et de la rose l'ADNc correspondant à une protéine qu'ils nomment la phénylacétaldéhyde synthase (PAAS). Cette enzyme n'accepte que la phénylalanine comme substrat et ne synthétise que du 2-phénylacétaldéhyde comme produit. Elle est donc bifonctionnelle et réalise en une seule étape à la fois la décarboxylation et la désamination (décarboxylation oxydative) de la phénylalanine sans passer par les intermédiaires prédits, la 2-phényléthylamine ou l'acide 2-phénylpyruvique (Kaminaga *et al.*, 2006). PAAS, appartenant à la famille des tyrosine décarboxylases, est une enzyme PLP-dépendante fonctionnant en tant qu'homotétramère. Un orthologue a par la suite été caractérisé dans un autre cultivar de rose par complémentation dans des levures (Farhi *et al.*, 2010) et un orthologue putatif a été trouvé dans les fleurs d'une orchidée (Mohd-Hairul *et al.*, 2010).

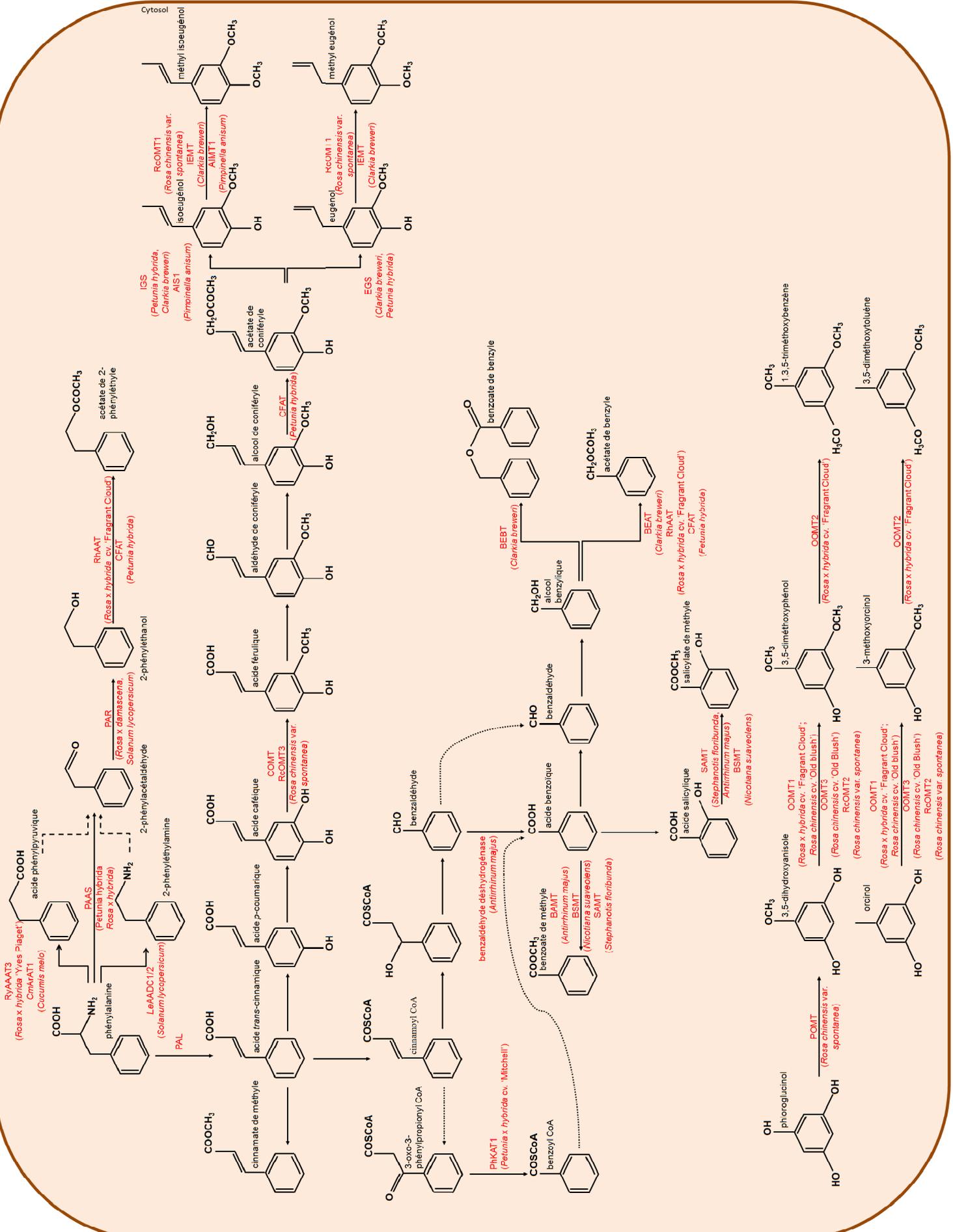


Figure 9 : Synthèse des composés aromatiques participant au parfum. En rouge, le nom des enzymes catalysant les réactions avec entre parenthèses le nom scientifique de la plante dans les fleurs de laquelle les enzymes ont été caractérisées.

PAAS est une enzyme exclusivement florale (Kaminaga *et al.*, 2006 ; Farhi *et al.*, 2010 ; Mohd-Hairul *et al.*, 2010) dont l'expression est maximale au moment de l'ouverture de la fleur et est corrélée avec l'émission du phénylacétaldéhyde et du 2-phényléthanol au cours de la journée (Farhi *et al.*, 2010). Un orthologue de PAAS a aussi été trouvé chez l'arabette (*AtAAS*) catalysant aussi la décarboxylation oxydative de la phénylalanine en 2-phénylacétaldéhyde (Gutensohn *et al.*, 2011). Cependant, l'expression du gène correspondant est constitutive dans l'écotype Col-0 et induite par le méthyljasmonate et les blessures mécaniques. Elle serait donc plutôt liée aux défenses de la plante. Au contraire, son expression est très forte dans les fleurs des écotypes Sei-0 et Di-G qui émettent du 2-phénylacétaldéhyde et où *AtAAS* jouerait un rôle dans la synthèse de ce composé odorant et donc dans la pollinisation (Gutensohn *et al.*, 2011). En 2007, Sakai *et al.* confirment les résultats de Kaminaga *et al.* (2006) sur des enzymes partiellement purifiées de pétales de rose et parviennent aussi à purifier partiellement la phénylacétaldéhyde réductase (PAR). Par la suite, ce même groupe caractérise cette enzyme qui réduit le phénylacétaldéhyde en 2-phényléthanol grâce au NADPH (Chen *et al.*, 2011b). Cette protéine s'exprime très fortement dans les pétales, aux stades 2 et 4 (boutons juste ouverts et très ouverts). Elle ne possède pas une spécificité stricte pour le 2-phénylacétaldéhyde et accepte aussi facilement le *S*-citronellal et l'hexylaldéhyde comme substrats (Chen *et al.*, 2011b).

Le 2-phényléthanol est aussi une molécule importante pour la saveur de nombreux fruits (Tieman *et al.*, 2006). Cependant, toutes les plantes n'utilisent pas la même voie de biosynthèse. Chez la tomate, la phénylalanine perd dans un premier temps une molécule de CO₂ sous l'action de plusieurs décarboxylases d'acides aminés aromatiques (*LeAADC1A*, *LeAADC1B* et *LeAADC2*) pour donner la phényléthylamine (Tieman *et al.*, 2006). Puis la 2-phényléthylamine est désaminée par une enzyme non encore caractérisée, pour donner le 2-phénylacétaldéhyde. Enfin, comme chez les roses, celui-ci est réduit en 2-phényléthanol par deux phénylacétaldéhyde réductases (*LePAR1* et *LePAR2*) (Tieman *et al.*, 2007). A l'inverse, chez le melon, la phénylalanine est d'abord désaminée par une transaminase des acides aminés aromatiques (*CmArAT1*) en phénylpyruvate, puis décarboxylée en 2-phénylacétaldéhyde puis réduit en 2-phényléthanol par deux enzymes non encore caractérisées (Gonda *et al.*, 2010). Cette voie de biosynthèse est commune aux levures chez qui elle a été baptisée "Voie d'Ehrlich" (Hazelwood *et al.*, 2008). Très récemment, cette dernière a été mise en évidence dans les protoplastes de rose avec l'identification et la caractérisation d'une transaminase des acides aminés aromatiques (*RyAAAT3*) ayant une plus forte affinité pour la phénylalanine et utilisant l'acide α -céto glutarique comme accepteur de l'amine (Hirata *et al.*,

2012). Il s'agit d'une enzyme PLP-dépendante et son gène s'exprime de façon constitutive dans toutes parties aériennes de la plante dont les pétales.

b) Synthèse de l'eugénol et de l'isoeugénol

La deuxième voie de synthèse à partir de la phénylalanine commence par une désamination de cet acide aminé par la phényl ammonia lyase (PAL) ce qui conduit au *trans*-cinnamate, véritable plaque tournante dans la synthèse des composés aromatiques (Fig. 9) (Dudareva & Pichersky, 2000 ; Maeda & Dudareva, 2012). La PAL a surtout été étudiée chez les végétaux dans le cadre des défenses de la plante, mais pas en relation avec la production de parfum. Elle a par contre été identifiée dans des fleurs de melon et de framboisier à des stades tardifs mais a été rattachée à la maturation des fruits (Diallianas & Kanellis, 1994 ; Kumar & Ellis, 2001). Deux ADNc ont été décrits dans les fleurs de pétunia (Verdonk *et al.*, 2005). Les réactions qui suivent celle catalysée par la PAL sont mal connues, les recherches se sont surtout concentrées sur les méthyltransférases. Le *trans*-cinnamate peut être méthylé par une enzyme non encore caractérisée, donnant ainsi le méthylcinnamate, une molécule participant au parfum de certaines plantes telles que *Clarkia breweri* (Dudareva & Pichersky, 2000). Le cinnamate peut aussi être hydroxylé en position *para* donnant le *p*-coumarate. Cette réaction fait appel à la cinnamate 4-hydroxylase dont deux gènes ont été clonés chez le pétunia mais non caractérisés (Colquhoun *et al.*, 2011b). Le *p*-coumarate peut aussi être obtenu de façon minoritaire par la désamination de la tyrosine par la tyrosine ammonia lyase TAL (Dudareva & Pichersky, 2000). Il est un précurseur de l'eugénol et de l'isoeugénol par une série de réaction dont seules quelques enzymes sont connues. Le *p*-coumarate est hydroxylé en position *meta* donnant l'acide caféique et ce groupement OH est aussitôt méthylé par la *S*-adénosyl-L-méthionine:acide caféique O-méthyltransférase (COMT) donnant l'acide férulique. Cette enzyme a été bien décrite dans le cadre de la lignification notamment mais pas dans le contexte de la synthèse du parfum. Cependant, COMT a été purifiée dans les pétales de *Clarkia breweri* (Wang & Pichersky, 1998) et caractérisée chez cette même espèce (Wang *et al.*, 1997) mais aussi dans les pétales d'une rose botanique, *R. chinensis* cv. 'Spontanea', sous le nom de RcOMT2, son gène s'exprimant de manière constitutive (Wu *et al.*, 2003). L'acide férulique est ensuite réduit en aldéhyde de coniféryle puis en alcool de coniféryle. Ce dernier est acétylé en acétate de coniféryle par l'alcool de coniféryle acétyltransférase (CFAT), caractérisée dans les fleurs de pétunia (Dexter *et al.*, 2007). Cet acétate de coniféryle est alors utilisé par l'eugénol synthase (EGS) ou l'isoeugénol synthase (IGS), deux réductases NADPH dépendantes, pour synthétiser de l'eugénol ou de

l'isoeugénol respectivement. L'EGS a été caractérisée dans les fleurs de *Petunia hybrida* et de *Clarkia breweri* (Koeduka *et al.*, 2008). L'IGS a été étudiée dans les fleurs de pétunia et de *Clarkia breweri* (Koeduka *et al.*, 2006 ; Koeduka *et al.*, 2008). *Petunia axillaris* subsp. *parodii* possède à la fois l'EGS et l'IGS (Koeduka *et al.*, 2009a). L'IGS est inactive du fait d'une mutation déplaçant le cadre de lecture. L'EGS est active mais son substrat, l'acétate de coniféryle, est préférentiellement hydraté en acétate de dihydroconiféryle et les fleurs n'émettent pas d'eugénol. La structure et le mécanisme réactionnel de l'EGS de basilic ont été précisés en 2007 par Louie *et al.*. Une autre enzyme, la chavicol/eugénol synthase CES, caractérisée dans les feuilles de *Larrea tridentata*, est aussi capable de synthétiser l'eugénol mais n'offre que peu d'homologie avec l'EGS et l'IGS (Vassão *et al.*, 2007). Une autre IGS bifonctionnelle a aussi été caractérisée dans les trichomes de l'anis, dont certains recouvrent la surface des sépales (Koeduka *et al.*, 2009b). Elle synthétise aussi du *t*-anol. L'eugénol et l'isoeugénol participent au parfum des roses en lui donnant une odeur épicée, tout comme leurs conjugués méthylés qui apportent une note herbacée (Wang & Pichersky, 1998).

Le méthyleugénol et le méthylisoeugénol sont obtenus par méthylation du groupement hydroxyl en position *para* par la *S*-adénosyl-L-méthionine:(iso)eugénol *O*-méthyltransférase (IEMT). Cette enzyme, uniquement florale et dont le gène s'exprime essentiellement dans les pétales, les étamines et les styles à l'anthèse, a été identifiée, purifiée et caractérisée dans les fleurs de *Clarkia breweri* (Wang *et al.*, 1997 ; Wang & Pichersky, 1998). Elle fonctionne en tant qu'homodimère en utilisant la *S*-adénosyl-L-méthionine comme donneur de groupements méthyl et fait partie de la famille de *O*-méthyltransférase, tout comme COMT. Sept acides aminés dans la partie N-terminale de la protéine sont responsables de la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat (Wang & Pichersky, 1999) et le changement de ceux-ci permet de modifier cette sélectivité (Wang & Pichersky, 1998 ; Wang & Pichersky, 1999). Trois autres régions conservées sont impliquées dans la fixation de la *S*-adénosyl-L-méthionine (Wang *et al.*, 1997). Par la suite, un orthologue, nommé *RcOMT1*, a été trouvé dans les pétales de *R. chinensis* cv. 'Spontanea' (Wu *et al.*, 2003). Ce gène, spécifique des pétales, s'exprime préférentiellement à l'anthèse. Une enzyme bifonctionnelle, AIMT1, a été caractérisée dans les trichomes de l'anis et méthyle aussi bien l'isoeugénol en méthylisoeugénol que le *t*-anol en *t*-anéthol (Koeduka *et al.*, 2009b).

c) Autres composés synthétisés à partir de la phénylalanine

La chaîne latérale du *trans*-cinnamate peut aussi être raccourcie. En perdant deux carbones cette molécule donne l'acide benzoïque (Fig. 9). Ce mécanisme a été étudié chez *Hypericum androsaemum* L. : un coenzyme A est fixé au cinnamate par une cinnamate:CoA ligase donnant le cinnamoyl CoA, la double liaison de celui-ci est hydratée par une cinnamoyl CoA hydratase/lyase qui facilite aussi le départ de l'acétyl-coenzyme A donnant un benzaldéhyde et enfin une benzaldéhyde déshydrogénase l'oxyde en acide benzoïque (Ahmed *et al.*, 2002). Cette dernière, une enzyme mitochondriale, a été caractérisée dans les fleurs d'*Antirrhinum majus* L. (Long *et al.*, 2009). Alternativement, un autre chemin réactionnel semble se produire dans les pétales de pétunia. Le *trans*-cinnamoyl CoA est transformé par une série de réactions non élucidée en 3-oxo-3-phénylpropionyl CoA. Puis la chaîne latérale est réduite de deux carbones par la 3-cétoacyl-CoA thiolase *PhKAT1* caractérisée chez le pétunia et donnant le benzoyl CoA, un précurseur de l'acide benzoïque par de nouvelles réactions dont les enzymes ne sont pas connues (Van Moerkercke *et al.*, 2009). *PhKAT1* est une enzyme des peroxysomes végétaux et il a été montré qu'elle était effectivement impliquée dans la production et l'émission des composés aromatiques odorants dérivés du benzoate (Van Moerkercke *et al.*, 2009). L'acide benzoïque peut ensuite être méthylé par une *S*-adénosyl-L-méthionine:acide benzoïque carboxyl méthyltransférase (BAMT) pour donner le benzoate de méthyle, un composé parfumé. Cette enzyme a été purifiée et caractérisée dans la fleur du mufler (Murfitt *et al.*, 2000). C'est un homodimère cytosolique, présent essentiellement sur les cellules coniques (face interne) des pétales, à un moindre degré sur la face externe, mais aussi dans la pilosité jaune du tube, formant ainsi un chemin pour les insectes vers le nectar (Kolossova *et al.*, 2001). Une enzyme similaire, uniquement florale, a aussi été trouvée dans les fleurs de tabac où elle méthyle aussi bien l'acide benzoïque que l'acide salicylique (ainsi que d'autres dérivés aromatiques mais avec une affinité moindre) et pour cette raison a été nommée BSMT (Pott *et al.*, 2004). La mutation d'un seul acide aminé de sa séquence permet en outre de changer sa sélectivité (Pedroso, 2007). Les BAMT, SAMT et BSMT appartiennent à la même famille enzymatique et ont des séquences très proches. Les SAMT et BSMT proviennent d'un même ancêtre commun. Après duplication du gène ancestral, non sélectif, les enzymes ont acquises leurs spécificités de substrat (Huang *et al.*, 2012). La *S*-adénosyl-L-méthionine:acide salicylique carboxyl méthyltransférase (SAMT) des fleurs de *Stephanotis floribunda* Brongn. participerait aussi à la synthèse du benzoate de méthyle grâce à sa faible affinité pour l'acide benzoïque, en quantité largement supérieure à l'acide salicylique dans les cellules des pétales de cette espèce (Pott *et al.*, 2004). Les SAMT

des fleurs de *Clarkia breweri* et d'*Antirrhinum majus* sont aussi capables de méthyler l'acide benzoïque avec une activité plus faible (Ross *et al.*, 1999 ; Negre *et al.*, 2002).

L'acide benzoïque peut aussi être réduit en benzaldéhyde puis en alcool benzylique (Fig. 9). Ces deux composés sont des molécules volatiles et odorantes participant au parfum des plantes, dont les roses (Flament *et al.*, 1993 ; Shalit *et al.*, 2004 ; Joichi *et al.*, 2005). Mais les enzymes impliquées dans cette cascade de réaction ne sont pas connues. Une aldo-céto réductase issue des racines d'*Aloe arborescens* Mill. a récemment été caractérisée et montre une forte activité avec le benzaldéhyde comme substrat (Morita *et al.*, 2007), ce qui ouvre la voie pour la recherche de telles enzymes dans les fleurs.

Les SAMT sont des enzymes méthylant l'acide salicylique, un dérivé hydroxylé en position ortho de l'acide benzylique (Fig. 9). L'acide salicylique et le salicylate de méthyle sont deux composés connus pour leur implication dans les mécanisme de défense de la plante. Mais l'ester est aussi une composante du parfum, notamment des plantes pollinisées par les papillons de nuit (Ross *et al.*, 1999). La SAMT a d'abord été purifiée et caractérisée dans les pétales de *Clarkia breweri* (Ross *et al.*, 1999). Tout comme la BAMT, la SAMT est un homodimère (Ross *et al.*, 1999 ; Negre *et al.*, 2002). Une SAMT a aussi été caractérisée dans les fleurs de muflier mais le très faible niveau d'expression de son gène et le fait que le muflier n'émette pas de salicylate de méthyle font penser que son rôle dans la synthèse du parfum est négligeable voire nul et qu'elle participerait plutôt aux défenses dans la fleur (Negre *et al.*, 2002), montrant ainsi toute la dualité de la fonction de ce composé. La SAMT a aussi été identifiée (Pott *et al.*, 2002), purifiée et caractérisée (Pott *et al.*, 2004) dans les fleurs du jasmin de Madagascar chez qui cette enzyme est spécifique des pétales (Pott *et al.*, 2002). La structure de l'enzyme a été résolue en 2003 par Zubieta *et al.*

d) Synthèse du 1,3,5-triméthoxybenzène et du 3,5-diméthoxytoluène

Deux autres composés aromatiques du parfum ne dérivent pas de la voie de synthèse que nous venons de voir. Le 1,3,5-triméthoxybenzène TMB et le 3,5-diméthoxytoluène DMT donnent un note caractéristique aux roses chinoises appelée "odeur de thé". La première est issue de la triple étherification du phloroglucinol alors que la seconde provient de la double étherification de l'orcinol (Fig. 9).

Si la synthèse du phloroglucinol a été étudiée chez les bactéries où il provient d'un polyacétate, d'une lactone ou d'un composé aromatique nitré (Achkar *et al.*, 2005), la voie de biosynthèse menant à l'orcinol n'est pas encore élucidée. Le phloroglucinol est d'abord

méthylé sur l'un de ces trois groupements hydroxyles par la phloroglucinol *O*-méthyltransférase POMT donnant ainsi le 3,5-dihydroxyanisole. La POMT est une enzyme homodimérique purifiée et caractérisée à partir de pétales de rose dont elle est spécifique. Elle utilise la *S*-adénosyl-L-méthionine comme donneur de groupements méthyle (Wu *et al.*, 2004). Les étherifications ultérieures sont très proches entre l'orcinol et le 3,5-dihydroxyanisole. Ces méthylation sont prises en charge par les orcinol *O*-méthyltransférases ou OOMT. Deux isoformes (97% d'homologie) de cette enzyme dans une rose moderne (Lavid *et al.*, 2002) et quatre autres dans deux autres cultivars de rose (Scalliet *et al.*, 2002) ont été caractérisées la même année. Bien que ces deux enzymes acceptent l'orcinol et le 3-méthoxyorcinol comme substrat, elles ont des spécificités légèrement différentes. Alors que OOMT1 et OOMT3, telles que définies par Scalliet *et al.* (2002), catalysent quasi exclusivement la méthyléthérification de l'orcinol (Lavid *et al.*, 2002 ; Scalliet *et al.*, 2002), OOMT2 prend aussi en charge cette réaction à un degré moindre et surtout catalyse la méthyléthérification du 3-méthoxyorcinol en DMT (Lavid *et al.*, 2002). De manière similaire, OOMT1 et OOMT3 catalysent l'étherification du 3,5-dihydroxyanisole (Lavid *et al.*, 2002 ; Scalliet *et al.*, 2002) et OOMT2 l'étherification du 3,5-diméthoxyphénol en TMB. Ces trois enzymes n'ont par contre aucune action sur le phloroglucinol (Lavid *et al.*, 2002 ; Scalliet *et al.*, 2002). Ces isoformes sont exclusivement florales, avec un pic d'expression de leur(s) gène(s) juste avant l'anthèse, sont localisées dans les cellules épidermiques des pétales, se comportent comme des homodimères et appartiennent à la même famille que les COMT décrites précédemment (Lavid *et al.*, 2002 ; Scalliet *et al.*, 2002 ; Scalliet *et al.*, 2006 ; Bergougnoux *et al.*, 2007). La différence de sélectivité du substrat entre les OOMT1 et OOMT2 réside dans l'encombrement stérique du site catalytique, la phénylalanine 126 de l'OOMT2 offrant plus d'espace que la tyrosine 127 de l'OOMT1, ce qui permet de fixer un groupement méthoxy, plus gros qu'un groupement hydroxyle (Scalliet *et al.*, 2008). Un gène proche des OOMT, nommée *RcOMT2*, a également été caractérisé dans les pétales de *R. chinensis* cv. 'Spontanea' mais son gène s'exprime de manière constitutive bien que plus forte dans les pétales à l'anthèse (Wu *et al.*, 2003). Il s'agit d'une COMT mais celle-ci accepte aussi comme substrat minoritaire l'orcinol et le 3,5-dihydroxyanisole mais pas le 3-méthoxyanisole ni le 3,5-diméthoxyphénol, et se comporte donc aussi comme une OOMT1 (Wu *et al.*, 2003). Les roses modernes ont une "odeur de thé" car elles émettent du DMT et du TMB, un caractère qu'elles ont hérité de leurs ancêtres chinois et que l'on ne retrouve pas chez leurs ancêtres européens. Pourtant les gènes des OOMT se retrouvent dans toutes les roses modernes, anciennes et botaniques. Cette différence de parfum s'explique par une

absence d'ARN et de protéines dans les pétales de roses, et donc une impossibilité de produire ces composés chez les rosiers botaniques européens (Scalliet *et al.*, 2006). Le gène *OOMT2* est présent chez les roses européennes mais pas *OOMT1*. Il a donc été postulé que l'apparition de l'«odeur de thé» chez les roses chinoises résulterait d'abord d'une augmentation de l'expression du gène *OOMT2* dans les pétales, puis de l'apparition, par duplication, du gène *OOMT1*, dont l'enzyme est plus efficace que *OOMT2* pour catalyser la première éthérisation (Scalliet *et al.*, 2008).

e) Modifications des composés aromatiques

Tout comme le géraniol, le 2-phényléthanol et l'alcool benzylique peuvent être acétylés en acétate de 2-phényléthyle et de benzyle respectivement, des molécules importantes contribuant au parfum. En effet, l'acétyltransférase *RhAAT*, qui acétyle le géraniol et le citronellol, n'a pas une sélectivité stricte et accepte des composés aromatiques (Guterman *et al.*, 2006). L'alcool de coniféryle acétyltransférase *CFAT* est aussi capable d'acétyler le 2-phényléthanol et l'alcool benzylique (Dexter *et al.*, 2007). Au contraire, dans la fleur de *Clarkia breweri*, il existe une enzyme spécifique de l'alcool benzylique, l'acétyl-CoA:alcool benzylique acétyltransférase (*BEAT*). Le gène correspondant s'exprime exclusivement dans les fleurs, essentiellement à l'anthèse et la protéine est relativement stable (Dudareva *et al.*, 1998). Un autre ester volatil et participant au parfum peut aussi se former à partir de l'alcool benzylique, le benzoate de benzyle. Cette réaction est catalysée par la benzoyl-CoA :alcool benzylique benzoyltransférase *BEBT*, une enzyme florale de *Clarkia breweri* mais aussi induite dans les feuilles endommagées et qui participe donc à la fois au parfum et aux défenses de la plante (D'Auria *et al.*, 2002). C'est une enzyme monomérique fortement représentée dans les stigmates dont la sélectivité est faible et qui pourrait accepter d'autres substrats tels que l'octanol. Un ADNc putatif de cette enzyme a aussi été trouvé dans les fleurs de pétunia (Verdonk *et al.*, 2005) où le benzoyl CoA est synthétisé par la *PhKAT1* (voir plus haut, Van Moerkercke *et al.*, 2009).

A l'instar des terpènes, les composés aromatiques peuvent aussi être glycosylés pour être stockés dans la cellule et relargués par une augmentation de l'activité des glycosidases (Verhoeven *et al.*, 2003). Cela a été particulièrement bien étudié pour le 2-phényléthanol qui se retrouve, chez la rose par exemple, sous la forme de glycosides mono- ou disaccharidiques (Watanabe *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2002). La concentration en glycosides de 2-phényléthanol augmente avant l'ouverture de la fleur puis diminue progressivement au cours de l'épanouissement, le 2-phényléthanol étant libéré par une

hydrolyse enzymatique (Oka *et al.*, 1999). Ceci permet notamment de manipuler le parfum d'un bouquet en vue de sa commercialisation. En effet, des roses coupées placées dans un vase contenant du 2-phényléthyl- β -D-glucopyranoside émettent 500 fois plus de 2-phényléthanol et de 2-phénylacétate qu'une rose dans l'eau grâce à l'action d'une β -glucosidase (Ikemoto *et al.*, 2004). Cette enzyme a été partiellement purifiée (Sakai *et al.*, 2008). L'eugénol peut lui aussi être stocké sous la forme de glycosides (Straubinger *et al.*, 1999). Contrairement aux terpènes, les composés aromatiques ne sont que très peu stockés par estérification avec un acide gras (Dunphy, 2006).

f) Régulation de la synthèse et de l'émission des composés aromatiques

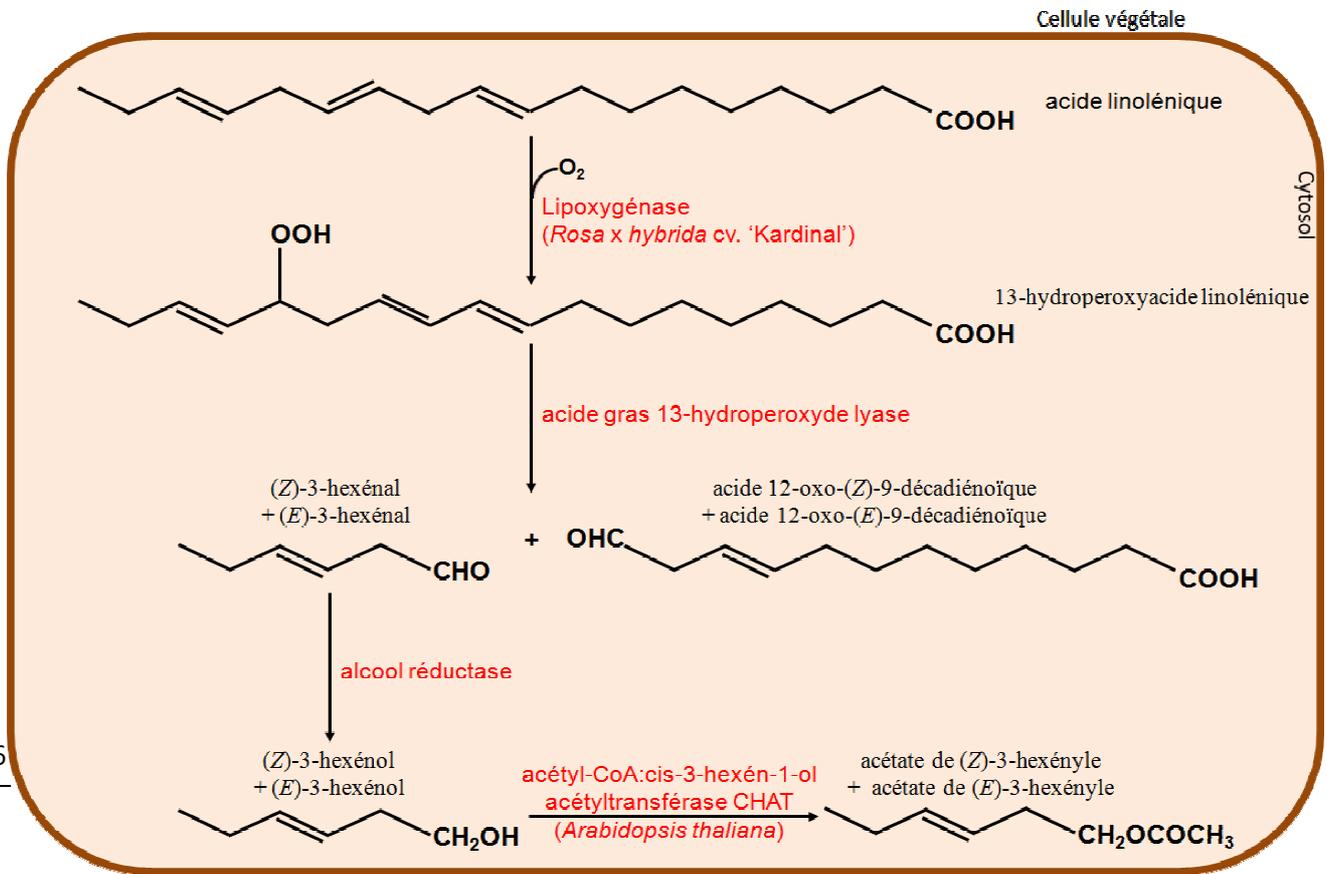
Tout comme pour les monoterpènes, l'étude de la régulation de la production et/ou de l'émission de parfum à un niveau transcriptionnel en est à ses débuts. Le premier facteur de transcription des voies de synthèse du parfum est ODORANT1, qui a été découvert chez le pétunia (Verdonk *et al.*, 2005). Il appartient à la famille des MYB et est exprimé majoritairement dans les pétales de fleurs ouvertes. Il est capable d'activer le promoteur de l'EPSP synthase et d'augmenter l'expression de la DAHP synthase et de la PAL. Les deux premières sont des enzymes de la voie des shikimates et la troisième initie la synthèse des composés aromatiques à partir de la phénylalanine. Toutes trois sont impliquées dans la production de composés aromatiques odorants chez le pétunia et ODORANT1 permet d'augmenter cette synthèse. A l'inverse, ce facteur de transcription n'affecte pas les couleurs, dérivant pourtant de composés aromatiques. L'hypothèse est que les molécules de la couleur sont synthétisées très tôt au cours du développement floral, à un moment où ODORANT1 ne s'exprime pas encore (Verdonk *et al.*, 2005). ODORANT1 active aussi le promoteur d'un transporteur ABC qui pourrait être responsable du transport des molécules odorantes ou de leurs précurseurs (Van Moerkercke *et al.*, 2012). Emission de benzénoïdes II (EOBII) est un autre facteur de transcription exclusivement floral découvert chez le pétunia (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Celui-ci active le promoteur de l'isoeugénol synthase mais active aussi celui du facteur de transcription ODORANT1. Son spectre d'action est donc plus large et l'expérience montre qu'il affecte les productions et les émissions du benzaldéhyde, du benzoate de benzyle, de l'isoeugénol et du 2-phényléthanol, mais n'a aucun effet sur la synthèse des monoterpènes (Spitzer-Rimon *et al.*, 2010). Ce facteur de transcription a été récemment montré comme contrôlant l'ouverture de la fleur (Colquhoun *et al.*, 2011a). Un troisième facteur de transcription exclusivement floral, PhMYB4, a été trouvé chez le pétunia (Colquhoun *et al.*, 2011b). A l'inverse des deux précédents, celui-ci réprime l'expression des

deux gènes de la cinnamate 4-hydroxylase, responsable de la synthèse de l'acide *p*-coumarique à partir de l'acide *trans*-cinnamique, l'une des étapes de la synthèse de l'eugénol et de l'isoeugénol. *PhMYB4* régule finement la balance entre la production des eugénol et isoeugénol et celle des autres composés aromatiques (Colquhoun *et al.*, 2011b).

3) Synthèse des dérivés d'acides gras : les oxylipides

Contrairement aux terpènes et aux composés aromatiques, les oxylipides n'ont été que très peu étudiés et quasiment uniquement dans un contexte de défense de la plante et non d'émission du parfum. On considère généralement trois voies de synthèse à partir des lipides, correspondant à des réponses différentes : la voie des jasmonates, la voie des divinyléthers et la voie des GLV (green leaf volatiles) (Matsui, 2006 ; Stumpe & Feussner, 2006 ; Lee *et al.*, 2008). Ces derniers sont des alcools, des aldéhydes et des esters à chaînes aliphatiques essentiellement en C₆, et sont impliqués dans les interactions plante-plante ou plante-insectes, notamment dans le cadre des défenses de la plante (Matsui, 2006 ; Stumpe & Feussner, 2006). Ces molécules sont aussi celles qui apportent un note "herbacée" au parfum des roses. Leur synthèse et les enzymes catalysant ces réactions n'ont pas été étudiées pour leur contribution à l'odeur émise par les fleurs mais il est vraisemblable que la voie de biosynthèse utilisée soit la même que celle empruntée pour les composés de défense. Dans celle-ci, l'acide linoléique est oxygéné en 13-hydroperoxyacide linoléique par une lipoxygénase ou LOX (Fig. 10) (Matsui, 2006 ; Stumpe & Feussner, 2006). Il est à noter que cette enzyme a été caractérisée dans les fleurs de rose mais en relation avec la sénescence (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 2000). Le peroxyde sert alors de base aux trois voies énumérées ci-dessus, chacune étant catalysée par une protéine différente appartenant à la famille des cytochromes P450 CYP74. Dans celle des GLV, le 13-hydroperoxyacide linoléique est coupé par une acide gras 13-hydroperoxyde lyase (13HPL), ce qui aboutit à la formation d'une molécule d'acide 12-oxo-(*Z*)-9-décadiénoïque et d'une molécule de (*Z*)-3-hexénal (Matsui, 2006 ; Stumpe & Feussner, 2006). Ces composés *Z* peuvent s'isomériser spontanément ou enzymatiquement en composés *E* (Matsui, 2006 ; Stumpe & Feussner, 2006). Les aldéhydes en C₆, à la base des GLV, peuvent être ensuite réduits en alcools correspondants puis ceux-ci être acétylés (Matsui, 2006 ; Stumpe & Feussner, 2006). Il existe un autre type de LOX peroxydant en position 9, des 9HPL coupant en position 9, ce qui aboutit à former des aldéhydes à chaînes en C₉. De la même manière, l'acide linoléique peut être substitué par d'autres acides gras, ce qui permet au final de synthétiser toute une variété de composés avec différentes longueurs de chaîne et

différentes positions et isoméries des doubles liaisons (Matsui, 2006 ; Stumpe & Feussner, 2006).



66

Figure 10 : Synthèse des “green leaf volatiles” en prenant pour exemple l’acide linoléique comme substrat et les 13-lipoxygénase et 13-hydroperoxyde lyase. En rouge, le nom des enzymes catalysant les réactions avec entre parenthèse le nom de la plante dans les fleurs de laquelle elle a été caractérisée.

Cependant, d’autres composés aliphatiques ou ramifiés, à plus ou moins longues chaînes, peuvent se former par d’autres réactions. Par exemple, la RdCCD1, qui intervient dans la synthèse des cétones de rose, est capable de cliver le lycopène pour aboutir à la formation de 6-méthyl-5-heptèn-2-one (Huang *et al.*, 2009a).

Un marquage radioactif de l’acétate (le précurseur de la synthèse des acides gras) dans les pétales de l’œillet montre que les dérivés d’acides gras participant au parfum sont produits au niveau des membranes puis sont stockés dans des particules “lipide-protéine” dans le cytosol (Hudak & Thompson, 1997). D’autres composés du parfum de l’œillet, soit du caryophyllène, du benzoate d’hexyle et du benzoate de benzyle ont aussi été trouvés dans ces particules.

Les alcools gras peuvent être aussi acétylés à l'image des terpènes et des composés aromatiques. La *RhAAT1*, une acétyl-coenzyme A:géraniol acétyltransférase de rose, accepte, en plus du géraniol, du 2-phényléthanol et de l'alcool benzylique, le 1-octanol en tant que substrat (Shalit *et al.*, 2003 ; Guterman *et al.*, 2006). Il existe cependant une enzyme dont le substrat préférentiel est un dérivé des acides gras : l'acétyl-CoA:*cis*-3-hexén-1-ol acétyltransférase (CHAT) est une enzyme que l'on retrouve dans les fleurs d'*A. thaliana* mais dont le rôle semble plutôt lié à la réponse aux blessures (D'auria *et al.*, 2002).

De même que les terpènes et les composés aromatiques, les dérivés d'acides gras sont aussi susceptibles d'être stockés sous une forme glycosylée. Ainsi, les (2E)- et (2Z)-2,6-diméthyl-6-hydroxyocta-2,7-diénoles et le (2E,6E)-2,6-diméthyl-1-hydroxyocta-2,6-diéno-8-ol se retrouvent sous forme pyranosylée dans les pétales de roses (Straubinger *et al.*, 1997).

III) Objectifs de la thèse

Il ressort donc de cette étude bibliographique que les voies métaboliques de synthèse des composés organiques volatils participant au parfum de la rose sont encore largement méconnues. Afin de combler les lacunes dans nos connaissances sur les processus biologiques à l'origine de la production et de l'émission du parfum par les fleurs de rose, les laboratoires BVpam et RDP utilisent une stratégie intégrée impliquant des approches moléculaires, génétiques et biochimiques pour identifier et caractériser les gènes impliqués dans ces voies de biosynthèse.

Suite à l'avènement des techniques d'étude du transcriptome ayant abouti à la caractérisation de plusieurs gènes chez la rose (Chanelière *et al.*, 2002 ; Guterman *et al.*, 2002 ; Dubois *et al.*, 2011) et au développement des outils de bioinformatique, il devient plus facile et plus rapide d'étudier l'expression simultanée d'un grand nombre de gènes pour sélectionner les plus susceptibles d'être effectivement impliqués dans les voies de synthèse des composés odorants. Avant mon arrivée au laboratoire, des comparaisons du transcriptome entre une rose parfumée (*Rosa × hybrida* cv. 'Papa Meiland') et une rose non parfumée (*Rosa × hybrida* cv. 'Rouge Meiland') avaient été réalisées par AFLP differential display et par utilisation d'une puce à ADN (Rosa-Affyarray ; Dubois *et al.*, 2011). Ces travaux avaient permis d'identifier plusieurs gènes potentiellement associés au parfum des roses. L'objectif de

ma thèse était de réaliser une analyse fonctionnelle de deux gènes parmi ceux-ci, l'un codant pour une Nudix hydrolase putative, *RhNUDX1*, le second pour la phénylacétaldéhyde synthase *RhPAAS*.

Dans une première partie de mon travail, l'objectif a été d'identifier la voie métabolique dans laquelle intervient la Nudix hydrolase *RhNUDX1*, ainsi que le rôle de cette protéine dans cette voie de biosynthèse. Dans ce but, des approches génétiques, moléculaires et biochimiques ont été utilisées.

La deuxième partie de mon travail avait pour objectif d'étudier le gène *RhPAAS*, codant pour la phénylacétaldéhyde synthase, déjà connue pour sa participation à la synthèse du 2-phénylacétaldéhyde, précurseur du 2-phényléthanol (Kaminaga *et al.*, 2006). Avant mon arrivée au laboratoire, une population de rosiers, nommée Hw, développée à partir d'un croisement entre une rose émettant du 2-phényléthanol (*R. × wichuraiana*, hybride du rosier sauvage *R. wichuraiana*) et une rose non parfumée (*R. × hybrida* cv. 'H190') (Crespel *et al.*, 2002) avait permis d'identifier trois allèles de PAAS. L'étude préliminaire de ces allèles avait fait l'objet de la thèse de J. Machenaud (2010), en collaboration avec l'IRHS de l'INRA d'Angers. La deuxième partie de mon travail poursuit cette caractérisation. En particulier, les cadres de lectures de ces allèles ont été complètement séquencés, les expressions de celles-ci ont été analysées dans la population Hw, et les allèles ont été surexprimés en systèmes hétérologues (levure, tabac) et homologue (rosier) afin de vérifier la fonctionnalité des isoformes en découlant. Il s'agissait de comprendre pourquoi seules certaines associations d'allèles conduisaient à la production de 2-phényléthanol.

Résultats et conclusions

D) Identification et caractérisation de la Nudix hydrolase *RhNUDX1*

A) Introduction

Lors de mon arrivée au laboratoire en novembre 2009, une puce à ADN confrontant les ADNc d'une rose parfumée (*Rosa × hybrida* cv. 'Papa Meilland') à ceux d'une rose non parfumée (*Rosa × hybrida* cv. 'Rouge Meilland') venait d'être réalisée. Cette expérience avait pour but de rechercher des gènes surexprimés dans la rose parfumée vis-à-vis de la rose non parfumée, ceux-ci étant les plus susceptibles d'être impliqués, directement ou indirectement, dans la synthèse d'un composé parfumé. A l'inverse, un gène surexprimé dans la rose non parfumée vis-à-vis de la rose parfumée pourrait être responsable de l'inhibition de cette synthèse. Ces résultats ont été confrontés à ceux d'une expérience d'AFLP differential display (polymorphisme de longueur des fragments amplifiés) réalisée également au laboratoire confrontant les ADNc de ces deux mêmes cultivars. Le gène le plus différenciellement exprimé dans la rose parfumée vis-à-vis de la rose non parfumée est le même pour les deux expériences. Nous avons donc entrepris la caractérisation de ce gène, inconnu jusqu'alors, grâce à l'analyse de sa séquence, l'analyse de son expression dans différents cultivars en la confrontant à l'émission des composés volatils dans ceux-ci, ainsi qu'un suivi spatial et temporel de cette expression dans une rose parfumée, et enfin le phénotypage d'une lignée ARN interférant pour ce gène.

L'ensemble de ces résultats a été résumé et consigné dans un article soumis à un journal à comité de lecture pour publication.

B) Article soumis pour publication

Le manuscrit de l'article est reproduit ci-dessous tel qu'il a été soumis :

The rose Nudix hydrolase, RhNUDX1, is involved in the biosynthesis of monoterpene alcohols, the typical rose scent compounds

Jean-Louis Magnard^a, Aymeric Rocchia^{a,b}, Philippe Vergne^b, Romain Hecquet^a, Annick Dubois^b, Jean-Claude Caissard^a, Frédéric Jullien^a, Florence Nicolè^a, Olivier Raymond^b, Sandrine Balzergue^c, Sophie Meyer^{d,e}, Patricia Claudel^{d,e}, Philippe Hugueney^{d,e}, Mohammed Bendahmane^b, Sylvie Baudino^{a,1}

a Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France; Université de Saint-Etienne, F-42000, Saint-Etienne, France; Laboratoire BVpam, EA3061, 23 rue du Dr Michelon, F-42000, Saint-Etienne, France.

b Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes UMR INRA-CNRS, Université Lyon 1-ENSL, IFR128 BioSciences-Gerland Lyon sud, Ecole Normale Supérieure, 46 allée d'Italie 69364 Lyon Cedex 07, France.

c URGV UMR INRA 1165 - CNRS 8114 - UEVE, 2 rue Gaston Crémieux, CP5708, 91057 Evry cedex, France

d INRA, UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, F-68000 Colmar, France.

e Université de Strasbourg, UMR 1131, 67000 Strasbourg, France

1 Corresponding author:

Sylvie Baudino

Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France; Université de Saint-Etienne, F-42000, Saint-Etienne, France; Laboratoire BVpam, EA3061, 23 rue du Dr Michelon, F-42000, Saint-Etienne, France.

Tel.: 33-4-77481525

E-mail: Sylvie.Baudino@univ-st-etienne.fr

Running Title: Nudix hydrolase role in scent production in rose petals

Manuscript information: 17 text pages, 5 figures, 9 supporting information files (3 figures, 2 tables, 2 datasets, 2 texts)

Data deposition: Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL databases under accession number JQ820249.

Abstract

Roses are among the most fragrant flowers and rose scent is composed of hundreds of volatile molecules among which monoterpene alcohols are the most abundant. Little is known about the molecular mechanisms underlying the biosynthesis and emission of these scent compounds in *Rosa sp.* Here, transcriptomic comparisons between scented and non-scented roses identified a rose Nudix hydrolase homologue (*RhNUDXI*) whose expression was highly induced in scented roses. *RhNUDXI* expression, analyzed in a collection of rose varieties exhibiting different scent compositions, correlated with monoterpene alcohol biosynthesis. In agreement with this observation, knockdown of *RhNUDXI* in rose plants lowered the accumulation of monoterpene alcohols and scent. Transient expression of the rose *RhNUDXI* in tobacco leaves resulted into a significant accumulation of geraniol and geranial monoterpenes. Our data provide evidence that *RhNUDXI* is involved in the production of the typical rose scent monoterpene molecules in petals and suggest a previously undiscovered role for a Nudix protein in scent molecules production.

Keywords

Floral scent; Petal; *Rosa*; Monoterpenes; Volatiles; Nudix hydrolase

Introduction

Roses are widely used as garden ornamental plants, as cut flowers and also for the production of essential oil for the perfume and cosmetic industries. Roses are among the most heavily scented flowers, with hundreds of volatile molecules in the essential oil of *Rosa x damascena* (1). Garden roses can exhibit diverse fragrances, such as the typical rose scent, but also scents described as resembling tea, various fruits, myrrh and even aniseed. However, rose breeders sometimes find it difficult to select scent traits, and not all roses arriving on the market nowadays are heavily scented, in particular roses bred for cut flowers often lack scent. The cause of the lack of fragrance in the flowers of these cultivars is unknown and has recently been shown not to be strongly linked to increased vase life (2). Rose scent is complex.

Variations in the composition of the volatile molecules, both in terms of quality and quantity, lead to different rose scent profile (3). These scent molecules belong to 3 major classes, terpenes, benzenoids/phenylpropanoids and fatty acid derivatives (4). For the typical rose scented flowers, the most abundant molecules are monoterpene alcohols and 2-phenylethanol. The tea fragrance has also been well studied and it is mostly due to aromatic compounds like 3,5 dimethoxytoluene (DMT) (3).

Despite the extensive literature on the chemistry of rose scent, very few studies have dealt with the molecular mechanisms controlling the biosynthesis and emission of rose scent compounds. Pioneering research on *C. breweri* and *A. majus* has shown that scent production is often regulated at the level of transcription (4). In roses, for instance, the pathway leading to the biosynthesis of DMT, partly responsible for the tea scent, has recently been described (5-7). Orcinol O-methyl transferases (OOMTs), the enzymes that are responsible for DMT synthesis, are specifically expressed in petals of roses emitting DMT (6). The enzymes involved in the synthesis of 2-phenylethanol have also recently been characterized in *Petunia* and in rose (8). However, in roses, information on genes involved in the terpene pathway is scarce. Only two genes have been characterized so far and no monoterpene synthase encoding gene has been isolated (9, 10). We are thus very far from having a detailed picture of the various pathways leading to the enormous diversity of compounds synthesized by rose flowers.

Here we report the identification and the functional characterization of a Nudix hydrolase (RhNUDX1) whose expression is highly induced in scented roses. Gene expression and metabolic profiling using a group of rose varieties exhibiting various scent compositions, showed that *RhNUDX1* expression correlated with the accumulation of typical rose scent compounds, the monoterpene alcohols. Knockdown of *RhNUDX1* in rose plants using an RNAi strategy and metabolic profiling permitted the association of *RhNUDX1* expression more specifically to accumulation of the monoterpene geraniol and its derivatives. Expression of *RhNUDX1* in tobacco leaves resulted in a significant accumulation of geraniol derivatives, thus confirming a role of the *RhNUDX1* gene in biosynthesis of monoterpene alcohols.

