



**HAL**  
open science

# Biosynthèse des composés odorants chez différents Pelargonium utilisés pour la production d'huile essentielle

Bernard Blerot

► **To cite this version:**

Bernard Blerot. Biosynthèse des composés odorants chez différents Pelargonium utilisés pour la production d'huile essentielle. Biologie végétale. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LY-SES003 . tel-01763435

**HAL Id: tel-01763435**

**<https://theses.hal.science/tel-01763435>**

Submitted on 11 Apr 2018

**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.

ACADEMIE DE LYON

UNIVERSITE JEAN MONNET

THESE

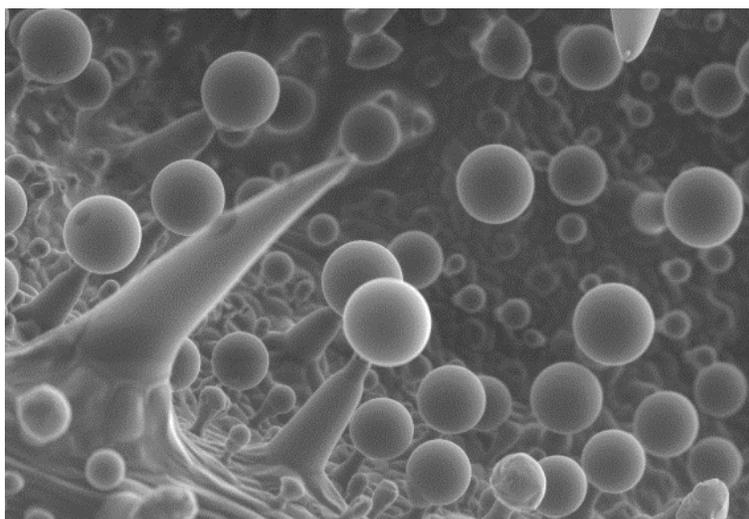
Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences

Discipline : Biologie et Physiologie Végétales

# Biosynthèse des composés odorants chez différents *Pelargonium* utilisés pour la production d'huile essentielle

Par

Bernard BLEROT



Soutenue le 18 janvier 2016 devant le jury :

Mme Nathalie GUIVARC'H, Professeur, Université de Tours

Rapporteur

M. Philippe HUGUENEY, Directeur de recherche INRA-Colmar

Rapporteur

Mme Martine HOSSAERT, Directeur de recherche CNRS-Montpellier

Examinatrice

M. Fabrice FOUCHER, Directeur de recherche INRA-Angers

Examineur

M. Xavier NESME, Ingénieur de recherche INRA-Lyon

Examineur

Mme Sylvie BAUDINO, Professeur, Université de St-Etienne

Directrice de thèse



Adresse du laboratoire :  
Laboratoire de biotechnologies végétales  
appliquées aux plantes aromatiques et médicinales  
23 rue du Docteur Paul Michelon  
42023 Saint-Etienne Cedex 2  
France



Adresse de l'entreprise :  
Laboratoire Monique Rémy  
IFF, International Flavors & Fragrances  
Parc d'activité des Bois de Grasse  
18-20 Avenue Joseph Honoré Isnard  
06130 Grasse  
France

*A Sophia,*

## SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>1</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>13</b>
<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
AVANT-PROPOS.....	15
I. BOTANY, AGRONOMY AND BIOTECHNOLOGY OF PELARGONIUM USED FOR ESSENTIAL OIL.....	16
II. LE PROJET <i>PELARGONIUM</i> EN ÉGYPTÉ.....	42
II.1 Le <i>Pelargonium</i> dans la parfumerie.....	43
II.1.1 L'histoire de la culture du <i>Pelargonium</i> .....	43
II.1.2 Les produits issus du <i>Pelargonium</i> .....	44
II.1.3 L'utilisation des produits issus du <i>Pelargonium</i> .....	45
II.2 L'état actuel de la culture du <i>Pelargonium</i> égyptien.....	46
II.2.1 La production conventionnelle à Beni-Souef.....	46
II.2.2 Le marché de l'HE du <i>Pelargonium</i> égyptien.....	47
II.3 Le partenariat IFF-LMR et Hashem Brothers.....	48
III. LES COV.....	50
III.1 Le rôle des COV.....	51
III.1.1 L'attraction des pollinisateurs.....	53
III.1.2 La défense contre les agresseurs.....	55
III.1.2.1 La défense directe.....	57
III.1.2.2 La défense indirecte.....	60
III.1.3 La communication entre plantes.....	62
III.1.4 La défense face aux stress abiotiques.....	64
III.1.4.1 Les COV peuvent détourner un excès d'énergie.....	64
III.1.4.2 Les COV peuvent agir comme antioxydants.....	67
III.1.4.3 Les COV peuvent agir comme stabilisateurs membranaires.....	69
III.1.5 La combinaison des stress.....	70
III.2 Les facteurs influençant l'émission des COV.....	71
III.2.1 Les facteurs physiques.....	72
III.2.2 Les facteurs biologiques.....	73
III.2.3 L'impact du changement climatique sur les futures émissions de COV.....	74
III.3 Le stockage et l'émission des COV.....	78
III.3.1 Le transport des COV dans la cellule.....	78