Results

Identification of candidate scent genes

cDNA AFLP differential display (cDNA-AFLP-DD) and DNA microarrays were used to compare the transcriptomes of two roses that exhibit very contrasted scent characteristics. *Rosa x hybrida* cv. Papa Meilland (hereafter ‘Papa Meilland’) is heavily scented with a typical rose scent, mostly composed of monoterpene alcohols and 2-phenylethanol. Conversely, *Rosa x hybrida* cv. Rouge Meilland (hereafter ‘Rouge Meilland’) is almost scentless. ‘Rouge Meilland’ flowers produce very small quantities of scent compounds, mostly fatty acid derivatives and DMT, as confirmed by solid/liquid phase extraction and analyses of volatiles (Table S1).

cDNA-AFLP-DD was performed using petals at the fully opened flower stage (defined according to (11)). At this stage, ‘Papa Meilland’ flowers are scented while ‘Rouge Meilland’ flowers are scentless. This strategy identified four amplicons that showed clear selective expression in petals of the scented rose ‘Papa Meilland’. Two of these sequences showed significant homology to a Nudix hydrolase (DIF1 and DIF8) and the other two presented homology to a gene encoding a putative laccase protein (DIF38 and DIF111).

In a complementary approach, an Affymetrix GeneChip® Rosa Genome Array (Rosal-Affyarray) containing 5175 rose expressed genes (12) was used to compare the transcriptomes of fully opened ‘Papa Meilland’ and ‘Rouge Meilland’ petals. Two independent biological replicates were analyzed for each cultivar. Among the 5175 genes, 91 (PM1 to PM91, 1.8%) were up regulated in ‘Papa Meilland’ and 134 (RM1 to RM134, 2.6%) showed higher expression levels in ‘Rouge Meilland’ (Dataset S1). PM1 exhibited the highest differential expression (fold increase 7583). Interestingly, the gene corresponding to PM1 encodes the same Nudix hydrolase as DIF1 and DIF8 identified in the cDNA-AFLP-DD. Gene Ontology annotations (GOs) were assigned to the genes that were up regulated in ‘Papa Meilland’ with Blast 2 go software (13). As revealed by statistics on GOs for Biological processes and Molecular functions, oxido-reduction activities and response to stress and abiotic stimulus were the most prevalent GOs terms assigned to the most differentially expressed genes (Dataset S1).

To evaluate the accuracy of the microarray and cDNA-AFLP-DD data, we performed quantitative real-time PCR (qPCR) on 21 representative genes whose expressions were clearly

up regulated in the fragrant cultivar ‘Papa Meilland’ (Table S2). qPCR analyses confirmed preferential expression in the fragrant cultivar ‘Papa Meilland’ for all analyzed genes, thus validating the results of the microarray and cDNA-AFLP-DD experiments (Table S2).

‘Papa Meilland’ and ‘Rouge Meilland’ differ not only for their scent profile but also for several other characteristics. Therefore, the expression of the 21 identified genes was investigated in a selection of 8 rose cultivars exhibiting very different scent profiles (Table S1, *Rosa x hybrida* cv. ‘Hacienda’, ‘Alister Stella Gray’ ‘Anna’, ‘Baccara’, ‘Black Baccara’, ‘Pariser Charme’ and *Rosa chinensis* cv. ‘Old Blush’ and ‘Mutabilis’). Solid/liquid phase extraction of volatiles and a principal component analysis identified 3 groups of scent compounds (Fig. S1). All fragrant cultivars with a typical rose scent (*Rosa x hybrida* cv. ‘Hacienda’, ‘Alister Stella Gray’ and ‘Pariser Charme’) clustered with a first group of compounds composed of monoterpene alcohols, 2-phenylethanol and farnesene derivatives. The tea scent cultivar ‘Anna’ had a very different scent profile and was associated with a second group of compounds composed of DMT, various sesquiterpenes and ionones. The less fragrant cultivars (‘Baccara’ and ‘Black Baccara’) were devoid of monoterpene alcohols and 2-phenylethanol and were associated with a third group of compounds (mostly fatty acid derivatives). ‘Old Blush’ was associated with the third group of compounds but was also characterized by its unusually high levels of TMB.

Putative correlations between gene expression and scent molecule production were investigated by qPCR (Table S2 and Dataset S2). The rational was to identify whether the expression of a given gene correlated with a specific scent compound. The expression of some differentially expressed genes (ie. PM5, PM84 and DIF38) did not correlate with the presence of any scent compound or class of compounds, and thus was likely not associated with scent biosynthesis.

Conversely, the expression of 6 genes correlated highly with scent compound production, thus suggesting a putative involvement of these genes in scent metabolic pathways. Expressions of PM13 (putative BRH21 ring finger protein), PM19, PM29, PM36 (putative sterol methyltransferase) and PM88 (putative alcohol dehydrogenase) were all correlated with the presence of monoterpene alcohols and their derivatives. The most striking result was the strong correlation between DIF1/PM1 expression and the presence of monoterpene alcohols, geraniol, nerol, citronellol and their derivatives (neral, geranial, geranic acid, geranyl acetate) (Fig. 1). The presence of other monoterpenes (β -Myrcene and β -ocimene) and of some sesquiterpenes (farnesene, farnesol and farnesyl acetate) was also correlated with DIF1/PM1

expression. The expression of DIF1/PM1 was investigated further using semi quantitative RTPCR in other *Rosa x hybrida* cultivars, which were either non-producers (‘Blanc Meilland Décor’ and ‘La Sévillana’) or producers (‘Cosmos’, ‘The Mac Cartney Rose’, ‘Rose à Parfum de l’Hay’ and ‘Sutter’s Gold’) of monoterpenes. PM1/DIF1 expression was highly expressed in the monoterpene and farnesene derivative-producing cultivars, thus further confirming the qPCR experiments (Fig. S2A). A similar correlation was also observed in 6 individuals from the progeny of a cross between the cultivars ‘Anna’ (non producer of monoterpenes, see Fig. S1) and ‘Bô’ (producer of monoterpenes (14)) (Fig. S2B). In summary, the strong correlation between monoterpene and farnesene derivative accumulation and *DIF1/PM1* expression in different rose cultivars suggests a key role for this gene in rose scent biosynthesis.

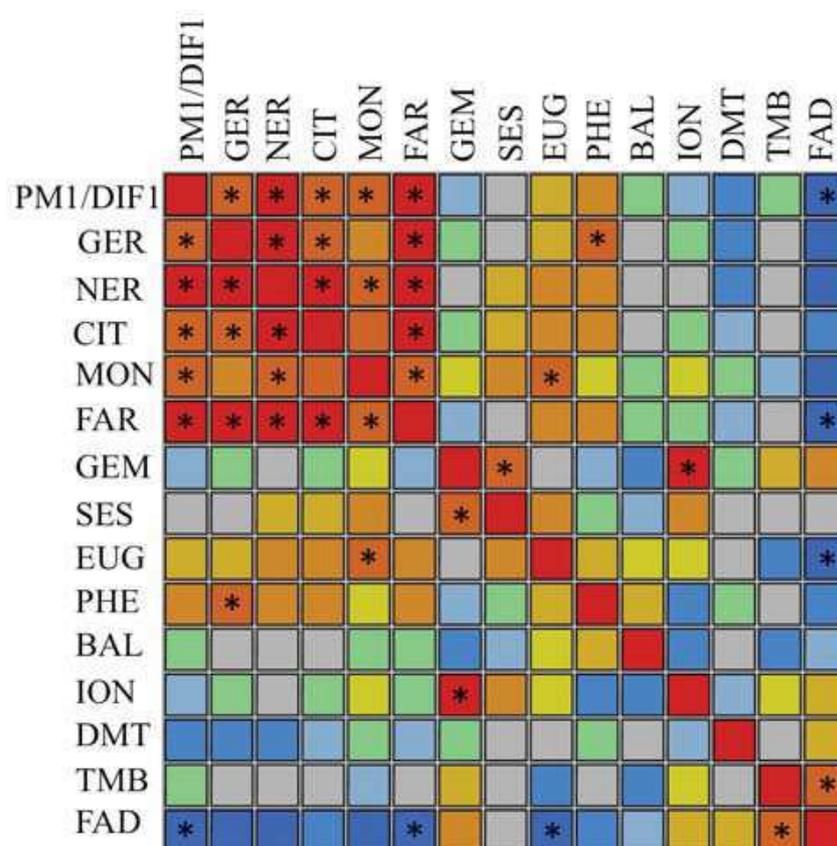


Figure 1: Correlation map of the expression of PM1/DIF1 and various scent compounds in different rose cultivars. Scent compounds were grouped according to their biosynthetic pathways (GER, geraniol and derivatives; CIT, citronellol and derivatives; GEM, germacrene D and derivatives ; MON, other monoterpenes ; SES, other sesquiterpenes ; FAD, fatty acid derivatives ; ION, ionones, PHE, 2-phenylethanol and derivatives ; BEN, benzyl alcohol and derivatives ; FAR, farnesene and derivatives ; NER, nerol and derivatives ; EUG, eugenol and methyleugenol). A non-parametric Spearman correlation test was used. Strengths of correlations are depicted by colors. Dark blue indicates a negative correlation with r close to -1. Dark red indicates a positive correlation with r close to +1. Grey indicates no correlation. Significant correlations are marked with asterisks ($\alpha = 0.05$).

DIF1/PM1 belongs to the Nudix hydrolase superfamily of proteins

Sequence analyses showed that DIF1/MP1 exhibited strong homology to Nudix hydrolases ((15); Fig. 2). A full-length cDNA clone corresponding to the rose sequence (*RhNUDX1*; JQ820249) was cloned from ‘Papa Meilland’ petals. This rose *RhNUDX1* encodes a 150 amino acid putative protein, with high similarity (59%) to AtNUDX1 from *Arabidopsis thaliana* (Fig. 2). In particular, the characteristic Nudix metal binding and catalytic domain (15), was conserved in RhNUDX1 (aa 48 to 70, Fig. 2A). This RhNUDX1 Nudix domain corresponded well to the consensus sequence except for the penultimate amino acid (aspartic acid instead of glycine; fig. 2A). Similar to AtNUDX1, no signal peptide or transit peptide to either mitochondria or chloroplasts was identified in RhNUDX1 using the TargetP (16) and SignalP (17) prediction softwares.

RhNUDX1 expression is linked to scent, both spatially and temporally

RhNUDX1 expression was analyzed in different tissues of ‘Papa Meilland’ by semiquantitative RT-PCR (Fig. 3A). No *RhNUDX1* expression was detected in young leaves and very low expression levels were found in stamens and sepals. High expression levels were observed in petals, which are the site of most scent production.

RhNUDX1 expression was then investigated in ‘Papa Meilland’ petals at different developmental stages. No *RhNUDX1* expression was detected in petals from young flower buds (Fig. 3B, stages 1 and 2) but its expression was highly induced in petals at a later flower development stage (stage 3) and remained high in fully open flowers (Fig. 3B, stage 4). In petals, accumulation and emission of scent compounds are maximum at stages 3 and 4 (11). The most abundant compounds emitted at stages 3 and 4 are monoterpene alcohols such as geraniol, citronellol, nerol and their derivatives. In contrast, at flower development stage 2, low production and emission of scent compounds are observed. It should be noted that no monoterpene alcohols are produced at this stage (11). These data together indicate that *RhNUDX1* expression in petals correlates with their capacity to produce scent compounds, especially monoterpene alcohols.

78

Western blot analysis using an anti-RhNUDX1 antibody showed that RhNUDX1 accumulated specifically at stage 4 in ‘Papa Meilland’ petals, at the predicted molecular weight of 16.8 kDa. No RhNUDX1 protein accumulation was observed in petals of the scentless rose ‘Rouge Meilland’ (Fig. 3C). The correlated expression of mRNA and protein suggests that RhNUDX1 accumulation is not translationally controlled.

Overexpression of RhNUDX1 in tobacco leaves leads to the production of geraniol and geranial

Expression data suggested that RhNUDX1 was linked to the production of some scent compounds, especially monoterpene alcohols. RhNUDX1 could play a direct role in scent production or its presence in scent producing cultivars could be a consequence of the scent biosynthetic process. To address these 2 hypotheses, we first tried to evaluate RhNUDX1 activity *in vitro*. Knowing that some proteins of the Nudix family exhibit pyrophosphatase activity, we hypothesized that RhNUDX1 could act on diphosphate intermediates of terpene biosynthesis. In order to test this hypothesis, RhNUDX1, expressed and purified from *E. coli*, was used for *in vitro* enzymatic assays. However, incubations of the recombinant protein with GPP under standard conditions did not lead to biosynthesis of terpenes *in vitro*.

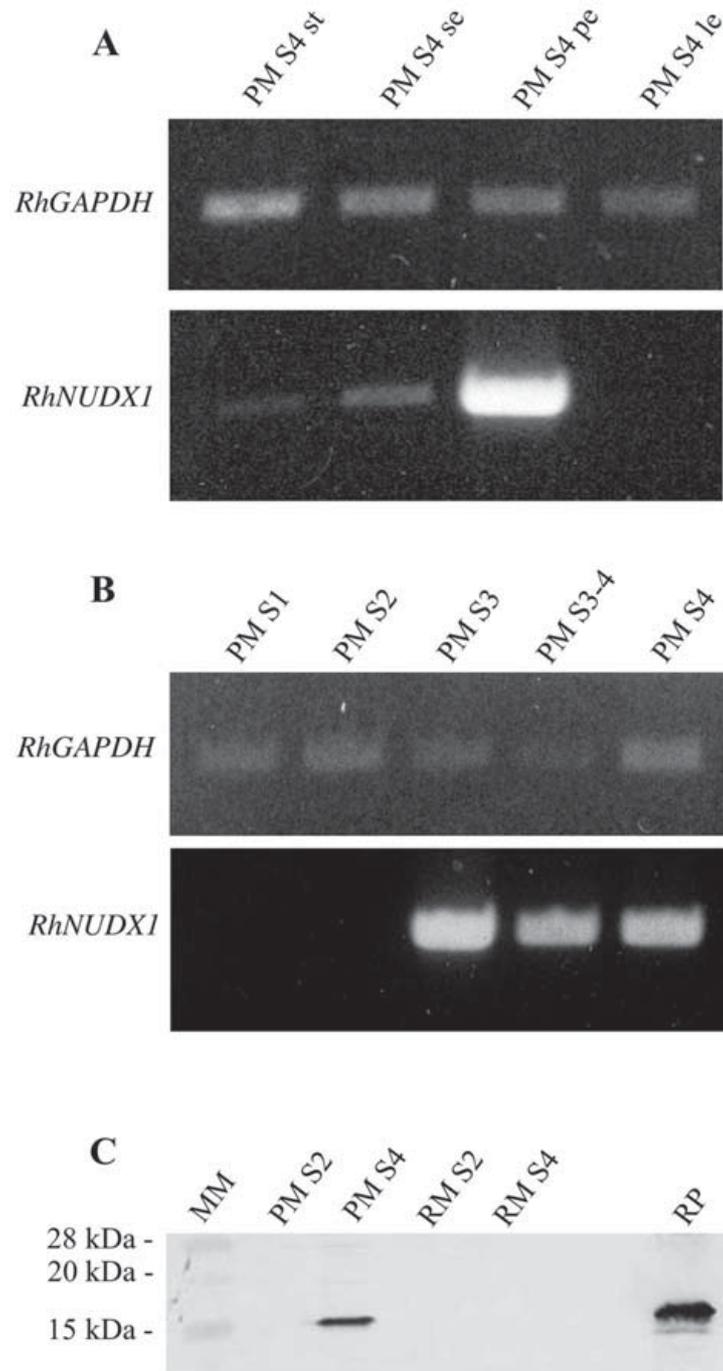


Figure 3: Analysis of *RhNUDX1* expression in *Rosa x hybrida*. *RhGAPDH* was used as a constitutive control gene for RT-PCR analyses. Flower developmental stages were defined as in (11). Emission of scent is maximal at stages 3 (S3) and 4 (S4); PM, ‘Papa Meilland’; RM, ‘Rouge Meilland’. A, Expression in young leaves and floral organs at S4, analyzed by semi quantitative RTPCR, st, stamens; se, sepals, pe, petals, le, young leaves. B, Expression in petals during development (from S1 to S4), analyzed by semi quantitative RT-PCR. C, Western blot analysis of *RhNUDX1* protein in *Rosa x hybrida* petals. MM, Molecular weight marker; RP, recombinant protein produced in *E. coli*. Each lane was loaded with 10 μ g of total proteins.

To circumvent this lack of *in vitro* activity, *Agrobacterium tumefaciens* containing *RhNUDX1* under the control of the 35S promoter was infiltrated into leaves of *Nicotiana benthamiana*. Control experiments were performed by infiltrating *Agrobacterium* expressing GFP. Western blot analysis using anti-RhNUDX1 antibody, performed 3 days following infiltration, confirmed that RhNUDX1 protein was expressed in leaves infiltrated with the RhNUDX1 construct but not in leaves infiltrated with the control construct (Fig. S3). Volatiles compounds present in infiltrated leaves, samples collected the same day were submitted to GCMS analysis after SPE extraction. Control leaves produced very small quantities of monoterpenes (0.34 μ g/g FW \pm 0.04; n=3) whereas significant amounts of geraniol and geranial were detected in *N. benthamiana* leaves expressing RhNUDX1 (17.40 μ g/g FW \pm 1.08; n=3). Taken together, these data suggest a role of RhNUDX1 in the production of the typical rose scent compounds, monoterpenes, in petals.

Rose plants with reduced *RhNUDX1* expression lack monoterpene alcohols

Finally, we generated transgenic rose plants expressing an *RhNUDX1* RNAi construct. As shown in Fig. 4, decreased expression levels of *RhNUDX1* were detected by qPCR in one transgenic plant (*RNAi-RhNUDX1-A*), therefore confirming the effectiveness of the RNAi strategy. Two other RNAi-*RhNUDX1* (lines B and C) transgenic events were generated. Although these later two lines carried the transgene, neither of them showed significant alteration in *RhNUDX1* expression (Fig. 4). Phenotypic analyses revealed that *RNAi-RhNUDX1-A* had a wild-type phenotype and no obvious morphological vegetative or floral alterations could be observed. *RNAi-RhNUDX1-B* and *C*, although not affected in *RhNUDX1* expression, also exhibited wild-type phenotypes. These data suggest that *RhNUDX1* does not play a major role in floral or vegetative development.

Solid/liquid phase extraction of volatiles from petals showed that geraniol (Fig. 5A) and more generally monoterpene (Fig. 5B) contents were much lower in the *RNAi-RhNUDX1-A* line, compared to non-transgenic roses. Rose lines *RNAi-RhNUDX1-B* and *C* did not exhibit down regulation of *RhNUDX1* expression (Fig. 4) and were not affected in geraniol and derivative biosynthesis, demonstrating that the observed down regulation of geraniol in *RNAi-RhNUDX1-A* is likely not associated with the rose transgenesis but rather with *RhNUDX1* down regulation. The compositions of the other volatile compounds were not significantly altered in the *RNAi-RhNUDX1-A* line (Fig. 5C to F), except for the sesquiterpenes, which showed higher levels of accumulation in the *RNAi-RhNUDX1-A* line than in untransformed plants (Fig. 5C). However, this is unlikely to be associated with the knockdown of *RhNUDX1*,

since a similar higher accumulation of sesquiterpenes was also observed in the other 2 independent transgenic roses (*RNAi-RhNUDX1* lines *B* and *C*) that did not exhibit down regulation of *RhNUDX1* expression (Fig. 5C). These data are another argument demonstrating the direct link between *RhNUDX1* expression and the production of monoterpenes, supporting its role in geraniol and geranial biosynthesis.

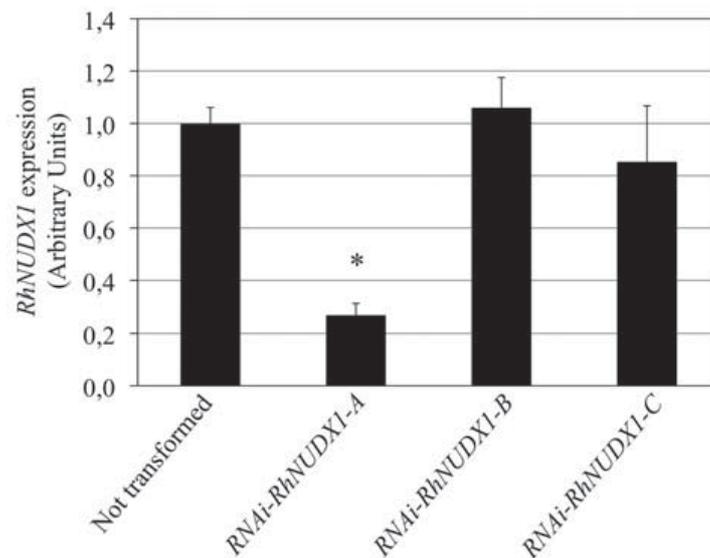


Figure 4: Real time quantitative RT-PCR analyses of *RhNUDX1* expression in petals of non transformed plants and in 3 transgenic *RNAi-RhNUDX1* lines. Standard error values are indicated by vertical bars (n=6). An asterisk indicates values that were determined by the Student's t test to be significantly different ($p < 0.01$).

Discussion

We used both a cDNA-AFLP-DD and a microarray strategy to identify genes involved in scent production in rose petals. These approaches permitted us to identify a set of genes (Table S2) whose expression was significantly up regulated in the fragrant cultivar ‘Papa Meilland’, compared to ‘Rouge Meilland’. At least some of these genes represent good candidates for involvement in scent production in rose petals. In the past few years, transcriptomic approaches have also been successfully used to identify scent-related genes in other flowers. For instance, they have led to the discovery of ODO1, the first transcription factor regulating fragrance in *Petunia* flowers (18). Guterman et al (9) were the first to use a petal microarray, combined with metabolic profiling, to identify genes involved in rose scent production, such as phenylacetaldehyde synthase (8) and OOMTs (5). Among the genes clearly highly expressed in our study, some are likely involved in processes not particularly linked to scent. This is the case for the laccase encoding gene *RhLAC*. *RhLAC* was highly expressed in petals of the scented cultivar ‘Papa Meilland’ but was also highly expressed in

the non-fragrant cultivars ‘Baccara’ and ‘Black Baccara’. In agreement with these data, *RhLAC* was previously shown to be induced in ethylene treated leaves and had been proposed to be associated with senescence and organ abscission in roses (19).

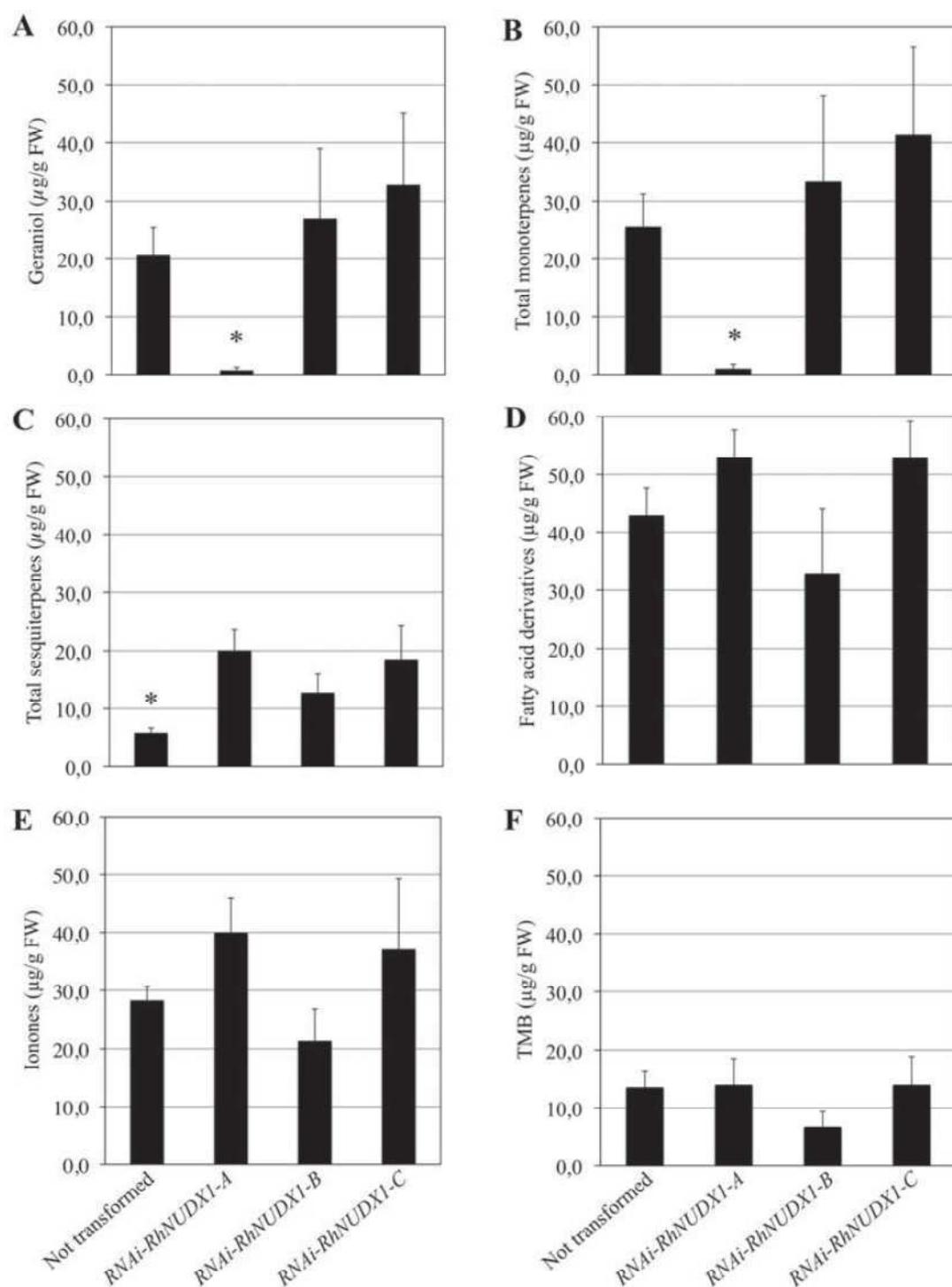


Figure 5: GCMS analyses of the petal volatile compounds in *RNAi-RhNUDX1* transgenic rose lines. A, geraniol; B, total monoterpenes; C, sesquiterpenes; D, fatty acid derivatives; E, ionones; F, 1,3,5-trimethoxybenzene (TMB). Values represent mean \pm standard error (n=6). An asterisk indicates values that were determined by the Student's t test to be significantly different ($p < 0.01$).

Interestingly, both the cDNA-AFLP-DD and the microarray approach identified *RhNUDX1*, a member of the Nudix hydrolase superfamily, as highly induced in the petals of a scented rose cultivar compared to non scented roses. *RhNUDX1* expression, evaluated in 17 rose cultivars exhibiting contrasted scent compositions, was especially high in roses producing monoterpenes, the typical rose scent molecules. Moreover, *RhNUDX1* was most highly expressed in petals, which are the main site of scent production (11). Finally, the pattern of expression of *RhNUDX1* during petal development coincided very well with the pattern of scent biosynthesis. Knockdown of *RhNUDX1* in rose and its overexpression in *N. benthamiana* leaves provide strong support for the involvement of a Nudix hydrolase in the biosynthesis of monoterpene scent compounds in rose petals, and especially geraniol and geraniol derivatives.

Pathways leading to the biosynthesis of monoterpene compounds are well documented in dozens of plants. Monoterpene synthesis generally takes place in plastids. Precursors of all the monoterpenes, Isopentenyl Diphosphate (IPP) and Dimethylallyl Diphosphate (DMAPP), are supplied by the well-studied methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway (20). These precursors are then transformed to allylic diphosphates, mostly geranyl pyrophosphate (GPP), by prenyltransferases (21). Finally, GPP is used as a substrate by various terpene synthases, for monoterpene production (22). Nudix enzymes belong to a superfamily of pyrophosphatases found in animals, plants and bacteria. They generally catalyze the hydrolysis of **nucleoside diphosphates** linked to other moieties (**X**) and contain the Nudix domain, defined by Bessman et al. (15) as G(X5)E(X7)REUXEEXXU. In plants, Nudix hydrolases are poorly characterized, although up to 29 genes have been identified in the *Arabidopsis* genome (23). Based on sequence similarities, several functional groups have been defined. It is thought that these enzymes can act as DIPPs (diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolases), coenzyme A pyrophosphatases, ADP-ribose pyrophosphatases, ApnA hydrolases and mRNA decapping enzymes (Fig. 2B). In *Arabidopsis*, few Nudix hydrolases have been linked to a specific function *in vivo*. AtNUDX7, for example, has been shown to act as negative regulator of plant defense response and has also been implicated in plant abiotic stress responses (24). Based on amino acid sequence homology, *RhNUDX1* shows the closest similarity to AtNUDX1. AtNUDX1 is a constitutively expressed cytosolic protein, first described by Dobrzanska et al. as an NADH pyrophosphatase (25). Later it was shown that under specific physiological conditions, AtNUDX1 was involved in the folate synthesis pathway, using dihydroneopterin triphosphate

as a substrate (26). In a recent study, AtNUDX1 was proposed to have a similar function to *E. coli* MutT (27). MutT acts to eliminate harmful nucleoside- and deoxynucleosidetriphosphates, such as 8-oxo-dGTP, which are known to be misincorporated in DNA during replication. To summarize, the conflicting results of the functional characterization of AtNUDX1 illustrate the difficulty faced in identifying the physiological substrates and determining the function of Nudix hydrolases *in vivo*. In *Rosa sp.* we show that RhNUDX1 is involved in the biosynthesis of monoterpenes. Although AtNUDX1 is the closest at the sequence level to RhNUDX1, considering our data and also the petal specific expression of the rose gene, it is likely that this Nudix enzyme has diverged to acquire a particular function related to monoterpene biosynthesis.

In the terpene pathway, two genes, Isopentenyl diphosphate isomerases (IDI1 and IDI2), belonging to the Nudix hydrolase superfamily, have been isolated. These IDI genes, which mediate the interconversion between IPP and DMAPP (28), have an imperfect Nudix domain, lacking several key amino acids of the catalytic site and thus may not act as true Nudix hydrolases (23). In contrast, RhNUDX1 has a complete Nudix domain with the characteristic REXXEE amino acids, suggesting that it is likely to function as a true Nudix hydrolase. Interestingly, in *Bacillus subtilis*, Withers et al (29) developed a sequence-independent method to identify terpene synthase genes and recovered a Nudix hydrolase that produced isopentenol, when provided with IPP and DMAPP. We showed that the down-regulation of *RhNUDX1* expression in *Rosa sp.* (*RNAi-RhNUDX1-A* line) correlated with down-regulation of monoterpene synthesis. Moreover, *RhNUDX1* overexpression in *N. benthamiana* leaves leads to a production of geraniol and one of its derivatives, geranial. These data strongly suggest that RhNUDX1 has a direct role in terpene production and that its high expression in fragrant rose cultivars is not a consequence of the scent production process. One possibility is that the protein is able to dephosphorylate GPP to generate geraniol. However, in basil, *Cinnamomum* and Perilla, classical geraniol synthases have been characterized (30-32). We overexpressed RhNUDX1 in *E. coli* and made enzymatic assays *in vitro* with GPP as a substrate after purification of the protein with no success. It has been shown that geraniol exists in conjugated forms, sometimes related to storage (33) so it is possible that RhNUDX1 uses conjugated forms of GPP as substrates or other allylic diphosphates. As RhNUDX1 is predicted to be a cytosolic enzyme and monoterpene synthesis usually takes place in plastids, it is possible that RhNUDX1 uses a conjugated substrate, present in the cytoplasm. Some studies, rather against the consensus view, state that in rose, the cytosolic mevalonate pathway

is implicated in the supply of allylic diphosphates for the biosynthesis of monoterpenes (33). Finally, we cannot rule out the possibility that RhNUDX1 has a less direct role in terpene synthesis, acting on a protein that would itself be responsible of the biosynthesis of geraniol and its derivatives. Further experiments are needed to identify the physiological substrate of RhNUDX1.

To summarize, we have discovered a previously un-reported function for a Nudix enzyme in the generation of the typical rose scent compounds in cultivated roses. In other species, these scent compounds are produced by classical terpene synthases. It would be interesting to see if the recruitment of a Nudix hydrolase is the result of some particular feature of the rose domestication or if this also occurred in botanical rose species and even in other species, outside of the genus *Rosa*. If this is the case, it would represent a striking example of convergent evolution in plant specialized metabolism (34).

Materials and methods

Plant material and scent analyses

Rose cultivars were cultivated outside in four locations: Université de Saint-Etienne, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon's Botanical Garden and Meilland Richardier production fields in Heyrieux, France. Transgenic roses 'Old Blush' were grown under controlled greenhouse conditions. Flower development was defined according to Bergougnoux et al. (11). Fragrance volatiles were analyzed according to Bergougnoux et al., 2007 (11).

RNA preparation and gene expression analyses

Total RNA preparation and cDNA synthesis were performed as previously described (12). cDNA-AFLP-DD and gene expression analyses were performed as described in SI materials and methods. The microarray experiment was done according to (12).

Production of RhNUDX1 in *E. coli*, antibody preparation, Western-blot Analyses and enzymatic assays

RhNUDX1 coding sequence was cloned into the bacterial expression vector pHXGWA (35). Purified RhNUDX1 was then used for the production of antibodies and for enzymatic activity assays using GPP as a substrate (detailed procedures are provided as SI Materials and methods).

Transient expression of RhNUDX1 in tobacco plants

The *RhNUDX1* coding sequence was cloned in the expression vector pMDC32 and then transformed into the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 (pMP90). These agrobacteria cultures were used to infiltrate leaves of *Nicotiana benthamiana* according to Batoko et al. (36). 72 h after infiltration, leaf sectors (about 1 g) were punched from infiltrated leaves, weighted, ground under liquid nitrogen and then suspended 20 mL of citrate/phosphate buffer (pH 4.5). 20 µL of a 1 g/L 4-nonanol solution was added as an external standard. After a 5-min centrifugation (6000 g at 4°C), the supernatant was collected and incubated overnight at 37 °C with 25 mg of AR2000 glycolytic enzyme (Gist-Brocades, Seclin, France). The released terpenes were collected on a C18 SPE column (Bond Elut Jr., Varian) and eluted with 4 mL of dichloromethane after washing with 3 x 5 mL of water. Extracts were dried in Pasteur pipettes filled with 0.5 g of anhydrous sodium sulphite and concentrated to 500 µL under a gentle nitrogen flux. Twenty microliters of a 1 g/L solution of m-cresol was added to each sample as internal control. Samples were stored at -20°C prior to GC/MS analysis.

Production of roses knockdown for RhNUDX1

A DNA fragment corresponding to part of the ORF of *RhNUDX1* (from bp 211 to bp 450) was amplified and cloned in the vector pDONR207 for Gateway cloning. It was then cloned into the vector pK7GWIWG2 (II) (37) after the CaMV 35S constitutive promoter. The resulting construct, referred to as *p35S::RNAi-RhNUDX1*, was used to transform *Rosa chinensis* cv. 'Old Blush'. Transgenic roses were produced according to Vergne et al. (38). Transgenic plants, referred to as *RNAi-RhNUDX1*, were characterized by qPCR and Southern blotting. For metabolomic analyses, several cuttings of the same transgenic event were used.

Acknowledgements

We thank N. Boyer, I. Desbouchages, P. Angelot and A. Lacroix for providing plant material. We thank G. Ingram for critical reading of the manuscript. We also thank F. Pautz (Jardin Botanique de la Ville de Lyon) and Meilland Richardier for providing rose samples. We also thank F. Gros, A. Bony for technical assistance and L. Legendre for help in the production of antibodies. This work was supported by the Région Rhône-Alpes and by INRA, France.

References

1. Ohloff G (1978) Importance of minor components in flavors and fragrance. *Perfum Flavor* 3:11-22.
2. Borda AM, Clark DG, Huber DJ, Welt BA, & Nell TA (2010) Effects of ethylene on volatile emission and fragrance in cut roses: The relationship between fragrance and vase life. *Postharvest Biol Technol* 59:245-252.
3. Joichi A, Yomogida K, Awano K-I, & Ueda Y (2005) Volatile components of teascented modern roses and ancient Chinese roses. *Flavour Fragrance J* 20:152-157.
4. Schnepf J & Dudareva N (2007) in *Annual Plant Reviews Volume 20: Flowering and its Manipulation*, ed Ainsworth C (Blackwell Publishing Ltd), pp 240-257.
5. Lavid N, *et al.* (2002) O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol* 129:1899-1907.
6. Scalliet G, *et al.* (2006) Role of petal-specific orcinol O-methyltransferases in the evolution of rose scent. *Plant Physiol* 140:18-29.
7. Scalliet G, *et al.* (2008) From the Cover: Scent evolution in Chinese roses. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5927-5932.
8. Kaminaga Y, *et al.* (2006) Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *J Biol Chem* 281:23357-23366.
9. Guterman I, *et al.* (2002) Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* 14:2325-2338.
10. Shalit M, *et al.* (2003) Volatile ester formation in roses. Identification of an acetylcoenzyme A. Geraniol/Citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiol* 131:1868-1876.
11. Bergougnoux V, *et al.* (2007) Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta* 226:853-866.
12. Dubois A, *et al.* (2011) Genomic Approach to Study Floral Development Genes in *Rosa* sp. *PLoS One* 6:e28455.
13. Götz S, *et al.* (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36:3420-3435.
14. Cherri-Martin M, Jullien F, Heizmann P, & Baudino S (2007) Fragrance heritability in Hybrid Tea roses. *Scientia Horticulturae* 113:177-181.
15. Bessman MJ, Frick DN, & O'Handley SF (1996) The MutT Proteins or "Nudix"

Hydrolases, a Family of Versatile, Widely Distributed, "Housecleaning" Enzymes. *J Biol Chem* 271:25059-25062.

16. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak Sr, & von Heijne G (2000) Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016.
17. Bendtsen J, Dyrlov, Nielsen H, von Heijne G, & Brunak S (2004) Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783-795.
18. Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, & Schuurink RC (2005) ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* 17:1612-1624.
19. Ahmadi N, Mibus H, & Serek M (2008) Isolation of an Ethylene-induced Putative Nucleotide Laccase in Miniature Roses (*Rosa hybrida* L.). *J Plant Growth Regul* 27:320-330.
20. Rodriguez-Concepcion M & Boronat A (2002) Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiol* 130:1079-1089.
21. Bouvier F, Suire C, d'Harlingue A, Backhaus RA, & Camara B (2000) Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *Plant J* 24:241-252.
22. Chen F, Tholl D, Bohlmann J, & Pichersky E (2011) The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J* 66:212-229.
23. Kraszewska E (2008) The plant Nudix hydrolase family. *Acta Biochim Pol* 55:663-671.
24. Ishikawa K, *et al.* (2009) Modulation of the Poly(ADP-ribosyl)ation Reaction via the Arabidopsis ADP-Ribose/NADH Pyrophosphohydrolase, AtNUDX7, Is Involved in the Response to Oxidative Stress. *Plant Physiol* 151:741-754.
25. Dobrzanska M, Szurmak B, Wyslouch-Cieszyńska A, & Kraszewska E (2002) Cloning and characterization of the first member of the Nudix family from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277:50482-50486.
26. Klaus SMJ, *et al.* (2005) A Nudix Enzyme Removes Pyrophosphate from Dihydroneopterin Triphosphate in the Folate Synthesis Pathway of Bacteria and Plants. *J Biol Chem* 280:5274-5280.
27. Yoshimura K, Ogawa T, Ueda Y, & Shigeoka S (2007) AtNUDX1, an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for

- eliminating oxidized nucleotides in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 48:1438-1449.
28. Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, & Pichersky E (2008) The Arabidopsis thaliana Type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases Are Targeted to Multiple Subcellular Compartments and Have Overlapping Functions in Isoprenoid Biosynthesis. *Plant Cell* 20:677-696.
 29. Withers ST, Gottlieb SS, Lieu B, Newman JD, & Keasling JD (2007) Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl Environ Microbiol* 73:6277-6283.
 30. Iijima Y, Gang DR, Fridman E, Lewinsohn E, & Pichersky E (2004) Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiol* 134:370-379.
 31. Masumoto N, Korin M, & Ito M (2010) Geraniol and linalool synthases from wild species of perilla. *Phytochemistry* 71:1068-1075.
 32. Yang T, Li J, Wang H-X, & Zeng Y (2005) A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry* 66:285-293.
 33. Dunphy PJ (2006) Location and biosynthesis of monoterpenyl fatty acyl esters in rose petals. *Phytochemistry* 67:1110-1119.
 34. Pichersky E & Lewinsohn E (2011) Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 62:549-566.
 35. Busso D, Delagoutte-Busso Bnd, & Moras D (2005) Construction of a set Gatewaybased destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 343:313-321.
 36. Batoko H, Zheng H-Q, Hawes C, & Moore I (2000) A Rab1 GTPase Is Required for Transport between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus and for Normal Golgi Movement in Plants. *Plant Cell* 12:2201-2218.
 37. Karimi M, Inzé D, & Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193-195.
 38. Vergne P, *et al.* (2010) Somatic embryogenesis and transformation of the diploid *Rosa chinensis* cv Old Blush. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100:73-81.
 39. Ogawa T, *et al.* (2008) Molecular characterization of organelle-type Nudix hydrolases in Arabidopsis. *Plant Physiol* 148:1412-1424.
 40. Gunawardana D, Likic VA, & Gayler KR (2009) A Comprehensive Bioinformatics Analysis of the Nudix Superfamily in Arabidopsis thaliana. *Comp Funct Genomics* 2009.

(1) Supplementary materials and methods

cDNA-AFLP-DD and gene expression analyses

PolyA⁺ RNA was purified starting from 100µg total RNA using the Straight[®]As mRNA system kit (Novagen) according to manufacturer instructions. cDNA-AFLP-DD was performed with the displayPROFILE™ kit (Q Biogene) according to manufacturer instructions: 1µg polyA⁺ RNA was used for double strand cDNA synthesis, the resulting cDNA were digested with the restriction enzyme TaqI, linked to adaptors and finally amplified by PCR. The amplicons were resolved on a sequencing polyacrylamide gel. Following autoradiography, candidate bands corresponding to differentially expressed products of interest were cut out from the gel. DNA was extracted from these polyacrylamide pieces by boiling 15 min in 10mM Tris pH8, 0.2mM EDTA. Purified DNA was amplified using the adaptor primers ATGAGTCCTGACGGA and ACTGGTCTCGTAGACTGCGTACCCGA, cloned into the pGEMTeasy vector (Promega) and then sequenced.

For semi-quantitative RT-PCR, single strand cDNA were prepared from 5 µg total RNA using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Amount of cDNA used for studying the expression of candidate genes was normalized using amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*RhGAPDH*). Amplification with *RhGAPDH* primers was performed for 26 cycles after assessing that this does not lead to a saturating amplification with the samples used in this study. Amount of cDNA yielding identical *RhGAPDH* amplifications were subsequently used for candidate gene amplifications. Real time quantitative RT-PCR (qPCR) was performed with the FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). Reactions were run in duplicate and quantified against a relative standard curve made from a serially diluted stock cDNA containing the target sequence. Data collection and analysis were performed using the StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems). Relative quantification of candidate genes was performed using rose orthologs of α -*TUBULIN* (*RhTUB*, Genbank accession number EC587914) and *EF1- α* (*RhEF1- α* , Genbank accession number BQ104256) as calibrators according to Vandesompele et al. (1). Geometric means of the arbitrary units of the calibrator's transcripts were used to normalize the relative amount of candidate gene transcripts. Primers specific to each cDNA were used for expression analysis by RT-PCR and qPCR.

Production of RhNUDX1 in *E. coli*, antibody preparation, Western-blot Analyses and enzymatic assays

RhNUDX1 coding sequence was cloned into the expression vector pHXGWA (2) to allow production of RhNUDX1 fused to a 6xHis-tagged thioredoxin. A thrombin protease cleavage site was inserted between the thioredoxin and RhNUDX1 coding sequences. The fusion protein was expressed in *E. coli* BL21-AI strain. After induction with 1 mM IPTG, bacteria were grown overnight at 20°C, lysed by sonication, then the fusion protein was purified by affinity chromatography on Talon® resin (Clontech). Thrombin protease (GE Healthcare life sciences) was incubated overnight at 4°C with the resin-bound fusion protein to recover RhNUDX1. One hundred micrograms of purified RhNUDX1 was subjected to SDS-Page for further purification. The band corresponding to RhNUDX1 was cut from the gel, ground in 800µl Freund's complete adjuvant and then used for immunization of a New-Zealand rabbit. Western blots were performed according to (3). Enzymatic assays were performed in a final volume of 500 µl containing 20 µg recombinant protein, buffer (100 mM phosphate, pH 5, 6 or 7, 5% glycerol, 1 mM DTT, 1mg/ml BSA) and cofactors (10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). The reaction was started by addition of 50 µM geranyl diphosphate and the mixture was overlaid with 500 µl of hexane. After an incubated period for 2 h at 30°C, the mixture was vigorously mixed and the upper hexane phase was collected, concentrated under nitrogen stream and analyzed by GC/MS. Negative controls were performed under the same conditions but using the purified product from *E. coli* without expression vector.

Principal Component Analyses (PCA)

Individual diagram of the fragrance of 10 rose cultivars, after grouping of the volatile organic compounds according to their biosynthetic classes, was obtained from a PCA performed using the R Stats program with the Ade4 package (4).

(2) Associated references

1. Vandesompele J, *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:1-12.
2. Busso D, Delagoutte-Busso Bnd, & Moras D (2005) Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 343:313-321.
3. Scalliet G, *et al.* (2006) Role of petal-specific orcinol O-methyltransferases in the evolution of rose scent. *Plant Physiol* 140:18-29.

(3) Supplementary figures and tables

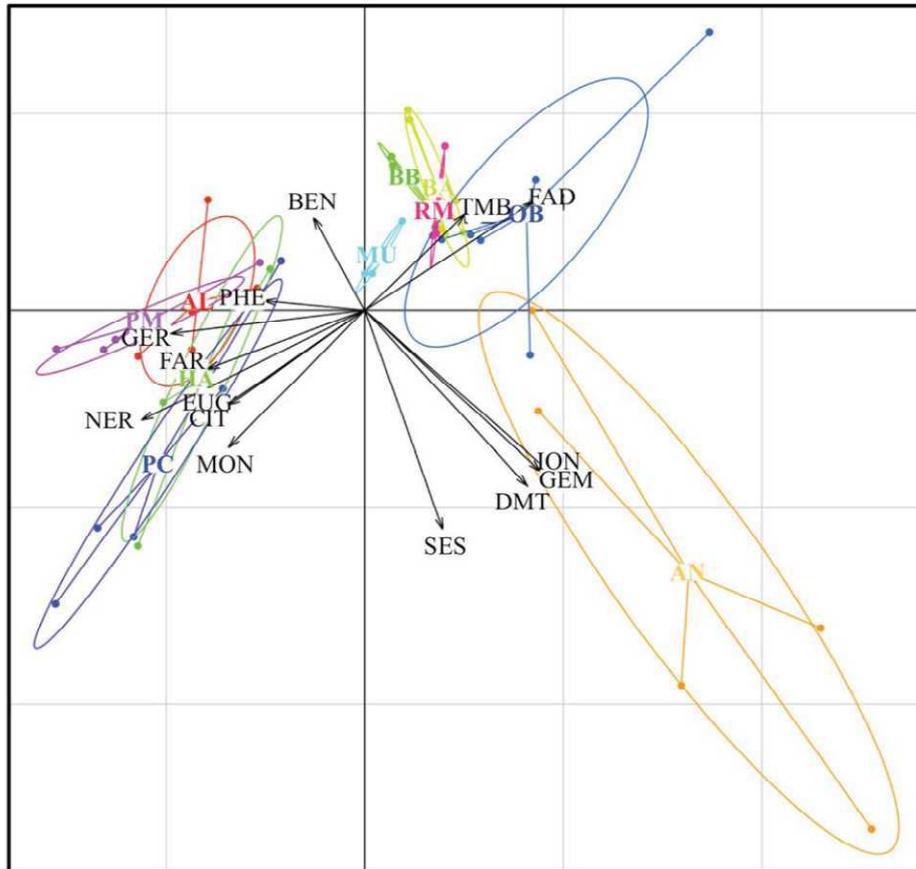


Figure S1. Principal component analysis on floral scent composition of 10 rose cultivars (AN, 'Anna'; OB, 'Old Blush'; PM, 'Papa Meilland'; RM, 'Rouge Meilland'; BA, 'Baccara'; BB, 'Black Baccara'; AL, 'Alister Stella Grey'; MU, 'Mutabilis'; PC, 'Pariser Charme'; HA, 'Hacienda'). For each cultivar, 3 to 7 replicates were sampled. Scent compounds were grouped according to their biosynthetic pathways (GER, geraniol and derivatives; CIT, citronellol and derivatives; GEM, germacrene D and derivatives; MON, other monoterpenes; SES, other sesquiterpenes; FAD, fatty acid derivatives; ION, ionones, PHE, 2-phenylethanol and derivatives; BEN, benzyl alcohol and derivatives; FAR, farnesene and derivatives; NER, nerol and derivatives; EUG, eugenol and methyleugenol). First component explains 38.3% and second component 18.7% of the total variation.

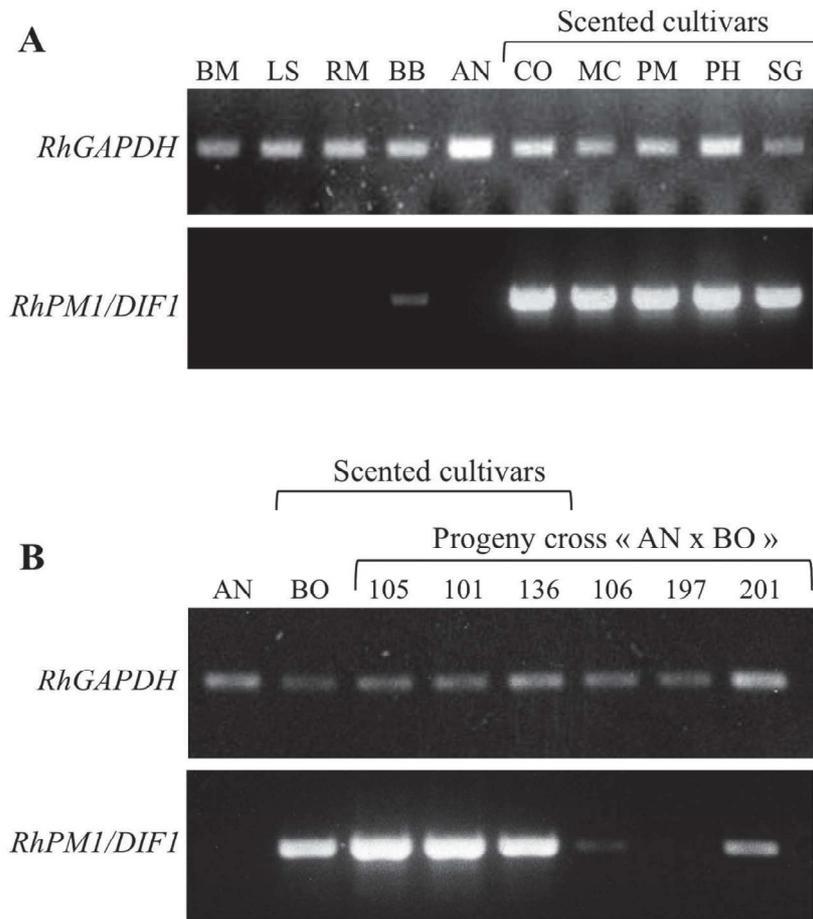


Figure S2. Semi quantitative RT-PCR analysis of PM1/DIF1 expression in petals at stage 4. *RhGAPDH* was used as a constitutive control gene. A, expression in different rose cultivars; ‘Cosmos’ (CO), ‘The Mac Cartney Rose’ (MC), ‘Papa Meilland’ (PM), ‘Rose à parfum de l’Haÿ’ (PH) and ‘Sutter gold’ (SG) cultivars emit monoterpene alcohols, whereas ‘Blanc Meilland Décor’ (BM), ‘La Sévillana’ (LS), ‘Rouge Meilland’ (RM), ‘Black Baccara’ (BB) and ‘Anna’ (AN) don’t emit monoterpene alcohols. B, Expression in the progeny of a cross between two rose cultivars, ‘Anna’ and ‘Bô’. ‘Bô’, ‘101’, ‘105’ and ‘106’ cultivars emit monoterpene alcohols, whereas ‘Anna’, ‘106’, ‘197’ and ‘201’ cultivars don’t emit monoterpenes.



Figure S3. Western blot analysis of RhNUDX1 protein in *Nicotiana benthamiana* leaves. 1 to 4, leaves infiltrated with *Agrobacterium* carrying *p35S::RhNUDX1*; 5 to 8, leaves transiently transformed with *Agrobacterium* carrying the *p35S::GFP* construct.

Compounds	Papa Meilland	Rouge Meilland	Alister Stella gray	Hacienda	Pariser Charme	Old Blush	Anna	Mutabilis	Baccara	Black Baccara
Fatty acid derivatives	1.6	53.1	0.2	2.0	2.3	24.0	9.2	7.5	33.7	34.2
Benzylalcohol and derivatives	1.2	14.1	0.6	1.0	2.5	0.1	0.6	0.3	24.6	46.8
2-phenylethanol and derivatives	12.7	0.0	80.5	47.1	0.1	0.4	0.0	0.6	3.5	4.5
3,5-dimethoxytoluene	0.6	24.3	0.1	1.6	0.0	0.1	15.8	0.6	7.1	11.7
1,2,3-trimethoxybenzene	0.2	0.6	0.0	0.0	0.0	9.7	0.0	1.1	4.3	0.0
Eugenol and methyleugenol	0.1	1.0	1.2	0.3	5.8	0.0	0.6	0.0	0.1	0.0
Geraniol and derivatives	63.4	2.0	14.2	28.6	48.1	44.4	0.1	74.4	3.4	2.8
Nerol and derivatives	6.6	0.0	1.2	3.3	15.5	0.2	0.0	3.3	0.2	0.0
Citronellol and derivatives	3.7	0.0	0.6	6.9	5.5	0.6	0.0	0.0	0.6	0.0
Other monoterpenes	0.2	0.0	0.0	1.0	3.8	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
Germacrene isomers	0.4	0.0	0.6	1.2	3.3	8.1	45.3	7.7	12.6	0.0
Farnesene and derivatives	9.2	4.1	0.5	6.1	6.0	0.1	0.0	0.8	0.5	0.0
Other sesquiterpenes	0.1	0.0	0.1	0.8	3.8	0.6	8.5	0.7	3.2	0.0
ionones	0.1	0.8	0.4	0.0	3.3	11.7	19.8	2.9	6.2	0.0
Total volatiles	324.4 +/-36.8	27.0 +/- 2.7	885.8 +/- 170.7	345.8 +/- 42.6	170.3 +/-24.9	167.2 +/- 26.6	162.2 +/- 38.7	144.7 +/- 17.1	45.7 +/- 3.8	22.8 +/- 1.8

Table S1: Major volatile compounds extracted from petals of 10 rose cultivars at fully opened flower stage and analyzed by GC-FID. Values represent relative proportion of total peak area (averages of 3 to 7 different replicates). Only compounds present in the headspace were taken into account. Total volatiles are expressed in μg per g of fresh weight +/- SE.

Clone n°	Accession number	Blast result	Microarray fold increase PM/RM	Relative expression of the candidate genes analyzed by qPCR									
				PM	RM	AL	HA	PC	OB	AN	MU	BA	BB
PM1/DIF1	CF349372	Nudix hydrolase	7583	6980.1	1.0	4734.0	17962.0	7379.0	2334.6	0.1	5663.9	0.5	87.0
PM3	EC586313	No significant homology	375	3.1	1.0	0.1	8.9	1.2	0.8	0.0	0.1	12.5	14.4
PM4	EC586128	Peptidyl-prolyl isomerase	330	1133.0	1.0	182.9	1141.9	71.5	538.8	595.8	879.0	239.2	88.3
PM5	BQ105401	UDP-glucosyltransferase	262	108.8	1.0	7.9	2.3	5.5	1.6	2.1	6.6	3.7	157.7
PM6	BI977820	Aldoketoreductase	249	1308.8	1.0	146.0	91.8	2904.1	1.7	7.7	61.7	316.2	370.5
PM9	BI978145	Metal ion binding protein	109	5.1	1.0	13.5	6.6	29.8	7.3	5.0	12.6	10.6	11.8
PM10	BQ106431	Long chain fatty alcohol oxidase	63	28.7	1.0	0.3	0.5	51.6	0.8	1.1	1.7	0.4	2.7
PM13	BQ104744	BRH1 RING finger protein	24	7.2	1.0	13.9	9.0	9.7	2.1	3.2	18.8	2.3	0.9
PM19	BI978913	No significant homology	20	3.8	1.0	24.4	3.8	9.9	71.7	0.9	78.6	2.8	0.7
PM20	BQ104568	PREG1-like negative regulator	27	2.9	1.0	5.8	43	1.2	8.6	6.1	22.6	0.0	0.0
PM29	BQ106437	Hypothetical protein <i>A. thaliana</i>	16	7.2	1.0	10.1	3.1	4.0	3.2	3.3	12.8	1.1	1.5
PM35	BQ106017	R-oxynitrile lyase isoenzyme 1	11	7.1	1.0	1.4	0.5	0.0	0.3	0.3	1.3	0.0	0.1
PM36	EC586532	Delta24-sterol-C-methyltransferase	10	6.9	1.0	2.4	2.6	7.1	1.8	2.0	9.0	0.1	0.3
PM45	BQ105260	Heat shock protein	11	4.9	1.0	0.7	2.8	0.5	0.5	1.3	2.6	0.4	0.6
PM46	BQ104892	Common plant regulatory factor	7	4.8	1.0	42.2	3.7	7.2	6.9	5.7	15.4	3.0	4.2
PM47	EC587456	Triterpene UDP-Glucosyl transferase	7	2.8	1.0	1.2	1.6	1.6	1.6	4.3	3.3	0.7	3.0
PM51	BQ104199	MYBR2 transcription factor	11	1.1	1.0	29.7	7.1	3.9	11.1	7.3	21.1	9.1	11.5
PM67	BQ105660	Cytochrome P450-like protein	8	5.1	1.0	0.8	0.6	0.2	0.1	0.7	0.3	0.4	1.3
PM84	BI977979	Auxin-responsive protein	5	1.4	1.0	4.0	5.3	1.1	7.4	2.7	35.4	0.4	2.4
PM88	BQ105775	Short-chain alcohol dehydrogenase like protein	5	3.7	1.0	0.4	4.3	2.4	0.7	1.5	1.4	0.4	0.1
DIF38/DIF111	EU603403	Putative laccase	NC	48.4	1.0	93.9	26.1	53.5	0.2	39.6	267.8	384.6	240.9

Table S2: List of 21 genes whose expression is up regulated in ‘Papa Meilland’ compared to ‘Rouge Meilland’, as revealed by microarray and cDNA-AFLP-DD analyses and expression of the 21 genes in petals of 10 different rose cultivars at fully opened flower stage, analyzed by qPCR. For microarray, fold changes represent the ratio of the mean sum intensity of two biological replicates. NC, not calculated. For qPCR analyses, values represent the relative quantity of cDNA, with expression in ‘Rouge Meilland’ stated as 1. Expression was normalized with *RhTUB* and *RhEF1- α* genes. PM, ‘Papa Meilland’; RM, ‘Rouge Meilland’; AL, ‘Alister Stella Grey’; HA, ‘Hacienda’; PC, ‘Pariser Charme’; OB, ‘Old Blush’; AN, ‘Anna’; MU, ‘Mutabilis’; BB, ‘Black Baccara’; BA, ‘Baccara’.

C) Résultats complémentaires

Afin de confirmer et de compléter les résultats publiés dans l'article précédent, une série d'expériences a été réalisée.

1) Suivi spatial et temporel de l'expression de *RhNUDX1*

Les résultats d'expression du gène *RhNUDX1* dans la rose parfumée *Rosa × hybrida* cv. 'Papa Meilland' ayant été obtenus par RT-PCR semi-quantitative, nous souhaitons les confirmer par une autre approche, la PCR quantitative (qPCR). A nouveau, une expression prépondérante de *RhNUDX1* est observée dans les pétales, et une très faible expression dans les étamines (Fig. 11). Aucune expression n'est détectée dans les feuilles, montrant que *RhNUDX1* est un gène typiquement floral. Toutefois ici, aucune expression n'a été trouvée dans les sépales contrairement aux expériences de RT-PCR semi-quantitative qui montraient une bande faible pour ce gène dans cet organe floral.

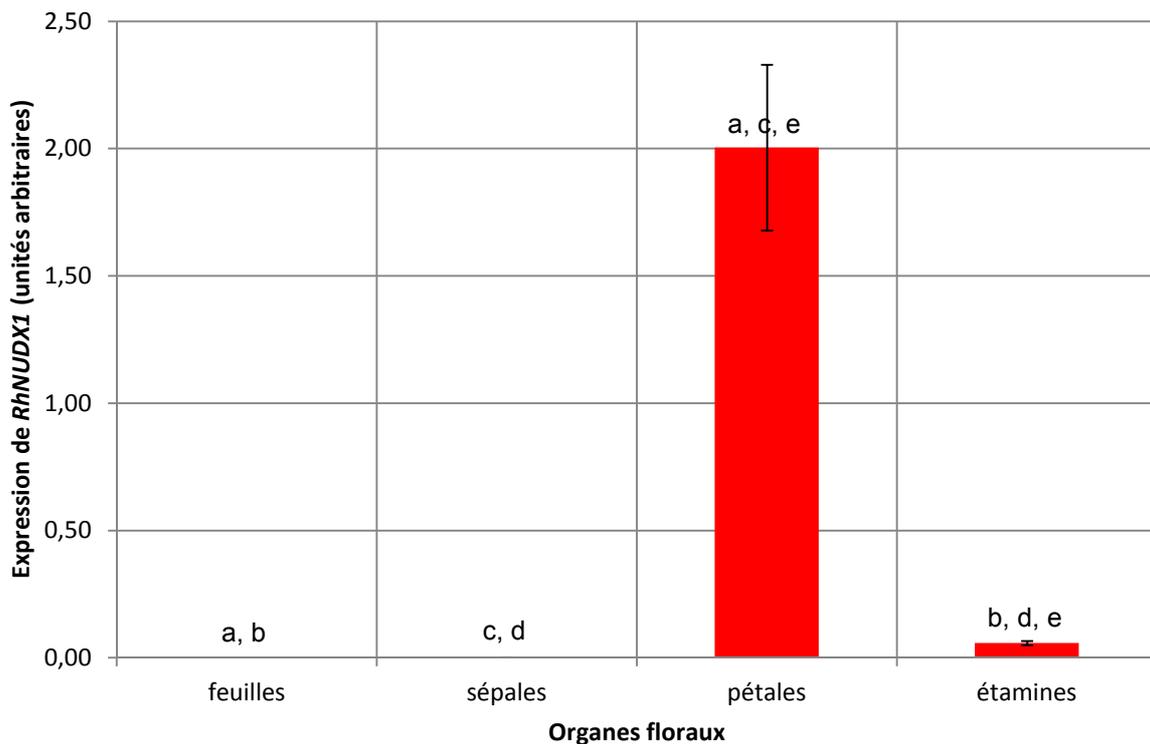


Figure 11 : Expression de *RhNUDX1* dans différents organes floraux et dans les feuilles de *Rosa × hybrida* cv. 'Papa Meilland'. Les couples de lettres au dessus des barres d'histogrammes désignent des résultats statistiquement différents ($p \leq 0,001$). Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

L'expression de *RhNUDX1* a ensuite été analysée au cours du développement floral dans les pétales (Fig. 12). Le gène ne s'exprime pas dans les boutons fermés et très peu lors des premiers stades. Son expression est très forte dans les derniers stades de l'ouverture de la fleur. Ces résultats confirment ceux de RT-PCR semi-quantitative sauf pour le stade "bouton juste ouvert" pour lequel aucune expression n'avait été détectée.

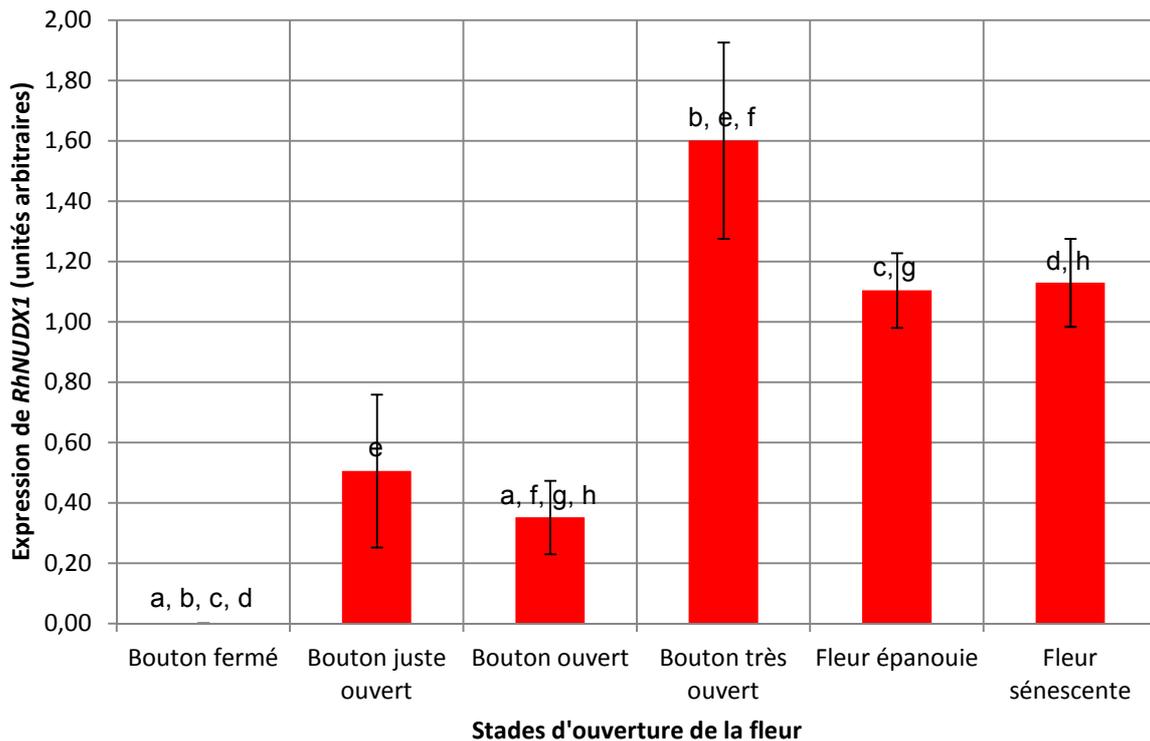


Figure 12 : Expression de *RhNUDX1* dans les pétales de *Rosa* × *hybrida* cv. 'Papa Meilland' à différents stades d'ouverture de la fleur. Les couples de lettres au dessus des barres d'histogrammes désignent des résultats statistiquement différents ($p \leq 0,05$). Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

2) Caractérisation de la lignée ARNi pour le gène *RhNUDX1*

Pour savoir si le phénotype observé sur la lignée ARN interférant (*RNAi-RhNUDX1-A*) pour le gène *RhNUDX1*, décrite dans l'article, est bien dû à l'effet de l'ARNi et pas à un effet de position de l'insertion de la construction, il a été nécessaire de déterminer le nombre d'insertions ainsi que la partie du génome dans laquelle elle(s) s'est (se sont) insérée(s). En effet, une seule lignée présentant une diminution de l'expression de *RhNUDX1* a été obtenue.

Le nombre d'insertions a été analysé par southern blot. Plusieurs tentatives ont été réalisées, toutes donnant des photographies aux bandes très peu marquées. Néanmoins, chaque piste, correspondant à la digestion de l'ADN génomique de la lignée ARNi par une enzyme de restriction différente, ne semble montrer qu'une seule bande visible alors qu'aucune bande n'est visible dans les pistes de la souche sauvage. Il ne semble donc y avoir dans le génome de la lignée transformée qu'un seul site d'insertion de la construction contenant l'ARNi interférant pour le gène *RhNUDXI*. Cependant, il n'est pas complètement exclu que plusieurs autres sites existent et que les bandes correspondantes soient trop faibles pour être détectées sur la radiographie. Ces résultats sont donc à confirmer par de nouvelles expériences.

La position du site d'insertion de la construction dans le génome a été recherchée par PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR). Le fragment obtenu possède 84% d'homologie sur 23% de sa longueur avec le gène de la protéine de transport des stérols (sterol carrier protein-2 SCP-2) d'*A. thaliana* (Edqvist *et al.*, 2004), une protéine permettant la translocation de lipides d'une membrane à une autre et importante pour le bon développement de la graine et de la plantule (Zheng *et al.*, 2008). Il est donc vraisemblable que la position de l'unique insertion n'ait pas d'incidence sur les voies de synthèse du parfum puisque le gène *SCP-2* n'a jamais été démontré comme étant impliqué dans la production et l'émission de composés odorants. L'effet observé sur la synthèse des monoterpènes dans cette lignée ARNi *RNAi-RhNUDXI-A* semble donc dû à la diminution de l'expression du gène *RhNUDXI*.

3) Greffage d'une souche sauvage sur la lignée ARNi pour le gène *RhNUDXI*

Pour démontrer que le phénotype observé sur la lignée ARNi interférant *RNAi-RhNUDXI-A* pour le gène *RhNUDXI* est bien dû à l'ARNi et non pas à un effet de position de l'insertion de la construction, des expériences de greffage d'une souche sauvage sur un porte-greffe issu de la lignée ARNi ont été réalisées. En effet, l'ARNi pourrait être transféré du porte-greffe au greffon et éteindre le gène endogène correspondant dans le scion sauvage (Kasai *et al.*, 2011). Ceci démontrerait que la diminution de l'expression de *RhNUDXI* et de la synthèse des monoterpènes dans les pétales du greffon n'est pas due à un effet de position de l'insertion de la construction, mais bien à l'effet de l'ARN interférant circulant depuis le porte greffe jusqu'au scion où il irait éteindre son gène cible, *RhNUDXI*.

Les résultats sont en cours d'acquisition.

D) Conclusion

Deux approches de transcriptomique comparative, cDNA AFLP display et puce à ADN, ont permis d'aboutir à l'identification d'un nouveau gène dont l'expression est plus forte dans les pétales d'une rose parfumée que dans les pétales d'une rose non parfumée.

Le gène nouvellement identifié dans cette étude, nommé *RhNUDX1*, est fortement exprimé dans les roses émettant des monoterpènes et très peu exprimé dans les fleurs ne produisant pas ce type de composés. Son expression est maximale dans les pétales au moment où l'émission est elle aussi maximale. De plus, cette expression coségrège avec ce caractère dans la descendance issue d'un croisement entre une rose synthétisant des monoterpènes et une rose n'en synthétisant pas. La protéine correspondante, *RhNUDX1*, apparaît donc impliquée dans cette voie de synthèse, ce que confirme l'extinction partielle d'expression de son gène par interférence d'ARN, même si cette extinction n'a été observée que dans une seule lignée transgénique.

II) Caractérisation des allèles de la phénylacétaldéhyde synthase PAAS

A) Introduction

Le 2-phényléthanol est une molécule importante pour le parfum de la rose. En effet, elle participe à l'odeur typique d'une rose au même titre que le géranol et est le composé majoritaire dans le parfum de certains cultivars tels que *R. × hybrida* cv. 'Alister Stella Gray'. Le 2-phényléthanol est synthétisé en deux étapes à partir de la L-phénylalanine. La première est une décarboxylation oxydative par la phénylacétaldéhyde synthase *RhPAAS*, suivie d'une réduction par la phénylacétaldéhyde réductase rose-PAR (voir introduction, p. 55 ; Kaminaga *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2009b).

Au laboratoire, trois allèles du gène *RhPAAS* ont été précédemment mis en évidence dans une population hybride de rosiers (Machenaud, 2010). Cette population, nommée Hw, est issue d'un croisement de deux cultivars : *R. × wichuraiana* (hybride du rosier sauvage *R. wichuraiana*) et *R. × hybrida* cv. 'H190' (Crespel *et al.*, 2002), dont seul le premier émet du 2-phényléthanol. Elle a permis de réaliser une carte génétique à partir de marqueurs AFLP (Crespel *et al.*, 2002) et microsatellites SSR (Hibrand-Saint Oyant *et al.*, 2008). Cette carte

concerne des caractères tels que le port de la remontée et l'époque de floraison, la duplication des pétales et la densité en épines des tiges. Cette population a aussi permis de révéler un QTL majeur pour le 2-phényléthanol sur le groupe de liaison B7 et le gène *RhPAAS* est présent sur un *locus* voisin à ce QTL toujours dans ce même groupe (Machenaud, 2010 ; collaboration INRA Angers). Suite à ce résultat, trois allèles du gène *RhPAAS* ont été mis en évidence dans la population Hw. Une caractérisation partielle a montré que le jeu de combinaison de ces allèles pourrait être responsable du phénotype observé chez les parents et chez les descendants (Machenaud, 2010).

Cette partie complète donc le travail de thèse de Jana Machenaud. Les cadres de lectures des trois allèles ont été complètement séquencés. Leurs expressions respectives ont été analysées dans la population Hw. Ils ont été surexprimés en systèmes hétérologues (levures, tabac) et homologue (rosiers) afin d'étudier la fonctionnalité des différentes isoformes.

B) Identification de trois allèles de PAAS

100

Les séquences des allèles *a1*, *a2* et *a3* obtenues précédemment (Machenaud, 2010) n'étaient pas complètes. Notamment, le cadre de lecture de l'allèle *a2* n'était pas complet, n'ayant ni le codon d'initiation, ni le codon de terminaison de la traduction, et posant ainsi un problème pour la production d'une isoforme fonctionnelle. Plusieurs approches ont été tentées afin de combler les lacunes dans les parties 3'- et 5'-UTR des allèles. La PCR inverse et la marche chromosomique n'ayant donné aucun résultat, nous avons amplifié les allèles par une PCR classique en prenant pour amorces les 22 premiers nucléotides de la séquence de *RhPAAS* obtenue par Kaminaga *et al.* (2006) et deux amorces inverses dans la partie 3'-UTR de celle-ci. Les séquences complètes obtenues sont données dans la figure 13.

		1	50
RhPAAS	(1)	ATCGATCTGTCTTTCTAGCCTTTATTGATCATCTGTTGTATCACCTAGCT	
a1	(1)	-TCGATCTGTCTTTCTAGCCTTTATTGATCATCTGTTGTATCACCTAGCT	
a2	(1)	-TCGATCTGTCTTTCTAGCCTTTATTGATCATCTGTTGTATCACCTAGCT	
a3	(1)	-TCGATCTGTCTTTCTAGCCTTTATTGATCATCTGTTGTATCACCTAGCT	
RhAADC	(0)	-----	
		51	100
RhPAAS	(51)	GTGTTCAACTAATTCACTTCCAATCTAAATGGGTAGCTTCCGATTCCACA	
a1	(50)	GTGTTCAACTAATTCACTTCCAATCTAAATGGGTAGCTTCCGATTCCACA	
a2	(50)	GTGTTCAACTAATTCACTTCCAATCTAAATGGGTAGCTTCCGATTCCACA	
a3	(50)	GTGTTCAACTAATTCACTTCCAATCTAAATGGGTAGCTTCCGATTCCACA	
RhAADC	(1)	-----ATGGGTAGCTTCCGATTCCACA	
		101	150

RhPAAS (101) GGGATCTACAAGAGATCGCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCCC
a1 (100) GGGATCTACAAGAGATCGCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCCC
a2 (100) GGGATCTACAAGAGATCGCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCCC
a3 (100) GGGATCTACAAGAGATCGCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCCC
RhAADC (23) GGGATCTACAAGAGATCGCTCTTCCCAACTGACCAAAGCCCTAGACCCC
151 200

RhPAAS (151) GAAGAGTTCAGGAAACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTA
a1 (150) GAAGAGTTCAGGAAACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTA
a2 (150) GAAGAGTTCAGGAAACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTA
a3 (150) GAAGAGTTCAGGAAACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTA
RhAADC (73) GAAGAGTTCAGGAAACAAGGCCATATGGTCATAAACTTCATTGCAGATTA
201 250

RhPAAS (201) CTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCCTAAGCCGAGTTGAACCAAGGT
a1 (200) CTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCCTAAGCCGAGTTGAACCAAGGT
a2 (200) CTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCCTAAGCCGAGTTGAACCAAGGT
a3 (200) CTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCCTAAGCCGAGTTGAACCAAGGT
RhAADC (123) CTATCAAAACATAGAGAAATATCCAGTTCCTAAGCCGAGTTGAACCAAGGT
251 300

RhPAAS (251) ATTTGAAAAAATGCCTACCAGTGTGAGCCCATATGACCCCTGAACCCATC
a1 (250) ATTTGAAAAAATGCCTACCAGAGTCAGCCCATATGACCCCTGAACCCATC
a2 (250) ATTTGAAAAAATGCCTACCAGAGTCAGCCCATATGACCCCTGAACCCATC
a3 (250) ATTTGAAAAAATGCCTACCAGAGTCAGCCCATATGACCCCTGAACCCATC
RhAADC (173) ATTTGAAAAAATGCCTACCAGAGTCAGCCCATATGACCCCTGAACCCATC
301 350

RhPAAS (301) TCAACCATCCTTAGAGATGTTTCAGATCACATTGTTCTTGGCCTAACACA
a1 (300) TCAACCATCCTTAGAGATGTTTCAGATCACATTGTTCTTGGCCTAACACA
a2 (300) TCAACCATCCTTAGAGATGTTTCAGATCACATTGTTCTTGGCCTAACACA
a3 (300) TCAACCATCCTTAGAGATGTTTCAGATCACATTGTTCTTGGCCTAACACA
RhAADC (223) TCAACCATCCTTAGAGATGTTTCAGATCACATTGTTCTTGGCCTAACACA
351 400

RhPAAS (351) TTGGCAAAGTCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTG
a1 (350) TTGGCAAAGTCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTG
a2 (350) TTGGCAAAGTCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTG
a3 (350) TTGGCAAAGTCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTG
RhAADC (273) TTGGCAAAGTCCAATTTCTTTGCATACTTCTCTTCAACTGCTAGCACTG
401 450

RhPAAS (401) CTGGATTTCTCGGTGAAATACTCACCCTGGATTTAATGTGGTGGGCTTC
a1 (400) CTGGATTTCTCGGTGAAATACTCACCCTGGATTTAATGTGGTGGGCTTC
a2 (400) CTGGATTTCTCGGTGAAATACTCACCCTGGATTTAATGTGGTGGGCTTC
a3 (400) CTGGATTTCTCGGTGAAATACTCACCCTGGATTTAATGTGGTGGGCTTC
RhAADC (323) CTGGATTTCTCGGTGAAATACTCACCCTGGATTTAATGTGGTGGGCTTC
451 500

RhPAAS (451) AACTGGGTTTTCATCACCAGCAGCAACCGAGCTCGAAAAATAGTCATGGA
a1 (450) AACTGGGTTTTCATCACCAGCAGCAACCGAGCTCGAAAAATAGTCATGGA
a2 (450) AACTGGGTTTTCATCACCAGCAGCAACCGAGCTCGAAAAATAGTCATGGA
a3 (450) AACTGGGTTTTCATCACCAGCAGCAACCGAGCTCGAAAAATAGTCATGGA
RhAADC (373) AACTGGGTTTTCATCACCAGCAGCAACCGAGCTCGAAAAATAGTCATGGA
501 550

RhPAAS (501) TTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTTCTCTGGCA
a1 (500) TTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTTCTCTGGCA
a2 (500) TTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTTCTCTGGCA
a3 (500) TTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTTCTCTGGCA
RhAADC (423) TTGGTTGGGAGACATGCTTCAGCTTCCCAAGTCTTTCCATTTCTCTGGCA
551 600

RhPAAS (551) ATGGCGGCGGTGTTTTGCATGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTTGACA
a1 (550) ATGGCGGCGGTGTTTTGCATGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTTGACA
a2 (550) ATGGCGGCGGTGTTTTGCATGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTTGACA
a3 (550) ATGGCGGCGGTGTTTTGCATGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTTGACA
RhAADC (473) ATGGCGGCGGTGTTTTGCATGGGAGTACTTGTGAGGCCATTGTTTGACA
601 650

RhPAAS (601) ATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACCCGAATTGGTAGCGAGAATTT

a1	(600)	ATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACTCCGAATTGGCAGAGAGAATTT
a2	(600)	ATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACCCGAATTGGTAGAGAGAATTT
a3	(600)	ATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACCCGAATTGGTAGAGAGAATTT
RhAADC	(523)	ATGGTGGCTGCCAGGGACCAAATGCTACCCGAATTGGTAGAGAGAATTT
		651 700
RhPAAS	(651)	GGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTTCAGACCAAACACATAGCACACTTCAAA
a1	(650)	GGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTTCAGACCAAACACATAGCACACTTCAAA
a2	(650)	GGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTTCAGACCAAACACATAGCACACTTCAAA
a3	(650)	GGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTTCAGATCAAACACATAGCACACTTCAAA
RhAADC	(573)	GGGAAAGCTTGTAGTGTATGGTTTCAGACCAAACACATAGCACACTTCAAA
		701 750
RhPAAS	(701)	AAGCTACCCAAATTGTTGGAATCAACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAG
a1	(700)	AGGCTACCCAAATTGTTGGAATCAACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAG
a2	(700)	AGGCTACCCAAATTGTTGGAATCAACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAG
a3	(700)	AAGCTACCCAAATTGTTGGAATCAACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAG
RhAADC	(623)	AAGCTACCCAAATTGTTGGAATCAACACGGAGAACTTCCGGGCCATCAAG
		751 800
RhPAAS	(751)	ACTACAAAGTCAACTGGTTTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGAC
a1	(750)	ACTACAAAGTCAACTGGTTTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGAC
a2	(750)	ACTACAAAGTCAACTGGTTTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGAC
a3	(750)	ACTACAAAGTCAACTGGTTTTGCACTACTACCTGAGATGCTAAGATTGAC
RhAADC	(673)	ACTACAAAGTCAACTGGTTTTGCACTATCACCTGAGATGCTAAGATTGAC
		801 850
RhPAAS	(801)	AATAAGTTCGGACCTGGAAAAAGGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCA
a1	(800)	AATAAGTTCGGACTTGGAAAAAGGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCA
a2	(800)	AATAAGTTCGGACTTGGAAAAAGGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCA
a3	(800)	AATAAGTTCGGACCTGGAAAAAGGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCA
RhAADC	(723)	AATAAGTTCGGACCTGGAAAAAGGTCTAGTGCCGCTCTTTCTTTGTGCCA
		851 900
RhPAAS	(851)	CAATTGGCACAACC GCCACCCTGCTATTGATCCATTGGAGGCCTATGT
a1	(850)	CAATGGCACAACC GCCACCCTGCTATTGATCCATTGGAGGCCTATGT
a2	(850)	CAATGGCACAACC GCCACCCTGCTATTGATCCATTGGAGGCCTATGT
a3	(850)	CAATGGCACAACC GCCACCCTGCTATTGATCCATTGGAGGCCTATGT
RhAADC	(773)	CAATTGGCACAACC GCCACCCTGCTATTGATCCATTGGAGGCCTATGT
		901 950
RhPAAS	(901)	CATGTAGCAAAAAGAATACCGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGC
a1	(900)	CATGTAGCAAAAAGAATACCGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGC
a2	(900)	CATGTAGCAAAAAGAATACCGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGC
a3	(900)	CATGTAGCAAAAAGAATACAGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGC
RhAADC	(823)	CATGTAGCAAAAAGAATACCGCGTGTGGGTTTCATGTGGATGCTGCATATGC
		951 1000
RhPAAS	(951)	TGGAAGTGCCTGCATTTGTCCAGAATTTCCGCATTTTCATTAACGGCGTAG
a1	(950)	TGGAAGTGCCTGCATTTGTCCAGAATTTCCGCATTTTCATTAACGGCGTAG
a2	(950)	TGGAAGTGCCTGCATTTGTCCAGAATTTCCGCATTTTCATTAACGGCGTAG
a3	(950)	TGGAAGTGCCTGCATTTGTCCAGAATTTCCGCATTTTCATTAACGGCGTAG
RhAADC	(873)	TGGAAGTGCCTGCATTTGTCCAGAATTTCCGCATTTTCATTAACGGCGTAG
		1001 1050
RhPAAS	(1001)	AGGGCGCAAATTCCTTTAGTTTTCAACCCCCATAAGTGGTTATTCCTGGA
a1	(1000)	AGGGCGCAAATTCCTTTAGTTTTCAACCCCCATAAGTGGTTATTCCTGGA
a2	(1000)	AGGGCGCAAATTCCTTTAGTTTTCAACCCCCATAAGTGGTTATTCCTGGA
a3	(1000)	AGGGCGCAAATTCCTTTAGTTTTCAACCCCCATAAGTGGTTATTCCTGGA
RhAADC	(923)	AGGGCGCAAATTCCTTTAGTTTTCAACCCCCATAAGTGGTTATTCCTGGA
		1051 1100
RhPAAS	(1051)	ATGGATTGCTGTTGCCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTTGGCAAGTTC
a1	(1050)	ATGGATTGCTGTTGCCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTTGGCAAGTTC
a2	(1050)	ATGGATTGCTGTTGCCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTTAGCAAGTTC
a3	(1050)	ATGGATTGCTGTTGCCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTTGGCAAGTTC
RhAADC	(973)	ATGGATTGCTGTTGCCTTTGGGTTAAGAATCCAAGTGTGTTGGCAAGTTC
		1101 1150
RhPAAS	(1101)	ACTGTCGACGAATCCGGAGTTTTTGGAGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGC
a1	(1100)	ACTGTCGACGAATCCGGAGTTTTTGGAGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGC

a2	(1100)	ACTGTTCGACGAATCCGGAGTTTTTTGAGGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGC
a3	(1100)	ACTGTTCGACGAATCCGGAGTTTTTTGAGGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGC
RhAADC	(1023)	ACTGTTCGACGAATCCGGAGTTTTTTGAGGAACAAAGCCAGTGATTCAAAGC
		1151 1200
RhPAAS	(1151)	AAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGGAGGTTTCGGC
a1	(1150)	AAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGGAGGTTTCGGC
a2	(1150)	AAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGGAGGTTTCGGC
a3	(1150)	AAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGGAGGTTTCGGC
RhAADC	(1073)	AAGTTGTGGACTACAAAGATTGGCAAATAGCCCTAAGCCGGAGGTTTCGGC
		1201 1250
RhPAAS	(1201)	GCATTGAAGCTGTGGCTTGTGCCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAG
a1	(1200)	TCATTGAAGCTGTGGCTTGTGCCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAG
a2	(1200)	GCATTGAAGCTGTGGCTTGTGCCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAG
a3	(1200)	GCATTGAAGCTGTGGCTTGTGCCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAG
RhAADC	(1123)	GCATTGAAGCTGTGGCTTGTGCCTAAGAAGCTATGGTGTGGCTAACCTTAG
		1251 1300
RhPAAS	(1251)	AAACTTTATTTCGTATCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGGGCTTG
a1	(1250)	AAACTTTATTTCGTATCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGGGCTTG
a2	(1250)	AAACTTTATTTCGTATCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGGGCTTG
a3	(1250)	AAACTTTATTTCGTATCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGGGCTTG
RhAADC	(1173)	AAACTTTATTTCGTATCCATGTCAAATGGCCAAGACTTTTGAAGGGCTTG
		1301 1350
RhPAAS	(1301)	TGAGAATGGACAAGAGGTTTGGAGATTCTGGTGCCTAGAAACTTCTCCTTG
a1	(1300)	TGAGAATGGACAAGAGGTTTGGAGATTCTGGTGCCTAGAAACTTCTCCTTG
a2	(1300)	TGAGAATGGACAAGAGGTTTGGAGATTCTGGTGCCTAGAAACTTCTCCTTG
a3	(1300)	TGAGAATGGACAAGAGGTTTGGAGATTCTGGTGCCTAGAAACTTCTCCTTG
RhAADC	(1223)	TGAGAATGGACAAGAGGTTTGGAGATTCTGGTGCCTAGAAACTTCTCCTTG
		1351 1400
RhPAAS	(1351)	GTCTGCTTTAGAATTTACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGA
a1	(1350)	GTCTGCTTTCAGAATTTACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGA
a2	(1350)	GTCTGCTTTAGAATTTACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGA
a3	(1350)	GTCTGCTTTAGAATTTACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGA
RhAADC	(1273)	GTCTGCTTTAGAATTTACCATCGGCCTTGATCAGTAGTAATGAGGATGA
		1401 1450
RhPAAS	(1401)	TGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATGCTGGAGGCCATCA
a1	(1400)	TGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATGCTGGAGGCCATCA
a2	(1400)	TGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATGCTGGAGGCCATCA
a3	(1400)	TGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATGCTGGAGGCCATCA
RhAADC	(1323)	TGAGATCGGTATGGTAAACGAGGTCAATTGCAAATGCTGGAGGCCATCA
		1451 1500
RhPAAS	(1451)	ATGCATCAGGTAAAGCATAACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTAC
a1	(1450)	ATGCATCAGGTAAAGCATAACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTAC
a2	(1450)	ATGCATCAGGTAAAGCATAACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTAC
a3	(1450)	ATGCATCAGGTAAAGCATAACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTAC
RhAADC	(1373)	ATGCATCAGGTAAAGCATAACATGACTCATGCTGTGGTTGGAGGGCTGTAC
		1501 1550
RhPAAS	(1501)	GTGCTTCGTTGCGCGGTTGGTGCCTACTCTGACCAGAGGAAAAGCACATAGT
a1	(1500)	GTGCTTCGTTGCGCGGTTGGTGCCTACTCTGACCAGAGGAAAAGCACATAGT
a2	(1500)	GTGCTTCGTTGCGCGGTTGGTGCCTACTCTGACTGAGGAAAAGCACATAGT
a3	(1500)	GTGCTTCGTTGCGCGGTTGGTGCCTACTCTGACCAGAGGAAAAGCACATAGT
RhAADC	(1423)	GTGCTTCGTTGCGCGGTTGGTGCCTACTCTGACCAGAGGAAAAGCACATAGT
		1551 1600
RhPAAS	(1551)	CGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGT
a1	(1550)	CGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGT
a2	(1550)	CGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGT
a3	(1550)	CGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGT
RhAADC	(1473)	CGAGGCTTGGAAATGTGGTGCAGGACCATGCACAAGCCATCCTCAGCACGT
		1601 1650
RhPAAS	(1601)	ATTGATAATAAGTAAAACACTACTTGTACTACGTACCATGAAAATAAAGAAT
a1	(1600)	ATTGATAATAAGTAAAACACTACTTGTACTACGTACCATGAAAATAAAGAAT
a2	(1600)	ATTGATAATAAGTAAAACACTACTTGTACTACGTACCATGAAAATAAAGAAT

a3	(1600)	ATTGATAATAAGTAAACTACTTGTACTACGTACCGTGGAAATAAAGAAT
RhAADC	(1523)	ATTGA-----
		1651 1700
RhPAAS	(1651)	ATCTGTGTGTGGTAATAGTCGAAACAGTTAGTTTCGGTTTGGAAATGCTTC
a1	(1650)	ATCTGTGTGTGGTAATAGTCGAAAATGCTTCAATCTCTGTGCTGG-----
a2	(1639)	-----
a3	(1650)	ATCTGTGTGTGGTAATAGTCGAAACAGTTAGTTTCGGTTTGGAAATGCTTC
RhAADC	(1527)	-----
		1701 1750
RhPAAS	(1701)	AATCTCTGTGCTGGTTATTGGATTAATAATATATCCACGGTCTGAATTGA
a1	(1695)	-----
a2	(1639)	-----
a3	(1713)	AATCTCTGTGCTGG-----
RhAADC	(1527)	-----
		1751 1775
RhPAAS	(1751)	ATATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
a1	(1695)	-----
a2	(1639)	-----
a3	(1713)	-----
RhAADC	(1527)	-----

Figure 13 : Séquences nucléotidiques des différentes versions de *RhPAAS*. a1, a2 et a3 : résultats de séquençage obtenus au cours de cette étude pour ces trois mêmes allèles. RhPAAS : séquence de *PAAS* obtenue par Kaminaga *et al.* (2006) chez le rosier (DQ192639). RhAADC : séquence de *PAAS* obtenue par Sakai *et al.* (2007) chez le rosier (AB305071). Surlignées en rouge apparaissent les amorces utilisées au cours de cette étude, en violet le codon initiateur et en vert le codon de terminaison.

Vingt-trois polymorphismes ont pu être observés entre les trois allèles de la population Hw (Fig. 13). *a3* est l'allèle le plus divergent avec 14 nucléotides de différence par rapport aux deux autres allèles (*a1* et *a2* ne différant que de 5 et 4 nucléotides respectivement). Ces séquences sont très proches de celle obtenue par Kaminaga *et al.* (2006), seulement 2 polymorphismes sont propres à *RhPAAS*. En outre, la séquence de *RhPAAS* ne diffère que d'un seul nucléotide par rapport à celle de *RhAADC* (Sakai *et al.*, 2007). La séquence obtenue ici pour *a2* contient le codon initiateur et le codon stop mais sa partie 3'-terminale n'a pas pu être complétée aussi loin que pour les allèles *a1* et *a3*. Il est à noter qu'une partie du 3'-UTR de *RhPAAS* et *a3* est manquante chez *a1*, la séquence de la région 3'-UTR de cette dernière ne contient en effet pas 19 paires de bases que l'on retrouve chez *RhPAAS* et *a3*.

Les séquences peptidiques déduites de ces séquences nucléotides font 501 acides aminés. Les séquences complètes sont données sur la figure 14. Les allèles diffèrent entre eux par huit acides aminés, dont deux sont propres à *a1*, un à *a2* et cinq à *a3* (Fig. 14). Encore une fois, la divergence de *a3* par rapport aux deux autres isoformes se reflète dans la séquence de l'enzyme. Ici, *RhPAAS*, l'enzyme caractérisée par Kaminaga *et al.* (2006) ne diffère des allèles que par deux acides aminés qui lui sont propres et est identique à *RhAADC*.

		1	50
RhPAAS	(1)	MGSF P FHRDLQEIASSQLTKALDPEEFRKQGHMVNFIADYYQNI E KYPV	
a1	(1)	MGSF P FHRDLQEIASSQLTKALDPEEFRKQGHMVNFIADYYQNI E KYPV	
a2	(1)	MGSF R FHRDLQEIASSQLTKALDPEEFRKQGHMVNFIADYYQNI E KYPV	
a3	(1)	MGSF P FHRDLQEIASSQLTKALDPEEFRKQGHMVNFIADYYQNI E KYPV	
RhAADC	(1)	MGSF P FHRDLQEIASSQLTKALDPEEFRKQGHMVNFIADYYQNI E KYPV	
		51	100
RhPAAS	(51)	LSRVEPGYLKKCL P V S APYDPEPISTILRDV Q NHIVPGLTHWQSPNFFAY	
a1	(51)	LSRVEPGYLKKCL P E SAPYDPEPISTILRDV Q DHIVPGLTHWQSPNFFAY	
a2	(51)	LSRVEPGYLKKCL P E SAPYDPEPISTILRDV Q DHIVPGLTHWQSPNFFAY	
a3	(51)	LSRVEPGYLKKCL P E SAPYDPEPISTILRDV Q NHIVPGLTHWQSPNFFAY	
RhAADC	(51)	LSRVEPGYLKKCL P V S APYDPEPISTILRDV Q NHIVPGLTHWQSPNFFAY	
		101	150
RhPAAS	(101)	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWVSSPAATELENI V MDWLGDML Q LP	
a1	(101)	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWVSSPAATELENI V MDWLGDML Q LP	
a2	(101)	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWVSSPAATELENI V MDWLGDML Q LP	
a3	(101)	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWVSSPAATELENI V MDWLGDML Q LP	
RhAADC	(101)	FSSTASTAGFLGEILTTGFNVVGFNWVSSPAATELENI V MDWLGDML Q LP	
		151	200
RhPAAS	(151)	KSFHFSGNGGGV L HGSTCEAI V CTMVAARDQML R RIG S ENLGKLVVYGSD	
a1	(151)	KSFHFSGNGGGV L HGSTCEAI V CTMVAARDQML L RIG R ENLGKLVVYGSD	
a2	(151)	KSFHFSGNGGGV L HGSTCEAI V CTMVAARDQML R RIG R ENLGKLVVYGSD	
a3	(151)	KSFHFSGNGGGV L HGSTCEAI V CTMVAARDQML R RIG S ENLGKLVVYGSD	
RhAADC	(151)	KSFHFSGNGGGV L HGSTCEAI V CTMVAARDQML R RIG S ENLGKLVVYGSD	
		201	250
RhPAAS	(201)	QTHSTLQKATQ I VGINTENFRAIKTTKSTGFAL S PEMLRLTISSDLEKGL	
a1	(201)	QTHSTLQKATQ I VGINTENFRAIKTTKSTGFAL S PEMLRLTISSDLEKGL	
a2	(201)	QTHSTLQKATQ I VGINTENFRAIKTTKSTGFAL S PEMLRLTISSDLEKGL	
a3	(201)	QTHSTLQKATQ I VGINTENFRAIKTTKSTGFAL L PEMLRLTISSDLEKGL	
RhAADC	(201)	QTHSTLQKATQ I VGINTENFRAIKTTKSTGFAL S PEMLRLTISSDLEKGL	
		251	300
RhPAAS	(251)	VPLFLCAT I GTTATTAIDPLEALCHVAKEY G VVHVDAAYAGSACICPEF	
a1	(251)	VPLFLCAT M GTTATTAIDPLEALCHVAKEY G VVHVDAAYAGSACICPEF	
a2	(251)	VPLFLCAT M GTTATTAIDPLEALCHVAKEY G VVHVDAAYAGSACICPEF	
a3	(251)	VPLFLCAT M GTTATTAIDPLEALCHVAKEY S VVHVDAAYAGSACICPEF	
RhAADC	(251)	VPLFLCAT I GTTATTAIDPLEALCHVAKEY G VVHVDAAYAGSACICPEF	
		301	350
RhPAAS	(301)	RHFINGVEGANSFSFNPHKW L FTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	
a1	(301)	RHFINGVEGANSFSFNPHKW L FTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	
a2	(301)	RHFINGVEGANSFSFNPHKW L FTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	
a3	(301)	RHFINGVEGANSFSFNPHKW L FTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	
RhAADC	(301)	RHFINGVEGANSFSFNPHKW L FTGMDCCCLWVKNPSVLASSLSTNPEFLR	
		351	400
RhPAAS	(351)	NKASDSKQVV D YKDWQ I ALSRRFR A LKLW L V L RSYGVANLRNFIRIHVKM	
a1	(351)	NKASDSKQVV D YKDWQ I ALSRRFR S LKLW L V L RSYGVANLRNFIRIHVKM	
a2	(351)	NKASDSKQVV D YKDWQ I ALSRRFR A LKLW L V L RSYGVANLRNFIRIHVKM	
a3	(351)	NKASDSKQVV D YKDWQ I ALSRRFR A LKLW L V L RSYGVANLRNFIRIHVKM	
RhAADC	(351)	NKASDSKQVV D YKDWQ I ALSRRFR A LKLW L V L RSYGVANLRNFIRIHVKM	
		401	450
RhPAAS	(401)	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRN F SLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	
a1	(401)	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRN F SLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	
a2	(401)	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRN F SLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	
a3	(401)	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRN F SLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	
RhAADC	(401)	AKTFEGLVRMDKRFEILVPRN F SLVCFRISPSALISSNEDDEIGMVNEVN	
		451	500
RhPAAS	(451)	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGG L YV L RCAVGATL T EEKHIVEAWN V VQDH	
a1	(451)	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGG L YV L RCAVGATL T EEKHIVEAWN V VQDH	
a2	(451)	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGG L YV L RCAVGATL T EEKHIVEAWN V VQDH	
a3	(451)	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGG L YV L RCAVGATL T EEKHIVEAWN V VQDH	

RhAADC	(451)	CKLLEAINASGKAYMTHAVVGGGLYVLRCAVGATLTTEEKHIVEAWN ⁵⁰¹ VVQDH ⁵⁰⁸
RhPAAS	(501)	AQAILSTY
a1	(501)	AQAILSTY
a2	(501)	AQAILSTY
a3	(501)	AQAILSTY
RhAADC	(501)	AQAILSTY

Figure 14 : Séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques de la figure 13. a1, a2 et a3 : séquences peptidiques déduites des séquençages obtenus au cours de cette étude pour ces trois mêmes allèles. RhPAAS : séquence peptidique déduite de la séquence de *PAAS* obtenue par Kaminaga *et al.* (2006) respectivement chez le rosier. RhAADC : séquence peptidique déduite de la séquence de *PAAS* obtenue par Sakai *et al.* (2007).

Dans les travaux précédents (Machenaud, 2010), il avait été montré qu’une plante dans laquelle l’expression de l’allèle *a2* était forte et majoritaire, ne produisait que très peu de 2-phényléthanol, au contraire de l’allèle *a1* dont la forte expression était corrélée avec une forte émission de 2-phényléthanol. *a3* s’exprimait toujours minoritairement et en petite quantité, quel que soit le contexte allélique, et les plantes ayant un contexte allélique *a3/a3* ne produisaient que peu de 2-phényléthanol. On pouvait donc émettre l’hypothèse que *a1* et *a3* étaient des isoformes actives de *RhPAAS* alors que *a2* n’était pas (ou peu) active. Au vu du séquençage présenté ici, un polymorphisme des acides aminés pourrait expliquer en particulier cette différence d’activité : le 5^e acide aminé apolaire (proline) chez *a1* et *a3*, et basique (arginine) chez *a2*.

C) Expression de *RhPAAS* au cours du développement floral

L’expression de *RhPAAS*, tous allèles confondus, a été quantifiée au cours du développement floral par qPCR. En effet, les séquences des trois allèles étant très proches, les amorces désignées pour la PCR quantitative ne permettent pas de discriminer l’un ou autre des allèles. Cette expérience a tout d’abord été menée chez *R. × hybrida* cv. ‘Alister Stella Gray’, un cultivar émettant beaucoup de 2-phényléthanol.

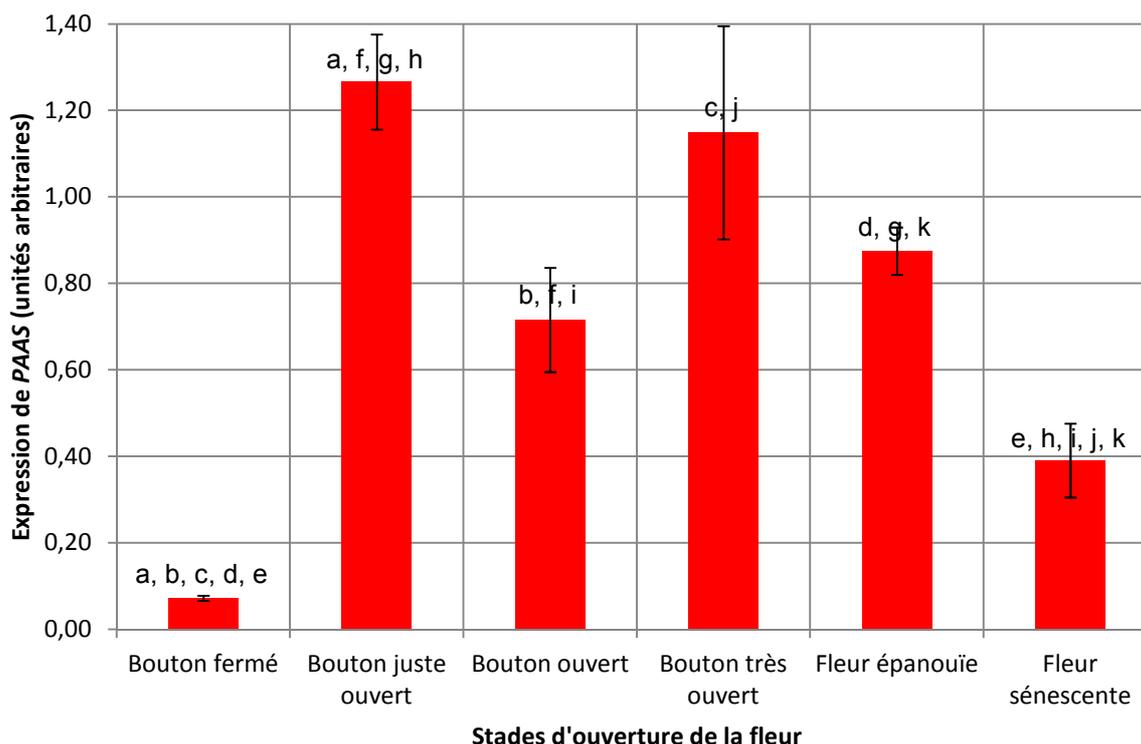


Figure 15 : Expression de *RhPAAS* dans les pétales de *Rosa* × *hybrida* cv. ‘Alister Stella Gray’ à différents stades d’ouverture de la fleur. Les couples de lettres au dessus des barres d’histogrammes désignent des résultats statistiquement différents ($p \leq 0,05$). Les barres d’erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

Les résultats montrent que *RhPAAS* est très peu exprimé dans les stades précoces du développement floral (Fig. 15). Son expression est maximale juste avant l’ouverture de la fleur, diminue au stade bouton ouvert puis reste constante au cours de l’anthèse et enfin diminue à la sénescence. Ces résultats montrent donc une expression plus précoce que ceux publiés par Farhi *et al.* (2010).

D) Les trois allèles ont différents niveaux d’expression selon le génotype

L’expression des trois allèles de *RhPAAS* a été analysée chez *R. × wichuraiana* (Rw), *R. × hybrida* cv. ‘H190’ (H190) et quatre de leurs descendants (Hw24, Hw68, Hw149 et Hw530) à différents stades d’ouverture de la fleur. Rw, Hw24 et Hw530 possèdent des fleurs émettant du 2-phényléthanol (Fig. 16). Cette production augmente au cours du développement. H190, Hw68 et Hw149 ne produisent quant à eux pas ou très peu de cette molécule. Rw est de génotype $a1/a2$, H190 de génotype $a3/a3$, Hw24 et Hw530 de génotype $a1/a3$, et enfin Hw68 et Hw149 de génotype $a2/a3$. Le but est ici d’évaluer l’expression du

gène *RhPAAS* dans les quatre contextes alléliques et d'apprécier sa variation au cours du développement floral.

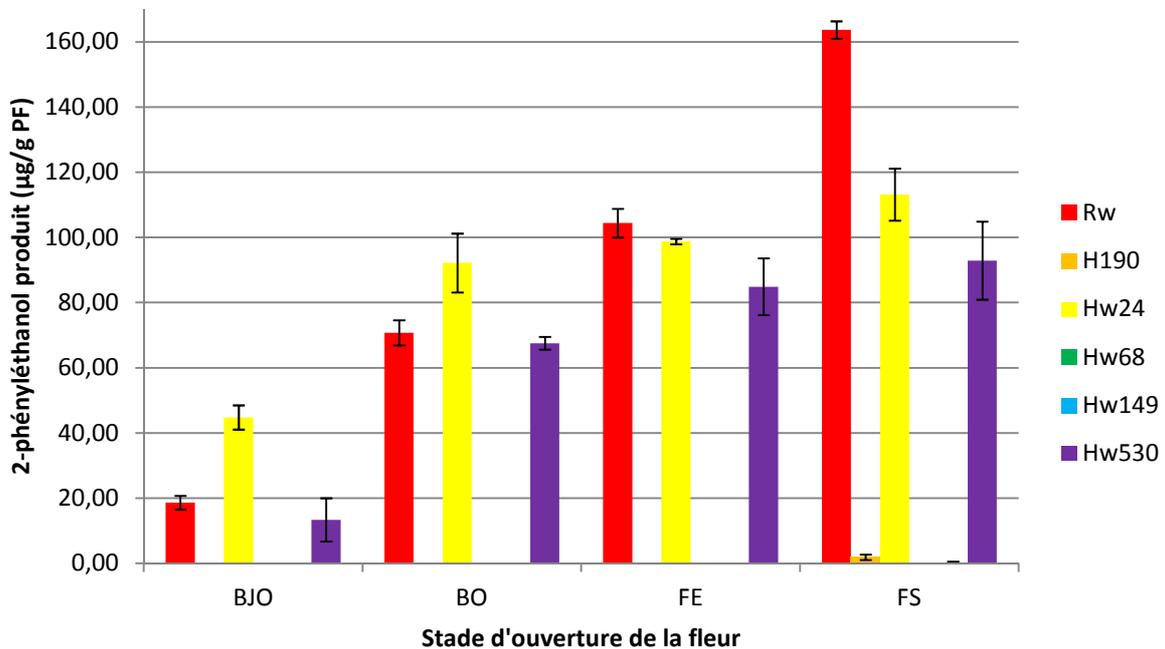


Figure 16 : Quantités de 2-phényléthanol produit par les pétales de *Rosa × wichuraiana* (Rw ; *a1/a2*), *R. × hybrida* cv. 'H190' (H190 ; *a3/a3*) et quatre de leurs descendants : Hw24 et Hw530 (*a1/a3*), et Hw68 et Hw149 (*a2/a3*) à différents stades d'ouverture de la fleur. BJO, Bouton juste ouvert ; BO, Bouton ouvert ; FE, Fleur épanouie ; FS, Fleur sénescence. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

Dans un contexte *a1/a2* (Rw), l'expression de *RhPAAS* est maximale juste avant et pendant l'ouverture de la fleur et devient très faible par la suite (Fig. 17). Dans un contexte *a1/a3* (Hw24 et Hw530), l'expression est aussi maximale avant l'ouverture de la fleur. A l'anthèse, elle chute considérablement (elle est nulle pour Hw530 dans nos conditions de détection) et reste à un niveau très faible pendant les stades suivants. Au contraire, l'expression de *RhPAAS* dans Hw68 et Hw149 (*a2/a3*) est maximale plus tardivement, dans la fleur épanouie, et est très faible dans les autres stades. Cette expression reste néanmoins bien inférieure au niveau observé dans les contextes *a1/a2* ou *a1/a3*. Enfin, les ARNm de *RhPAAS* sont quasiment indétectables dans nos conditions tout au long du développement floral chez H190 (*a3/a3*).

Parallèlement à ces niveaux d'expression du gène *RhPAAS*, tous allèles confondus, des

expériences de courbe de fusion à haute résolution (HRM) ont été réalisées au Laboratoire BVpam par Emilie Cavel (ATER, Université de Saint-Etienne) chez ces mêmes six rosiers au stade bouton juste ouvert afin de connaître la proportion des ARNm dérivant de chaque allèle participant à l'expression de *PAAS* (résultats non montrés ici). Quel que soit le contexte allélique, *a1/a2* (Rw) ou *a1/a3* (Hw24 et Hw530), *a1* représente 100% des ARN. Par contre, dans un contexte *a2/a3* (Hw68 et Hw149), *a2* est majoritaire et représente environ 75% des ARNm de *RhPAAS*. Par conséquent, *a3* ne s'exprime dans tous les cas que très minoritairement (les résultats de HRM sur H190 (*a3/a3*) confirment qu'il est le seul allèle présent dans ce cultivar).

a1 est donc un allèle dominant s'exprimant fortement dans les rosiers émettant du 2-phényléthanol (Fig. 16) juste avant et pendant l'ouverture de la fleur où il représente 100% des ARNm de *RhPAAS*. *a2* est lui absent des ARN dans un contexte *a1/a2* (Rw) mais devient majoritaire dans un contexte *a2/a3* (Hw68 et Hw149, rosiers émettant peu de 2-phényléthanol) où il a tendance à s'exprimer un peu plus tardivement que *a1*, au stade fleur épanouie. L'expression de *a3* reste quant à elle très minoritaire quel que soit le cas de figure.

Il semble donc que l'allèle *a1* du gène *RhPAAS* soit le seul capable d'entraîner une production importante de 2-phényléthanol. *a3* s'exprimant toujours très faiblement, même si ses ARNm sont effectivement traduits et que la protéine en dérivant est fonctionnelle, il ne semble pouvoir participer que très minoritairement à la production de parfum. Par contre, dans un contexte *a2/a3*, *a2* s'exprime plus faiblement et à un stade plus tardif (fleur épanouie) que *a1* et pourrait logiquement entraîner la synthèse de 2-phényléthanol, bien qu'à un niveau beaucoup plus faible. Or ces rosiers n'émettent pas ou très peu de cette molécule (Fig. 16). Il existe donc peut être un blocage soit de la traduction, soit de l'activité de l'isoforme *a2* permettant d'expliquer cette non-production. Nous allons donc évaluer la quantité de protéine dans les pétales, ainsi qu'estimer l'activité de chacune des isoformes de *PAAS*.

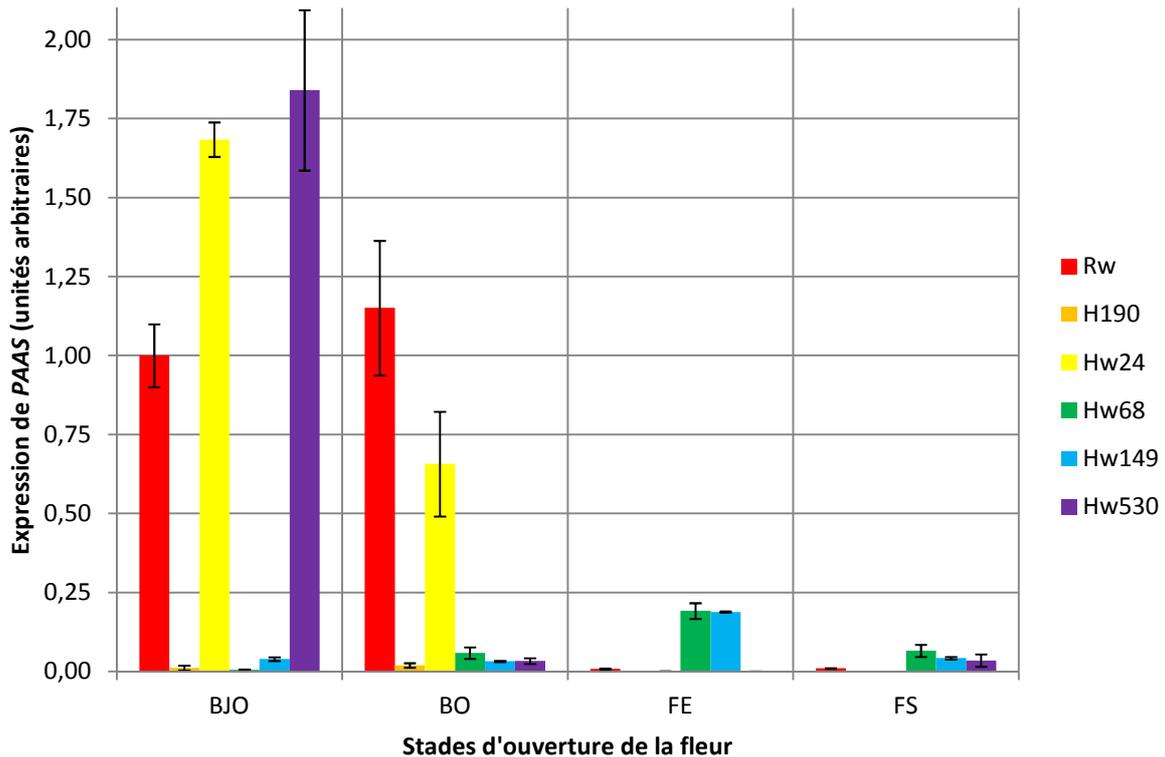


Figure 17 : Expression de PAAS dans les pétales de *Rosa* × *wichuraiana* (Rw ; *a1/a2*), *R.* × *hybrida* cv. ‘H190’ (*a3/a3*) et quatre de leurs descendants : Hw24 et Hw530 (*a1/a3*), et Hw68 et Hw149 (*a2/a3*) à différents stades d’ouverture de la fleur. BJO, Bouton juste ouvert ; BO, Bouton ouvert ; FE, Fleur épanouie ; FS, Fleur sénescente. Les barres d’erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

E) Détection de la protéine RhPAAS dans les pétales

Afin d’évaluer la quantité de protéine RhPAAS présente dans les pétales de ces six rosiers des anticorps anti-PAAS ont été générés. Les isoformes a1, a2 et a3 ne différant que de 8 acides aminés non adjacents, un anticorps dirigé contre l’une d’elle pourrait reconnaître les trois. Il a donc été produit chez *E. coli* des protéines recombinantes de l’isoforme a1 fusionnées à une étiquette polyhistidine. Celle-ci a permis de purifier la protéine recombinante sur une colonne de cobalt. Le produit de la purification migré sur gel d’agarose ne révèle qu’une seule bande de même que le western blot avec un anticorps anti-6×His, montrant ainsi une protéine pure et non dégradée (Fig. 18).

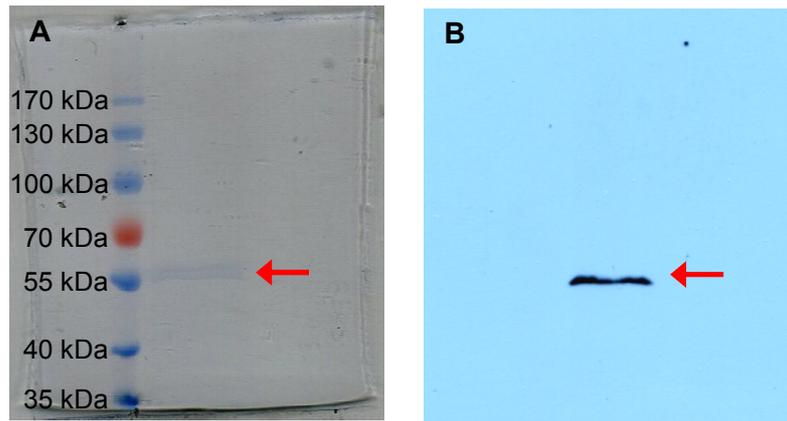


Figure 18 : Analyse de la protéine recombinante purifiée à partir d'*E. coli*. A : révélation au bleu de coomassie. B : révélation avec un anticorps anti-6×His. La flèche rouge indique la position de l'isoforme a1 de *RhPAAS* fusionnée à l'étiquette 6×His.

La protéine recombinante fusionnée à l'étiquette polyhistidine a été injectée dans des souris et les sérums recueillis. Ces derniers ont été testés sur des extraits de protéines totales de cals de rosiers exprimant l'allèle *a1* fusionnée à la GFP, qui produisent du 2-phényléthanol (voir plus loin). La révélation avec un anticorps anti-souris ne montre aucune bande tandis que l'utilisation d'un anticorps anti-GFP fait apparaître la protéine *RhPAAS* fusionnée à la GFP (Fig. 19A). Cependant, l'application des sérums à un extrait d'une protéine d'*A. thaliana* fusionnée à l'étiquette polyhistidine et utilisée comme contrôle, fait là aussi apparaître une bande, montrant la production d'anticorps dirigés contre l'étiquette polyhistidine (Fig. 19B).

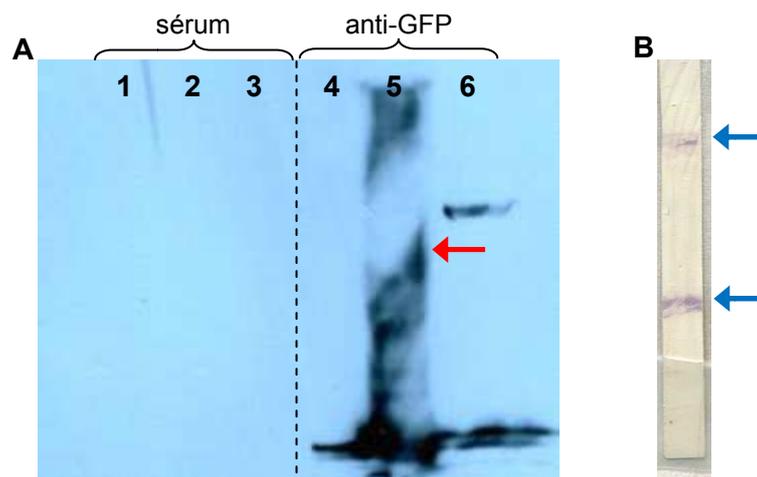


Figure 19 : Analyse de l'efficacité des sérums. A : 1 et 4 : échelle de poids moléculaires ; 2 et 5 : extraits de protéines totales de cals de rosiers exprimant la construction 35S::GFP:PAAS-*a1* ; 3 et 6 : extraits de protéine d'*A. thaliana* fusionnée à une étiquette GFP. 1, 2 et 3 : hybridation avec le dernier sérum de souris ; 4, 5 et 6 : hybridation avec un anticorps anti-GFP ; la flèche rouge indique la position prévue de l'isoforme a1 fusionnée à la GFP. B : extrait de protéine d'*A. thaliana* fusionnée à une étiquette 6×His ; les flèches bleues montrent la position des bandes révélées.

Les sérums contiennent donc uniquement des anticorps anti-6×His et les souris n'ont fabriqué aucun anticorps dirigé contre la protéine *RhPAAS*. De nouveaux essais de production d'anticorps sont en cours. L'allèle *a1* a été cloné dans le vecteur pFN18K, permettant ainsi de surexprimer l'isoforme *a1* fusionnée à une étiquette labile HaloTag (Los & Wood, 2006). Cette étiquette permet, de la même manière que l'étiquette polyhistidine, de purifier la protéine d'intérêt sur une colonne de résine HaloLink. A l'inverse de l'étiquette polyhistidine, l'étiquette HaloTag peut être clivée par une protéase du virus de la gravure du tabac (TEV). Il ne sera alors injecté dans les souris que la protéine *RhPAAS* afin d'augmenter les chances de production d'anticorps dirigés contre cette protéine.

F) Les trois isoformes sont capables de synthétiser du 2-phényléthanol

Afin d'analyser la fonctionnalité des trois isoformes de *RhPAAS*, celles-ci ont été transformées dans différents systèmes hétérologues (levures) et *in planta* (tabac et rosier). Les levures produisent naturellement de faibles quantités de 2-phénylacétaldéhyde et de 2-phényléthanol par la voie d'Erlich. Les allèles ont donc été introduits dans une souche *aro10Δ* mutée dans la deuxième étape de la voie d'Erlich (Farhi *et al.*, 2010). Elle ne peut donc plus produire de 2-phénylacétaldéhyde et de 2-phényléthanol et une isoforme fonctionnelle viendrait compléter cette perte. Les levures *aro10Δ* transformées avec les trois allèles émettent toutes plus de 2-phényléthanol que la souche mutée non complétée (Fig. 20). Il semble donc que les trois isoformes de *RhPAAS* soient bien actives. Cependant, les levures n'apportent pas les mêmes modifications post-traductionnelles, glycosylations ou phosphorylations par exemple, à la protéine que l'organisme d'origine (c'est-à-dire le rosier). Il faut donc vérifier cette activité par expression des allèles *in planta*.

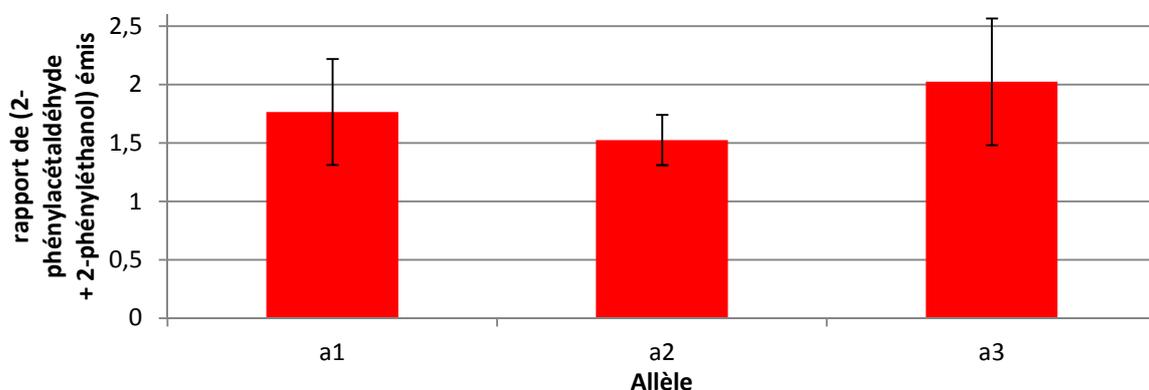


Figure 20 : Production de 2-phénylacétaldéhyde et de 2-phényléthanol par les levures transformées avec les allèles de *RhPAAS* par rapport à la production des levures transformées avec la GFP. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

Les allèles ont donc été exprimés de manière transitoire par infiltration dans les feuilles de tabac. Les feuilles infiltrées avec uniquement le vecteur p19 (contrôle négatif), ne produisent pas de 2-phényléthanol (Fig. 21). Au contraire, les feuilles infiltrées avec les trois allèles émettent des quantités importantes de 2-phényléthanol, toutes à un niveau comparable, même si les feuilles infiltrées avec *a3* émettent significativement un peu plus de 2-phényléthanol que celles infiltrées avec *a2*. Il semble donc que les trois isoformes de la phénylacétaldéhyde synthase soient toutes trois parfaitement fonctionnelles. Il est à noter que les chromatogrammes ne montrent aucun pic de 2-phénylacétaldéhyde, mais celui du 2-phényléthanol, ce qui suggère que la première molécule est directement réduite en la seconde par une enzyme présente chez le tabac, jouant le rôle de la phénylacétaldéhyde réductase (PAR) caractérisée chez la rose (Chen *et al.*, 2011b).

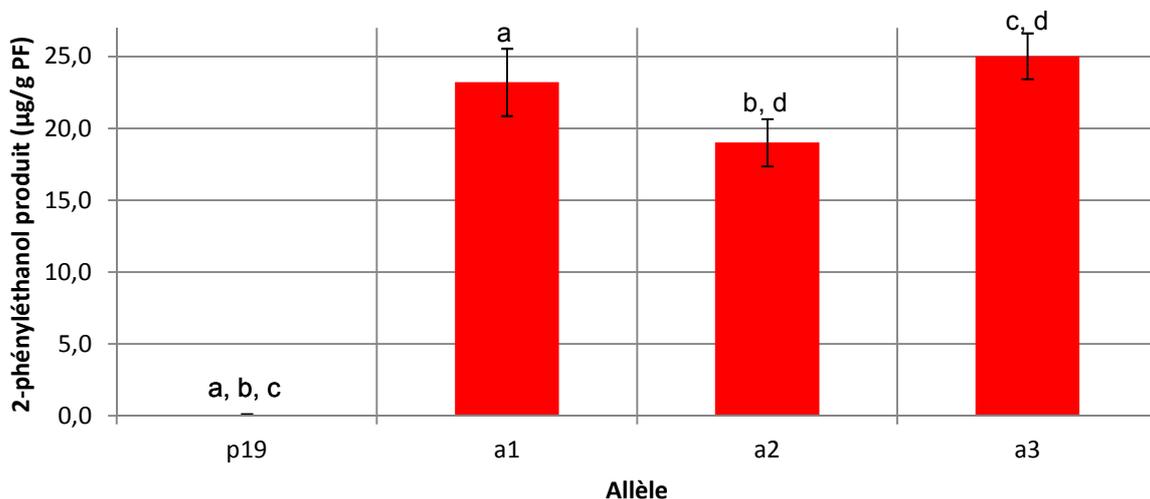


Figure 21 : Production de 2-phényléthanol par les feuilles de tabac infiltrées avec les allèles de *RhPAAS*. Les feuilles ont été récoltées quatre jours après transformation. Les couples de lettres au dessus des barres d’histogrammes désignent des résultats statistiquement différents ($p \leq 0,05$). Les barres d’erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

Des différences dans les modifications post-traductionnelles de *RhPAAS* pouvant exister entre le tabac et le rosier, les allèles ont donc été introduits de manière stable dans des cals de rosiers. Les cals non transformés ne produisent pas de 2-phényléthanol (Fig. 22). Au contraire, les cals transformés avec chacun des allèles de *RhPAAS* émettent du 2-phényléthanol à des niveaux comparables. On confirme donc à nouveau que les trois isoformes de la phénylacétaldéhyde synthase sont bien fonctionnelles.

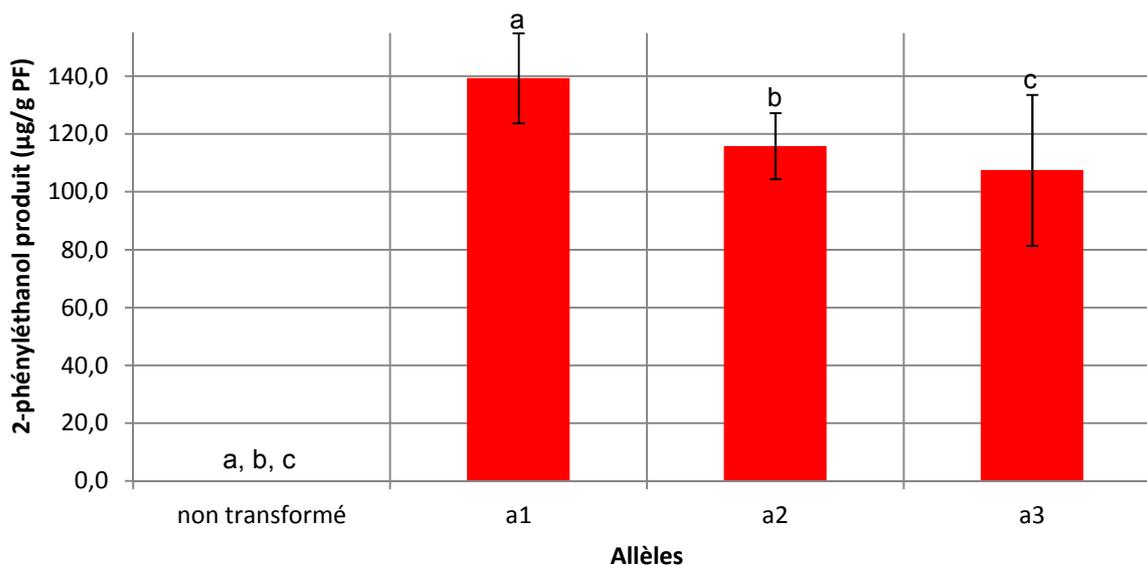


Figure 22 : Production de 2-phényléthanol par les cals de *Rosa chinensis* cv. ‘Old Blush’ transformés avec les allèles de *RhPAAS*. Les couples de lettres au dessus des barres d’histogrammes désignent des résultats statistiquement différents ($p \leq 0,01$). Les barres d’erreur correspondent aux erreurs standard. Trois réplicats biologiques ont été réalisés.

G) Conclusion

114

Les études précédentes ont montré l’existence de trois allèles du gène *RhPAAS* chez le rosier (Machenaud, 2010). La répartition de ces allèles, nommés *a1*, *a2* et *a3*, dans une descendance F1 (Hw) entre deux rosiers, l’un produisant du 2-phényléthanol (Rw), le second en produisant très peu (H190), aboutit aux quatre contextes alléliques suivants :

- hétérozygote *a1/a2* (parent Rw) produisant beaucoup de 2-phényléthanol (104,4 µg/g PF en FE) ;
- homozygote *a3/a3* (parent H190) dont le parfum est dépourvu de 2-phényléthanol (0,0 µg/g PF en FE) ;
- hétérozygote *a1/a3* (descendants Hw24 et Hw530) produisant du 2-phényléthanol (98,7 et 84,9 µg/g PF en FE, respectivement) ;
- et hétérozygote *a2/a3* (descendants Hw68 et Hw149) ne produisant pas de 2-phényléthanol (0,0 µg/g PF en FE).

Par conséquent, la production de 2-phényléthanol semble liée à la présence de l’allèle *a1*. Mais les mécanismes en jeu faisant que la présence des allèles *a2* et *a3* n’entraîne pas la synthèse de 2-phényléthanol en grande quantité restaient inconnus. Nous avons donc entrepris de les caractériser tous les trois.

Dans un premier temps, le séquençage complet du cadre de lecture des trois allèles a permis de mettre en évidence 23 polymorphismes mononucléotidiques et seulement 8 acides aminés de différence entre les isoformes des protéines générées par ces allèles. Aucune de ces différences ne semble pouvoir expliquer les phénotypes des différents contextes alléliques puisque nous avons montré que les trois isoformes sont parfaitement actives. L'inefficacité des allèles *a2* et *a3* est à chercher à un autre niveau, soit transcriptionnel, soit traductionnel.

Pour cela, nous avons étudié les niveaux d'expression de chacun des allèles. *a1* s'exprime fortement juste avant et pendant l'ouverture de la fleur puis ne s'exprime presque plus dans les stades plus tardifs de la floraison. Au contraire, *a3* est un allèle ne s'exprimant qu'à un niveau extrêmement faible et aboutit très vraisemblablement à une quantité minimale de l'isoforme *a3* dans les pétales. Il semble donc que la très faible transcription (ou la très forte dégradation) de cet allèle soit à elle seule responsable de la non-production de 2-phénylacétaldéhyde et de 2-phényléthanol dans le génotype *a3/a3* (H190). *a2* ne s'exprime pas dans un contexte génétique *a1/a2* (Rw) mais représente 75% des transcrits dans un contexte *a2/a3*, bien que son niveau reste très faible comparé à celui de *a1* juste avant et pendant l'ouverture de la fleur. A l'inverse de *a1*, *a2* s'exprime plus tardivement, au stade fleur épanouie pendant lequel on détecte une quantité faible mais non négligeable d'ARNm. Deux hypothèses pourraient alors expliquer que *a2* n'entraîne pas la production d'une quantité, même faible, de 2-phényléthanol : i) son expression tardive aboutit à un stockage sous forme glycosylée et la fleur sénescence avant que le composé odorant ne soit relargué, et ii) les ARNm de *a2* ne sont pas traduits en l'isoforme *a2*, qui est active comme nous l'avons démontré dans cette étude.

Discussion générale et perspectives

Les mécanismes moléculaires et les protéines impliqués dans les voies de biosynthèse des molécules odorantes sont assez peu connus chez la rose. C'est pour combler ces lacunes que nous avons entrepris d'étudier ces voies métaboliques. Dans une première partie, nous avons ainsi pu identifier *RhNUDX1*, une nouvelle protéine impliquée dans la synthèse des monoterpènes. Dans une seconde partie, nous avons étudié trois allèles de la phénylacétaldéhyde synthase, une enzyme de la voie de synthèse du 2-phényléthanol. Ces résultats permettent de comprendre un peu mieux pourquoi une rose est parfumée tandis qu'une autre est inodore.

G) *RhNUDX1*, une nouvelle protéine impliquée dans la synthèse du parfum chez la rose

Deux approches de transcriptomique comparative, cDNA AFLP display et puce à ADN, ont permis d'aboutir à l'identification d'un nouveau gène dont l'expression est plus forte dans les pétales d'une rose parfumée que dans les pétales d'une rose non parfumées. Cette façon d'aborder l'étude des gènes du parfum avait déjà permis l'identification et la caractérisation de la germacrène-D synthase et de l'alcool acétyltransférase (Guterman *et al.*, 2002) et continue à être utilisée grâce à la possibilité qu'elle offre de regarder un grand nombre de gènes (Mohd-Hairul *et al.*, 2011).

Ce gène code pour une nouvelle protéine, *RhNUDX1*, participant à la production des monoterpènes. Elle appartient à la famille des Nudix hydrolases qui sont pour l'essentiel des pyrophosphohydrolases. Cependant, bien que l'expression de *RhNUDX1* corrèle parfaitement avec la production et l'émission des monoterpènes dans tous les cultivars analysés, nous n'avons pas encore déterminé sa fonction. Deux hypothèses concernant son rôle peuvent être envisagées :

- *RhNUDX1* pourrait être une enzyme directement impliquée dans la cascade de réaction permettant la synthèse des monoterpènes. Il sera alors nécessaire de déterminer quel est son substrat en l'incubant *in vitro* avec toute une variété de molécules et dans différentes conditions environnementales. Les substrats

phosphorylés sont à privilégier étant donné l'appartenance de *RhNUDX1* à une famille de pyrophosphohydrolases ;

- *RhNUDX1* pourrait agir de manière indirecte sur une ou plusieurs enzyme(s) impliquée(s) dans la cascade de réaction aboutissant à la synthèse des monoterpènes. Dans ce cas, il sera nécessaire de déterminer à quel niveau (traductionnel, post-traductionnel, cofacteur...) intervient *RhNUDX1* et sur quelle(s) protéine(s).

Les monoterpènes sont des assemblages d'unités isopréniques ayant pour intermédiaire de synthèse le pyrophosphate de géranyle GPP. Les GPP synthases synthétisent le GPP par condensation d'un pyrophosphate d'isopentényle et d'un pyrophosphate de diméthylallyle, eux-mêmes produits par la voie de Rohmer dans le plaste (Rohmer, 1999). Elles sont pour l'essentiel plastidiales, bien que certaines soient parfois associées à d'autres organites (Sommer *et al.*, 1995 ; Bouvier *et al.*, 2000). La synthèse des monoterpènes est linéaire puis se ramifie à partir du GPP pour donner la grande variété de composés connus dans cette famille de molécules. La diminution de l'expression de *RhNUDX1* affectant la production de l'ensemble des monoterpènes, la protéine correspondante pourrait donc être une enzyme agissant sur un substrat de la voie de Rohmer ou sur l'IPP, remplissant le rôle d'une GPP synthase. Cependant, en toute vraisemblance, *RhNUDX1* est une protéine cytosolique. En effet, sa séquence est dépourvue de peptide d'adressage et sa localisation par fusion à la GFP est cytosolique (Jean-Claude Caissard, communication personnelle). Une intervention dans la voie de Rohmer semble donc à exclure. Certaines études montrent une translocation de l'IPP du cytosol vers le plaste (Banthorpe *et al.*, 1972 ; Dunphy, 2006) pris en charge par un transporteur actif (Soler *et al.*, 1993). La voie cytosolique de production de l'IPP, la voie mévalonate, pourrait donc être une autre piste, alimentant le plaste en IPP. Or, la production de sesquiterpènes, qui se fait dans le cytosol à partir de l'IPP de la voie mévalonate, n'est pas affectée, voire est légèrement augmentée, par l'extinction de l'expression de *RhNUDX1*. Une enzyme de la voie du mévalonate semble donc là aussi à exclure. La translocation inverse de l'IPP du plaste vers le cytosol est peu soutenue (Lichtenthaler *et al.*, 1997). Mais ce changement de compartiment pourrait expliquer le phénotype observé. En effet, si *RhNUDX1* avait le rôle d'une GPP synthase, l'extinction de son gène entraînerait une diminution de la production de monoterpènes, une augmentation du stock plastidial d'IPP qui pourrait donc d'avantage alimenter le pool cytosolique et conduire à une surproduction de sesquiterpènes.

Or les essais d'activité *in vitro* de *RhNUDX1* recombinante avec l'IPP comme substrat n'ont pas abouti à la formation d'un quelconque produit.

La séquence du gène *RhNUDX1* contient un domaine nudix G(X₅)E(X₇)REUXEEXXU. Elle appartient donc à la famille des nudix hydrolases, nom proposé par Bessman *et al.* (1996) pour des hydrolases des nucléosides diphosphates liés à un noyau X. Chez les plantes, peu de choses sont connues. Le génome de l'arabette possède 29 gènes codant pour des nudix hydrolases et seulement 16 ont été caractérisées (Kraszewska, 2008). Le riz, le peuplier et la vigne possèdent respectivement 33, 53 et 30 gènes de nudix hydrolases. Ces enzymes nécessitent un cation divalent pour le bon fonctionnement de l'hydrolyse d'un substrat avec plus ou moins de spécificité. La variété des molécules prises en charge inclut d'ADP-ribose, l'ADP-glucose, l'Ap₄A, les dNTP, le FADH, le NADH, le NADPH, le coenzyme A et la coiffe des ARNm (Kraszewska, 2008). L'analyse phylogénétique des nudix hydrolases place *RhNUDX1* très proche de *AtNUDX1* d'*Arabidopsis thaliana* avec 59% d'homologie. Celle-ci fut la première enzyme de cette famille à être caractérisée chez les plantes (Dobrzanska *et al.*, 2002). *AtNUDX1* est une enzyme de sanitation capable de reconnaître et de d'hydrolyser la désoxyguanosine oxydée dans le stock de désoxyribonucléotides de la cellule (Fig. 23 ; Dobrzanska *et al.*, 2002 ; Yoshimura *et al.*, 2007). *RhNUDX1* est elle aussi capable de réaliser la pyrophosphohydrolyse des désoxynucléotides et de la 8-oxo-désoxyguanosine (Hecquet, 2010). Cependant, l'activité de *RhNUDX1* vis-à-vis des substrats classiques de *AtNUDX1* étant très faible, il est peu probable que *RhNUDX1* remplisse effectivement cette fonction. Le rôle d'une telle enzyme dans la synthèse du parfum paraît peu concevable. Tout comme *RhNUDX1*, *AtNUDX1* est dépourvu de peptide d'adressage et sa protéine est localisée dans le cytosol (Yoshimura *et al.*, 2007). Il a été montré qu'elle est capable d'agir, au moins en *in vitro*, sur un grand nombre de substrats : l'hydrolyse du NADH qui permettrait de réguler le ratio NADH/NAD⁺ servant de balance entre l'anabolisme et le catabolisme (Dobrzanska *et al.*, 2002), la pyrophosphohydrolyse du DHNTP, une étape essentielle dans la biosynthèse du folate (Klaus *et al.*, 2005), la métabolisation des dGTP, dATP et dTTP (Klaus *et al.*, 2005 ; Ogawa *et al.*, 2005) et l'hydrolyse du 8-oxo-dGTP (Ogawa *et al.*, 2005) participant à la protection de l'ADN contre les dommages oxydatifs et à leur réparation (Yoshimura *et al.*, 2007). Tous ces substrats *in vitro* ne sont cependant pas nécessairement des substrats physiologiques de cette enzyme. Il est légitime de penser que *RhNUDX1* puisse accepter les mêmes substrats. Mais contrairement à *AtNUDX1* dont l'expression est constitutive (Ogawa *et*

al., 2005), *RhNUDX1* est spécifique des pétales (une très faible expression est cependant détectée dans les étamines) ce qui ne plaide pas en faveur de sa participation à des mécanismes ayant lieu dans tous les organes de la plante. Cependant, *AtNUDX1* déphosphorylant le DHNTP, il se pourrait que *RhNUDX1* déphosphoryle aussi une molécule, peut-être le GPP, puisque, nous l'avons vu, *RhNUDX1* est liée à la synthèse des monoterpènes. Cependant, une fois encore, des essais *in vitro* d'incubation de la protéine avec du GPP, de l'IPP ou du GGPP n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque activité de *RhNUDX1* envers ces substrats.

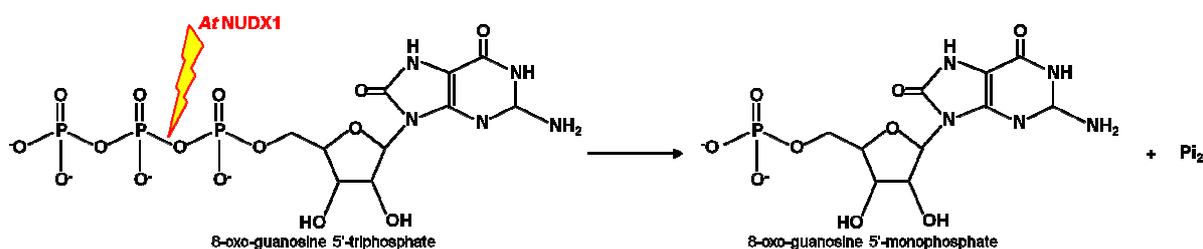


Figure 23 : Réaction catalysée par *AtNUDX1*.

Les voies de synthèse de l'IPP, et en particulier la voie de Rohmer, contiennent plusieurs molécules phosphorylées. *RhNUDX1* intervient peut être dans ces biosynthèses. Cette protéine étant vraisemblablement cytosolique, elle pourrait agir sur une molécule de la voie du mévalonate. La majorité des composés intermédiaires de cette voie sont activés par un coenzyme A. Mais l'acide mévalonique l'est sous une forme pyrophosphatée. Il est donc possible que *RhNUDX1* réalise la pyrophosphohydrolyse du mévalonate pyrophosphate MVAPP, ce qui pourrait avoir comme conséquence indirecte d'augmenter la synthèse d'IPP par la voie plastidiale pour compenser et ainsi d'alimenter la synthèse des monoterpènes dans le plaste. Il serait donc intéressant de tester le MVAPP en tant que substrat de *RhNUDX1*.

Il est à noter que les deux seules IPP isomérases de l'arabette (*IDI1* et *IDI2*) (Phillips *et al.*, 2008) présentent un domaine structurellement très proche du motif Nudix et ont pour cette raison été placées dans la famille des Nudix hydrolases, bien que leurs domaines Nudix soient imparfaits et qu'elles ne possèdent pas d'activité pyrophosphohydrolase (Kraszewska, 2006). Les IPP isomérases sont des enzymes participant à la synthèse des terpènes. Il est alors tentant de penser que *RhNUDX1* pourrait arborer une telle fonction. Cependant, *RhNUDX1* est vraisemblablement cytosolique. Dans ce compartiment, l'IPP synthétisé sert

essentiellement à la biosynthèse du FPP, puis des sesquiterpènes. Or l'extinction partielle de l'expression du gène *RhNUDX1* provoque une légère augmentation de la production des sesquiterpènes et une forte diminution de celle des monoterpènes, phénotype qui serait plus logique pour une IPP isomérase plastidiale. D'autant plus qu'il n'a pas été possible de prouver une telle activité en condition *in vitro*. Il semble donc peu probable que *RhNUDX1* soit une IPP isomérase cytosolique.

En conclusion, il est pour l'heure impossible d'attribuer une fonction à la protéine *RhNUDX1* bien que tout un faisceau de preuves atteste de son implication réelle dans la voie de synthèse des monoterpènes. D'autres substrats que ceux déjà utilisés seraient néanmoins intéressants à tester. Les monoterpènes sont stockés dans la cellule sous forme acylée ou glycosylée (Dunphy, 2006). *RhNUDX1* pourrait donc potentiellement être une acétylase ou une glycosylase relargant du géraniol à partir d'un ester d'acide gras ou d'un géranylglucoside.

D'autre part, des expériences complémentaires ont été entreprises en vue de mieux caractériser la lignée ARN interférant *RNAi-RhNUDX1-A*. Afin de regarder si l'extinction partielle de l'expression du gène *RhNUDX1* affecte aussi l'expression d'autres gènes, une puce à ADN et un RNAseq sont en cours de réalisation, confrontant les ADNc des pétales de la lignée ARN interférant pour le gène *RhNUDX1* avec les ADNc des pétales d'une souche sauvage, toutes deux aux stades "bouton juste ouvert" et "fleur épanouie". Ces expériences pourront donner des indications sur d'éventuelles interactions de *RhNUDX1* avec d'autres protéines ou d'autres gènes.

Afin de pallier au fait de n'avoir qu'une seule lignée ARN interférant pour le gène *RhNUDX1*, des transformations transitoires ont été réalisées dans les pétales. Le protocole appliqué est le même que pour la transformation des feuilles de tabac. Elles ont été réalisées sur un cultivar parfumé (*Rosa × hybrida* cv. 'Papa Meilland') et un cultivar non parfumé (*R. × hybrida* cv. 'Rouge Meilland'). Pour cela, deux constructions ont été utilisées, le gène *RhNUDX1* fusionné à un promoteur constitutif fort p35S pour une surexpression du gène, et une construction en épingle à cheveux dans le vecteur pk7GWIWG2(II) afin de produire un ARN interférant. Les résultats sont en cours d'acquisition.

Des expériences de métabolome sont en cours sur la lignée ARN interférant pour le gène *RhNUDX1*. Elles ont pour but de comparer par chromatographie liquide les intermédiaires réactionnels des voies mévalonate et non mévalonate dans les pétales entre cette lignée et un rosier sauvage. Elles pourraient permettre de connaître les molécules (non détectables par CPG dans nos conditions) impactées par la diminution de l'expression de *RhNUDX1* et de savoir ainsi à quel niveau agit cette Nudix hydrolase.

Enfin, des ESTs au cours du développement floral de *R. chinensis* cv. 'Old Blush' ont été récemment publiés (Dubois *et al.*, 2012). Ces expériences mettent en évidence plusieurs gènes de synthèse du parfum déjà caractérisés chez la rose : GDS, POMT, OOMT1, CCD1, CCD4, PAAS et PAR. Il serait également intéressant d'aller rechercher des homologues des enzymes plus en amont dans la biosynthèse des terpènes, dans les voies mévalonate et non-mévalonate.

II) *RhPAAS*, un gène à trois allèles aux caractéristiques différentes

Nous nous sommes aussi intéressés à la phénylacétaldéhyde synthase *RhPAAS*, une enzyme de la voie de biosynthèse du 2-phényléthanol. Nous avons ainsi pu confirmer l'existence de trois allèles de ce gène dans la population hybride Hw et nous avons caractérisé chacun d'eux. *a1* est un allèle s'exprimant fortement, *a2* s'exprime faiblement, l'expression de *a3* est quasiment indétectable. Les trois allèles codent pour des isoformes de *RhPAAS* parfaitement fonctionnelles. Cependant, seuls les génotypes ayant au moins une copie de *a1* émettent du 2-phényléthanol en quantité importante. La transcription très faible de l'allèle *a3* explique très certainement la très faible production de 2-phénylacétaldéhyde dans le cultivar 'H190'. L'allèle *a2* s'exprime faiblement et tardivement, il faudra confirmer par la suite la présence tardive de la protéine *RhPAAS* en analysant la quantité de protéines dans les pétales grâce à la production d'un anticorps dirigé contre cette enzyme, ce qui permettra de confirmer où se situe réellement le blocage. Deux hypothèses pourraient expliquer que *a2* n'entraîne pas la production d'une quantité, même faible, de 2-phényléthanol : i) son expression tardive aboutit à un stockage sous forme glycosylée et la fleur sénescence avant que le composé odorant ne soit relargué, et ii) les ARNm de *a2* ne sont pas traduits en l'isoforme *a2*, qui est active comme nous l'avons démontré dans cette étude.

C'est pour étudier la deuxième hypothèse sur la présence de protéine de *RhPAAS* dans les pétales de chacun des génotypes de la population Hw, que nous avons produit un anticorps dirigé contre les trois isoformes de la phénylacétaldéhyde synthase. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à produire un anticorps sélectif de *RhPAAS*. Un nouvel essai de production de l'anticorps à partir de protéines purifiées dont l'étiquette a été coupée, est en cours. Ceci permettra de savoir si les ARNm de *a2* sont effectivement traduits et si la traduction constitue le frein à la production de 2-phényléthanol. Une analyse protéomique de la protéine *RhPAAS* pourrait en outre permettre de savoir si les différentes isoformes sont représentées dans le pool de protéines de *RhPAAS* à l'image du pourcentage des allèles dans le pool des ARNm de *RhPAAS*. Elle permettrait aussi de connaître les modifications post-traductionnelles des isoformes et de déterminer s'il existe une éventuelle différence entre celles-ci qui pourrait provoquer une non-fonctionnalité de l'une d'elle. Si une isoforme *a2* est bien présente dans les pétales, une extraction au pentane/acétate d'éthyle (Watanabe *et al.*, 2002 ; Hayashi *et al.*, 2004) ou au pentane/dichlorométhane (Watanabe *et al.*, 2001) permettrait de vérifier la première hypothèse, à savoir le stockage du 2-phényléthanol sous forme glycosylée à un stade tardif. En effet, *a2* s'exprimant tardivement, si ses ARNm sont bien traduits en protéine, il se pourrait que le stockage du 2-phényléthanol empêche et retarde l'émission de la molécule et que la fleur finisse par sénescer avant la libération du 2-phényléthanol.

Les causes des différences d'expression entre les allèles sont à rechercher dans les régions non codantes adjacentes au cadre de lecture. Cependant à l'heure actuelle, nous ne disposons que de courtes séquences en 5' et 3' des régions traduites et les recherches futures à un niveau génétique devront s'orienter dans cette direction. Dans ce cadre là, le séquençage du génome du rosier pourrait être d'une aide importante. La région promotrice de chacun des allèles constitue une première piste. Une fusion entre ces promoteurs et des protéines reportrices permettrait d'évaluer l'efficacité de ceux-ci et de déceler d'éventuelles différences entre les allèles.

Si les causes n'en sont pas encore claires, ce phénomène de différences d'expression entre allèles n'est toutefois pas totalement inconnu de la littérature. En effet, Guo *et al.* (2004) ont étudié l'expression des allèles de quinze gènes du maïs et ont montré que les motifs d'expression sont différents d'un gène à l'autre : certains allèles s'expriment de façon égale (bialléliques) alors que dans d'autres cas, un seul allèle s'exprime et l'autre ne s'exprime pas du tout (monoallélisme), et tous les niveaux intermédiaires existent. Les ratios des taux d'expression des allèles peuvent même varier en fonction de conditions environnementales.

Les contextes génétiques contenant l'allèle *a1* de *RhPAAS* semblent donc répondre à la définition du monoallélisme, tandis que *a2* domine largement *a3* avec 75% d'expression dans un génotype *a2/a3* et les deux occupent donc une place intermédiaire entre mono- et bi-allélisme. Par ailleurs, on peut qualifier la relation entre *a1* et *a2* ou *a3* de non-cumulative, *a1* s'exprimant toujours seul, alors que *a2* et *a3* semblent cumulatifs (Springer & Stupar, 2007). D'autre part, on peut observer que les descendants de génotype *a1/a3* ont un niveau d'expression de *RhPAAS* supérieur à celui du parent de génotype *a1/a2* au stade bouton juste ouvert. Cette situation a été qualifiée de "au dessus du meilleur des parents" (*above high-parent*) par Springer & Stupar (2007). Elle résulte aussi ici en une plus forte émission de 2-phényléthanol chez certains descendants que chez les parents. Ce phénomène fait penser au phénomène d'hétérosis ou "vigueur hybride" (Springer & Stupar, 2007) et pourrait correspondre à un effet délétère de *a2*.

Grover *et al.* (2012) définissent les concepts de biais d'expression homologue (un allèle parental s'exprime plus que l'autre) et de dominance de niveau d'expression (l'expression totale des allèles dans un descendant se rapproche du niveau d'expression totale dans un des parents). Dans ce contexte, il existe un biais d'expression pour les allèles de *RhPAAS* en faveur de *a1* vis-à-vis de *a2* et *a3*, et en faveur de *a2* vis-à-vis de *a3*. D'autre part, l'expression de *RhPAAS* dans les descendants de génotype *a1/a3* se rapproche de l'expression dans le parent de génotype *a1/a2*, alors que l'expression de *RhPAAS* dans les descendants de génotype *a2/a3* se rapproche de l'expression dans le parent de génotype *a3/a3*. Il existe donc une dominance de niveau d'expression.

Nous avons donc montré qu'un contexte allélique explique la variabilité de l'émission de 2-phényléthanol dans la descendance issue d'un croisement entre une rose émettant ce composé et une rose en émettant très peu. Ceci explique le QTL majeur pour le 2-phényléthanol sur le groupe de liaison B7 observé dans la population Hw, le gène *RhPAAS* étant situé au niveau de ce QTL dans le même groupe de liaison (Machenaud, thèse 2010). En 2010, Spiller *et al.* ont décrit deux autres QTL pour la production du 2-phényléthanol sur une population issue de *R. multiflora*. Un QTL majeur sur le groupe LG5 explique 60% de la variabilité et est indirectement lié à un EST de l'acide aminé décarboxylase *RhAADC* cloné par Sakai *et al.* (2007). Un QTL mineur sur le groupe LG2 explique 28% de la variabilité et comprend des paralogues du gène de l'alcool acétyltransférase *RhAAT1* (Guterman *et al.*, 2002). Cependant, les groupes de liaison LG5 et LG2 sont différents du groupe B7. *RhAADC* est une acide aminé décarboxylase présentant 99% d'homologie avec la phénylacétylaldéhyde synthase *RhPAAS* de Kaminaga *et al.* (2006) et fonctionnant de la même manière, c'est-à-dire

une décarboxylation oxydative de la phénylalanine en phénylacétaldéhyde (Sakai *et al.*, 2007). Bien que les groupes de liaison LG5 et B7 ne colocalisent pas sur le même locus, ils semblent donc expliquer par la même enzyme la variabilité de l'émission de 2-phényléthanol dans la descendance. Cependant, le groupe LG5 n'explique que 60% de cette variabilité alors que le groupe B7 possède un QTL majeur pour le 2-phényléthanol. Ces résultats laissent supposer qu'il existerait plusieurs gènes codant pour la phénylacétaldéhyde synthase, sur des chromosomes différents. D'autre part, 50% des descendants produisent du 2-phényléthanol dans la population Hw. Dans la population étudiée par Spiller *et al.* (2010), 100% des descendants sont producteurs, alors que les deux populations sont issues d'un parent émettant du 2-phényléthanol et l'autre non. Cette différence est probablement à l'origine des QTL différents expliquant la production de cette molécule. *RhAAT1*, localisée dans le groupe LG2 est une alcool acétyltransférase capable de lier un groupement acétyle sur le 2-phényléthanol (Shalit *et al.*, 2003 ; Guterman *et al.*, 2006). Bien qu'en aval de la synthèse du 2-phényléthanol contrairement à *RhPAAS* et *RhAADC*, *RhAAT1* permet de réguler la quantité de ce composé dans la cellule, ce qui peut expliquer pourquoi son gène apparaît aussi dans un QTL lié à cette molécule.

La phénylacétaldéhyde réductase rose-PAR, intervenant à la suite de *RhPAAS* et *RhAADC* et transformant le phénylacétaldéhyde en 2-phényléthanol (Chen *et al.*, 2011), n'apparaît pas dans les QTL liés à cette dernière molécule. Au vu de la présence de 2-phényléthanol dans les tabacs et levures dans lesquels a été introduit le gène *RhPAAS* mais pas le gène *rose-PAR*, il semble que cette réduction puisse être prise en charge par d'autres réductases endogènes. Cette étape, catalysée par plusieurs enzymes, ne constitue donc pas un facteur limitant dans la voie de synthèse du 2-phényléthanol et il paraît difficile que le gène de *rose-PAR* puisse ressortir dans un groupe de liaison possédant un QTL lié au 2-phényléthanol. A l'inverse, la glycosylation du 2-phényléthanol est une forme de stockage du 2-phényléthanol (Watanabe *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2002) et la coupure de ce sucre représente donc un facteur limitant dans l'émission de cette molécule (Oka *et al.*, 1999). *al* s'exprime fortement juste avant et pendant l'ouverture de la fleur puis ne s'exprime presque plus dans les stades plus tardifs de la floraison. Ce décalage de l'expression par rapport à l'émission du 2-phényléthanol, qui a plutôt lieu au stade fleur épanouie, a déjà été observé, par Farhi *et al.* (2010) mais de manière moins marquée que dans nos résultats. Il pourrait correspondre à un stockage de la molécule sous forme glycosylée dans les stades précoces du développement floral, juste après sa biosynthèse. Dans les stades plus tardifs, une hydrolyse enzymatique viendrait relarguer l'importante quantité accumulée

de ce composé (Oka *et al.*, 1999). Une β -glucosidase a été mise en évidence par Ikemoto *et al.* (2004) et partiellement purifiée par Sakai *et al.* (2008). Cependant, le gène correspondant à cette enzyme n'est pas connu.

III) Conclusion générale et perspectives

Les approches transcriptomiques ont permis la découverte d'enzymes impliquées dans les voies de synthèse des composés organiques volatils participant au parfum de la rose (Channelière *et al.*, 2002 ; Guterman *et al.*, 2002). Les banques d'EST et les puces à ADN sont des outils puissants pour de telles applications. Cependant, l'approche protéomique pourrait constituer une alternative en travaillant à un autre niveau. Les gels 2D-PAGE à différents stades de développement et le séquençage des protéines d'intérêt ont permis de dresser une liste de candidats, dont certains non-connus jusque-là (Dafny-Yelin *et al.*, 2005). Une rose parfumée a été utilisée et les gènes de synthèse de composés parfumés y sont sous-représentés. Cependant, en comparant le protéome des pétales d'une rose parfumée avec celui d'une rose non-parfumée, il est raisonnable de penser pouvoir trouver de nouveaux gènes impliqués dans la production de parfum, mais potentiellement aussi de mettre en évidence des modifications post-traductionnelles affectant l'activité de telles enzymes.

125

Des approches génomiques, notamment la recherche de QTL, permettent de cerner des fragments de chromosomes (groupes de liaison) ayant un effet quantitatif sur un caractère donné. Les premières analyses portant sur le parfum de la rose (Spiller *et al.*, 2010 ; Machenaud, 2010) ont permis de localiser des groupes liés à l'émission de 2-phényléthanol. Ces groupes contiennent notamment trois gènes en relation avec la synthèse du 2-phényléthanol (*RhPAAS*, *RhAADC* et *RhAATI*) validant ainsi cette approche. D'autres candidats (rose-PAR, β -glucosidase, etc...) pourront être recherchés dans ces groupes de liaison. De plus, la caractérisation fonctionnelle (expression hétérologue et enzymologie, ARN interférants, surexpression...) de gènes inconnus présents dans ces groupes pourrait aboutir à la découverte de nouvelles protéines impliquées dans la synthèse de composés organiques volatils participant au parfum de la rose. Mais ces outils ne permettent pas uniquement de mettre en évidence des enzymes. ODORANT1, le premier facteur de transcription identifié dans les voies de biosynthèse du parfum, a lui aussi été trouvé lors

d'une étude transcriptomique confrontant un pétunia à fleurs parfumées avec un pétunia à fleurs non parfumées (Verdonk *et al.*, 2005). PAP1, un régulateur des voies de synthèse des composés aromatiques et terpéniques du parfum de la rose, a été caractérisé en introduisant le gène *AtPAP1* d'*A. thaliana* dans un rosier (Ben Zvi *et al.*, 2012). La recherche de candidats potentiels dans d'autres organismes et leur introduction ou leur extinction dans la rose permettrait de palier à l'absence de génome séquencé chez le genre *Rosa*.

Si les voies de synthèse menant à la production de composés organiques volatils participant au parfum sont connues et décrites, seules quelques enzymes ont été caractérisées dans chaque plante à fleurs. Une fois le génome d'une espèce de rosier séquencé, il sera alors plus simple d'aller chercher dans celui-ci les orthologues des enzymes caractérisées chez d'autres familles végétales puis de les caractériser dans le rosier enfin de reconstituer l'ensemble des voies de biosynthèse. En l'absence de ce génome, il est possible d'explorer les banques d'ESTs disponibles. La puce à ADN ayant permis l'identification de *RhNUDX1* a été construite à partir de 5000 ESTs. Outre cette Nudix hydrolase, elle a permis de faire ressortir plusieurs autres gènes potentiels, dont un certain nombre d'alcool oxydoréductases et d'aldocétoréductases dont les expressions sont corrélées à la production des alcools monoterpéniques et à celle de leurs dérivés oxydés, le géraniol, le géraniol et l'acide gérannique par exemple. Ces gènes pourraient donc être de bons candidats pour des enzymes impliquées dans la synthèse de molécules odorantes. D'autre part, de nouvelles ESTs viennent d'être publiées (Dubois *et al.*, 2012). Plusieurs gènes de synthèse y apparaissent (GDS, OOMT par exemple) et cette banque pourrait servir à l'identification de nouveaux gènes par puce ou RNAseq.

La recherche sur le parfum des roses se saurait être complète sans une description de l'émission des composés volatils organiques à travers la membrane plasmique des cellules des épidermes de pétales de roses. La visualisation par colorimétrie des terpènes et des composés aromatiques tendent à montrer une sécrétion granulocrine (Caissard *et al.*, 2004). Cependant, de nombreuses protéines de transfert de lipides sont présentes dans ces épidermes et pourraient être impliquées dans une sécrétion eccrine des molécules du parfum (Caissard *et al.*, 2004). Aucune n'a pour l'heure été caractérisée comme transporteurs de terpènes, de cétones de rose, de composés aromatiques ou de dérivés d'acides gras. L'épaisseur de la cuticule à la surface des pétales n'explique pas la différence d'émission entre une rose parfumée et une rose non parfumée (Bergougnoux *et al.*, 2007). Il est donc intéressant de se

tourner vers de telles protéines de transport pour comprendre les différences de parfum entre deux roses.

L'ensemble de ces recherches fondamentales peut intéresser la recherche appliquée. En effet, l'horticulture, et plus particulièrement le domaine de la sélection variétale, se tourne vers les outils génétiques pour assister la création de nouveaux cultivars. Des pépinières telles que la société Delbard, Meilland-Richardier ou Nirp International, pourraient utiliser des marqueurs moléculaires afin de créer des variétés de roses plus résistantes aux stress biotiques et abiotiques, aux fleurs avec plus de pétales, mais aussi plus parfumées. Dans cet optique, des recherches telles que celles menées sur *RhNUDX1* et sur les allèles de *RhPAAS* présentent un intérêt tout particulier pour les sélectionneurs de la profession.

Matériel et méthodes

D) Matériel végétal, souches et plasmides

A) Matériel végétal

1) Cultivars de rosier et stades de développement

Les variétés horticoles de rosiers utilisées dans le cadre de ma thèse ainsi que leur provenance sont représentées sur la figure 24 et dans le tableau 7. Elles ont été sélectionnées selon leurs parfums, chacune possédant ses propres caractéristiques odorantes. Toutes ont été utilisées pour extraire du parfum des pétales et de l'ARN.

Cultivar	Origine	Obtenteur	Lieu de culture	Parfum	Description de l'odeur
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Papa Meilland'	Meilland-Richardier	Meilland, 1963	ENS de Lyon	+++	Odeur de rose
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Rouge Meilland'	Meilland-Richardier	Meilland, 1983	ENS de Lyon	-	Aucune odeur
<i>Rosa chinensis</i> cv. 'Old Blush'	Jardin botanique de Lyon	Angleterre, ca. 1750	ENS de Lyon	++	Odeur de rose + odeur de thé
<i>Rosa chinensis</i> cv. 'Mutabilis'	Les Roses anciennes André Eve	Angleterre, dès 1789	ENS de Lyon	+	Odeur de thé
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Hacienda'	Orard	Orard, 1998	ENS de Lyon	+++	Odeur de rose + odeur citronnée
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Anna'	Broizat Hortirose	Charles Broizat	ENS de Lyon	+	Odeur de thé
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Alister Stella Gray'	Peter Beales Roses	Alexander Hill Grey, 1894	ENS de Lyon	++	Odeur de rose
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Black Baccara'	Meilland-Richardier	Meilland, 2000	ENS de Lyon	-	Odeur de vert
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Pariser Charme'	Leibniz Universität Hannover	Mathias Tantau Jr., 1965	ENS de Lyon	+++	Odeur de rose épicée (clou de girofle)
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i> cv. 'Baccara'	Meilland-Richardier	Meilland, 1954	Jardin botanique de Lyon	-	Odeur de vert

Tableau 7 : Dix cultivars de rosier utilisés dans cette thèse. La puissance du parfum va de 'sans parfum' (-) à 'très parfumée' (+++).

Pour le séquençage des allèles du gène de la phénylacétaldéhyde synthase *RhPAAS*, deux autres rosiers ont été utilisés. Il s'agit de *Rosa* × *wichuraiana* (hybride du rosier sauvage *R. wichuraiana*) et *R.* × *hybrida* cv. 'H190'. Tous deux sont cultivés par l'INRA d'Angers

(Crespel *et al.*, 2002). Ils ont permis l'élaboration d'une carte génétique réalisée à l'aide de marqueurs AFLP (Crespel *et al.*, 2002). Ces deux rosiers phénotypiquement différents (Tab. 8) sont à l'origine d'une population interspécifique F1 (nommée Hw) composée de 733 hybrides dont 91 ont été utilisés pour générer la carte génétique des parents (Hibrand-Saint Oyant *et al.*, 2008). *R. × wichuraiana* est un hybride diploïde utilisé comme parent mâle et *R. × hybrida* cv. 'H190', utilisé comme parent femelle, est un dihaploïde issu de la régénération de gamètes femelles de *R. × hybrida* cv. 'Zambra' fécondés avec du pollen irradié (Meynet *et al.*, 1994).



Figure 24 : Dix cultivars de rosier utilisés dans cette thèse. A : *Rosa × hybrida* cv. 'Papa Meilland' ; B : *R. × hybrida* cv. 'Rouge Meilland' ; C : *R. chinensis* cv. 'Old Blush' ; D : *R. chinensis* cv. 'Mutabilis' ; E : *R. × hybrida* cv. 'Hacienda' ; F : *R. × hybrida* cv. 'Anna' ; G : *R. × hybrida* cv. 'Alister Stella Gray' ; H : *R. × hybrida* cv. 'Black Baccara' ; I : *R. × hybrida* cv. 'Pariser Charme' ; et J : *R. × hybrida* cv. 'Baccara'.

<i>Rosa × wichuraiana</i>	<i>Rosa × hybrida</i> cv. 'H190'
Parent mâle	Parent femelle
Diploïde	Dihaploïde
Fleur simple, blanche	Fleur double, jaune
Epineux	Inerne
Résistant aux maladies	Sensibles aux maladies
Sarmenteux	Port buissonnant
Non remontant	Remontant
Produit beaucoup de 2-phényléthanol	Produit très peu de 2-phényléthanol

Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques des deux parents de la population Hw.

La quantification de l'expression des gènes au cours du développement floral de la rose, a été réalisée à six stades d'ouverture de la fleur. Ceux-ci sont définis et représentés par les caractéristiques suivantes (Fig. 25) (Bergougnoux *et al.*, 2007) :

- 'Bouton fermé' (BF) : sépales redressés et recouvrant entièrement les pétales.
- 'Bouton juste ouvert' (BJO) : sépales redressés mais laissant apparaître les pétales.
- 'Bouton ouvert' (BO) : sépales s'écartant des pétales et pétales les plus externes commençant à se déplier.
- 'Bouton très ouvert' (BTO) : sépales réfléchis et nombreux pétales dépliés.
- 'Fleur épanouie' (FE) : tous les pétales dépliés.
- 'Fleur sénescence' (FS) : pétales commençant à se détacher du réceptacle floral, étamines, styles et stigmates bien visibles.



Figure 25 : Les six stades de développement floral chez *Rosa chinensis* cv. 'Old Blush'. BF : bouton fermé ; BJO : bouton juste ouvert ; BO : bouton ouvert ; BTO : bouton très ouvert ; FE : fleur épanouie ; FS : fleur sénescence.

2) Lignée de *Nicotiana benthamiana*

La lignée de tabac utilisée au cours de cette thèse appartient à l'espèce *Nicotiana benthamiana* disponible au laboratoire.

B) Souches bactériennes et de levures

1) *Escherichia coli*

Au cours de cette thèse, quatre souches de la bactérie *Escherichia coli* ont été utilisées pour des applications différentes :

- DH5- α (GibcoBRL[®]): pour le clonage, la multiplication de plasmide et la conservation des allèles de *RhPAAS* et leurs différentes constructions ;
- BL21-AI[™] One Shot[®] Cells (Invitrogen[™]) : pour l'expression inductible des protéines recombinantes des allèles de *RhPAAS* ;

- StrataClone SoloPack Competent Cells (Stratagene): pour le séquençage des allèles de *RhPAAS* et leur conservation ;
- One Shot[®] TOP10 (Invitrogen[™]): pour le clonage directionnel des allèles de *RhPAAS* par le système Gateway.

Les génotypes de ces quatre souches bactériennes sont donnés dans le tableau 9.

Souche :	Génotype :
Bactéries :	
DH5- α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 ndA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ ,m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
BL21-AI SoloPack	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm araB</i> : :T7RNAP- <i>tetA lacZ</i> Δ M15 <i>endA recA tonA</i>
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rspL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
Agrobactéries :	
EHA105	C58 pTiBo542 ; T-region : :aph, Km(R) ; A281 derivative harboring pEHA101, T-DNA replaced with nptII, elimination of T-DNA boundaries unconfirmed, super-virulent.
Levures :	
BY4741	MATa ; <i>his3</i> Δ 1 ; <i>leu2</i> Δ 0 ; <i>met15</i> Δ 0 ; <i>ura3</i> Δ 0
YDR380w	BY4741 ; MATa ; <i>his3</i> Δ 1 ; <i>leu2</i> Δ 0 ; <i>met15</i> Δ 0 ; <i>ura3</i> Δ 0 ; YDR380w : :kanMX4

Tableau 9 : Génotypes des différentes souches de bactéries, d'agrobactéries et de levures utilisées.

2) *Agrobacterium tumefaciens*

Pour la transformation des cals embryogènes de *Rosa chinensis* cv. 'Old Blush', la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été utilisée (Hood *et al.*, 1993). Ces rosiers transformés ont permis de comparer les activités *in planta* des différentes isoformes de *RhPAAS*. Cette même souche a permis de transformer du tabac *Nicotiana benthamiana* pour les expériences d'expression transitoire des allèles de *RhPAAS* afin de comparer leurs activités respectives. Le génotype de cette souche d'agrobactéries est donné dans le tableau 9.

3) *Saccharomyces cerevisiae*

La comparaison des activités des isoformes de *RhPAAS* en système hétérologue a nécessité l'utilisation d'une souche de levure *aro10* Δ , mutée dans la seconde étape de la voie d'Erlich (YDR380w). Celle-ci dérive de la souche sauvage BY4741 qui a été utilisée en tant que contrôle. Les deux souches ont été obtenues auprès d'Euroscarf (Rose *et al.*, 2003) Les génotypes des souches de levures sont donnés dans le tableau 9.

C) Vecteurs

1) Vecteurs de séquençage

Afin de séquencer les allèles de *RhPAAS*, les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur StrataClone Blunt PCR Cloning Vector pSC-B-amp/kan de Stratagene (Fig. 26A). L'insert vient se positionner à l'intérieur du gène *lacZ'* codant pour la β -galactosidase permettant ainsi de sélectionner les clones blancs contenant effectivement un insert. Les amplicons obtenus par TAIL-PCR ont été séquencés après clonage TA dans le vecteur pCR 2.1-TOPO d'Invitrogen (Fig. 26B). De la même façon que ci-dessus, l'insert vient couper le gène *lacZ α* pour une sélection par la couleur des clones transformés.

2) Vecteur de clonage GATEWAY™

Suite à l'élaboration de différentes constructions des allèles de *RhPAAS*, celles-ci ont été clonées directionnellement dans le vecteur pENTR/D-TOPO d'Invitrogen (Fig. 26C). Ce dernier a ensuite servi de vecteur d'entrée pour les clonages GATEWAY™. Par recombinaison GATEWAY™, les constructions des 3 allèles de *RhPAAS* dépourvu du codon start ATG ont été clonées à partir du vecteur pENTR/D-TOPO dans le vecteur pDEST17 d'Invitrogen (Fig. 26D). Ceci permet de fusionner *RhPAAS* à une étiquette 6xHis du côté N-terminal de la protéine. Transformé dans la souche BL21-AI d'*Escherichia coli*, ce système permet d'exprimer conditionnellement cette protéine de fusion placée sous contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose. La queue polyhistidine permet ensuite de purifier *RhPAAS* sur une colonne de cobalt. Par recombinaison GATEWAY™, les constructions des 3 allèles de *RhPAAS* dépourvus du codon start ATG ont été clonées à partir du vecteur pENTR/D-TOPO dans le vecteur pk7WGF2 (Fig. 26E ; Functional Genomics Division of the Department of Plant Systems Biology, Gent, Belgique). Ceci permet de fusionner *RhPAAS* à la protéine fluorescente GFP du côté N-terminal de la protéine. Cette construction permet, d'une part, de repérer les cellules de rosier et de tabac effectivement transfectées mais aussi de localiser à l'échelle cellulaire la position de *RhPAAS* grâce au rapporteur GFP fluoresçant en vert par excitation à 488 nm. Elle permet aussi ainsi de comparer les activités des 3 isoformes de *RhPAAS in planta* dans un rosier (*R. chinensis* cv. 'Old Blush') et dans des feuilles de tabac *Nicotiana benthamiana* ne produisant tous deux pas ou très peu de 2-phényléthanol.

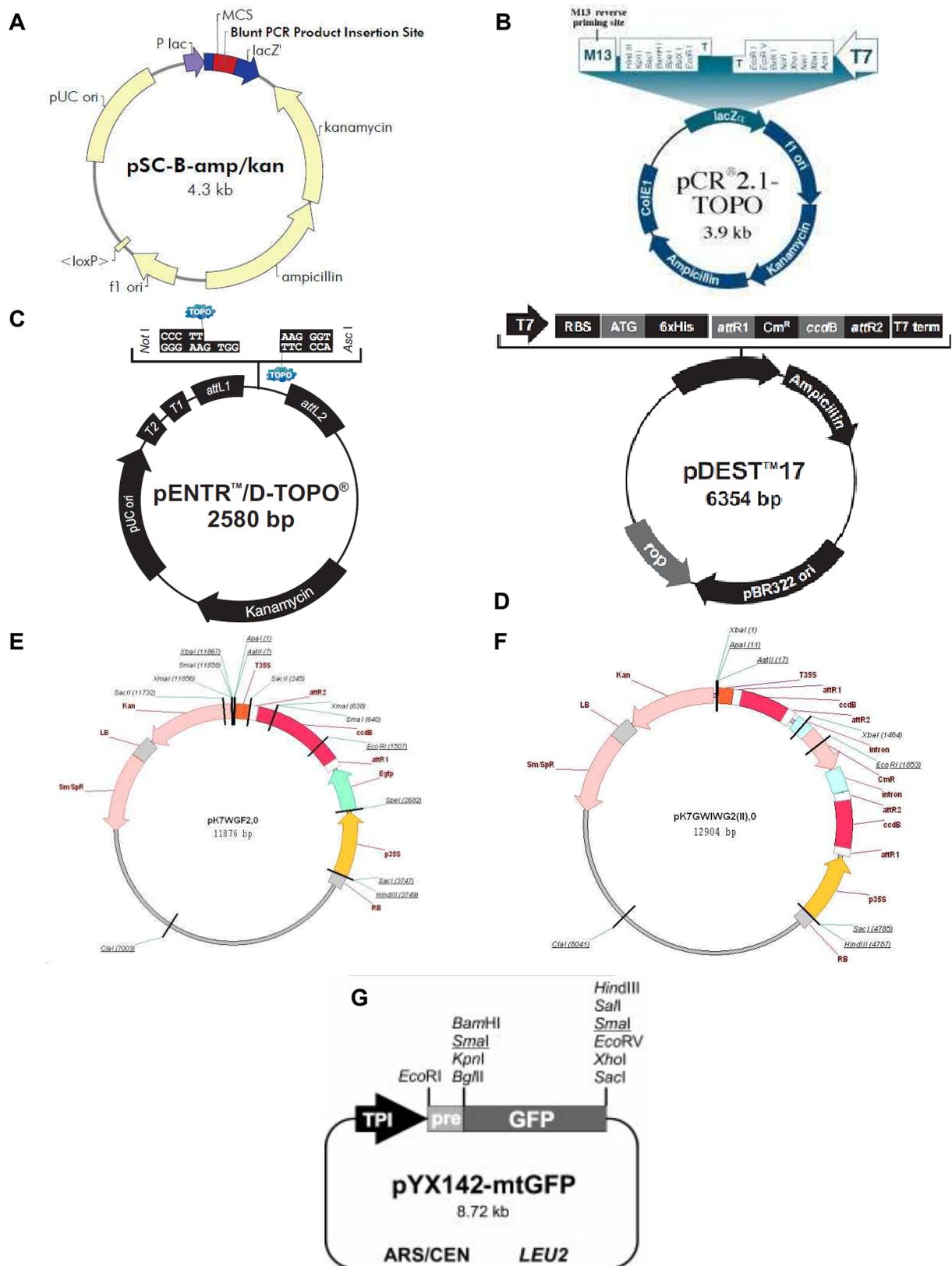


Figure 26 : Cartes des vecteurs utilisés dans les clonages. A : vecteur pSC-B-amp/kan ; B : pCR 2.1 TOPO ; C : vecteur pENTR/D-TOPO ; D : vecteur pDEST17 ; E : vecteur pk7WGF2.0 ; F : pk7GWIWG2(II) ; G : pYX142.

3) Vecteur pour la production d'ARN interférant

Afin d'éteindre son expression *in planta*, la séquence entière du gène *RhNUDX1* a été cloné dans le vecteur pk7GWIWG2(II) (Fig. 26F ; Functional Genomics Division of the Department of Plant Systems Biology, Gent, Belgique). Il est inséré tête-bêche en deux points du vecteur, permettant ainsi la formation d'une structure en épingle à cheveux permettant la production d'ARN interférant. Il a été utilisé pour la transformation stable de rosier.

4) Vecteur d'expression en levure

Afin d'exprimer le gène *RhPAAS* dans les levures, sa séquence a été insérée dans le vecteur pYX142. Celui-ci a été obtenu sous forme d'un vecteur pYX142-mtGFP contenant la séquence d'une GFP adressée à la mitochondrie (Fig. 26G ; Westermann & Neupert, 2000). Cette séquence nécessite d'être ôtée par restriction puis remplacée par la séquence de *RhPAAS* par ligation.

II) Techniques d'extraction d'acides nucléiques

A) Extraction d'ARN totaux à partir de matériel végétal

L'extraction des ARN totaux de pétales à différents stades de développement, d'étamines, de sépales et de feuilles de rosiers est réalisée avec le kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Brièvement, 200 mg d'organes frais sont placés dans un tube eppendorf de 2 mL contenant une bille de tungstène, puis plongés dans l'azote liquide. 10% (m/V) de polyvinylpyrrolidone (PVP-40, Sigma, St. Louis, MO, USA) sont ajoutés par échantillon et le tout est broyé avec l'appareil TissueLyser II de Qiagen®. Les tissus sont lysés avec le tampon RAP puis les étapes suivantes sont effectuées selon le protocole du kit. L'ADN restant potentiellement dans les échantillons est digéré par l'ADNase I du kit Turbo DNA-free™ (Ambion, Austin, TX, USA) selon les recommandations du fabricant.

La qualité des ARN est analysée par migration sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium. Ils sont dosés à 260 nm grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech France).

B) Extraction d'ADN génomique de bourgeons de rosier

L'extraction d'ADN génomique (ADN_g) de rosiers s'est faite à partir de bourgeons et de très jeunes feuilles selon un protocole adapté du kit DNeasy plant mini kit (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Brièvement, 100 mg d'organes frais sont placés dans un tube eppendorf de 2 mL contenant une bille de tungstène, puis plongés dans l'azote liquide. 10% (m/V) de polyvinylpyrrolidone (PVP-40, Sigma, St. Louis, MO, USA) sont ajoutés et le tout est broyé avec l'appareil TissueLyser II de Qiagen[®]. Les noyaux sont purifiés avec 1,5 mL de tampon d'extraction (KCL 80 mM, NaCl 20 mM, Tris 15 mM, EDTA 2 mM, β-mercaptoéthanol 14,08 mM, Triton[®] X100 8,48 mL) sous agitation (30 rpm) pendant 1 h 30 min. Ils sont précipités et séparés des chloroplastes par centrifugation à 3000 g pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et le culot subit le traitement décrit par le protocole du kit. Les ADN_g ainsi extraits sont ensuite dosés à 260 nm grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech, France).

C) Extraction de plasmides

L'ADN plasmidique est extrait, après une nuit d'incubation à 37°C, de 2 mL des cultures liquides des clones positifs en PCR sur colonies, à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les instructions du fabricant.

Succinctement, 2 mL de culture liquide de bactéries sont centrifugés 1 min à 11 000 g et le surnageant est éliminé. 250 µL de tampon A1 sont ajoutés au culot puis vortexés, 250 µL de tampon A2 sont ajoutés puis mélangés par retournement, enfin 300 µL de tampon A3 sont ajoutés puis mélangés par retournement. Le tout est centrifugé 10 min à 11 000 g. Le surnageant est chargé sur une colonne blanche du kit puis centrifugé 1 min à 11 000 g. Le surnageant est jeté et la colonne est lavée par ajout de 500 µL de tampon AW puis centrifugation 1 min à 11 000 g. 600 µL de tampon A4 sont ajoutés sur la colonne puis celle-ci est à nouveau centrifugée 1 min à 11 000 g. Le surnageant est jeté et la colonne est ensuite séchée par une centrifugation de 2 min à 11 000 g. Enfin, 50 µL de tampon d'élution AE préalablement chauffé sont ajoutés sur la colonne et laissés à incuber 10 min à température ambiante. Finalement, la colonne est placée sur un eppendorf stérile et centrifugée 1 min à 11 000 g pour récupérer 50 µL de plasmides extraits qui sont ensuite dosés à 260 nm grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech, France).

Une fraction de 30 μL à 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de ces ADN plasmidiques est préparée pour séquençage entre les sites M13_F et M13_R. Celui-ci est assuré par la société GATC Biotech (Constance, Allemagne).

III) Techniques d'amplification d'ADN par PCR

A) PCR quantitative en temps réel qPCR

Afin de synthétiser des ADN_c, 1 μg d'ARN totaux sont rétrotranscrits en utilisant le kit Revert AidTM M-MuLV Reverse transcriptase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) selon le protocole fourni par le fabricant. Une amorce poly-dT (T11VN) est utilisée, permettant de ne rétrotranscrire que les ARN messagers (ARN_m).

Succinctement, 2 μL d'amorces T11VN à 100 μM sont ajoutés à 1 μg d'ARN totaux et de l'eau q.s.p. 11 μL . Le mélange est incubé 5 min à 70°C puis 5 min sur glace. 4 μL de tampon de réaction 5X, 1 μL d'un mélange équimolaire des 4 dNTP à 20 mM, 1 μL de Ribolock RNA inhibitor et 2 μL d'eau sont alors ajoutés au mélange. Le tout est à nouveau incubé 5 min à 37°C. Enfin, 200 unités d'enzyme RevertAid M-MuLV Reverse sont ajoutées au mélange qui est alors incubé 1 h à 42°C. La réaction est stoppée par 10 min d'incubation à 70°C. Finalement, le mélange est refroidi par 10 min d'incubation sur glace.

Les PCR quantitatives sont réalisées en utilisant le kit FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) sur l'appareil StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). Une droite d'étalonnage est réalisée pour chaque gène à partir d'une série de dilution de 2 en 2 (1/20^e à 1/1280^e) d'un échantillon d'ADN_c de référence (*R. × hybrida* cv. 'Rouge Meilland'). L'expression des gènes d'un dupliqué de chaque échantillon biologique a été quantifiée grâce à ces droites d'étalonnage en utilisant le logiciel StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems). Elle est calculée selon une méthode de quantification relative (Gabelli *et al.*, 2004 ; Busso *et al.*, 2005) et est exprimée en unité arbitraire. Deux gènes de ménage sont utilisés : les orthologues chez le rosier de l' α -tubuline (*RhTUB*, Genbank accession number EC587914) et d'EF1- α (*RhEF1- α* , Genbank accession number BQ104256) dont l'expression a été prouvée stable chez le rosier (Dubois *et al.*, 2011). Les amorces spécifiques à chaque gène ont été conçues à l'aide du logiciel de Roche Applied Science (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>) et sont consignées en annexe 7.

B) PCR directe

Devant la difficulté d'obtenir un séquençage des régions 5' et 3'-UTR du gène *RhPAAS* par les méthodes de PCR inverse et de marche chromosomique, il a été décidé d'utiliser une méthode de PCR classique en prenant pour amorces les parties les plus externes connues de ce gène (résultats obtenus par Kaminaga *et al.*, 2006).

Brièvement, 250 ng d'ADN génomique sont amplifiés par PCR en utilisant les amorces *RhPAAS* 5'UTR_Fw1 et *RhPAAS* 3'UTR_Rv1 ou Rv2 (annexe 8) et la polymérase haute fidélité Phusion Hot Start (Biolabs) selon les instructions du fabricant.

La totalité du produit de PCR est analysée par migration sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium afin de vérifier l'amplification d'une séquence spécifique. Les bandes sont alors découpées et les amplicons extraits avec le kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Ces derniers sont ensuite dosés à 260 nm grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech France) puis sont clonés dans le vecteur StrataClone Blunt PCR Cloning Vector pSC-B-amp/kan (voir matériel et méthodes p. 135) et envoyés à séquencer.

C) PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR)

La PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR) est une polymérisation en chaîne dite "emboîtée" utilisant des amorces spécifiques pour une séquence connue et des amorces dégénérées afin qu'elles s'hybrident dans des séquences inconnues (Liu *et al.*, 1995). Le principe est rappelé sur la figure 27. Les compositions des différents milieux réactionnels et les conditions des PCR employées lors de cette thèse sont celles décrites dans l'article de Liu *et al.*, 1995.

Cette technique permet d'amplifier un fragment du transgène inséré dans le génome ainsi que sa région flanquante. Elle permet ainsi de déterminer dans quelle séquence, codante ou non, de l'ADN est venu s'insérer le transgène.

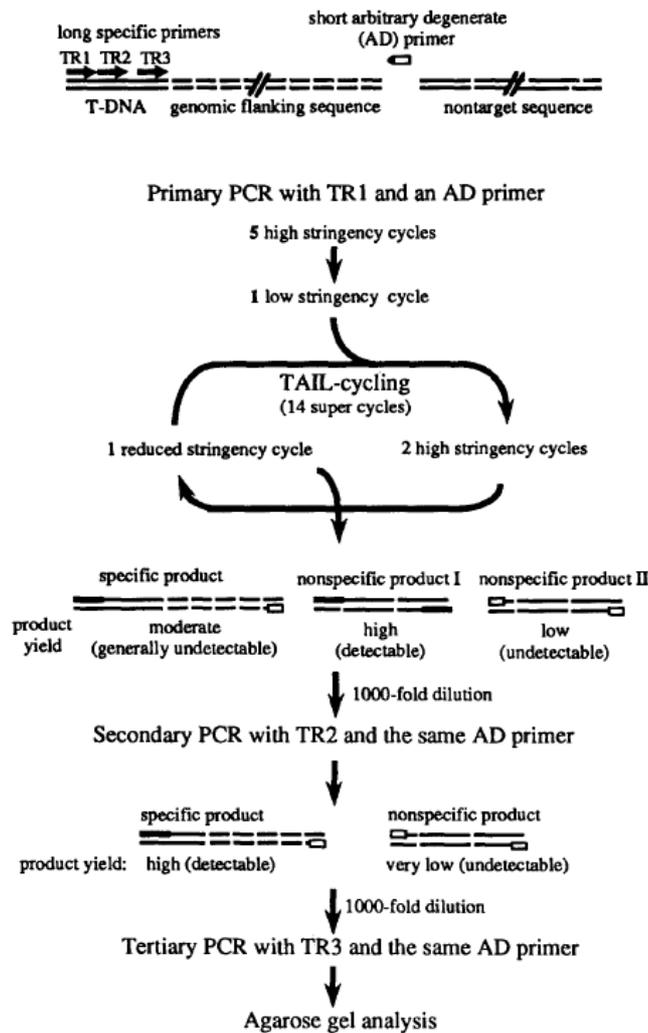


Figure 27 : Principe de la PCR à asymétrie thermique entrelacée (TAIL-PCR). D'après Liu *et al.*, 1995.

IV) Techniques de clonage

A) Clonage dans le vecteur StrataClone Blunt Vector pSC-B-amp/kan

La polymérase Phusion Hot Start (Biolabs) permet d'obtenir des amplicons à bords francs. Il est donc nécessaire de les cloner dans des systèmes de vecteur dits "blunt". Le plasmide utilisé ici est le StrataClone Blunt PCR cloning vector pSC-B-amp/kan selon les instructions du fabricant. Succinctement, 2 μL d'amplicons (5-50 ng) sont ajoutés à 3 μL de tampon StrataClone Blunt Cloning Buffer et 1 μL de vecteur StrataClone Blunt Vector Mix amp/kan et le mélange réactionnel est incubé 5 min à température ambiante. 1 μL de ce

mélange est ajouté à un tube de bactéries StrataClone SoloPack competent cells. Le tout est incubé 20 min sur glace puis 45 s à 42°C et enfin 2 min sur glace. 250 µL de milieu LB liquide préchauffé sont ajoutés dans chaque tube de bactéries qui sont ensuite mises à incuber à 37°C sous agitation (225 rpm) pendant 1 h. 5 µL et 100 µL de bactéries transformées sont étalées sur boîtes de LB-agar additionné d'ampicilline à 50 µg.mL⁻¹, sur lesquelles ont été préalablement étalés 25 µL de X-Gal à 25mg.µL⁻¹.

Les clones blancs sont vérifiés pour leurs insertions par PCR sur colonie. Un clone est piqué à l'aide d'un cône puis dilué dans 20 µL d'eau. A 1 µL de cette dilution, sont ajoutés :

- 2 µL de tampon GoTaq ;
- 0,1 µL d'un mélange des quatre nucléotides à 20 mM chacune ;
- 0,25 µL de chacune des amorces M13_F et M13_R ;
- 0,05 µL de polymérase GoTaq ;
- 6,35 µL d'eau ;

La totalité du produit de PCR est analysée par migration sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium afin de vérifier l'amplification d'une bande de taille correspondante à celle attendue de l'insert additionnée de 150 pb (taille des polylinkers, séquences entre les amorces M13_F et M13_R sur le vecteur). Les 19 µL restant des dilutions de clones s'étant révélés positifs en PCR sur colonies, servent à ensemercer 2,5 mL de milieu LB liquide additionné d'ampicilline à 50 µg.mL⁻¹ qui serviront pour le séquençage des inserts.

B) Clonage dans le vecteur hybride pYX142

Afin de cloner les constructions des allèles en lieu et place de la séquence pre-GFP dans le vecteur pYW142-mtGFP, il est nécessaire de digérer avec les enzymes de restriction EcoRI et XhoI les constructions flanquées de séquences EcoRI et XhoI d'une part, et le vecteur pYX142-mtGFP d'autre part, afin de lui ôter le gène de la GFP et sa préséquence. Une ligation permettra alors de cloner directionnellement les séquences des allèles dans le vecteur. Brièvement, 1 µg de construction EcoRI-allèle-XhoI ou du plasmide pYX142-mtGFP est double digéré pendant 4 h à 37°C par 7,5 et 5 unités d'enzymes EcoRI et XhoI respectivement. La totalité du produit de double digestion est analysée par migration sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium afin de purifier les constructions et le plasmide ainsi digérés. Les bandes sont alors découpées et l'ADN extrait du gel à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole du fabricant.

Ce dernier est ensuite dosé à 260 nm grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech France). 25,8 ng de construction EcoRI-allèle-XhoI digérée sont alors reliqués à 50 ng de vecteur pYX142 ouvert, par 400 unités de T4 DNA ligase (Biolabs) à 16°C pendant une nuit. 50 µL de bactéries DH5-α sont ensuite transformés avec 1 µL du produit de ligation : 20 min d'incubation sur glace puis 45 s à 42°C et enfin 2 min sur glace ; 250 µL de milieu LB liquide préchauffé sont ajoutés dans chaque tube de bactéries qui sont ensuite mises à incuber à 37°C sous agitation (225 rpm) pendant 1 h ; 5 µL et 100 µL de bactéries transformées sont étalées sur boîtes de LB-agar additionné d'ampicilline à 50 µg.mL⁻¹. Les clones ainsi obtenus sont vérifiés par PCR sur colonies et séquencés.

C) Clonage dans le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO

Les amplicons (produits PCR) des allèles portant en amont une séquence CACC peuvent être clonées directionnellement directement dans le vecteur pENTR-D-TOPO selon les instructions du fabricant. Succinctement, 5 à 10 ng de produits PCR, 1 µL de solution saline et 5 µL d'eau stérile sont ajoutés à 1µL de vecteur pENTR-D-TOPO et incubés 5 min à température ambiante. 2 µL de ce produit de clonage sont ajoutés à un tube de bactéries One Shot TOP10 pour transformation : 5 min d'incubation sur glace puis 30 s à 42°C et enfin 2 min sur glace ; 250 µL de milieu SOC préchauffé sont ajoutés dans chaque tube de bactéries qui sont ensuite mises à incuber à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant 1 h ; 5 µL et 100 µL de bactéries transformées sont étalées sur boîtes de LB-agar additionné d'ampicilline à 50 µg.mL⁻¹. Les clones ainsi obtenus sont vérifiés par PCR sur colonies et séquencés.

D) Clonage TA dans le vecteur pCR 2.1-TOPO

Les amplicons obtenus par TAIL-PCR ont été clonés dans le vecteur pCR 2.1-TOPO grâce à la technique du "TA cloning" selon les instructions du fabricant. Succinctement, 1 µL d'amplicon, 1 µL de solution saline et 3 µL d'eau stérile sont ajoutés à 1µL de vecteur pCR 2.1-TOPO et incubés 5 min à température ambiante. 2 µL de ce produit de clonage sont ajoutés à un tube de bactéries DH5-α pour transformation : 5 min d'incubation sur glace puis 45 s à 42°C et enfin 2 min sur glace ; 250 µL de milieu LB préchauffé sont ajoutés dans chaque tube de bactéries qui sont ensuite mises à incuber à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant 1 h ; 5 µL et 100 µL de bactéries transformées sont étalées sur boîtes de LB-agar

additionné de kanamycine à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sur lesquelles ont été préalablement étalés $25 \mu\text{L}$ de X-Gal à $25\text{mg}.\mu\text{L}^{-1}$. Les clones blancs ainsi obtenus sont vérifiés par PCR sur colonies et séquencés.

E) Recombinaison GATEWAY™ dans les vecteurs d'expression

Le vecteur pENTR/D-TOPO sert ici de vecteur d'entrée pour permettre d'insérer les allèles de *RhPAAS* dans des vecteurs d'expression par simple recombinaison homologue grâce à la technologie GATEWAY™. Les meilleurs clones de chacune des constructions en vecteur pENTR/D-TOPO sont choisis pour servir à cette recombinaison selon les instructions du fabricant (Invitrogen). Succinctement, $2 \mu\text{L}$ d'ADN (environ 100 ng) extrait des clones sont ajoutés à $1 \mu\text{L}$ de vecteur pDEST17 ou pk7WGF2, $4 \mu\text{L}$ de tampon TE à pH 8,0 et $2 \mu\text{L}$ de LR Clonase II Enzyme Mix. Le mélange est incubé 1 h à 25°C . $1 \mu\text{L}$ de solution de protéinase K est ensuite ajouté au mélange qui est alors incubé 10 min à 37°C . Enfin, $1 \mu\text{L}$ de la réaction finale est ajouté à un tube de bactéries DH5- α pour transformation : 30 min d'incubation sur glace puis 30 s à 42°C et enfin 2 min sur glace ; $450 \mu\text{L}$ de milieu SOC préchauffé sont ajoutés dans chaque tube de bactéries qui sont ensuite mis à incuber à 37°C sous agitation (200 rpm) pendant 1 h ; $20 \mu\text{L}$ et $100 \mu\text{L}$ de bactéries transformées sont étalées sur boîtes de LB-agar additionné d'ampicilline à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le vecteur pDEST17 ou de spectinomycine à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le vecteur pk7WGF2. Les clones ainsi obtenus sont vérifiés par PCR sur colonies et séquencés.

141

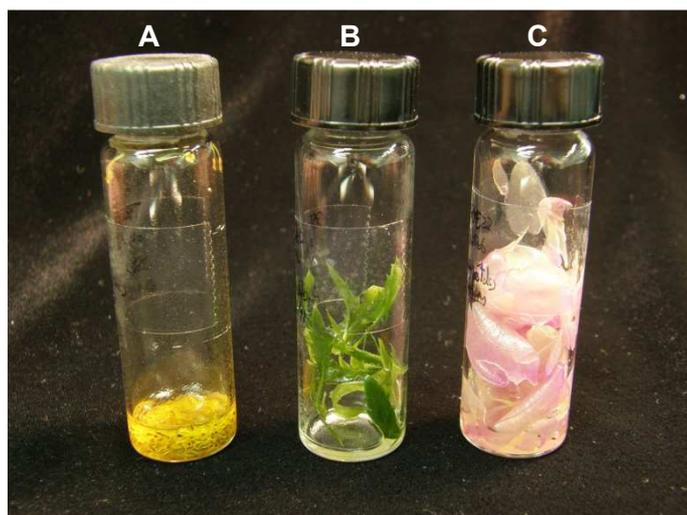
V) Techniques d'analyse des composés volatils

A) Extraction par solvant

1) Extraction de parfum à partir d'organes de rosier

Afin de recueillir les composés odorants synthétisés par les organes floraux, il est nécessaire de réaliser une extraction solide/liquide en utilisant l'hexane comme solvant. Les organes frais sont recueillis dans des flacons en verre à bouchon à vis étanches (Fig. 28). Pour 1g de pétales, sépales ou feuilles sont ajoutés 2 mL d'une solution de camphre à 10 mg.L^{-1}

dans l'hexane. Pour 1g d'étamines sont ajoutés 4 mL de cette même solution de camphre dans l'hexane. Les flacons sont ensuite mis à incuber 24 h à 4°C avant que la phase organique liquide ne soit recueillie dans des fioles à bouchons à vis à septum pour analyse en chromatographie en phase gazeuse (le camphre de la solution d'hexane servant d'étalon interne pour cette analyse).



142 **Figure 28 : Méthode d'extraction solide/liquide des composés volatils organiques** dans A : étamines, B : sépales et C : pétales.

2) Extraction de composés volatils de cultures de levures

Lors des expériences de comparaison des activités des allèles de *RhPAAS* en système hétérologue, il a aussi été nécessaire de recueillir les composés volatils organiques émis par les levures. Pour ce faire, 15 mL de culture de levures ont été enfermés dans un flacon en verre à bouchon à vis étanches auxquels ont été ajoutés 5 mL de la même solution de camphre à 10 mg.L⁻¹ dans l'hexane. Le mélange est agité vigoureusement puis laissé à décanter 5 minutes. La phase organique (phase supérieure) est ensuite recueillie dans les mêmes fioles à bouchons à vis à septum pour analyse en chromatographie en phase gazeuse.

B) Headspace dynamique sur culture liquide de *Saccharomyces cerevisiae*

Contrairement à l'extraction par solvant, la méthode du headspace dynamique permet de ne recueillir que les molécules effectivement émises par la fleur, et non plus la totalité des

composés organiques synthétisés par un organe (Fig. 29). Le parfum ainsi analysé a une composition plus proche de l'odeur effectivement perçue par les insectes et le nez humain.

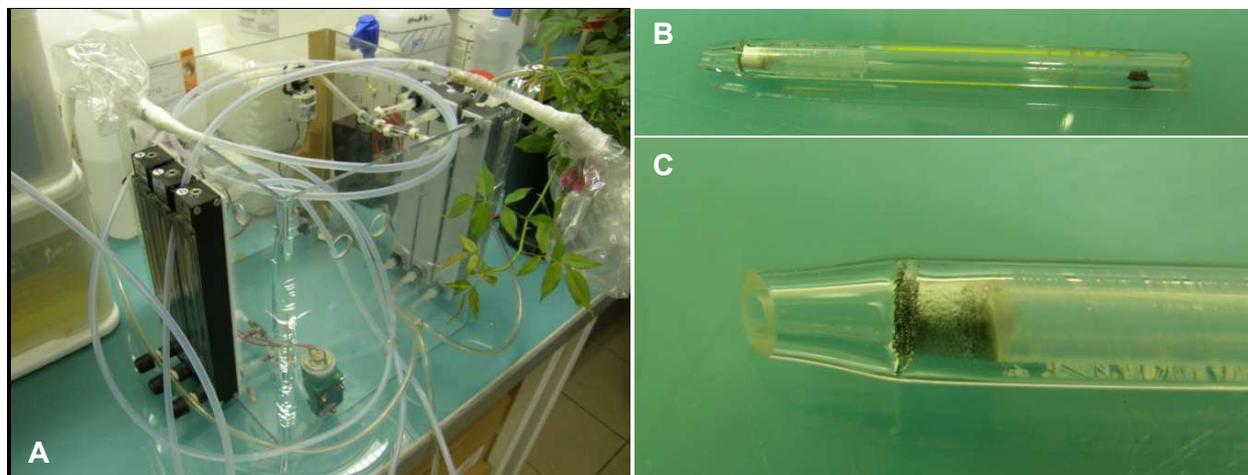


Figure 29 : Montage pour la capture de parfum par headspace dynamique. A : machinerie ; B : cartouche de Tenax ; C : détail du polymère dans la cartouche de Tenax.

Utilisée lors des expériences de comparaison des activités des isoformes de RhPAAS en système *Saccharomyces cerevisiae*, le headspace dynamique consiste à piéger sur un polymère (Porapak Q (Supelco, Bellefonte, PA, USA)) les composés organiques volatils produits par les levures et relargués dans l'air ambiant par la culture liquide. Le montage utilisé pour cette expérience est représenté sur la figure 30. Celui-ci est adapté du montage de la figure 28 utilisé pour capter les composés volatils émis par les fleurs. 25 mL de culture de levure sont incubés à 30°C pendant des durées variables dans un ballon en verre à fond plat fermé hermétiquement par un bouchon en plastique. Par ce bouchon arrive dans le ballon un courant d'air purifié sur charbon actif à un débit de 140 mL.min⁻¹. De ce bouchon est aussi aspiré l'air contenu dans le ballon à un débit de 140 mL.min⁻¹, air qui transite par la cartouche de Porapak Q. L'air à l'intérieur du ballon est ainsi continuellement en mouvement et les composés organiques volatils émis par les levures sont piégés sur le polymère. La cartouche de Porapak Q est ensuite éluée avec 5mL d'hexane auquel sont ajoutés 500 µL de la solution de camphre à 10 mg.L⁻¹ dans l'hexane. Les échantillons sont concentrés sous un courant d'azote puis analysés en chromatographie en phase gazeuse.

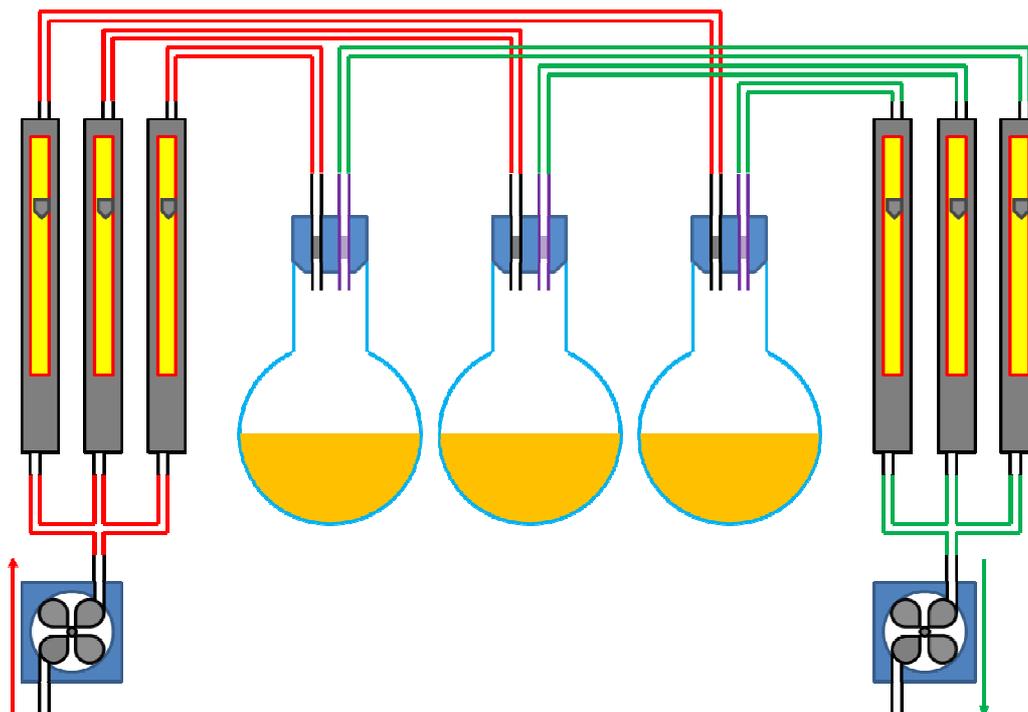


Figure 30 : Système d'extraction du parfum émis par des cultures de levures. L'air est aspiré par la première pompe et est distribué dans les trois ballons de culture de levures par un système d'entrée (rouge). Il est purifié par passage sur une cartouche de charbon actif avant son entrée dans un ballon (cartouche noire). Il ressort en passant par une cartouche captant les molécules volatiles (cartouche violette). Le système de sortie (vert) permet d'aspirer cet air via une seconde pompe. Le contrôle des pressions en entrée et sortie est assuré par des rotamètres (rectangles gris avec jauge jaune).

C) Analyse des extraits de parfum

1) Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des composés organiques volatils contenus dans les échantillons préparés par les méthodes ci-dessus, se fait par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le chromatographe Agilent 6850 est équipé d'une colonne capillaire HP-Innowax DB5 (30 m × 0,25 mm, phase stationnaire polaire de polyéthylène glycol, épaisseur de film : 0,25µm) dans laquelle circule un courant d'azote (gaz vecteur) à un débit de 1 mL.min⁻¹, et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) en sortie avec un voltage d'ionisation de 70 eV et une température de 250°C. Les conditions suivantes sont appliquées à la colonne : 3 min à 40°C, suivies d'une incrémentation de 2°C.min⁻¹ jusqu'à une température de 160°C, suivie d'une nouvelle incrémentation de température de 12°C.min⁻¹ jusqu'à 240°C, la température est ensuite maintenue à 240°C pendant 2 min. Le débit de gaz vecteur est maintenu constant. 2 µL d'extrait sont injectés par analyse dans la colonne à une température de 250°C, en mode 'split' avec un ratio de 4 :1.

2) Identification des composés organiques volatils

Les composés organiques volatils sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des composés purs suivants : 2-phényléthanol, géraniol, nérol, citronellol, β -caryophyllène et cis-3-hexénol (Payan-Bertrand), 3,5-diméthoxytoluène (DMT), (Philippe Hugueney, INRA Colmar), germacrène D (R.C. Treatt & Co. Ltd) et trans-2-hexénal (Aldrich). Le camphre sert d'étalon interne et les quantités de composés organiques volatils sont calculées en mg équivalent de camphre. Un ratio de un est postulé (Picone *et al.*, 2004).

En parallèle de la détection par ionisation de flamme, la chromatographie en phase gazeuse peut être couplée à la spectrométrie de masse CPG-SM (Agilent 6890). Les conditions de la chromatographie restent inchangées sauf le gaz vecteur (dihydrogène). Les molécules sont analysées avec un taux de balayage de masse 2,94/s pour une gamme allant de 50 à 550 m/z. Les spectres ainsi obtenus de chacun des composés sont comparés à ceux issus des bases de données du CNRS, Wiley 275 et Nist 98 pour permettre l'identification de chacune de ces molécules.

VI) Méthode d'analyse des corrélations gènes-parfum

145

Afin de déterminer l'implication potentielle d'un gène dans la biosynthèse d'un (ou plusieurs) composé(s) organique(s) volatil(s), il a été nécessaire de déterminer des pourcentages de corrélation entre l'expression des gènes quantifiés par qPCR dans des pétales d'une fleur épanouie et la production de molécules odorantes analysée par extraction solide/liquide suivie d'une chromatographie en phase gazeuse (CPG-FID et CPG-SM) dans ces mêmes pétales. Cette analyse en composante principale (ACP) basée sur la méthode de corrélation de Spearman, réalisée sur 10 cultivars de roses différant par leurs parfums, s'est faite à l'aide du package Ade4 du programme R Stats (Adobe).

Le diagramme des individus basé uniquement sur les composés organiques volatils permet de classer les cultivars en groupes à odeurs similaires. Le diagramme des variables permet quant à lui d'observer les corrélations entre l'expression d'un gène et la production d'une molécule. Par ailleurs, ces diagrammes sont liés à une matrice quantifiant précisément ces corrélations et permettant donc de supposer l'implication probable d'un gène dans la biosynthèse d'un (ou plusieurs) composés organiques volatils.

VII) Techniques d'expression de protéines recombinantes

A) Conception des différentes constructions des allèles de *RhPAAS*

Afin d'exprimer sélectivement les différentes allèles du gène *RhPAAS* de la phénylacétaldéhyde synthase sous forme simple ou fusionnée, il a été nécessaire de concevoir différentes constructions de chacune d'elle.

Afin de pouvoir insérer les trois allèles de *RhPAAS* dans le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO, le vecteur hybride pYX142 ou un vecteur à bords francs, trois types de construction ont été réalisées :

- pour pENTR/D-TOPO : séquence des allèles possédant en amont une séquence CACC permettant l'insertion directionnelle du gène. Les constructions contiennent ou non les codons start ATG et stop TGA enfin d'envisager différentes fusions.

- pour pYX142 : séquence des allèles possédant en amont une séquence CCGGAATTCGG contenant le site de restriction de EcoRI, et en aval une séquence CCGCTCGAGCGG comprenant le site de restriction de XhoI. Ceci permet d'insérer directionnellement les allèles avec leurs codons start ATG et stop TGA dans le vecteur.

- pour des vecteurs à bords francs, les constructions comprennent uniquement les séquences des allèles entre les codons start ATG et stop TGA.

Par ailleurs, l'allèle *a2* ayant un polymorphisme vis-à-vis des allèles *a1* et *a3* au 14^e nucléotide de la séquence codante, il a été nécessaire d'envisager deux types d'amorces différentes. Celles-ci sont toutes données en annexe 9.

Succinctement, 100 ng d'allèles *a1*, *a2* ou *a3* sont amplifiés par en utilisant les amorces adéquates pour la construction désirée (annexe 9) et la polymérase haute fidélité Phusion Hot Start (Biolabs) selon les instructions du fabricant. La totalité du produit de PCR est analysée par migration sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium afin de vérifier l'amplification d'une séquence spécifique. Les bandes sont alors découpées et les amplicons extraits avec le kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Ces derniers sont ensuite dosés à 260 nm grâce au NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech France).

B) Expression dans *Escherichia coli*

Afin de produire un anticorps dirigé contre la protéine RhPAAS, il a été nécessaire de produire dans un premier temps cette protéine, sous sa forme a1. Pour ceci, la souche BL21-AI, inductible par l'arabinose, a été utilisée. L'étiquette polyhistidine permet ensuite de purifier l'isoforme a1 de RhPAAS sur une colonne de cobalt.

10 ng d'ADN, extrait du meilleur clone de bactéries DH5- α transformées avec le vecteur pDEST17 contenant la séquence de l'allèle *a1*, sont ajoutés à un tube de bactéries BL21-AI One Shot pour transformation : 30 min d'incubation sur glace puis 30 s à 42°C et enfin 2 min sur glace ; 250 μ L de milieu SOC préchauffé sont ajoutés dans chaque tube de bactéries qui sont ensuite mises à incuber à 37°C sous agitation (200 rpm) toute une nuit ; 10 μ L et 200 μ L de bactéries transformées sont étalées sur boîtes de LB-agar additionné d'ampicilline à 50 μ g.mL⁻¹. Les clones ainsi obtenus sont vérifiés par PCR sur colonies et séquencés.

Un clone ainsi obtenu est choisi pour la production de l'allèle *a1* marqué d'une étiquette polyhistidine. Il sert à ensemencer une culture dans du milieu LB liquide additionné d'ampicilline à 50 μ g.mL⁻¹. Celle-ci est cultivée toute une nuit à 37°C jusqu'à ce que la DO_{600nm} atteigne entre 0,6 et 1,0. Elle est alors diluée 20 fois dans du milieu LB liquide additionné d'ampicilline à 50 μ g.mL⁻¹. Elle est à nouveau cultivée à 37°C pendant 2 à 3 heures, jusqu'à ce que la DO_{600nm} atteigne 0,4. Une moitié de culture est induite par addition de L-arabinose à une concentration massique de 0,2%, l'autre moitié de la culture reste non induite. Pour les besoins de la cinétique de production, des fractions de 500 μ L de cultures induites et non-induites sont prélevées toutes les heures pendant 4 h. Les fractions sont ensuite centrifugées à 11000 g pendant 2 min. La lyse des bactéries est réalisée par ajout de 0,5 mL de tampon de lyse (phosphate de potassium 50 mM à pH 7,8 ; NaCl 400 mM ; KCl 100 mM ; glycérol 10% ; Triton X-100 0,5% ; imidazole 10 mM) puis par sonication (plusieurs cycles de 20s sur glace jusqu'à ce que la suspension s'éclaircisse, 40% d'intensité). Les fractions sont ensuite centrifugées 1 min à 11000 g et les surnageants sont séparés des culots. 500 μ L de SDG 2X sont ajoutés aux surnageants et 500 μ L de SDG 1X aux culots. Les surnageants et les culots sont colorés par ajout de bleu de bromophénol, incubés 5 minutes à 95°C et mis à migrer sur un gel de polyacrylamide à 7,5% afin de déterminer le meilleur temps de production et si la protéine se situe dans la fraction soluble ou insoluble.

C) Expression dans *Saccharomyces cerevisiae*

Les tests d'activité des isoformes de RhPAAS ont été réalisés sur une souche de levure *aro10Δ* incapable de produire du phénylacétaldéhyde car étant mutée dans la voie d'Erlich pour la première réaction (Farhi *et al.*, 2010). Il a donc fallu dans un premier temps rendre cette souche compétente afin de pouvoir la transformer, puis de réaliser le test en lui-même.

Une öse de la souche YDR380w prélevée au bord de la colonie (partie en croissance) est resuspendue dans 1 mL d'eau puis centrifugée 5 s à 11 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 mL de LiAc à 100 mM. Les levures sont ainsi incubées 5 min à 30°C. La suspension est à nouveau centrifugée 5 s à 11 000 g et le surnageant éliminé. Sont alors ajoutés au culot 240 µL de PEG à 50%, 36 µL de LiAc à 1 M, 5 µL de sperme de saumon à 10 mg/mL, 10 ng d'ADN plasmidique des meilleurs clones séquencés de pYX142 contenant les allèles de *RhPAAS* et q.s.p. 350 µL d'eau. La suspension est ainsi incubée 20 min à 42°C. Après incubation, celle-ci est centrifugée 10 s à 11 000 g, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 300 µL d'eau. 150 µL sont étalés sur boîte de milieu minimum SD déficient en leucine. Les clones ainsi obtenus sont vérifiés par PCR sur colonies pour la présence d'un allèle de *RhPAAS*.

148

Afin de tester les activités de chacune des isoformes de RhPAAS, les levures transformées sont cultivées dans le montage décrit en figure 12. Une culture stationnaire de levure sert àensemencer une nouvelle culture dans du milieu minimum SD déficient en leucine, incubée toute une nuit à 30°C. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,5, la culture est diluée jusqu'à une DO_{600nm} de 0,2. 25 mL de culture diluée sont placés dans chaque ballon. Le dispositif comporte 3 entrées et sorties d'air et 3 ballons permettant de comparer une souche BY4741 (contrôle positif), une souche YDR380w non transformée (contrôle négatif) et une souche YDR380w transformée avec le vecteur pYX142 contenant un des trois allèles de *RhPAAS*. Les cultures sont réalisées pendant 8h dans une étuve à 30°C. Le parfum est récupéré pendant ces 8h de culture par un courant d'air continu propre (purifié sur charbon actif) sur une cartouche de Porapak Q (50/80) (Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA). Les molécules odorantes sont ensuite éluées de la cartouche par 5 mL d'hexane. Parallèlement, le parfum de 15 mL de culture de levures est extrait par ajout de 5 mL d'hexane et mélangé, la phase organique est récupérée après décantation. 500µL d'une solution de camphre à 10 mg/L dans l'hexane sont ajoutée pour étalon interne dans chacun des produits d'extraction du

parfum (headspace et extraction liquide/liquide). Ces extraits sont analysés pour leur composition selon la méthode décrite en matériel et méthode IV) C).

D) Expression *in planta*

En plus des tests d'activité des isoformes de RhPAAS chez la levure, des tests ont eu lieu *in planta* afin d'anticiper d'éventuels changements d'activité liés à une maturation de la protéine chez le rosier qui n'aurait probablement pas lieu chez la levure. Il a donc été convenu de réaliser ces tests en expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana* donnant ainsi des résultats rapides, et en surexpression stable chez *R. chinensis* cv. 'Old Blush', résultats plus longs à obtenir mais plus fiables quant à l'activité réelle des isoformes.

1) Préparation des agrobactéries compétentes

Les tabacs et les rosiers sont ici infiltrés par la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens*. Il a donc été nécessaire de transformer cette souche avec les allèles de *RhPAAS* par électroporation. Dans le vecteur pk7WGF2 utilisé ici, les isoformes sont fusionnées à la protéine fluorescente GFP ainsi de marquer les cellules effectivement transformées qui seront ainsi sélectionnées. Un μg d'ADN, extrait des meilleurs clones de bactéries DH5- α transformées avec le vecteur pk7WGF2 contenant les séquences des allèles *a1*, *a2* et *a3*, est ajouté à un tube d'agrobactéries EHA105 pour transformation : le mélange est placé dans une cuvette d'électroporation (espacement des électrodes : 1 mm) et électroporé à 2,2 kV ; 700 μL de milieu LB liquide préchauffé sont ajoutés dans chaque tube d'agrobactéries qui sont ensuite mises à incuber à 28°C sous agitation (200 rpm) pendant 2 h ; 10 μL et 200 μL d'agrobactéries transformées sont étalées sur boîtes de LB-agar additionné de rifampicine à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et de spectinomycine à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les clones ainsi obtenus sont vérifiés par PCR sur colonies et séquencés.

2) Expression transitoire de *a1*, *a2* et *a3* chez *Nicotiana benthamiana*

Des cultures liquides de LB additionné de rifampicine à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et de spectinomycine à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sontensemencées avec les meilleurs clones des souches d'agrobactéries EHA105 contenant les allèles du gène *RhPAAS*. Une culture liquide de la souche contenant le vecteur p19/pBIN est aussi préparée en parallèle. Ces cultures sont incubées une nuit à 28°C et 200 rpm. Le lendemain, les cultures sont diluées jusqu'à une

DO_{600nm} de 0,3 et remises à incuber jusqu'à ce que la DO_{600nm} atteigne 0,5. Les bactéries sont culottées par 10 min de centrifugation à 20°C et 3500 rpm. Le culot est lavé avec 3 mL de milieu d'induction (MES 50 mM ; NaH₂PO₄ 2 mM ; acétylsyringone 200 µM ; glucose 0,5% w/v ; pH 5,6) pour 15 mL de culture initiale. Les bactéries sont à nouveau culottées par 10 min de centrifugation à 20°C et 3500 rpm. Le culot est repris dans 12 mL de milieu d'induction pour 15 mL de culture initiale. Chaque souche contenant l'allèle d'intérêt est mélangée avec un volume égal de souche P19/pBIN, et incubée 2 h à température ambiante. Enfin, chaque culture est inoculée à l'aide d'une seringue à travers l'épiderme inférieur des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Ces dernières sont récoltées 4 jours plus tard, les zones injectées sont découpées et le parfum en est extrait par l'hexane et analysé par CPG-FID et CPG-SM.

3) Expression stable de a1, a2 et a3 chez *Rosa chinensis* cv. 'Old Blush'

Alternativement à l'expression transitoire en tabac, des rosiers (*Rosa chinensis* cv. 'Old Blush') ont aussi été infiltrés avec les mêmes clones d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Cette transformation a été réalisée avec le protocole publié par Vergne *et al.* (2010). Elle permet de surexprimer de manière stable les isoformes *a1*, *a2* et *a3* de RhPAAS dans le rosier. Le parfum a été extrait des cals ainsi obtenus par l'hexane et analysé par CPG-FID et CPG-SM.

VIII) Obtention et caractérisation de rosiers transgéniques

A) Obtention des plantes transgéniques

Le protocole appliqué ici est celui couramment utilisé au laboratoire et publié par Vergne *et al.* (2010). Succinctement, des cultures liquides de LB additionné de spectinomycine à 50 µg.mL⁻¹ sontensemencées avec les meilleurs clones des souches d'agrobactéries EHA105 contenant les allèles du gène *RhPAAS*. Ces cultures sont incubées une nuit à 28°C et 200 rpm. Parallèlement, des bouquets d'embryons somatiques sont excisés des cals embryogènes et cultivés sur milieu EMM (embryogenic callus maintenance medium). Le lendemain, la virulence des agrobactéries est induite par dilution au 1/20 dans du milieu minimum MinA et incubation 2 h à 28°C, 100 rpm. Pendant ce temps, les embryons excisés la

veille sont blessés sur sable de mer stérile par agitation 2 fois 2 min à 400 rpm et rincés avec du MinA stérile. Les embryons sont alors co-cultivés avec les agrobactéries induites pendant 1 h à température ambiante et 60 rpm. Ils sont ensuite séchés sur papier filtre et cultivés pendant 2 jours à l'obscurité sur milieu SIM (shoot inducing medium). Afin d'éliminer l'excédent d'agrobactéries, ils sont alors lavés plusieurs fois par agitation 1 min à 250 rpm dans de l'eau stérile additionné de céphotaxime à 500 mg.L⁻¹ et de carbénicilline à 50 mg.mL⁻¹, puis séchés sur papier filtre. Ils sont ensuite à nouveau cultivés pendant 4 semaines sur milieu SIM additionné de céphotaxime à 500 mg.L⁻¹ et de carbénicilline à 50 mg.mL⁻¹, puis repiqués toutes les 3 semaines sur milieu EMM additionné de kanamycine à 30 mg.L⁻¹ et de timentine[™] à 150 mg.L⁻¹.

B) Southern blot

Afin de déterminer le nombre d'insertion du transgène dans les rosiers transformés (lignées ARN interférents), les ADN génomiques sont analysés par southern blot. 12 µg d'ADN_g sont digérés sur une nuit par 10 unités d'enzymes de restriction. 3 enzymes ont été testées : EcoRI, HindIII et XhoI. Le lendemain, le produit de digestion est précipité par 15 min d'incubation à -20°C dans 500 µL d'une solution de NaAc 120 mM dans l'éthanol puis centrifugation à 16 000 g pendant 20 min. Les ADN_g digérés sont ensuite lavés 2 fois avec 500 µL d'éthanol 70% et centrifugés 20 min à 16 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN_g est mis à sécher à température ambiante.

Les ADN_g digérés sont ensuite mis à migrer une nuit à 40 V sur un gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium. Le gel est dépuriné par une immersion de 10 min sous agitation dans une solution d'HCl 125 mM, rincé à l'eau distillée, dénaturé par un bain de 30 min sous agitation dans une solution de NaOH 0,5 M et de NaCl 1,5 M, rincé à nouveau dans de l'eau distillée, puis neutralisé par 30 min d'immersion dans une solution de NaCl 1,5 M et de Tris 0,5 M à pH 7,5. Les ADN_g sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose pendant 5 h avec du tampon SSC 20X. Les ADN_g sont fixés sur la membrane par un traitement aux UV. Celle-ci est ensuite préhybridée 30 min à 42°C par du tampon DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) puis hybridée toute une nuit à 42°C par une solution de ce même tampon contenant 10 µL de sonde spécifique à l'insert et marquée à la digoxygénine (produite avec le kit PCR DIG Probe synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) selon le protocole du fabricant). La membrane

est ensuite lavée 2 fois 5 min à température ambiante avec du tampon SSC 2X, SDS 0,1X, 2 fois 15 min à 68°C avec du tampon SSC 0,1X, SDS 0,1 X, et 2 minutes à température ambiante dans un tampon acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M, tween 20 0,3% (V/V), pH 7,5. Elle est bloquée 30 min à température ambiante par du Blocking reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) dilué dans un tampon acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5. L'anticorps lié à la phosphatase alcaline (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne)) est ensuite fixé par 30 min d'incubation à température ambiante. La membrane est à nouveau lavée 2 fois 15 min à température ambiante avec un tampon acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M, tween 20 0,3% (V/V), pH 7,5, puis incubée 3 min à température ambiante dans du tampon de détection tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 9,5. Enfin, elle est révélée en ajoutant le substrat de la phosphatase alcaline (Amersham CDP-star Detection Reagent (GE Healthcare UK, Little Chalfont, UK)) avec différents temps d'exposition sur film photographique. L'apparition de bandes permet de connaître pour chaque lignée le nombre minimum d'insertions du transgène dans le génome des rosiers transformés.

C) Greffage de rosiers

152

Afin de vérifier que la sur(ou sous)-production d'un (ou plusieurs) composé(s) est effectivement due à l'ARN interférent dirigé contre *RhNUDX1*, des bourgeons de rosiers non transformés (*Rosa chinensis* cv. 'Old Blush') ont été greffés sur des boutures des lignées ARN interférents selon la méthode de l'écusson. Le but était de tester si l'ARN interférent peut être transmis du porte-greffe (lignée transformée) vers le greffon (rosier sauvage), jouant pleinement son rôle dans les fleurs de ce dernier sans influence d'un potentiel effet de position de l'insert. Les composés organiques volatils synthétisés et l'expression du gène *RhNUDX1* dans les pétales des fleurs des greffons ont été analysés avec les techniques précédemment citées : qPCR et extraction solide/liquide suivie des CPG-FID et CPG-SM.

IX) Techniques d'analyse des protéines

Afin de détecter la présence de la protéine *RhPAAS* et de ses différentes isoformes dans les pétales de rosiers à différents stades de développement et dans plusieurs contextes

alléliques de *RhPAAS*, il a été nécessaire dans un premier temps de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre cette protéine puis de réaliser des western blots sur différents extraits de pétales.

A) Production d'anticorps anti-*RhPAAS*

1) Production de l'isoforme a1 de *RhPAAS*

Le clone utilisé précédemment pour la cinétique de production de l'isoforme a1 est utilisé pour ensemercer une culture liquide dans du milieu LB additionné d'ampicilline à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Celle-ci est cultivée toute une nuit à 37°C jusqu'à ce que la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteigne entre 0,6 et 1,0. Elle est alors diluée 20 fois dans du milieu LB liquide additionné d'ampicilline à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Elle est à nouveau cultivée à 37°C pendant 2 à 3 heures, jusqu'à ce que la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteigne 0,4. 50 mL de culture est induite par addition de L-arabinose à une concentration massique de 0,2%. Cette phase de production dure 4 h. La totalité de la culture est ensuite centrifugée à 11000 g pendant 2 min. La lyse des bactéries est réalisée par ajout de 2 mL de tampon de lyse (phosphate de potassium 50 mM à pH 7,8 ; NaCl 400 mM ; KCl 100 mM ; glycérol 10% ; Triton X-100 0,5% ; imidazole 10 mM) puis par sonication (plusieurs cycles de 20s sur glace jusqu'à ce que la suspension s'éclaircisse, 40% d'intensité).

Les protéines portant une étiquette polyhistidine, peuvent être purifiées sur une colonne de nickel ou de cobalt. Elles sont ici purifiées sur une résine de cobalt Talon Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) selon les instructions du fabricant. Succinctement, 100 μL de résine resuspendue sont centrifugés 2 min à 700 g et le surnageant est éliminé. La résine est équilibrée 2 fois par ajout de 1 mL de tampon d'équilibration/lavage et 2 min de centrifugation à 700 g. Les 2 mL de lyse cellulaire sont ajoutés au culot de résine et sont agités pendant 20 min à température ambiante. La suspension est alors centrifugée 5 min à 700 g et le surnageant est éliminé. La résine est lavée 2 fois avec 2 mL de tampon d'équilibration/lavage, centrifugée 5 min à 700 g et le surnageant est éliminé. 100 μL de tampon d'équilibration/lavage sont à nouveau ajoutés au culot de résine afin de la resuspendre et de la transférer sur une colonne gravimétrique. La résine en place est lavée avec 500 μL de tampon d'équilibration/lavage. Enfin, l'isoforme a1 de *RhPAAS* est éluée de la résine avec 500 μL de tampon d'éluion. La pureté du produit d'éluion est analysée sur gel de polyacrylamide à 7,5% coloré au bleu de coomassie et

l'intégrité de l'isoforme a1 de *RhPAAS* par western blot avec un anticorps dirigé contre l'étiquette polyhistidine.

2) Production d'anticorps anti-*RhPAAS*

Afin de produire un anticorps anti-*RhPAAS*, l'isoforme a1 purifiée de *RhPAAS* a été injectée dans des souris (expérience réalisée par Judit Szecsi au PBES-Lyon). Cinq souris ont reçues quatre injections de 100 μL d'une solution de l'isoforme a1 à 0,2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ dans du PBS, chacune espacée de 3 semaines. Environ 50 μL de sérum sont prélevés sur chaque souris avant injection pour contrôler la production d'anticorps et leur spécificité. En fin d'expérience, 4 semaines après la dernière injection, 150 μL de sérum sont prélevés sur les souris qui sont tuées. Les différents prélèvements sont analysés par western blot pour la spécificité de leurs anticorps polyclonaux sur une fraction de l'isoforme a1 purifiée, puis sur un extrait de protéines totales de pétales de *R. \times hybrida* cv. 'Papa Meilland'.

B) Suivi de la présence de *RhPAAS* par western blot au cours de la floraison de la population Hw

154

Afin de déterminer la présence des différentes isoformes de *RhPAAS* au cours du développement floral et dans plusieurs contextes alléliques du gène *RhPAAS*, des extraits de protéines totales ont été réalisés aux stades de développement définis en matériel et méthode I) A) 2) chez les parents de la population hybride Hw (*R. \times wichuraiana* et *R. \times hybrida* cv. 'H190') ainsi que quatre descendants, deux émettant du 2-phényléthanol (*R. \times hybrida* Hw24 et Hw530) et les deux autres non (*R. \times hybrida* Hw68 et Hw149). Des pétales à différents stades du développement floral sont prélevés sur les différents rosiers, placés dans un tube eppendorf de 2 mL, puis plongés dans l'azote liquide. 3,3 μL de SDS sont ajoutés par mg de pétales frais. Les échantillons sont broyés au mortier en pratiquant 3 cycles de décongélation/congélation afin d'incorporer le tampon de manière homogène. Ils sont ensuite dénaturés par 5 min d'incubation à 95°C et centrifugés 20 min à 4°C et 18 000 g. Le surnageant est récupéré et à nouveau centrifugé 5 min à 4°C et 18 000 g. Le surnageant est récupéré et aliquoté en fraction de 50 μL . Une fraction de ces extraits totaux de protéines est analysée par western blot pour la présence des isoformes de *RhPAAS*, en utilisant les anticorps polyclonaux anti-*RhPAAS* produit précédemment.

Bibliographie

- Achkar J., Xian M., Zhao H. & Frost J. W.** – 2005 – Biosynthesis of phloroglucinol – *Journal of the American Chemical Society*, 127: 5332-5333
- Achuthan C. R., Babu B. H. & Padikkala L.** – 2003 – Antioxidant and hepatoprotective effects of *Rosa damascena* – *Pharmaceutical Biology*, 41: 357-361
- Adiwilaga K. & Kush A.** – 1996 – Cloning and characterization of a cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) – *Plant Molecular Biology*, 30: 935-946
- Aharoni A., Giri A. P., Deuerlein S., Griepink F., de Kogel W.-J., Verstappen F. W. A., Verhoeven H. A., Jongma M. A., Schwab W. & Bouwmeester H. J.** – 2003 – Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants – *The Plant Cell*, 15: 2866-2884
- Aharoni A., Giri A. P., Verstappen F. W. A., Berteaux C. M., Sevenier R., Sun Z., Jongma M. A., Schwab W. & Bouwmeester H. J.** – 2004 – Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species – *The Plant Cell*, 16: 3110-3131
- Ahmed M. A., El-Mawla A. & Beerhues L.** – 2002 – Benzoid acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* – *Planta*, 214: 727-733
- Aros D., Gonzalez V., Allemann R. K., Müller C. T., Rosati C. & Rogers H. J.** – 2012 – Volatile emissions of scented *Alstroemeria* genotypes are dominated by terpenes, and a myrcene synthase gene is highly expressed in scented *Alstroemeria* flowers – *Journal of Experimental Botany*, 63: 2739-2752
- Attucci S., Aitken S. M., Ibrahim R. K. & Gulick P. J.** – 1995a – A cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase in white lupin – *Plant Physiology*, 108: 835-836
- Attucci S., Aitken S. M., Gulick P. & Ibrahim R. K.** – 1995b – Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein – *Archives of the Biochemistry and Biophysics*, 321: 493-500
- Babu K. G. D., Singh B., Joshi V. P. & Singh V.** – 2002 – Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures – *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 136-140
- Bach T. J. & Lichtenthaler H. K.** – 1982a – Inhibition by mevalonin of mevalonate formation and plant root elongation – *Naturwissenschaften*, 69: 242-243
- Bach T. J. & Lichtenthaler H. K.** – 1982b – Mevalonin: a highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of radish plants - *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Biosciences*, 37: 46-50
- Bach T. J., Boronat A., Caelles C., Ferrer A., Weber T. & Wettstein A.** – 1991 – Aspects related to mevalonate biosynthesis in plants – *Lipids*, 26: 637-638
- Banay, S.** – 2006 – Most expensive perfumes – *Forbes*, 2 March 2006

Banthorpe D. V., Le Patourel G. N. & Francis M. J. O. – 1972 – Biosynthesis of geraniol and nerol and their b-D-glucosides in *Pelargonium graveolens* and *Rosa dilecta* – *Biochemistry Journal*, 130: 1045-1054

Basim E. & Basim H. – 2003 – Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil – *Fitoterapia*, 74: 394-396

Baydar H. & Baydar N. G. – 2005 – The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.) – *Industrial Crops and Products*, 21: 251-255

Ben Zvi M., Shklarman E., Masci T., Kalev H., Debener T., Shafir S., Ovadis M. & Vainstein A. – 2012 – *PAP1* transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers – *New Phytologist*, 195: 335-345

Bergougnoux V. – 2005 – Biosynthèse et sécrétion du parfum chez *Rosa × hybrida* L., 214 p. – Thèse: Biologie Végétale: Université Jean Monnet de Saint Etienne (France)

Bergougnoux V., Caissard J.-C., Jullien F., Magnard J.-L., Scalliet G., Cock J. M., Hugueney P. & Baudino S. – 2007 – Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds – *Planta*, 226: 853-866

Bessman M. J., Frick D. N. & O'Handley S. F. – 1996 – The MutT proteins or “nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, ‘housecleaning’ enzymes – *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 25059-25062

156
Bianchi G., Nuzzi M., Leva A. A. & Rizzolo A. – 2007 – Development of a headspace-solid phase micro extraction method to monitor changes in volatile profile of rose (*Rosa hybrida*, cv David Austin) petals during processing – *Journal of Chromatography A*, 1150: 190-197

Blanc V. M. & Pichersky E. – 1995 – Nucleotide sequence of a *Clarkia breweri* cDNA clone of *Ip11*, a gene encoding isopentenyl pyrophosphate isomerase – *Plant Physiology*, 108: 855-856

Bouvier F., d'Harlingue A., Suire C., Bakhaus R. A. & Camara B. – 1998 – Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits – *Plant Physiology*, 117: 1426-1431

Bouvier F., Suire C., d'Harlingue A., Backhaus R. A. & Camara B. – 2000 – Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells – *The Plant Journal*, 24: 241-252

Bouvier F., Rahier A. & Camara B. – 2005 – Biogenesis, molecular and function of plant isoprenoids – *Progress in Lipid Research*, 44: 357-429

Burke C. C., Wildung M. R. & Croteau R. – 1999 – Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 13062-13067

Burke C. & Croteau R. – 2002a – Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression, and characterization – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405: 130-136

Burke C. & Croteau R. – 2002b – Interaction with the small subunit of geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of geranylgeranyl diphosphate synthase to produce geranyl diphosphate – *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 3141-3149

Busso D., Delagoutte-Busso Bnd., & Moras D. – 2005 – Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli* – *Analytical Biochemistry*, 343: 313-321

Caissard J.-C., Joly C., Bergougnoux V., Hugueney P., Mauriat M. & Baudino S. – 2004 – Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants – *Recent Research Developments in Cell Biology*, 2: 1-15

Caissard J.-C., Bergougnoux V., Martin M., Mauriat M. & Baudino S. – 2006 – Chemical and histochemical analysis of ‘Quatre Saisons Blanc Mousseux’, a moss rose of the *Rosa × damascena* group – *Annals of Botany*, 97 : 231-238

Caissard J.-C., Baudino S. & Hugueney P. – 2009 – Le parfum des roses – *Pour la Science*, 376: 56-61

Campbell M., Hahn F. M., Poulter C. D. & Leustek T. – 1997 – Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana* – *Plant Molecular Biology*, 36: 323-328

Carretero-Paulet L., Ahumada I., Cunillera N., Rodríguez-Concepción M., Ferrer A., Boronat A. & Campos N. – 2002 – Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway – *Plant Physiology*, 129: 1581-1591

Casparie W. A., Mooks-Kamps B., Palfenier-Wegter R. M., Struijk P. C. & van Zeist W. – 1977 – The Palaeobotany of Swifterbant – *Helinium Wetterren*, 17: 28-55

Cervantes-Cervantes M., Gallagher C. E., Zhu C. & Wurtzel E. T. – 2006 – Maize cDNAs expressed in endosperm encode functional farnesyl diphosphate synthase with geranylgeranyl diphosphate synthase activity – *Plant Physiology*, 141: 220-231

Chan W.-S., Abdullah J. O., Namasivayam P. & Mahmood M. – 2009 – Molecular characterization of a new 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) transcript from *Vanda Mimi* Palmer – *Scientia Horticulturae*, 121: 378-382

Chan W.-S., Abdullah J. O. & Namasivayam P. – 2011 – Isolation, cloning and characterization of fragrance-related transcripts from *Vanda Mimi* Palmer – *Scientia Horticulturae*, 127: 388-397

Channelière S., Rivière S., Scalliet G., Szecsi J., Jullien F., Dolle C., Vergne P., Dumas C., Bendahmane M., Hugueney P. & Cock J. M. – 2002 – Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags – *FEBS letters*, 515: 35-38

Chen A., Kroon P. A. & Poulter C. D. – 1994 – Isoprenyl diphosphate synthases: Protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of a secondary structure – *Protein Science*, 3: 600-607

Chen X. Y., Chen Y., Henstein P. & Davission V. J. – 1995 - Cloning, expression and characterization of (+)- δ -cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 324: 255–266

Chen X. Y., Wang M. S., Chen Y., Davission V. J. & Henstein P. – 1996 – Cloning and heterologous expression of a second cotton (+)- δ -cadinene synthase – *Journal of Natural Products*, 59: 944–951

Chen F., Tholl D., D’Auria J. C., Farooq A., Pichersky E. & Gershenzon J. – 2003 – Biosynthesis and emission of terpenoid volatils from *Arabidopsis* flowers – *The Plant Cell*, 15: 481-494

Chen F., Tholl D., Bohlmann J. & Pichersky E. – 2011a – The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom – *The Plant Journal*, 66: 212-229

Chen X.-M., Kobayashi H., Sakai M., Hirata H., Asai T., Ohnishi T., Baldermann S. & Watanabe N. – 2011b – Functional characterization of rose phenylacetaldehyde reductase (PAR), an enzyme involved in the biosynthesis of the scent compound 2-phenylethanol – *Journal of Plant Physiology*, 168: 88-95

Choi D., Ward B. L. & Bostock R. M. – 1992 – Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid – *The Plant Cell*, 4: 1333-1344

158 **Clastre M., Bantignies B., Feron G., Soler E. & Ambid C.** – 1993 – purification and characterization of geranyl diphosphate synthase from *Vitis vinifera* L. cv. Muscat de Frontignan cell cultures – *Plant Physiology*, 102: 205-211

Collin H. A. – 2003 – Extraction and industrial processes – *Encyclopedia of Rose Science*. Ed. par Roberts A., Debener T. & Gudin S.. London: Academic Press, pp. 726-735

Colquhoun T. A., Schwieterman M. L., Wedde A. E., Schimmel B. C. J., Marciniak D. M., Verdonk J. C., Kim J. Y., Oh Y., Gális I., Baldwin I. T. & Clark D. G. – 2011a – EOBII controls flower opening by functioning as a general transcriptomic switch – *Plant Physiology*, 156: 974-984

Colquhoun T. A., Kim J. Y., Wedde A. E., Levin L. A., Schmitt K. C., Schuurink R. C. & Clark D. G. – 2011b – *PhMYB4* fine-tunes the floral volatile signature of *Petunia × hybrida* through *PhC4H* – *Journal of experimental Botany*, 62: 1133-1143

Crespel L., Chirollet M., Durel C.E., Zhang D., Meynet J. & Gudin S. – 2002 – Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers – *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 1207-1214

Croteau R. & Krap. F. – 1991 – Origin of natural odorants – *Perfumes, Art, Science and Technology*. Ed. par Müller PM. & Lamparsky D.. London: Elsevier Applied Science, pp. 101-126

Cseke L., Dudareva N. & Pichersky E. – 1998 – Structure and evolution of linalool synthase – *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1491-1498

Cunillera N., Arró M., Delourme D., Karst F., Boronat A. & Ferrer A. – 1996 – *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes – *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 7774-7780

Cunillera N., Boronat A. & Ferrer A. – 1997 – The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform – *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 15381-15388

Cunningham F. X. Jr. & Gantt E. – 2000 – Identification of mutli-gene families encoding isopentenyl disphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli* – *Plant Cell Physiology*, 41: 119-123

D'Auria J. C., Chen F. & Pichersky E. – 2002 – Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damage leaves of *Clarkia breweri* – *Plant Physiology*, 130: 466-476

Dafny-Yelin M., Guterman I., Menda N., Ovadis M., Shalit M., Pichersky E., Zamir D., Lewinsohn E., Adam Z., Weiss D. & Vainstein A. – 2005 – Flower proteome: changes in protein spectrum during the advanced stages of rose petal development – *Planta*, 222: 37-46

David R. & Carde J. P. – 1964 - Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif nadi – *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, 258: 1338-1340.

DeCock K. – 2008 – Genetic diversity of wild roses (*Rosa* spp.) in Europe, with an in-depth morphological study of Flemish populations. 239 p. – Thèse: Biologie Végétale: Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University (Belgique)

Degenhardt J., Köllner T. G. & Gershenzon J. – 2009 – Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants – *Phytochemistry*, 70: 1621-1637

Dexter R., Qualley A., Kish C. M., Ma C.J., Koeduka T., Nagegowda D. A., Dudareva N., Pichersky E. & Clark D. – 2007 – Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol – *The Plant Journal*, 49: 265-275

Diallinas G. & Kanellis A. K. – 1994 – A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding – *Plant Molecular Biology*, 26: 273-279

Dobrzanska M., Szurmak B., Wyslouch-Cieszynska A. & Kraszewska E. – 2002 – Cloning and characterization of the first member of the nudix family from *Arabidopsis thaliana* – *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 50482-50486

Dobson H. E. M. – 1987 – Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees – *Oecologia*, 72: 618-623

Dobson H. E. M. – 1988 – Survey of pollen and pollenkitt lipids: chemicals cues to flower visitors? – *American Journal of Botany*, 75: 170-182

Dobson H. E. M., Bergström G. & Groth I. – 1990 – Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae) – *Israel Journal of Botany*, 39: 143-156

Dobson H. E. M. & Bergström G. – 2000 – The ecology and evolution of pollen odors – *Plant Systematics and Evolution*, 222: 63-87

Dobson H. E. M., Bergström J., Bergström G. & Groth I. – 1987 – Pollen and flower volatiles in two *Rosa* species – *Phytochemistry*, 26: 3171-3173

Dobson H. E. M., Danielson E. M. & Van Wesep I. D. – 1999 – Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae) – *Plant Species Biology*, 14: 153-166

Dogbo O. & Camara B. – 1987 – Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography – *Biochimica et Biophysica Acta*, 920: 140-148

Dubois A., Remay A., Raymond O., Balzergue S., Chauvet A., Maene M., Pécrix Y., Yang S.-H., Jeauffre J., Thouroude T., Boltz V., Martin-Magniette M.-L., Janczarski S., Legeai F., Renou J.-P., Vergne P., Le Bris M., Foucher F. & Bendahmane M. – 2011 – Genomic approach to study floral development genes in *Rosa* sp. – *PLOS One*, 6: e28455

Dubois A., Carrere S., Raymond O., Pouvreau B., Cottret L., Roccia A., Onesto J.-P., Sakr S., Atanassova R., Baudino S., Foucher F., Le Bris M., Gouzy J. & Bendahmane M. – 2012 – Transcriptome database resource and gene expression atlas for the rose – *BMC Genomics*, 13:638. DOI:10.1186/1471-2164-13-638

160

Dudareva N., D'Auria J. C., Nam K. H., Raguso R. A. & Pichersky E. – 1998 – Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase – an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri* – *The Plant Journal*, 14: 297-304

Dudareva N. & Pichersky E. – 2000 – Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents – *Plant Physiology*, 122: 627-633

Dudareva N., Martin D., Kish C. M., Kolosova N., Gorenstein N., Fäldt J., Miller B. & Bohlmann J. – 2003 – (*E*)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily – *The Plant Cell*, 15: 1227-1241

Dudareva N., Andersson S., Orlova I., Gatto N., Reichelt M., Rhodes D., Boland W. & Gershenzon J. – 2005 – The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers – *Proceedings of the National Academy of Science*, 102: 933-938

Dunphy P. J. & Allcock C. – 1972 – Isolation and properties of a monoterpene reductase from rose petals – *Phytochemistry*, 11: 1887-1891

Dunphy P. J. – 2006 – Location and biosynthesis of monoterpenyl fatty acyl esters in rose petals – *Phytochemistry*, 67: 1110-1119

Dyer J. H., Maina A., Gomez I. D., Cadet M., Oeljeklaus S. & Schiedel A. C. – 2009 – Cloning, expression and purification of an acetoacetyl CoA thiolase from sunflower cotyledon – *International Journal of Biological Sciences*, 5: 736-744

Edqvist J., Rönnberg E., Rosenquist S., Blomqvist K., Viitanen L., Salminen T. A., Nylund M., Tuuf J. & Mattjus P. – 2004 – Plants express a lipid transfer protein with high similarity to mammalian sterol carrier protein-2 – *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 53544-53553

Enjuto M., Balcells L., Campos N., Caelles C., Arró M. & Boronat A. – 1994 – *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 927-931

Enjuto M., Lumbreras V., Marín C. & Boronat A. – 1995 – Expression of the *Arabidopsis HMG2* gene, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues – *The Plant Cell*, 7: 517-527

Eriksson T., Hibbs M. S., Yoder A. D., Delwiche C. F., & Donoghue M. J. – 2003 – The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the *TRNL/F* region of chloroplast DNA – *International Journal of Plant Sciences*, 164: 197–211

Erlanson E. W. – 1938 – Phylogeny and polyploidy in *Rosa* – *New Phytologist*, 37: 72-81

Estévez J., Cantero A., Reindl A., Reichler S. & León P. – 2001 – 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants – *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 22901-22909

Farhi M., Lavie O., Masci T., Hendel-Rahmanim K., Weiss D., Abeliovich H. & Vainstein A. – 2010 – Identification of rose phenylacetaldehyde synthase by functional complementation in yeast – *Plant Molecular Biology*, 72: 235-245

Farooq A., Khan M. A., Ali A. & Riaz A. – 2011 – Diversity of morphology and oil content of *Rosa damascena* landraces and related *Rosa* species from Pakistan – *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 48: 177-183

Feron G., Clastre M. & Ambid C. – 1990 – Prenyltransferase compartmentation in cells of *Vitis vinifera* cultivated in vitro – *FEBS letters*, 271: 236-238

Flament I., Debonneville C. & Furrer A. – 1993 – Volatile constituents of roses: Characterization of cultivars based on the headspace analysis of living flower emission – *Bioactive volatile compounds from plants*. Ed. par Teranishi, R., Buttery R. G. & Sugisawa H.. Washington DC: American Chemical Society. pp. 269-281

Fournier P. – 2000 – Les quatre flores de France – Ed. Paris: Dunod, 1103 pp.

FranceAgriMer – 2011 – Végétaux d'intérieur/Achats des Français en 2010 – FranceAgriMer [en ligne]. Disponible sur :

http://www.franceagrimer.fr/content/download/6888/39662/file/horti_interieur_2011.pdf

Francis M. J. O. & Allcock C. – 1969 – Geraniol β -D-glucoside: occurrence and synthesis in rose flowers – *Phytochemistry*, 8: 1339-1347

Friesen J. A. & Rodwell V. W. – 2004 – The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases – *Genome Biology*, 5: 248

Fukuchi-Mizutani M., Ishiguro K., Nakayama T., Utsunomiya Y., Tanaka Y., Kusumi T. & Ueda T. – 2000 – Molecular and functional characterization of a rose lipoxygenase cDNA related to flower senescence – *Plant Science*, 160: 129-137

Gabelli S.B., Bianchet M.A., Azurmendi H.F., Xia Z., Sarawat V., Mildvan A.S., & Amzel L.M. – 2004 – Structure and Mechanism of GDP-Mannose Glycosyl Hydrolase, a Nudix Enzyme that Cleaves at Carbon Instead of Phosphorus – *Structure*, 12: 927-935

Gao S., Lin J., Liu X., Deng Z., Li Y., Sun X. & Tang K. – 2006 – Molecular cloning, characterization and functional analysis of a 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase gene from *Ginkgo biloba* – *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 502-510

Garnero J. – 1976 – Sur la composition des huiles essentielles et absolues de rose bulgare (*Rosa damascena* Mill.). Revue de la littérature – *Revista Italiana Essenza, Profumi, Piante Officinali, Olii Vegetali, Saponi*, 58: 548-552

Gonda I., Bar E., Portnoy V., Lev S., Burger J., Schaffer A. A., Tadmor Y., Gepstein S., Giovannoni J. J., Katzir N. & Lewinsohn E. – 2010 – Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit – *Journal of Experimental Botany*, 61: 1111-1123

Grover C. E., Gallagher J. P., Szadkowski E. P., Yoo M. J., Flagel L. E. & Wendel J. F. – 2012 – Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploids – *New Phytologist*, 196: 966-971

Gudin S. – 2000 – Rose: genetics and breeding – *Plant Breeding Reviews*, 17: 159-189

Guirimand G., Guihur A., Phillips M. A., Oudin A., Glévarec G., Melin C., Papon N., Clastre M., St-Pierre B., Rodríguez-Concepción M., Burlat V. & Courdavault V. – 2012 – A single gene encodes isopentenyl diphosphate isomerase isoforms targeted to plastids, mitochondria and peroxysomes in *Catharanthus roseus* – *Plant Molecular Biology*, 79: 443-459

Guo M., Rupe M. A., Zinselmeier C., Habben J., Bowen B. A. & Smith O. S. – 2004 – Allelic variation of gene expression in maize hybrids – *The Plant Cell*, 16: 1707-1716

Guoliang W. – 2003 – Ancient Chinese roses – *Encyclopedia of Rose Science*. Ed. par Roberts A., Debener T. & Guadin S.. London: Academic Press, pp. 111-117

Gutensohn M., Klempien A., Kaminaga Y., Nagegowda D. A., Negre-Zakharov F., Huh J.-H., Luo H., Weizbauer R., Mengiste T., Tholl D. & Dudareva N. – 2011 – Role of aromatic aldehyde synthase in wounding/herbivory response and flower scent production in different *Arabidopsis* ecotypes – *The Plant Journal*, 66: 591-602

Guterman I., Shalit M., Menda N., Piestun D., Dafny-Yelin M., Shalev G., Bar E., Davydov O., Ovadis M., Emanuel M., Wang J., Adam Z., Pichersky E., Lewinsohn E., Zamir D., Vainstein A. & Weiss D. – 2002 – Genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes – *The Plant Cell*, 14: 2325-2338

Guterman I., Masci T., Chen X., Negre F., Pichersky E., Dudareva N., Weiss D. & Vainstein A. – 2006 – Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants: rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers – *Plant Molecular Biology*, 60: 555-563

Hampel D., Mosandl A. & Wüst M. – 2006 – Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in strawberry fruits and foliage: ²H labeling studies – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1473-1478

Hayashi S., Yagi K., Ishikawa T., Kawasaki M., Asai T., Picone J., Turnbull C., Hiratake J., Sakata K., Takada M., Ogawa K. & Watanabe N. – 2004 – Emission of 2-phenylethanol from its β-D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [2H8] L-phenylalanine in rose flowers – *Tetrahedron*, 60: 7005-7013

Hans J., Hause B., Strack D. & Walter M. H. – 2004 – Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize – *Plant Physiology*, 134: 614-624

Hazelwood L. A., Daran J.-M., van Maris A. J. A., Pronk J. T. & Dickinson J. R. – 2008 – The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism – *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2259-2266

Hecquet R. – 2010 – Caractérisation du gène *RhDIF1* exprimé spécifiquement dans les pétales de roses parfumées – Thèse: Biologie Végétale: Université Jean Monnet de Saint Etienne (France).

Helsper J. P. F. G., Davies J. A., Bouwmeester H. J., Krol A. F. & van Kampen M. H. – 1998 – Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* L. cv. Honesty – *Planta*, 207: 88-95

Hendel-Rahmanim K., Masci T., Vainstein A. & Weiss D. – 2007 – Diurnal regulation of scent emission in rose flowers – *Planta*, 226: 1491-1499

Hibrand-Saint Oyant L., Crespel L., Rajapakse S., Zhang L. & Foucher F. – 2008 – Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits – *Tree Genetics & Genomes*, 4: 11-23

Hirata H., Ohnishi T., Ishida H., Tomida K., Sakai M., Hara M. & Watanabe N. – 2012 – Functional characterization of aromatic amino acid aminotransferase involved in 2-phenylethanol biosynthesis in isolated rose petal protoplasts – *Journal of Plant Physiology*, 169: 444-451

Hirooka K., Bamba T., Fukusaki E. & Kobayashi A. – 2003 – Cloning and kinetic characterization of *Arabidopsis thaliana* solanesyl diphosphate synthase – *Biochemical Journal*, 370: 679-686

Hirooka K., Izumi Y., An C.-L., Nakazawa Y., Fukusaki E. & Kobayashi A. – 2005 – Functional analysis of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana* – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69: 592-601

Hollick A. A. – 1936 – The tertiary flora of Alaska – *United States Geological Survey Professional Paper*, 182: 1-185

Hood E. E., Gelvin S. B., Melchers L. S. & Hoekema A. – 1993 – New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants – *Transgenic Research*, 2: 208-218

Hsiao Y.-Y., Jeng M.-F., Tsai W.-C., Chuang Y.-C., Li C.-Y., Wu T.-S., Kuoh C. S., Chen W.-H. & Chen H.-H. – 2008 – A novel homodimeric geranyl diphosphate synthase from the orchid *Phalaenopsis bellina* lacking a DD(X)₂₋₄D motif – *The Plant Journal*, 55: 719-733

Hsieh M.-H. & Goodman H. M. – 2005 – The *Arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis – *Plant Physiology*, 138: 641-653

Hsieh M.-H. & Goodman H. M. – 2006 – Functional evidence for the involvement of *Arabidopsis* IspF in the nonmevalonate pathway of plastid isoprenoid biosynthesis – *Planta*, 223: 779-784

Huang F.-C., Horváth G., Molnár P., Turcsi E., Deli J., Schrader J., Sandmann G., Schmidt H. & Schwab W. – 2009a – Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena* – *Phytochemistry*, 70: 457-464

164 **Huang F.-C., Molnár P. & Schwab W.** – 2009b – Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes – *Journal of Experimental Botany*, 60: 3011-3022

Huang R., Hippauf F., Rohrbeck D., Haustein M., Wenke K., Feike J., Sorrelle N., Piechulla B. & Barkman T. J. – 2012 – Enzyme functional evolution through improved catalysis of ancestrally nonpreferred substrates – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 2966-2971

Hudak K. A. & Thompson J. E. – 1997 – Subcellular localization of secondary lipid metabolites including fragrance volatiles in carnation petals – *Plant Physiology*, 114: 705-713

Huguney P. & Camara B. – 1990 – Purification and characterization of farnesyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum* – *FEBS Letters*, 273: 235-238

Ikemoto T., Nagai T., Fujita A. & Iwamoto M. – 2004 – Effect of feeding of 2-phenylethyl glucopyranoside on the scent emission of cut flowers – *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 24-28

Iwata H., Kato T. & Ohno S. – 2000 – Triparental origin of Damask roses – *Gene*, 259: 53-59

Jakobsen H. B. & Olsen C. E. – 1994 – Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ – *Planta*, 192: 365-371

Jesse L. C., Moloney K. A. & Obrycki J. J. – 2006 – Insect pollinators of the invasive plant, *Rosa multiflora* (Rosaceae), in Iowa, USA – *Weed Biology and Management*, 6: 235-240

Joichi A., Yogogida K., Awano K. & Ueda Y. – 2005 – Volatile components of tea-scented modern roses and ancient Chinese roses – *Flavour and Fragrance Journal*, 20: 152-157

Joly A. & Edwards P. A. – 1993 – Effects of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity – *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 26983-26989

Kai G., Miao Z., Zhang L., Zhao D., Liao Z., Sun X., Zhao L., Tang K. – 2006– Molecular cloning and expression analyses of a new gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from *Taxus × media* – *Biologia Plantarum*, 50: 359-366

Kaminaga Y., Schnepf J., Peel G., Kish C.M., Ben-Nissan G., Weiss D., Orlova I., Lavie O., Rhodes D., Wood K., Porterfield D.M., Cooper A.J.L., Schloss J.V., Pichersky E., Vainstein A. & Dudareva N. – 2006 – Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyses phenylalanine decarboxylation and oxidation – *The Journal of Biological chemistry*, 281: 23357-23366

Kasai A., Bai S., Li T. & Harada T. – 2011 – Graft-transmitted siRNA signal from the root induces visual manifestation of endogenous post-transcriptional gene silencing in the scion – *PLOS One*, 6: e16895

Kato-Emori S., Higashi K., Hosoya K., Kobayashi T. & Ezura H. – 2001 – Cloning and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in melon (*Cucumis melo* L. *reticulatus*) – *Molecular Genetics and Genomics*, 265: 135-142

Kevan P. G., Eisikowitch D., Ambrose J. D. & Kemp J. R. – 1990 – Cryptic dioecy and insect pollination in *Rosa setigera* Michx. (*Rosaceae*), a rare plant of Carolinian Canada – *Biological Journal of the Linnean Society*, 40: 229-243

Khemvong S. & Suvachittanont W. – 2005 – Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. – *Plant Science*, 169: 571-578

Kim H.-J., Kim K., Kim N.-S. & Lee D.-S. – 2000 – Determination of floral fragrances of *Rosa hybrida* using solid-phase trapping-solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry – *Journal of Chromatography A*, 902: 389-404

Kim B.-R., Kim S.-U. & Chang Y.-J. – 2005 – Differential expression of the three 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase genes in rice – *Biotechnology Letters*, 27: 997-1001

Kim S. M., Kuzuyama T., Chang Y. J., Song K. S. & Kim S. U. – 2006a – Identification of a class 2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis – *Planta Medica*, 72: 234-240

Kim S. M., Kuzuyama T., Chang Y.-J. & Kim S.-U. – 2006b – Cloning and characterization of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECS) gene from *Ginkgo biloba* – *Plant Cell Reports*, 25: 829-835

Klaus S. M. J., Wegkamps A., Sybesma W., Hugenholtz J., Gregory III J. F. & Hanson A. D. – 2005 – A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate

in the folate synthesis pathway of bacteria and plants – *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 5274-5280

Koeduka T., Fridman E., Gang D. R., Vassão D. G., Jackson B. L., Kish C. M., Orlova I., Spassova S. M., Lewis N. G., Noel J. P., Baiga T. J., Dudareva N. & Pichersky E. – 2006 – Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 10128-10133

Koeduka T., Louie G. V., Orlova I., Kish C. M., Ibdah M., Wilkerson C. G., Bowman M. E., Baiga T. J., Noel J. P., Dudareva N. & Pichersky E. – 2008 – The multiple phenylpropene synthases in both *Clarkia breweri* and *Petunia hybrida* represent two distinct protein lineages – *The Plant Journal*, 54: 362-374

Koeduka T., Orlova O., Baiga T. J., Noel J. P., Dudareva N. & Pichersky E. – 2009a – The lack of floral synthesis and emission of isoeugenol in *Petunia axillaris* subsp. *parodii* is due to a mutation in the isoeugenol synthase gene – *The Plant Journal*, 58: 961-969

Koeduka T., Baiga T. J., Noel J. P. & Pichersky E. – 2009b – Biosynthesis of *t*-anethole in anise: characterization of *t*-anol/isoeugenol synthase and an *O*-methyltransferase specific for a C7-C8 propenyl side chain – *Plant Physiology*, 149: 384-394

Kolossova N., Sherman D., Karlson D. & Dudareva N. – 2001 – Cellular and subcellular localization of S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in snapdragon flowers – *Plant Physiology*, 126: 956-964

166

Kraszewska E. – 2008 – The plant Nudix hydrolase family – *Acta Biochimica Polonica*, 55: 663-671

Krüssmann G. – 1981 – The complete book of roses – Ed. Portland: Timber Press, 436 pp.

Kumar A. & Ellis B. E. – 2001 – The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution – *Plant Physiology*, 127: 230-239

Kuntz M., Römer S., Suire C., Hugueney P., Weil J. H., Schantz R. & Camara B. – 1992 – Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from the *Capsicum annuum*: Correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening – *The Plant Journal*, 2: 25-34

Landmann C., Fink B., Festern M., Dregus M., Engel K.-H. & Schwab W. – 2007 – Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*) – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465: 417-429

Lange B. M., Wildung M. R., McCaskill D. & Croteau R. – 1998 – A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 2100-2104

Lange B. M. & Croteau R. – 1999 – Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365: 170-174

Laskaris G., De Jong, C. F., Jaziri M., van der Heijden R., Theodoridis G. & Verpoorte R. – 1999 – Geranylgeranyl diphosphate synthase activity and taxane production in *Taxus baccata* cells – *Phytochemistry*, 50: 936-946

Lavid N., Wang J., Shalit M., Guterman I., Bar E., Beuerle T., Menda N., Shafir S., Zamir D., Adam Z., Vainstein A., Weiss D., Pichersky E. & Lewinsohn E. – 2002 – O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals – *Plant Physiology*, 129: 1899-1907

Lee D.-S., Nioche P., Hamberg M. & Raman C. S. – 2008 – Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes – *Nature*, 455: 363-370

Leivar P., González V. M., Castel S., Trelease R., López-Iglesias C., Arró M., Boronat A., Campos N., Ferrer A. & Fernández-Busquets X. – 2004 – Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase – *Plant Physiology*, 137: 57-69

Li C. P. & Larkins B. A. – 1996 – Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase – *Gene*, 171: 193-196

Liao Z., Chen M., Gong Y., Guo L., Tan Q., Feng X., Sun X., Tan F. & Tang K. – 2004 – A new geranylgeranyl diphosphate synthase gene from *Ginkgo biloba*, which intermediates the biosynthesis of the key precursor for ginkgolides – *Mitochondrial DNA*, 15: 153-158

Lichtenthaler L., Rohmer M. & Schwender J. – 1997 – Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants – *Physiologia Plantarum*, 101: 643-652

Liu Y.-G., Mitsukawa N., Oosumi T. & Whittier R. F. – 1995 – Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR – *The Plant Journal*, 8: 457-463

Lois L. M., Rodríguez-Concepción M., Gallego F., Campos N. & Boronat A. – 2000 – Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase – *The Plant Journal*, 22: 503-513

Long M. C., Nagegowda D. A., Kaminaga Y., Ho K. K., Schnepf J., Sherman D., Weiner H., Rhodes D. & Dudareva N. – 2009 – Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis – *The Plant Journal*, 59: 256-265

Los G. V. & Wood K. – 2006 – The HaloTag[™] – *Methods in Molecular Biology*, 356: 195-208

Louie G. V., Baiga T. J., Bowman M. E., Koeduka T., Taylor J. H., Spassova S. M., Pichersky E. & Noel J. P. – 2007 – Structure and reaction mechanism of basil eugenol synthase – *PLOS One*, 10: e993

Lücker J., Bouwmeester H. J., Schwab W., Blaas J., van der Plas L. H. W. & Verhoeven H. A. – 2001 – Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside – *The Plant Journal*, 27: 315-324

Lumbreras V., Campos N. & Boronat A. – 1995 – The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* *HMG1* gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region – *The Plant Journal*, 8: 541-549

Lützow M. & Beyer P. – 1988 – The isopentenyl-diphosphate Δ -isomerase and its relation to the phytoene synthase complex in daffodil chromoplasts – *Biochimica et Biophysica Acta*, 959: 118-126

Ma Y., Yuan L., Wu B., Li X., Chen S. & Lu S. – 2012 – Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* – *Journal of Experimental Botany*, 63: 2809-2823

Machenaud J. – 2010 – Biosynthèse du 2-phényléthanol et sécrétion du parfum chez la rose. 144 pp. – Thèse: Biologie Végétale: Université Jean Monnet de Saint Etienne (France)

Maeda H. & Dudareva N. – 2012 – The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants – *The Annual Review of Plant Biology*, 63: 73-105

Maia N. & Vénard P. – 1976 – Cytotaxonomie du genre *Rosa* et origine des rosiers cultivés – *Travaux sur le rosier de serre menés au C. R. A. d'Antibes*. Ed. par Fédération Nationale des Producteurs de l'Horticulture et des Pépinières. Paris : INRA Editions, pp 7-20

Mahmood N., Piacente S., Pizza C., Burke A., Khan A. I. & Hay A. J. – 1996 – The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from *Rosa damascena* – *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229: 73-79

Maldonado-Mendoza I. E., Burnett R. J. & Nessler C. L. – 1992 – Nucleotide sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus* – *Plant Physiology*, 100: 1613-1614

Marrero P. F., Poulter C. D. & Edwards P. A. – 1992 – Effects of site-directed mutagenesis of the highly conserved aspartate residues in domain II of farnesyl diphosphate synthase activity – *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 21873-21878

Maruyama T., Ito M., Kiuchi F. & Honda G. – 2001 – Molecular cloning, functional expression and characterization of d-limonene synthase from *Schizonepeta tenuifolia* – *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24: 373-377

Matsui K. – 2006 – Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism – *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 274-280

McCormack D. – 2008 – Clive Christian smells expensive – *National Post*, 15 august 2008

McGarvey D. J. & Croteau R. – 1995 – Terpenoid metabolism – *The Plant Cell*, 7: 1015-1026

Meifang P., Yijian Y., Chunxian Y., Min C. & Zhihua L. – 2008 – Cloning and functional analysis of a new IspF gene from *Ginkgo biloba* – *Scientia Silvae Sinicae*, 10

Meynet J., Barrade R., Duclos A. & Siadous R. – 1994 – Dihaploid plants of roses (*Rosa* × *hybrida* cv. ‘Sonia’) obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds – *Agronomie*, 2: 169-175

Mohd-Hairul A. R., Sun C. W., Namasivayam P., Lian G. E. C. & Abdullah J. O. – 2010 – Putative phenylacetaldehyde synthase transcript of *Vanda* Mimi Palmer: sequence and expression analysis – *International Journal of Botany*, 6: 424-432

Mohd-Hairul A. R., Namasivayam P., Abdullah J. O. & Lian G. E. C. – 2011 – Screening, isolation, and molecular characterization of putative fragrance-related transcripts from *Vanda* Mimi Palmer – *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 1651-1660

Montamat F., Guilloton M., Karst F. & Delrot S. – 1995 – Isolation and characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase – *Gene*, 167: 197-201

Mookherjee B. D., Trenkle R. W. & Richard A. – 1989 – Live vs. dead. Part II. A comparative analysis of the headspace volatiles of some important fragrance and flavor raw materials – *Journal of Essential Oil Research*, 1: 85-90

Morita H., Mizuuchi Y., Abe T., Kohno T., Noguchi H. & Abe I. – 2007 – Cloning and functional analysis of a novel aldo-keto reductase from *Aloe arborescens* – *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30: 2262-2267

Murfitt L. M., Kolosova N., Mann C. J. & Dudareva N. – 2000 – Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus* – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382: 145-151

Nagegowda D. A., Ramalingam S., Hemmerlin A., Bach T. J. & Chye M.-L. – 2005 – *Brassica juncea* HMG-CoA synthase: localization of mRNA and protein – *Planta*, 221: 844-856

Nagegowda D. A., Gutensohn M., Wilkerson C. G. & Dudareva N. – 2008 – Two nearly identical terpene synthase catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers – *The Plant Journal*, 55: 224-239

Nakamura A., Shimada H., Masuda T., Ohta H. & Takamiya K. – 2001 – Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco – *FEBS Letters*, 506: 61-64

Nakamura S. – 1987 – Scent and component analysis of the hybrid tea rose – *Perfumer and Flavorist*, 12: 43-45

Naves, Y. R. – 1949 – Etudes sur les matières végétales volatiles LXXXIII. Présence de carvone et d'éther méthylique de l'eugénol dans l'essence de rose de Bulgarie – *Helvetica Chimica Acta*, 32: 967-968

Negre F., Kolosova N., Knoll J., Kish C. M. & Dudareva N. – 2002 – Novel S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme responsible for biosynthesis of methyl salicylate and methyl benzoate, is not involved in floral scent production in snapdragon flowers – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406: 261-270

Nelson A. J., Doerner P. W., Zhu Q & Lamb C. J. – 1994 – Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene that is elicitor-inducible – *Plant Molecular Biology*, 25 : 401-412

Nieuwenhuizen N. J., Wang M. Y., Matich A. J., Green S. A., Chen X., Yauk Y.-K., Beuning L. L., Nagegowda D. A., Dudareva N. & Atkinson R. G. – 2009 – Two terpene synthases are responsible for the major sesquiterpenes emitted from the flowers of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) – *Journal of Experimental Botany*, 60: 3203-3219

Ogawa T., Ueda Y., Yoshimura K. & Shigeoka S. – 2005 – Comprehensive analysis of the cytosolic nudix hydrolases in *Arabidopsis thaliana* – *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 25277-25283

Oh S. K., Kang H., Shin D. H., Yang J. & Han K. H. – 2000 – Molecular cloning and characterization of a functional cDNA clone encoding isopentenyl diphosphate isomerase from *Hevea brasiliensis* – *Journal of Plant Physiology*, 157: 549-557

Ohloff G. & Demole E. – 1987 – Importance of the odoriferous principle of Bulgarian rose oil in flavour and fragrance chemistry – *Journal of Chromatography*, 406: 181-183

Oka N., Ohki M., Ikegami A., Sakata K. & Watanabe N. – 1997 – First isolation of geranyl disaccharide glycosides as aroma precursors from rose flowers – *Natural Product Letters*, 10: 187-192

Oka N., Ikegami A., Ohki M., Sakata K., Yagi A. & Watanabe N. – 1998 – Citronellyl disaccharide glycoside as an aroma precursor from rose flowers – *Phytochemistry*, 47: 1527-1529

170

Oka N., Ohishi H., Hanato T., Hornberger M., Sakata K. & Watanabe N. – 1999 – Aroma evolution during flower opening in *Rosa damascena* Mill. – *Zeitschrift für Naturforschung*, 54: 889-895

Okada K., Saito T., Nakagawa T., Kawamukai M. & Kamiya Y. – 2000 – Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis* – *Plant Physiology*, 122: 1045-1056

Omata A., Yomogida K., Nakamura S., Ota T., Toyoda T., Amano A. & Muraki S. – 1991 – New sulphur components of rose oil – *Flavour and Fragrance Journal*, 6: 142-152

Ozkan G., Sagdic O., Baydar N. G. & Baydar H. – 2004 – Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extracts – *Food Science and Technology International*, 10: 277-281

Pan Z., Herickhoff L. & Backhaus R. A. – 1996 – Cloning, characterization, and heterologous expression of cDNAs for farnesyl diphosphate synthase from the guayule rubber plant reveals that this prenyltransferase occurs in rubber particles – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332: 196-204

Pedroso F. L. – 2007 – *In vitro* synthesis of, methyl salicylate & methyl benzoate, by *Nicotiana suaveolens* via BSMT – Thèse: Biologie Végétale: Kalamazoo College (Michigan, USA)

Phillips M. A., Walter M. H., Ralph S. G., Dabrowska P., Luck K., Urós E. M., Boland W., Strack D., Rodríguez-Concepción M., Bohlmann J. & Gershenzon J. – 2007 – Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*) – *Plant Molecular biology*, 65: 243-257

Phillips M. A., D’Auria J. C., Gershenzon J. & Pichersky E. – 2008 – The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis – *The Plant Cell*, 20: 677-696

Pichersky E., Raguso R. A., Lewinsohn E. & Croteau R. – 1994 – Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae): I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity – *Plant Physiology*, 106:1533-1540

Pichersky E., Lewinsohn E. & Croteau R. – 1995 – Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in *Clarkia breweri* – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316: 803-807

Picone J. M., Clery R. A., Watanabe N., MacTavish H. S. & Turnbull C. G. N. – 2004 – Rhythmic emission of floral volatiles from *Rosa damascena semperflorens* cv. ‘Quatre Saisons’ – *Planta*, 219: 468-478

Piechulla B. & Pott M. B. – 2003 – Plant scents – mediators of inter-and intraorganismic communication – *Planta* 217: 687-689

Pott M. B., Pichersky E. & Piechulla B. – 2002 – Evening specific oscillations of scent emission, SAMT enzyme activity, and SAMT mRNA in flowers of *Stephanotis floribunda* – *Journal of Plant Physiology*, 159: 925-934

Pott M. B., Hippauf F., Saschenbrecker S., Chen F., Ross J., Kiefer I., Sluzarenko A., Noel J. P., Pichersky E., Effmert U. & Piechulla B. – 2004 – Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens* – *Plant Physiology*, 135: 1946-1955

Potter D., Eriksson T., Evans R. C., Oh S., Smedmark J. E. E., Morgan D. R., Kerr M., Robertson K. R., Arsenault M., Dickinson T. A., & C. S. Campbell C. S. – 2007 – Phylogeny and classification of Rosaceae – *Plant Systematics and Evolution*, 266: 5–43

Proteau P. J. – 2004 – 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase: an overview – *Bioorganic Chemistry*, 32:483-493

Pulido P., Perello C. & Rodriguez-Concepcion M. – 2012 – New insights into plant isoprenoid metabolism – *Molecular Plant*, 5: 964-967

Ramos-Valdivia A. C., van der Heijden R. & Verpoorte R. – 1997 – Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function – *Natural Product Reports*, 14: 591-603

Reddy A. R. & DAS V. S. R. – 1987 – Chloroplast autonomy for the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) – *New Phytologist*, 106: 457-464

Rehder A. – 1940 – Rosa L. – *A manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America exclusive of the subtropical and warmer temperate regions* (2nd ed.). Ed. par Rehder A.. New York: Macmillan. pp. 426-451

Rodríguez-Concepción M. – 2006 – Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells – *Phytochemistry Reviews*, 5: 1-15

Rodríguez-Concepción M., Ahumada I., Diez-Juez E., Sauret-Güeto S., Lois L. M., Gallego F., Carretero-Paulet L., Campos N. & Boronat A. – 2001 – 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening – *The Plant Journal*, 27: 213-222

Rodríguez-Concepción M. & Boronat A. – 2002 – Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics – *Plant Physiology*, 130: 1079-1089

Roeder S., Hartmann A.-M., Effmert U. & Pichuella B. – 2007 – Regulation of simultaneous synthesis of floral scent terpenoids by the 1,8-cineole synthase of *Nicotiana suaveolens* – *Plant Molecular Biology*, 65: 107-124

Rohdich F., Wungsintaweekul J., Eisenreich W., Richter G., Schuhr C. A., Hecht S., Zenk M. H. & Bacher A. – 2000a – Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana* – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 6451-6456

172

Rohdich F., Wungsintaweekul J., Lüttgen H., Fischer M., Eisenreich W., Schuhr C. A., Hecht S., Fellermeier M., Schramek N., Zenk M. H. & Bacher A. – 2000b – Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase from tomato – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 8251-8256

Rohmer M. – 1999 – The discovery of a mevalonate-independent pathway for the isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants – *Natural Product Reports*, 16: 565-574

Rose M., Kotter P., Hauf J. & Entian K.D. – 2003 – The yeast strain collection EUROSCARF: a source for useful tools in yeast genetics and molecular biology – *Yeast*, 20: S343

Ross J. R., Nam K. H., D'Auria J. C. & Pichersky E. – 1999 – *S*-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferase – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367: 9-16

Rouquier S., Blancher A. & Giorgi D. – 2000 – The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: evidence for the reduction of the functional fraction in primates – *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 2870-2874

Rubio A., Rambla J. L., Santaella M., Gómez M. D., Orzaez D., Granell A. & Gómez-Gómez L. – 2008 – Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in b-ionone release – *The Journal of Biological Chemistry*, 238: 24816-24825

Rusanov K., Kovacheva N., Stefanova K., Atanassov A. & Atanassov I. – 2009 – Rosa damascene - genetic resources and capacity building for molecular breeding – *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23: 1436-1439

Sakai M., Hirata H., Sayama H., Sekiguchi K., Itano H., Asai T., Dohra H., Hara M. & Watanabe N. – 2007 – Production of 2-phenylethanol in roses as the dominant floral scent compounds from L-phenylalanine by two key enzymes, a PLP-dependent decarboxylase and a phenylacetaldehyde reductase – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 2408-2419

Sakai M., Tomita S., Hirata H., Asai T., Dohra H., Hara M. & Watanabe N. – 2008 – Purification and characterization of β -glucosidase involved in the emission of 2-phenylethanol from rose flowers – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72 : 219-221

Sallaud C., Rontein D., Onillon S., Jabès F., Duffé P., Giacalone C., Thoraval S., Escoffier C., Herbette G., Leonhardt N., Causse M. & Tissier A. – 2009 – A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites* – *The Plant Cell*, 21 : 301-317

Sanmiya K., Ueno O., Matsuoka M. & Yamamoto N. – 1999 – Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts – *Plant Cell Physiology*, 40: 348-354

Scalliet G., Journot N., Jullien F., Baudino S., Magnard J.-L., Channelière S., Vergne P., Dumas C., Bendahmane M., Cock J. M. & Hugueney P. – 2002 – Biosynthesis of the major scent components 3,5-dimethoxytoluene and 1,3,5-trimethoxybenzene by novel rose O-methyltransferases – *FEBS Letters*, 523: 113-118

Scalliet G., Lionnet C., Le Behec M., Dutron L., Magnard J.-L., Baudino S., Bergougnoux V., Jullien F., Chambrier P., Vergne P., Dumas C., Cock J. M. & Hugueney P. – 2006 – Role of petal-specific orcinol O-methyltransferases in the evolution – *Plant Physiology*, 140: 18-29

Scalliet G., Piola L., Douady C. J., Réty C., Raymond O., Baudino S., Bordji K., Bendahmane M., Dumas C., Cock J. M. & Hugueney P. – 2008 – Scent evolution in Chinese roses – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 5927-5932

Schillmiller A. L., Schauvinhold I., Larson M., Xu R., Charbonneau A. L., Schmidt A., Wilkerson C., Last R. L. & Pichersky E. – 2009 – Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesis from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 10865-10870

Schmidt A. & Gershenzon J. – 2008 – Cloning and characterization of two different types of geranyl diphosphate synthases from Norway spruce (*Picea abies*) – *Phytochemistry*, 69: 49-57

Schmidt A., Wächtler B., Temp U., Krekling T., Séguin A. & Gershenzon J. – 2009 – A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies* – *Plant Physiology*, 152: 639-655

Schulz H. – 2003 – Odoriferous substances and pigments – *Encyclopedia of Rose Science*. Ed. par Roberts, A., Debener, T. & Gudín, S.. London: Academic Press, pp. 231-240

Schwender J., Müller C., Zeidler J. & Lichtenthaler H. K. – 1999 – Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana* – *FEBS Letters*, 455: 140-144

Seemann M., Wegner P., Schünemann V., Tse Sum Bui B., Wolff M., Marquet A., Trautwein A. X. & Rohmer M. – 2005 – Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from *Arabidopsis thaliana* is a [4Fe-4S] protein – *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10: 131-137

Seetang-Nun Y., Sharkey T. D. & Suvachittanont W. – 2008 – Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis* – *Journal of Plant Physiology*, 165: 991-1002

Shalit M., Guterman I., Volpin H., Bar E., Tamari T., Menda N., Adam Z., Zamir D., Vainstein A., Weiss D., Pichersky E. & Lewinsohn E. – 2003 – Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals – *Plant Physiology*, 131: 1868-1876

Shalit M., Shafir S., Larkov O., Bar E., Kaslassi D., Adam Z., Zamir D., Vainstein A., Weiss D., Ravid U. & Lewinsohn E. – 2004 – Volatile compounds emitted by rose cultivars: Fragrance perception by man and honeybees – *Israel Journal of Plant Science*, 52: 245-255

Shepherd R. E. – 1958 – The ABCs of Hybridizing – *American Rose Annual*, 43: 78-

174
Shimada T., Endo T., Fujii H., Hara M., Ueda T., Kita M. & Omura M. – 2004 – Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase from *Citrus unshiu* Marc. – *Plant Science*, 166: 49-58

Shimada T., Endo T., Fujii H., Hara M. & Omura M. – 2005 – Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8 cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc – *Plant Science*, 168: 987-995

Simkin A. J., Underwood B. A., Auldrige M., Loucas H. M., Shibuya K., Scmelz E., Clark D. G. & Klee H. J. – 2004 – Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of β -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers – *Plant Physiology*, 136: 3504-3514

Sitthithaworn W., Kojima N., Viroonchatapan E., Suh D.-Y., Iwanami N., Hayashi T., Noji M., Saito K., Niwa Y. & Sankawa U. – 2001 – Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Scoparia dulcis* and *Croton sublyratus*. Plastid localization and conversion to a farnesyl diphosphate synthase by mutagenesis – *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49: 197-202

Soler E., Feron G., Clastre M., Dargent R., Gleizes M. & Ambid C. – 1992 – Evidence for a geranyl-diphosphate synthase located within the plastids of *Vitis vinifera* L. cultivated in vitro. *Planta*, 187: 171-175

Soler E., Clastre M., Bantigies B., Marigo G. & Ambid C. – 1993 – Uptake of isopentenyl diphosphate by plastids isolated from *Vitis vinifera* L. cell suspensions – *Planta*, 191: 324-329

Sommer S., Severin K., Camara B. & Heide L. – 1995 – Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon* – *Phytochemistry*, 38: 623-627

Song L. & Poulter C. D. – 1994 – Yeast farnesyl-diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 3044-3048

Spiller M., Berger R. G. & Debener T. – 2010 – Genetic dissection of scent metabolic profiles in diploid rose population – *Theoretical and Applied Genetics*, 120: 1461-1471

Springer N. M. & Stupar R. M. – 2007 – Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? – *Genome Research*, 17: 264-275

Spitzer-Rimon B., Marhevka E., Barkai O., Marton I., Edelbaum O., Masci T., Prathapani N.-K., Shklarman E., Ovadis M. & Vainstein A. – 2010 – *EOBII*, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia – *The Plant Cell*, 22: 1961-1976

Staïkov V. M. & Zolotovitch G. D. – 1960 – Causes of increase in the essential oil content of *Rosa damascena* petals kept in water – *Compte rendu de l'Académie Bulgare des Sciences*, 13: 725-728

Stermer B. A., Bianchini G. M. & Korth K. L. – 1994 – Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants – *Journal of Lipid Research*, 35: 1133-1140

Stougaard B. – 1983 – Pollination in *Rosa multiflora* – *Tidsskrift for Planteavl*, 87: 633-642

175

Straubinger M., Knapp H., Oka N., Watanabe N. & Winterhalter P. – 1997 – Isolation of a glucosidic β -damascenone precursor from rose petals – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4053-4056

Straubinger M., Knapp H., Watanabe N., Oka N., Washio H. & Winterhalter P. – 1999 – Three novel eugenol glycosides from rose flowers, *Rosa damascena* Mill. – *Natural Product Letters*, 13: 5-10

Stumpe M. & Feussner I. – 2006 – Formation of oxylipins by CYP74 enzymes – *Phytochemistry Reviews*, 5: 347-357

Suwanmanee P., Suvachittanont W. & Fincher G. B. – 2002 – Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from *Hevea brasiliensis* (HBK) Mull. Arg. – *ScienceAsia*, 28: 29-36

Suzuki H. & Uritani I. – 1976 – Subcellular localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and other membrane-bound enzymes in sweet potato roots – *Plant and Cell Physiology*, 17: 691-700

Suzuki M., Matsumoto S., Mizoguchi M., Hirata S., Takagi, K., Hashimoto I., Yamono Y., Ito M., Fleischmann P., Winterhalter P., Morita T. & Watanabe N. – 2002 – Identification of (3S,9R)- and (3S,9S)-megastigma-6,7-dien-3,5,0-triol 9-O- β -D-glucopyranosides as damascenone progenitors in the flowers of *Rosa damascena* Mill. – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66: 2692-2697

- Tabaei-Aghdaei S. R., Babaei A., Khosh-Khui M., Jaimand K., Rezaee M. B., Assareh M. H. & Naghavi M. R.** – 2007 – Morphological and oil content variations amongst Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) landraces from different regions of Iran – *Scientia Horticulturae*, 113: 44-48
- Tarbouriech M.F.** – 2001 – Des églantiers et des roses – *Dossier de l'environnement de l'INRA*, 21: 119-124
- Tarshis L. C., Proteau P. J., Kellog B. A., Sacchettini J. C. & Poulter C. D.** – 1996 – Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 15018-15023
- Teh S.-L., Abdullah J. O. & Namasivayam P.** – 2012 – Molecular cloning, sequencing, and characterization of a putative acetyl-CoA-C-acetyltransferase cDNA from a highly fragrant orchid hybrid *Vanda Mimi* Palmer – *Hindawi Publishing corporation*, 2012: 509034
- Tholl D., Kish C. M., Orlova I., Sherman D., Gershenzon J. Pichersky E. & Dudareva N.** – 2004 – Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases – *The Plant Cell*, 16: 977-992
- Tholl D., Chen F., Petri J., Gershenzon J. & Pichersky E.** – 2005 – Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers – *The Plant Journal*, 42: 757-771
- Tieman D., Taylor M., Fernie A. R., Hanson A. D. & Klee H. J.** – 2006 – Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 8287-8292
- Tieman D. M., Loucas H. M., Kim J. Y., Clark D. G. & Klee H. J.** – 2007 – Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol – *Phytochemistry*, 68: 2660-2669
- Turner G. W. & Croteau R.** – 2004 – Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase – *Plant Physiology*, 136: 4215-4227
- Vainstein A., Lewinsohn E., Pichersky E. & Weiss D.** – 2001 – Floral Fragrance. New inroads into the old commodity – *Plant Physiology*, 127: 1383-1389
- Van de Pol P. A.** – 2003 – History of the perfume industry – *Encyclopedia of Rose Science*. Ed. par Roberts, A., Debener, T. & Gudin, S.. London: Academic Press, pp. 410-414
- Van Moerkercke A., Schauvinhold I., Pichersky E., Haring M. A. & Schuurink R. C.** – 2009 – A plant thiolase involved in benzoid acid biosynthesis and volatile benzenoid production – *The Plant Journal*, 60: 292-302
- Van Moerkercke A., Galván-Ampudia C. S., Verdonk J. C., Haring M. A. & Schuurink R. C.** – 2012 – Regulators of the floral fragrance production and their target genes in petunia are not exclusively active in the epidermal cells of petals – *Journal of Experimental Botany*, 63: 3157-3171

Van Schie C. C. N., Haring M. A. & Schuurink R. C. – 2006 – Regulation of terpenoid and benzenoid production in flowers – *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 203-208

Vassão D. G., Kim S.-J., Milhollan J. K., Eichinger D., Davin L. B. & Lewis N. G. – 2007 – A pinoresinol-lariciresinol reductase homologue from the creosote bush (*Larrea tridentata*) catalyzes the efficient in vitro conversion of *p*-coumaryl/coniferyl alcohol esters into the allylphenols chavicol/eugenol, but not the propenylphenols *p*-anol-isoeugenol – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465: 209-218

Veau B., Courtois M., Oudin A., Chénieux J.-C., Rideau M. & Clastre M. – 2000 – Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* – *Biochimica et Biophysica Acta*, 1517: 159-163

Verdonk J. C., Haring M. A., van Tunen A. J. & Schuurink R. C. – 2005 – *ODORANTI* regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers – *The Plant Cell*, 17: 1612-1624

Vergne P., Maene M., Gabant G., Chauvet A. & Debener T. & Bendahmane M. – 2010 – Somatic embryogenesis and transformation of the diploid *Rosa chinensis* cv. 'Old Blush' – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100: 73-81.

Verhoeven H. A., Blaas J. & Brandenburg W. A. – 2003 – Fragrance profiles of wild and cultivated roses – *Encyclopedia of Rose Science*. Ed. par Roberts, A., Debener, T. & Gudin, S.. London: Academic Press, pp. 240-248.

Walter M. H., Hans J. & Strack D. – 2002 – Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots – *The Plant Journal*, 31: 243-254

Wang J., Dudareva N., Bhakta S., Raguso R. A. & Pichersky E. – 1997 – Floral scent production in *Clarkia breweri* (*Onagraceae*): II. Localization and developmental modulation of the enzyme *S*-adenosyl-L-methionine:(iso)eugenol *O*-methyltransferase and phenylpropanoid emission – *Plant Physiology*, 114: 213-221

Wang J. & Pichersky E. – 1998 – Characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:(iso)eugenol *O*-methyltransferase involved in floral scent production in *Clarkia breweri* – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 349: 153-160

Wang J. & Pichersky E. – 1999 – Identification of specific residues involved in substrate discrimination in two plant *O*-methyltransferases – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368: 172-180

Wang G. & Dixon R. A. – 2009 – Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis – *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 9914-9919

Watanabe N., Messerer M. & Winterhalter P. – 1997 – Uncommon glycoconjugates of 2-phenylethanol from rose flowers and Riesling wine – *Natural Product Letters*, 10: 39-42

Watanabe S., Hashimoto I., Hayashi K., Yagi K., Asai T., Knapp H., Straubinger M., Winterhalter P. & Watanabe N. – 2001 – Isolation and identification of 2-phenylethyl disaccharide glycosides and mono glycosides from rose flowers, and their potential role in scent formation – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65: 442-445

Watanabe S., Hayashi K., Yagi K., Asai T., MacTavish H., Picone J., Turnbull C. & Watanabe N. – 2002 – Biogenesis of 2-phenylethanol in rose flowers: incorporation of [²H₈]L-phenylalanine into 2-phenylethanol and its β-D-glucopyranoside during the flower opening of *Rosa* ‘Hoh-Jun’ and *Rosa damascena* Mill. – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66: 943-947

Weber T. & Bach T. J. – 1994 – Conversion of acetyl-coenzyme A into 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A in radish seedlings: evidence of a single monomeric protein catalyzing a Fe^{II}/quinine-stimulated double condensation reaction – *Biochimica et Biophysica Acta*, 1211: 85-96

Wegener A., Gimbel W., Werner T., Hani J. Ernst D. & Sandermann H. Jr. – 1997 – Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L. with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase – *Biochimica et Biophysica Acta*, 1350: 247-252

Weiss E. A. – 1997 – *Rosaceae – Essential oil crops*. Ed. par Weiss E. A.. New York: CAB International, pp. 393-416

Westermann B. & Neupert W. – 2000 – Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* – *Yeast*, 16: 1421-1427

Widrechner M. P. – 1981 – History and utilization of *Rosa damascena* – *Economic Botany*, 35: 42-58

178

Williams D. C., McGarvey D. J., Katahira E. J. & Croteau R. – 1998 – Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active ‘pseudomature’ form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair – *Biochemistry*, 37: 12213-12220

Wissemann V. – 2003 – Conventional taxonomy (wild roses) – *Encyclopedia of Rose Science*. Ed. par Roberts, A., Debener, T. & Gudín, S.. London: Academic Press, pp. 111-117

Wissemann V. & Ritz C. M. – 2005 - The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy – *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147: 275-290

Won M.-M., Cha E.-J., Toon O.-K., Kim N.-S., Kim K. & Lee D.S. – 2009 – Use of headspace mulberry paper bag micro solid phase extraction for characterization of volatile aromas of essential oils from Bulgarian rose and provence lavender – *Analytica Chimica Acta*, 631: 54-61

Wong R. J., Mc Cormack D. K. & Russell D. W. – 1982 – Plastid 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase has distinctive kinetic and regulatory features: Properties of the enzyme and positive phytochrome control of activity in pea seedlings – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 216: 631-638

Wright G. A., Lutmerding A, Dudareva N. & Smith B. H. – 2005 – Intensity and the ratios of compounds in the scent of the snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*) – *Journal of Comparative Physiology A*, 191: 105-114

Wu S., Watanabe N., Mita S., Ueda Y., Shibuya M. & Ebizuka Y. – 2003 – Two O-methyltransferases isolated from flower petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea* involved in scent biosynthesis – *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96: 119-128

Wu S., Watanabe N., Mita S., Dohra H., Ueda Y., Shibuya M. & Ebizuka Y. – 2004 – The key role of phloroglucinol O-methyltransferase in the biosynthesis of *Rosa chinensis* volatile 1,3,5-trimethoxybenzene – *Plant Physiology*, 135: 95-102

Xu Y.-H., Wang J.-W., Wang S., Wang J.-Y. & Chen X.-Y. – 2004 – Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A – *Plant Physiology*, 135: 507–515

Yoonram K., Takahashi S., Rattanapittayaporn A., Koyama T., Wititsuwannakul D. & Wititsuwannakul R. – 2008 – cDNA, from *Hevea brasiliensis* latex, encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase – *Plant Science*, 175: 694-700

Yoshimura K., Ogawa T., Ueda Y. & Shigeoka S. – 2007 – *AtNUDX1*, an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for eliminating oxidized nucleotides in *Arabidopsis* – *Plant Cell Physiology*, 48: 1438-1449

Zhang M., Li K. & Zhang C. – 2009 – Identification and characterization of class 1 *DXS* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the MEP pathway from soybean – *Molecular Biology Reports*, 36: 876-887

Zheng B. S., Rönner E., Viitanen L., Salminen T. A., Lundgren K., Moritz T. & Edqvist J. – 2008 – *Arabidopsis* sterol carrier protein-2 is required for normal development of seeds and seedlings – *Journal of Experimental Botany*, 59: 3485-3499

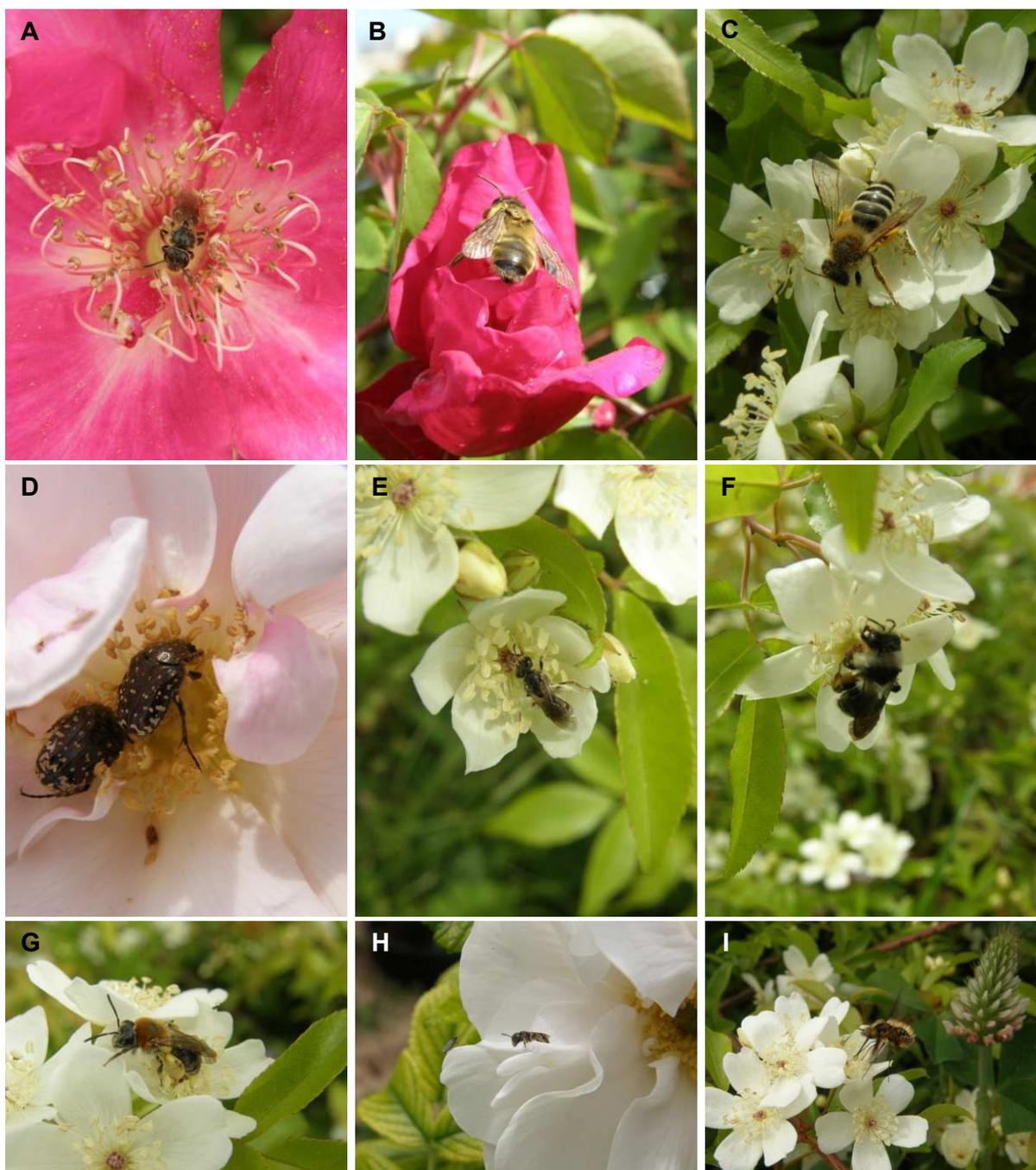
Zhu X., Suzuki K., Saito T., Okada K., Tanaka K., Nakagawa T., Matsuda H. & Kawamukai M. – 1997 – Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene *GGPS6* from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria – *Plant Molecular Biology*, 35: 331-341

Zubieta C., Ross J. R., Koscheski P., Yang Y., Pichersky E. & Noel J. P. – 2003 – Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family – *The Plant Cell*, 15: 1704-1716

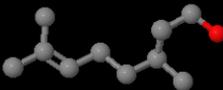
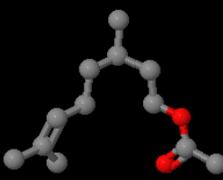
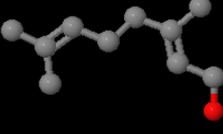
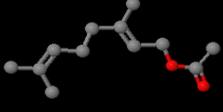
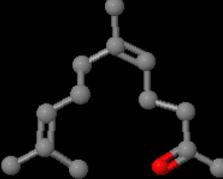
Annexes

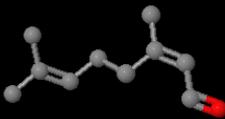
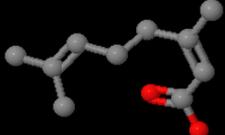
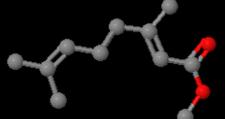
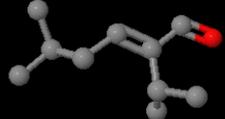
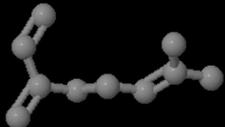
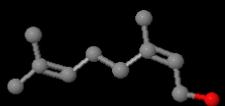
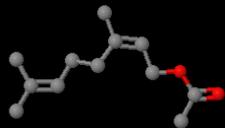
Espèce	Nom vernaculaire	Rosier visité	Référence
Coleoptera :			
<i>Cetonia aurata</i> L.	Cétoine dorée	<i>Rosa × hybrida</i>	Observation personnelle
<i>Cantharidae</i> Imhoff	Cantharides	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
<i>Staphylinidae</i> Latreille	Staphylinidés	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
flower-feeding scarab beetles on <i>Rosa rugosa</i> Thunb.		<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
Diptera :			
<i>Eristalis tenax</i> L.	Eristale gluante	<i>Rosa setigera</i> Michx.	Kevan <i>et al.</i> , 2008
<i>Syrphus ribesii</i> L.	Syrphe des groseillers	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Stougaard, 1983
<i>Calypttratae</i>	Mouches	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
<i>Syrphidae</i> Latreille	Syrphides	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
		<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
		<i>Rosa setigera</i> Michx.	Kevan <i>et al.</i> , 2008
Heteroptera :			
<i>Miridae</i> Hahn	Miridés	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
Hymenoptera :			
<i>Apis mellifera</i> L.	Abeille domestique européenne	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
		<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Stougaard, 1983
		<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
		<i>Rosa setigera</i> Michx.	Kevan <i>et al.</i> , 2008
<i>Bombus hypnorum</i> L.	Bourdon des arbres	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
<i>Bombus lapidarius</i> L.	Bourdon des pierres	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
<i>Bombus terrestris</i> L.	Bourdon terrestre	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
<i>Bombus</i> sp.	Bourdon	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
<i>Andrenidae</i> Latreille	Abeilles solitaires	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
<i>Apidae</i> Latreille	Abeilles sociales	<i>Rosa setigera</i> Michx.	Kevan <i>et al.</i> , 2008
<i>Formicidae</i> Latreille	Fourmis	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
<i>Halictidae</i> Thomson	Halictes, abeilles de la sueur	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
		<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
<i>Megachilidae</i> Latreille	Mégachilides	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	Dobson <i>et al.</i> , 1999
Neuroptera :			
<i>Chrysopidae</i> Schneider	Chrysopes	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006
Thysanoptera :			
<i>Thysanoptera</i> Haliday	Thrips	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	Jesse <i>et al.</i> , 2006

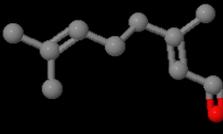
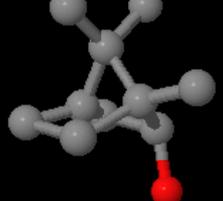
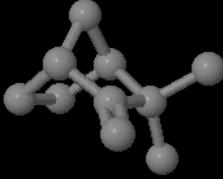
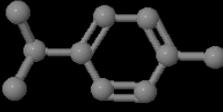
Annexe 1 : Les insectes pollinisateurs des rosiers

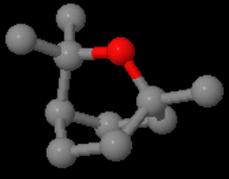
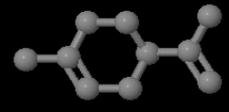
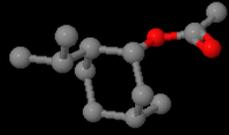
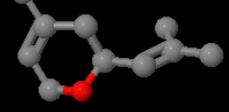
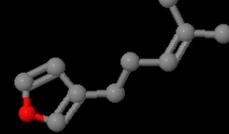
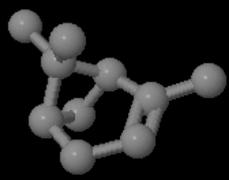
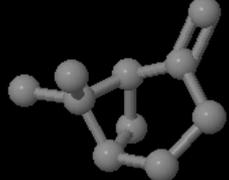
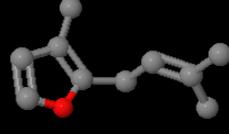
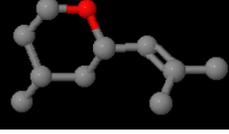


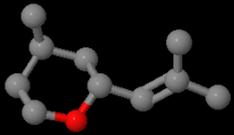
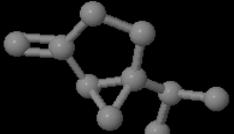
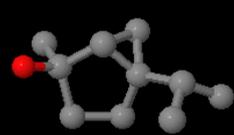
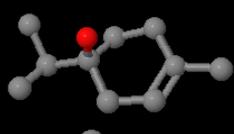
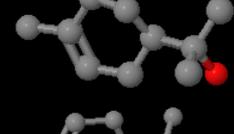
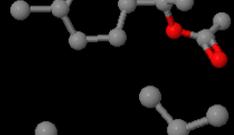
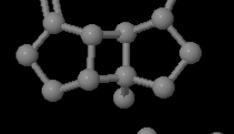
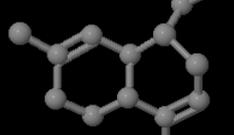
Annexe 2 : Pollinisateurs des rosiers. A : *Halictus* sp. sur *Rosa chinensis* cv. 'Sanguinea', B : *Apis mellifera mellifera* L. sur *Rosa chinensis* cv. 'Sanguinea' ; C : *Andrena gravida* Imhoff sur *Rosa banksiae* Aiton var. *normalis* Regel ; D : *Oxythyrea funesta* Poda sur *Rosa* × *hybrida* cv. 'Souvenir de Sainte Anne' ; E : *Lasioglossum* sp. sur *Rosa banksiae* Aiton var. *normalis* Regel ; F : *Andrena cineraria* L. sur *Rosa banksiae* Aiton var. *normalis* Regel ; G : *Andrena haemorrhoa* Fabricius sur *Rosa banksiae* Aiton var. *normalis* Regel ; H : *Lasioglossum* sp. sur *Rosa* × *hybrida* cv. 'Souvenir de Sainte Anne' ; I : *Bombylius fimbriatus* Meigen sur *Rosa banksiae* Aiton var. *normalis* Regel.

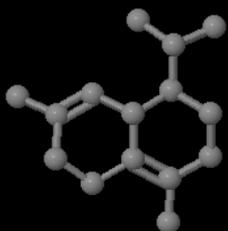
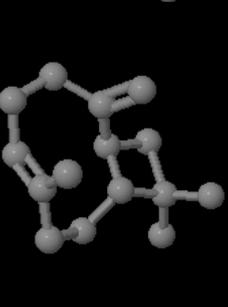
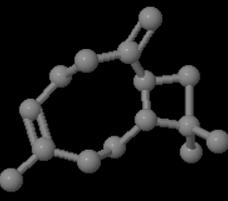
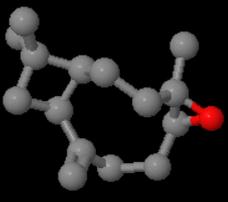
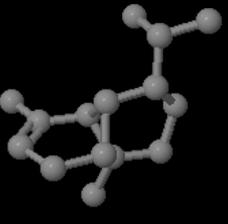
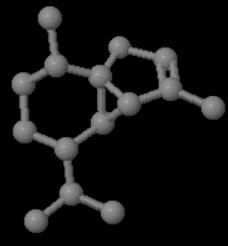
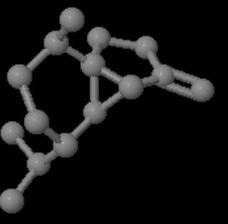
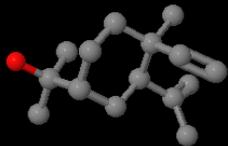
	Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
monoterpènes aliphatiques	citronellol		floral, cuir, cireux, bouton de rose, citronné	Nakamura, 1987 Ohloff & Demole, 1987 Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Oka <i>et al.</i> , 1999 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Baydar & Baydar, 2005 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Won <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010
	acétate de citronellyle		floral, vert, rose, fruité, citronné, boisé, tropical, fruit	Flament <i>et al.</i> , 1993 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2003 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Won <i>et al.</i> , 2009
	géraniol		sucré, floral, fruité, rose, cireux, citronné	Nakamura, 1987 Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Baydar & Baydar, 2005 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Won <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010
	acétate de géranyle		floral, rose, lavande, vert, cireux	Flament <i>et al.</i> , 1993 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Hendel-Rahmanim <i>et al.</i> , 2007 Spiller <i>et al.</i> , 2010
	acétone de géranyle		frais, rose, feuille, floral, vert, magnolia, aldéhydique, fruité	Dobson & Bergström, 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005

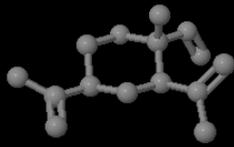
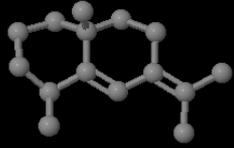
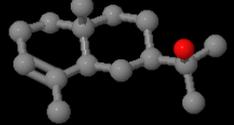
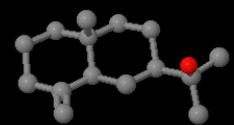
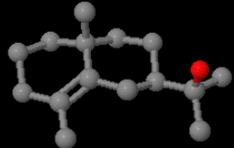
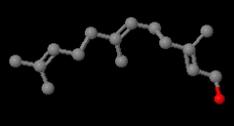
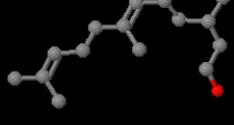
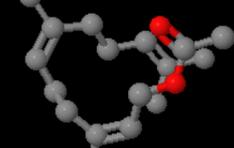
<p>géraniol (citral A ; (Z)-citral)</p>		<p>sucré, citronné, zest de citron</p>	<p>Flament <i>et al.</i>, 1993 Helsper <i>et al.</i>, 1998 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i>, 2000 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i>, 2004 Shalit <i>et al.</i>, 2004 Joichi <i>et al.</i>, 2005 Bianchi <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>acide gérannique (acide 3,7-diméthyl-2,6-octadiénoïque)</p>		<p>herbes sèches, acide, vert, moisi, pied, boisé</p>	<p>Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i>, 2005</p>
<p>méthylgeranylolate</p>		<p>cireux, vert, fruité, fleur</p>	<p>Helsper <i>et al.</i>, 1998</p>
<p>isodihydrolavandulal (2-isopropyl-5-méthyl-2-hexénal)</p>		<p>herbeux, lavande, boisé, vert, myrtille, tomate</p>	<p>Won <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>(-)-linalol</p>		<p>citronné, floral, sucré, bois de rose boisé, vert, myrtille</p>	<p>Ohloff & Demole, 1987 Kim <i>et al.</i>, 2000 Babu <i>et al.</i>, 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i>, 2004 Baydar & Baydar, 2005 Joichi <i>et al.</i>, 2005 Rusanov <i>et al.</i>, 2009 Won <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>myrcène</p>		<p>poivré, terpène, épicé, baume, plastique</p>	<p>Flament <i>et al.</i>, 1993 Kim <i>et al.</i>, 2000 Babu <i>et al.</i>, 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>nérol</p>		<p>sucré, naturel, neroli, citronné, magnolia</p>	<p>Flament <i>et al.</i>, 1993 Helsper <i>et al.</i>, 1998 Babu <i>et al.</i>, 2002 Scalliet <i>et al.</i>, 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i>, 2004 Shalit <i>et al.</i>, 2004 Baydar & Baydar, 2005 Joichi <i>et al.</i>, 2005 Bianchi <i>et al.</i>, 2007 Rusanov <i>et al.</i>, 2009 Spiller <i>et al.</i>, 2010</p>
<p>acétate de néryle</p>		<p>floral rose, savonneux, citronné, rosée, poire</p>	<p>Flament <i>et al.</i>, 1993 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i>, 2000 Shalit <i>et al.</i>, 2003 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i>, 2004 Shalit <i>et al.</i>, 2004 Bianchi <i>et al.</i>, 2007 Spiller <i>et al.</i>, 2010</p>

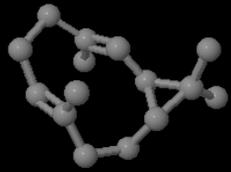
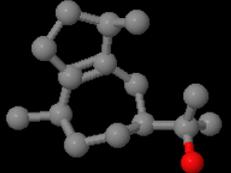
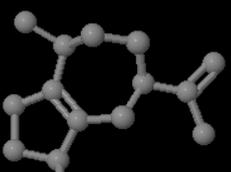
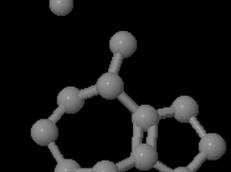
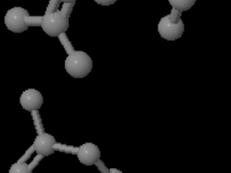
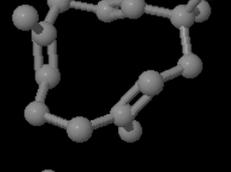
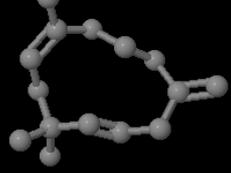
cycliques	néral (citral B ; (E)-citral)		citronné, citron	Helsper <i>et al.</i> , 1998 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Spiller <i>et al.</i> , 2010
	acide nérique			Joichi <i>et al.</i> , 2005
	(E)- β -ocimène (<i>trans</i> - β -ocimène)		sucré, herbeux	Flament <i>et al.</i> , 1993 Shalit <i>et al.</i> , 2004
	dihydroactinidiolide		musc, coumarine	Joichi <i>et al.</i> , 2005
	bornéol		pin, camphre, terreux	Joichi <i>et al.</i> , 2005
	camphène		frais, boisé, sapin, terpène	Kim <i>et al.</i> , 2000
	camphre		camphré	Joichi <i>et al.</i> , 2005
	Δ -3-carène		sucré, citronné	Shalit <i>et al.</i> , 2004
	carvone		menthe, réglisse	Naves, 1949
	<i>p</i> -cymène		frais, citronné terpène, boisé, épice	Schulz, 2003 Won <i>et al.</i> , 2009

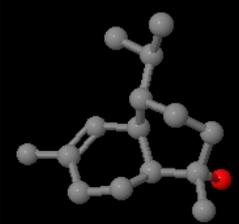
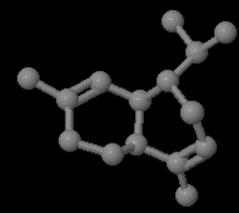
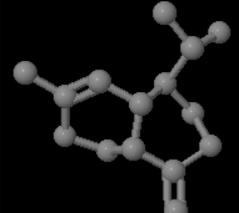
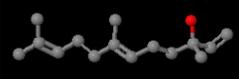
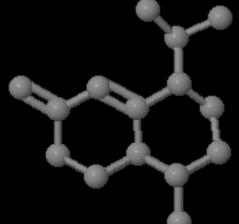
eucalyptol (1,8-cinéol)		eucalyptus herbeux, camphre	Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2004
limonène		citronné, orange, frais, sucré	Flament <i>et al.</i> , 1993 Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Won <i>et al.</i> , 2009
cis-linalol oxide (furanoïde)		terreux, floral, sucré, boisé	Joichi <i>et al.</i> , 2005
trans-linalol oxyde (pyranoïde)		citron vert	Joichi <i>et al.</i> , 2005
acétate de menthyle		thé, menthe, fruité	Won <i>et al.</i> , 2009
(±)-nérol oxide		vert, herbe, herbeux, oxyde de diphényle, narcisse, céleri	Ohloff & Demole, 1987
perillène		boisé,	Ohloff & Demole, 1987 Schulz, 2003
α-pinène		frais, camphre, sucré, pin, terreux, boisé	Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Won <i>et al.</i> , 2009
β-pinène		bois sec, résineux, pin, foin vert,	Flament <i>et al.</i> , 1993 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004
Rose furane		Caramel, vert, menthe	Ohloff & Demole, 1987 Schulz, 2003
cis-rose oxyde		vert, rose rouge, épice, frais, géranium	Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004

sesquiterpènes	<i>trans</i> -rose oxyde		floral, vert, vert, herbeux (menthe), fruité	Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Babu <i>et al.</i> , 2002
	sabinène		boisé, terpène, citronné, pin, épice	Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004
	hydrate de <i>cis</i> -sabinène		baume	Joichi <i>et al.</i> , 2005
	terpinén-4-ol			Babu <i>et al.</i> , 2002
	α -terpinéol		pin, terpène, lilas, citronné, boisé, floral	Babu <i>et al.</i> , 2002 Joichi <i>et al.</i> , 2005
	acétate de terpinyle		herbeux, bergamote, lavande, chaud, citronné	Won <i>et al.</i> , 2009
	β -bourbonène		herbeux, boisé	Flament <i>et al.</i> , 1993 Babu <i>et al.</i> , 2002
	α -cadinol		herbe, bois	Joichi <i>et al.</i> , 2005
	δ -cadinol		herbeux	Joichi <i>et al.</i> , 2005
	α -cadinène		boisé, sec	Babu <i>et al.</i> , 2002
	γ -cadinène			Won <i>et al.</i> , 2009

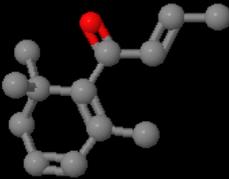
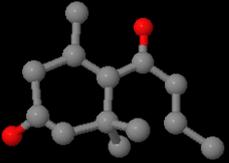
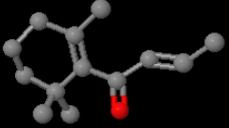
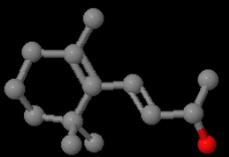
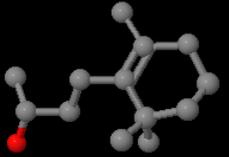
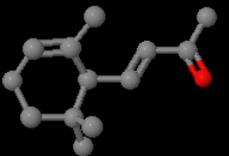
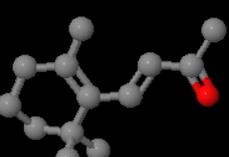
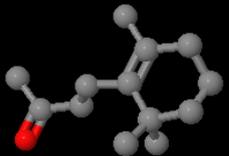
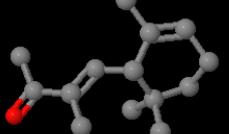
<p>δ-cadinène</p>		<p>thym, herbeux, boisé, sec</p>	<p>Guterman <i>et al.</i>, 2002 Shalit <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>β-caryophyllène (<i>trans</i>-caryophyllène)</p>		<p>sucré, boisé, épice, clou de girofle, sec</p>	<p>Flament <i>et al.</i>, 1993 Helsper <i>et al.</i>, 1998 Kim <i>et al.</i>, 2000 Babu <i>et al.</i>, 2002 Guterman <i>et al.</i>, 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i>, 2004 Joichi <i>et al.</i>, 2005 Bianchi <i>et al.</i>, 2007 Won <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>isocaryophyllène</p>		<p>boisé, épice</p>	<p>Won <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>oxyde de caryophyllène</p>		<p>sucré, frais, sec, boisé, épice</p>	<p>Guterman <i>et al.</i>, 2002 Shalit <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>α-copaène</p>		<p>boisé, épice, miel</p>	<p>Guterman <i>et al.</i>, 2002 Shalit <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>α-cubébène</p>		<p>herbeux, cireux</p>	<p>Flament <i>et al.</i>, 1993 Guterman <i>et al.</i>, 2002 Shalit <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>β-cubébène</p>		<p>citronné, fruité, radis</p>	<p>Helsper <i>et al.</i>, 1998 Guterman <i>et al.</i>, 2002 Shalit <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>β-élémol</p>			<p>Joichi <i>et al.</i>, 2005</p>

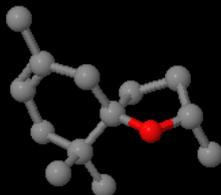
β -élémane		herbeux, cireux, frais	Babu <i>et al.</i> , 2002 Guterman <i>et al.</i> , 2002 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
bicycloélémane			Guterman <i>et al.</i> , 2002 Shalit <i>et al.</i> , 2004
α -eudesmol			Joichi <i>et al.</i> , 2005
β -eudesmol		boisé, vert	Joichi <i>et al.</i> , 2005
γ -eudesmol		cireux, sucré	Joichi <i>et al.</i> , 2005
farnésol		léger, muguet floral, sucré, lis, cireux	Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Rusanov <i>et al.</i> , 2009
2,3-dihydrofarnésol		floral, métallique, cyclamen	Joichi <i>et al.</i> , 2005
acétate de farnésyle		vert, floral, rose	Joichi <i>et al.</i> , 2005
α -farnésène		citronné, herbeux, lavande, bergamote, myrrhe, neroli, vert	Dobson & Bergström, 2000 Guterman <i>et al.</i> , 2002 Kim <i>et al.</i> , 2000 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Won <i>et al.</i> , 2009
germacrène D			Flament <i>et al.</i> , 1993 Guterman <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Hendel-Rahmanim <i>et al.</i> , 2007

bicyclogermacrène		vert, boisé	Guterman <i>et al.</i> , 2002 Shalit <i>et al.</i> , 2004
guaiol		léger, bois de gaïac, thé, rose	Joichi <i>et al.</i> , 2005
α -guaiène		sucré, boisé, baume, poivré	Joichi <i>et al.</i> , 2005
β -guaiène		sucré, boisé, sec, bois de gaïac, épicé, poudreux	Won <i>et al.</i> , 2009
hédycaryol			Joichi <i>et al.</i> , 2005
α -humulène		boisé	Joichi <i>et al.</i> , 2005
β -humulène			Babu <i>et al.</i> , 2002
époxyde d'humulène			Joichi <i>et al.</i> , 2005

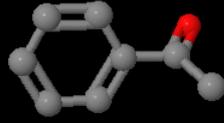
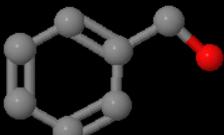
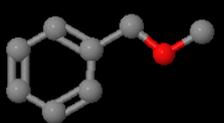
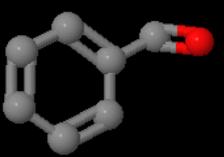
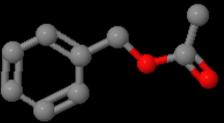
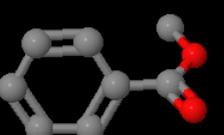
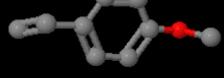
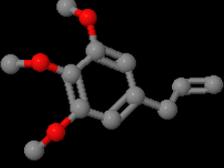
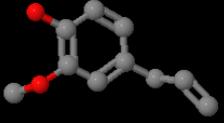
T-muurolol		herbeux, épicé, miel	Joichi <i>et al.</i> , 2005
α -muurolène			Guterman <i>et al.</i> , 2002 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
γ -muurolène		herbeux, boisé, épice	Flament <i>et al.</i> , 1993
(E)-nérolidol		floral, citron vert, boisé, cireux	Joichi <i>et al.</i> , 2005
bicyclosésquiphellandrène			Guterman <i>et al.</i> , 2002 Shalit <i>et al.</i> , 2004

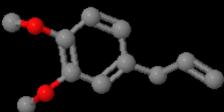
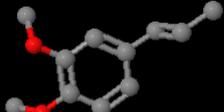
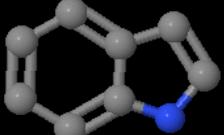
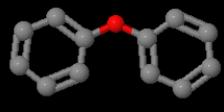
Annexe 3 : Liste non exhaustive des principaux terpénoïdes participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentscompany.com).

Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
β -damascénone		naturel, sucré, fruité, rose, prune, raisin, framboise, sucre	Ohloff & Demole, 1987 Schulz, 2003 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010
3-hydroxy- β -damascénone			Ohloff & Demole, 1987
β -damascone		fruité, floral, cassis, prune, rose, miel, tabac	Ohloff & Demole, 1987 Babu <i>et al.</i> , 2002
3-hydroxy- β -damascone			Joichi <i>et al.</i> , 2005
β -ionol		sucré, herbeux, floral, violette, tropical, baume, boisé	Joichi <i>et al.</i> , 2005
dihydro- β -ionol		boisé, floral, ambré	Nakamura, 1987 Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005
5-oxo-dihydro- α -ionol			Joichi <i>et al.</i> , 2005
α -ionone		sucré, boisé, floral, violette, iris, tropical, fruité	Spiller <i>et al.</i> , 2010
β -ionone		floral, boisé, sucré, fruité, fruits rouges, tropical, cire d'abeille	Flament <i>et al.</i> , 1993 Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010
3-hydroxy- β -ionone			Joichi <i>et al.</i> , 2005
dihydro- β -ionone		terreux, boisé, acajou, iris, sec, ambre	Nakamura, 1987 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005
α -isométhyl ionone		violette, sucré, iris, poudreux, floral, boisé	Won <i>et al.</i> , 2009

<i>cis</i> -théaspirane (théaspirane B)		thé, herbeux, vert, humidité, tabac, feuille, métallique, boisé, épicé	Nakamura, 1987 Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>trans</i> -théaspirane (théaspirane A)		thé, herbeux, vert, humidité, tabac, feuille, métallique, boisé, épicé	Nakamura, 1987 Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005

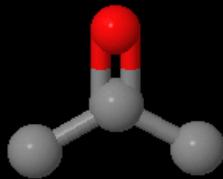
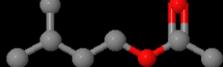
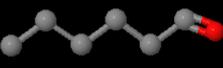
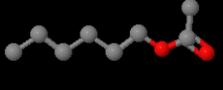
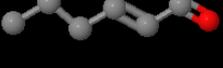
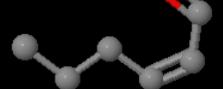
Annexe 4 : Liste non exhaustive des principales cétones de roses participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentcompany.com).

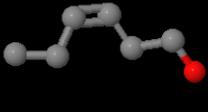
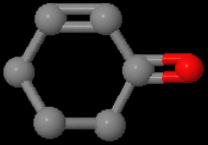
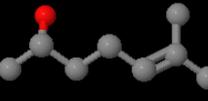
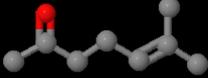
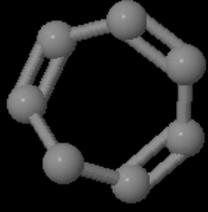
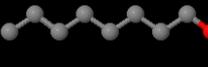
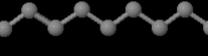
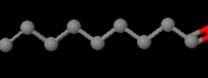
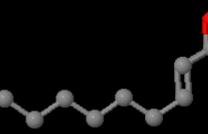
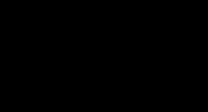
Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
acétophénone		sucré, âcre, aubépine, mimosa, amande, acacia, chimique,	Joichi <i>et al.</i> , 2005
alcool benzylique		floral, rose, phénolique, balsamique	Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Spiller <i>et al.</i> , 2010
éther méthylé de benzyle		fruité, éthéré, ylang, vert, floral, jacinthe	Flament <i>et al.</i> , 1993
benzaldéhyde		fort, vif, sucré, amer, amande, cerise	Flament <i>et al.</i> , 1993 Kim <i>et al.</i> , 2000 Joichi <i>et al.</i> , 2005
acétate de benzyle		sucré, floral, fruité, jasmin frais	Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007
benzoate de méthyle		phénolique, gaulthérie, amande, floral, ylang-ylang,	Kim <i>et al.</i> , 2000 Won <i>et al.</i> , 2009
anisole		phénolique, essence, éthéré, anis	Flament <i>et al.</i> , 1993
4-méthylanisole <i>p</i> -méthoxytoluène		naphtalène, crésol, ylang, poudreux, noisette	Flament <i>et al.</i> , 1993
<i>p</i> -vinylanisole (4-vinylanisole ; <i>p</i> -méthoxystyrène)		sucré	Nakamura, 1987 Flament <i>et al.</i> , 1993
élémicine		épice, fleur	Joichi <i>et al.</i> , 2005
estragol		sucré, sassafras, anis, épice, vert, herbeux, fenouil	Flament <i>et al.</i> , 1993
eugénol		sucré, épice, clou de girofle, boisé	Naves, 1949 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009

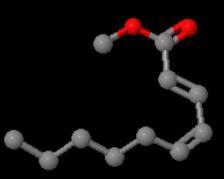
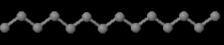
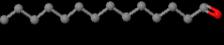
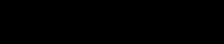
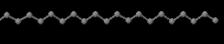
méthyl eugénol		sucré, frais, chaud, épicé, clou de girofle, oeillet, cannelle	Naves, 1949 Flament <i>et al.</i> , 1993 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Wu <i>et al.</i> , 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Rusanov <i>et al.</i> , 2009
méthyl isoeugénol		épicé, clou de girofle, floraison, oeillet, boisé	Wu <i>et al.</i> , 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005
indole		animal, floral, naphtalène, fécal	Nakamura, 1987 Joichi <i>et al.</i> , 2005
orcinol diméthyléther (3,5-diméthoxytoluène ; 1,3-diméthoxy-5-méthyl benzène)			Nakamura, 1987 Mookherjee <i>et al.</i> , 1989 Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Lavid <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
phénoxybenzène (éther de diphenyle)		géranium, feuille, vert, phénolique	Won <i>et al.</i> , 2009
2-phényléthanol		floral, rose, rose fanée, rose épanouie, eau	Nakamura, 1987 Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Oka <i>et al.</i> , 1999 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Babu <i>et al.</i> , 2002 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003 Verhoeven <i>et al.</i> , 2003 Picone <i>et al.</i> , 2004 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Baydar & Baydar, 2005 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Bianchi <i>et al.</i> , 2007 Rusanov <i>et al.</i> , 2009 Won <i>et al.</i> , 2009 Spiller <i>et al.</i> , 2010
acétate de 2-phényléthyle		rose épanouie, sucré, miel, fruité, tropical	Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2003 Schulz, 2003 Verhoeven <i>et al.</i> , 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005

			Spiller <i>et al.</i> , 2010
isophorone		rafraîchissement, boisé, sucré, vert, camphre, fruité, moisi, bois de cèdre, tabac, cuir	Kim <i>et al.</i> , 2000
salicylate de méthyle		gaulthérie, menthe,	Kim <i>et al.</i> , 2000 Joichi <i>et al.</i> , 2005
dibenzothiophène (et ses dérivés méthylés)		fade,	Schulz, 2003
1,3,5-triméthoxybenzène			Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Wu <i>et al.</i> , 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005
3,5-diméthoxybenzène			Shalit <i>et al.</i> , 2004

Annexe 5 : Liste non exhaustive des principaux composés aromatiques participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentscompany.com).

Nom	Représentation	Descriptif de l'odeur	Référence
acétone		solvant, étheré, pomme, poire	Flament <i>et al.</i> , 1993
acétate d'éthyle		étheré, fruité, sucré, herbe, vert	Joichi <i>et al.</i> , 2005
2-butanol		sucré, abricot	Joichi <i>et al.</i> , 2005
acétate de butyle		étheré, solvant, fruité, banane	Kim <i>et al.</i> , 2000
isoamyl acétate		sucré, fruité banane, solvant	Flament <i>et al.</i> , 1993
pentanol			Joichi <i>et al.</i> , 2005
pentanal			Joichi <i>et al.</i> , 2005
acétate de pentyle			Joichi <i>et al.</i> , 2005
hexanol			Kim <i>et al.</i> , 2000 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
2-éthyl hexanol		citronné frais, floral, huileux, sucré	Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2004
hexanal		frais, vert, grassex, aldéhydique, herbe, feuillage, fruité, sueur	Flament <i>et al.</i> , 1993 Joichi <i>et al.</i> , 2005
acétate d'héxyle		fruité, vert, pomme, banane, sucré	Flament <i>et al.</i> , 1993 Helsper <i>et al.</i> , 1998 Kim <i>et al.</i> , 2000 Shalit <i>et al.</i> , 2003 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>trans</i> -2-hexénol (<i>(E)</i> -2-hexénol)		frais, vert, feuillage fruité, banane pas mûr	Schulz, 2003 Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>trans</i> -2-hexénal (<i>(E)</i> -2-hexénal)		vert, banane, aldéhydique, grassex, fromage	Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>cis</i> -2-hexénal (<i>(Z)</i> -2-hexénal)		vert	Flament <i>et al.</i> , 1993
acétate de <i>trans</i> -2-hexényle (acétate de (<i>E</i>)-2-hexényle)		sucré, troène, vert, frais, épilchures de pomme, épilchures de	Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004

		banane, cireux pomme	Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>cis</i> -3-hexéno (<i>Z</i>)-3-hexéno)		frais, vert, herbe coupé, feuillage, légume, herbeux, huileux	Kim <i>et al.</i> , 2000 Scalliet <i>et al.</i> , 2002 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Spiller <i>et al.</i> , 2010
<i>trans</i> -3-hexéno (<i>E</i>)-3-hexéno)		vert intense, amer, terreux, gras	Joichi <i>et al.</i> , 2005 Spiller <i>et al.</i> , 2010
acétate de <i>cis</i> -3-hexényle (acétate de (<i>Z</i>)-3-hexényle)		frais, vert, sucré, fruité, banane, pomme, herbeux	Mookherjee <i>et al.</i> , 1989 Shalit <i>et al.</i> , 2003 Schulz, 2003 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005 Flament <i>et al.</i> , 1993
2-cyclohexén-1-one		grillé, sariette, vert	Kim <i>et al.</i> , 2000
6-méthyl-5-heptén-2-ol (hepténo de coriandre)		sucré, huileux, vert, coriandre	Joichi <i>et al.</i> , 2005
6-méthyl-5-heptén-2-one		citron vert, moisi, citronnelle, pomme,	Dobson & Bergström, 2000 Joichi <i>et al.</i> , 2005
cycloheptatriène			Won <i>et al.</i> , 2009
octanol		Cireux, vert, orange, aldéhydique, rose, champignon	Joichi <i>et al.</i> , 2005
nonane		essence	Kim <i>et al.</i> , 2000
nonanal		cireux, aldéhydique, rose frais, iris, zest d'orange, gras, épilures	Flament <i>et al.</i> , 1993 Shalit <i>et al.</i> , 2004 Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>trans</i> -2-nonéno (<i>E</i>)-2-nonéno)		gras, vert, concombre, aldéhydique, citronné	Joichi <i>et al.</i> , 2005
<i>trans</i> -4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène (<i>E</i>)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène)			Flament <i>et al.</i> , 1993 Schulz, 2003
décane			Kim <i>et al.</i> , 2000
décanal		sucré, aldéhydique, cireux zest d'orange, citronné, floral	Flament <i>et al.</i> , 1993 Schulz, 2003

2,4-décadiénoate de méthyle		fruité, cireux, poire	Joichi <i>et al.</i> , 2005
2-undécanone		cireux fruité crémeux, graisseux, iris, floral	Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000
6,10-diméthyl-5,9-undécadién-2-ol			Joichi <i>et al.</i> , 2005
tridécane			Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000
2-tridécanone		graisseux, cireux laiteux, noix de coco, noisette, herbeux, terreux	Dobson & Bergström, 2000 Kim <i>et al.</i> , 2000
tétradécane		léger, cireux	Kim <i>et al.</i> , 2000
tétradécanol		fruité, cireux iris, noix de coco	Kim <i>et al.</i> , 2000
tétradécanal		graisseux, cireux ambre, encens, sec, zeste de citron, musc	Dobson & Bergström, 2000
acétate de tétradécyle (acétate de myristyle)		graisseux, cireux	Dobson & Bergström, 2000
pentadécane		cireux	Dobson & Bergström, 2000
pentadécanol			Kim <i>et al.</i> , 2000
2-pentadécanone		frais, jasmin, céleri	Kim <i>et al.</i> , 2000
hexadécane			Kim <i>et al.</i> , 2000
hexadécanol		cireux, floral	Kim <i>et al.</i> , 2000
hexadécanal		carton	Dobson & Bergström, 2000
acétate d'hexadécyle (acétate de cétyle)			Dobson & Bergström, 2000
heptadécane			Babu <i>et al.</i> , 2002
nonadécane (C19)		fade	Babu <i>et al.</i> , 2002 Schulz, 2003
nonadécène			Schulz, 2003
cis-9-nonadécène			Schulz, 2003
9-éicosène (C20)			Babu <i>et al.</i> , 2002
hénicosane (hénéicosane)		cireux	Dobson & Bergström, 2000 Schulz, 2003
docosane (C22)		cireux	Babu <i>et al.</i> , 2002

Annexe 6 : Liste non exhaustive des principaux dérivés d'acides gras participant au parfum des roses. Les représentations des molécules ont été obtenues avec le logiciel Jmol. Les odeurs des molécules sont issues de la base The Good Scent Company (www.thegoodscentcompany.com).

Clone n°	Numéro d'accension	Résultat de blast		Amorces	T _m (°C)
PM1/ DIF1	CF349372	Nudix hydrolase	Fw	TCGTCAAGAGCCCCAGAAATA	60
			Rv	CCACTCATACCATCCCCAAC	60
PM3	EC586313	No significant homology	Fw	TGGGTTTTCGTTGCCTAGATT	59
			Rv	CAAATTTGCACCATAACATGAGA	59
PM4	EC586128	Peptidyl-prolyl isomerase	Fw	TCAATCTCAAGTTTTGGAGCAC	59
			Rv	CTTGCCCAATTTTGAAGCTG	60
PM5	BQ105401	UDP-glucosyltransferase	Fw	ATGATGCGTTTATGCCTTGG	60
			Rv	TTACCCCAACAATCCCAAAC	59
PM6	BI977820	Aldoketoreductase	Fw	TCTGTGAAACTGACACCAGAAGA	59
			Rv	AGCATCTTCGGAAGCAAAAAG	59
PM7	CF349692	Long chain fatty alcohol oxidase	Fw	GAGGTGGCAGGAGTAGACAA	60
			Rv	CAGCAAGTGATCGGATTTGA	59
PM9	BI978145	Metal ion binding protein	Fw	GGAGCCAAGAAAGATGATAAGAAA	60
			Rv	TGGTCACCACCTCCGTCT	60
PM10	BQ106431	Long chain fatty alcohol oxidase	Fw	CCTTCCATGAACGAGCTATATGA	60
			Rv	CATCTTCCCATCTTTTGTATGC	59
PM13	BQ104744	BRH1 RING finger protein	Fw	TTCCCAGTGGGTTACACAGAG	60
			Rv	CCCAAAAGAGAGAGGGTGTG	59
PM19	BI978913	No significant homology	Fw	TCCTCTGCCAACACCATAGTT	59
			Rv	GGTAAAGGGCCAAGAAGGAC	59
PM20	BQ104568	PREG1-like negative regulator	Fw	GCTTATGTTTATCTCGATCGGTTT	59
			Rv	ACGTTGAACGAATTGATAGGC	59
PM29	BQ106437	Hypothetical protein A. <i>thaliana</i>	Fw	CGGGATTTTTTTCAGCTGTTTG	60
			Rv	TTGTGACTGTGGCCATTGAT	59
PM35	BQ106017	R-oxynitrile lyase isoenzyme 1	Fw	ACGGAGCTGTTGAATTGCTT	59
			Rv	CTGTGGCATGAATTCCCACT	60
PM36	EC586532	Delta24-sterol-C-methyltransferase	Fw	TGGGATTTTAAGGAGATGTCTG	59
			Rv	TCGCTTTTGTGATCTTGC	60
PM45	BQ105260	Heat shock protein	Fw	CAAGGTCTGGAACCAAGGAG	59
			Rv	TCCAATCATGCTCACATCAGA	60
PM46	BQ104892	Common plant regulatory factor	Fw	CAATGATGAAGTAAATCTGTGAAG	60
			Rv	TGGTATGGTTTTTGGGATCTG	59
PM47	EC587456	Triterpene UDP-Glucosyl transferase	Fw	CATTGATGTCCCTCAAGCAG	59
			Rv	GAAAAATTTAGCTGGTGACTTTGC	60
PM51	BQ104199	MYBR2 transcription factor	Fw	CACTATGGCCTCGCACTACC	60
			Rv	TCGTAGCCAGGAGGAGAGTC	59
PM67	BQ105660	Cytochrome P450-like protein	Fw	GCTGACAAGTACGGTCCAATC	59
			Rv	AGCTTCATAGTTGTTGATGACCAG	59
PM84	BI977979	Auxin-responsive protein	Fw	TTAAACCACGACGAGACGAA	59
			Rv	TCGGAGAAGCCACGTTTAGA	60
PM88	BQ105775	Short-chain alcohol dehydrogenase like protein	Fw	GGTGAAGCTCCTCTTCGACA	60
			Rv	GCAGTTGACCAGGATGTGG	60
DIF38	EU603403	Putative laccase	Fw	TGACCAACCAAGGAATCCA	59
			Rv	CTGGTTGAATCGGGCACT	59
HKG1		RhTub	Fw	ATTGAGCGTCCCACCTACAC	62
			Rv	AGCATGAAATGGATCCTTGG	58
HKG2		RhEF1- α :	Fw	GGGTAAGGAGAAGGTTACATC	66
			Rv	CAGCCTCCTTCTCAAACCTCT	64

Annexe 7 : Séquence des amorces utilisées en qPCR. Fw : amorce sens ; Rv : amorce antisens ; T_m : température de fusion.

Amorces :	Séquences :	T_m (°C)
5'UTR_Fw1	TCGATCTGTCTTTCTAGCCTTT	49,6
3'UTR_Rv1	CCAGCACAGAGATTGAAGCA	51,1
3'UTR_Rv2	CCATGGTACGTAGTACAAGTAG	43,9

Annexe 8 : Séquence des amorces utilisées en PCR classique. Fw : amorce sens ; Rv : amorce antisens ; T_m : température de fusion.

Amorces :	Séquences :	T_m (°C)
a1 & a3 Fw avec ATG	ATGGGTAGCTTCCCATTCCAC	54,4
a2 Fw avec ATG	ATGGGTAGCTTCCGATTCCAC	54,5
a1 & a3 Fw CACC avec ATG	CACCATGGGTAGCTTCCCATTCCAC	63,2
a2 Fw CACC avec ATG	CACCATGGGTAGCTTCCGATTCCAC	63,3
a1 & a3 Fw CACC sans ATG	CACCGGTAGCTTCCCATTCCACAGG	65,1
a2 Fw CACC sans ATG	CACCGGTAGCTTCCGATTCCACAGG	65,2
a1 & a3 Fw EcoRI avec ATG	CCGGAATTCCGGATGGGTAGCTTCCCATTCCAC	75,3
a2 Fw EcoRI avec ATG	CCGGAATTCCGGATGGGTAGCTTCCGATTCCAC	75,3
a1, a2 & a3 Rv avec TGA	TCAATACGTGCTGAGGATGGC	55,0
a1, a2 & a3 Rv sans TGA	ATACGTGCTGAGGATGGCTTG	54,2
a1, a2 & a3 Rv XhoI avec TGA	CCGCTCGAGCGGTCAATACGTGCTGAGGATGGC	78,1

Annexe 9 : Séquence des amorces utilisées pour la conception des différentes constructions des 3 allèles de *RhPAAS*. Fw : amorce sens ; Rv : amorce antisens ; T_m : température de fusion.