III.3.2 Le stockage des COV.....	81
III.3.2.1 Le stockage intracellulaire.....	81
III.3.2.2 Les structures spécialisées de stockage et d'émission.....	82
III.3.2.2.1 Les trichomes glandulaires.....	84
III.3.2.2.1 Les canaux résinifères.....	87
III.4 La biosynthèse des COV.....	88
III.4.1 La biosynthèse des phénylpropanoïdes/benzénoïdes.....	89
III.4.2 La biosynthèse des dérivés d'acides gras (voie des oxylipides).....	91
III.4.3 La biosynthèse des terpènes et terpénoïdes.....	93
III.4.3.1 La formation de l'IPP et du DMAPP.....	95
III.4.3.2 La formation des prényl diphosphates.....	100
III.4.3.3 La formation des terpènes.....	103
III.4.3.4 La formation des terpénoïdes.....	112
III.5 La perception des COV.....	115
IV. LES BIOTECHNOLOGIES VÉGÉTALES.....	119
IV.1 Intérêt des biotechnologies végétales.....	120
IV.2 Les biotechnologies et l'industrie de la parfumerie.....	122
IV.2.1 Sélection des molécules d'intérêt.....	123
IV.2.2 Identification du végétal.....	126
IV.2.3 Etude des voies de biosynthèse et des enzymes clés.....	126
IV.2.4 Les biotechnologies comme aide à la sélection variétale.....	127
IV.2.5 Les biotechnologies pour produire des OGM de plantes.....	129
IV.2.6 Les biotechnologies pour produire des OGM de micro-organismes.....	133
IV.3 Les biotechnologies et l'industrie pharmaceutique.....	137
IV.4 Les biotechnologies et l'industrie agroalimentaire.....	141
V. CONCLUSIONS.....	143
VI. OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	144
<b>CHAPITRE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>147</b>
I. MATÉRIEL VÉGÉTAL, SOUCHES ET PLASMIDES.....	147
I.1 Le matériel végétal.....	147
I.1.1 <i>Pelargonium</i> .....	147
I.1.2 <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	147
I.2 Les souches bactériennes.....	150
I.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	150
I.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	150
I.3 Les plasmides.....	151
I.3.1 Plasmide de séquençage, multiplication et conservation des gènes.....	151
I.3.2 Plasmides d'expression bactérienne.....	152
I.3.3 Plasmides pour l'expression dans les cellules végétales.....	154
I.3.3.1 Transformation transitoire.....	154
I.3.3.2 Transformation stable.....	155
II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	156
II.1 Extraction d'acides nucléiques.....	156
II.1.1 Extraction d'ARN totaux à partir des jeunes feuilles de <i>Pelargonium</i> .....	156

II.1.2 Purification d'ADN plasmidique (Mini préparation d'ADN plasmidique).....	157
II.2 Obtention d'ADN complémentaire.....	158
II.2.1 Traitement à la DNase.....	158
II.2.2 Réaction de réverse-transcription.....	158
II.2.3 Vérification de la qualité des ADNc sur gel d'électrophorèse.....	159
II.2.4 Vérification de la qualité des ADNc par « fausse » rétro-transcription.....	159
II.3 Construction de la banque d'ADNc double brin pour la RACE-PCR.....	160
II.3.1 Purification des ARN messagers.....	160
II.3.2 Obtention de la banque d'ADNc double brin.....	160
II.4 Techniques d'amplification de l'ADN par PCR.....	161
II.4.1 Amplification par oligonucléotides dégénérés.....	161
II.4.2 RACE-PCR.....	161
II.4.3 Marche génomique.....	162
II.4.3 PCR Inverse.....	163
II.4.5 RT-PCR semi-quantitative.....	164
II.4.6 RT-PCR quantitative (qPCR) .....	165
II.5 Techniques de clonage.....	167
II.5.1 Purification sur gel des fragments PCR.....	167
II.5.2 Clonage de fragments dans les vecteurs pGemT-easy et pCR-Blunt.....	167
II.5.3 Sous-clonage par recombinaison avec le système GATEWAY™ .....	168
II.6 Expression de protéines recombinantes.....	170
II.6.1 Conception des différentes constructions des TPS.....	170
II.6.2 Expression dans <i>Escherichia coli</i> .....	170
II.6.2.1 Transformation des bactéries thermo-compétentes.....	170
II.6.2.2 La technique de production des enzymes dans les bactéries.....	171
II.6.2.3 Production des bactéries thermo-compétentes.....	171
II.6.3 Expression <i>in Planta</i> via <i>A. tumefaciens</i> .....	173
II.6.3.1 Transformation des bactéries thermo-compétentes.....	173
II.7 Purification de protéines recombinantes.....	174
II.7.1 Lyse cellulaire et centrifugation.....	174
II.7.2 Chromatographie d'affinité sur résine de chélation de cations métalliques.....	174
II.8 Tests d'activités des terpène synthases.....	176
II.9 Analyse des protéines par SDS-PAGE.....	176
II.10 Obtention de plantes transgéniques.....	178
II.10.1 Transformation transitoire de feuilles de tabac.....	178
II.10.2 Transformation stable de plants de <i>Pelargonium</i> et de tabac.....	179
III. TECHNIQUES DE BIO-INFORMATIQUE.....	181
III.1 Préparation d'une banque d'ADNc normalisée et pyroséquençage 454.....	181
III.2 Analyse des séquences obtenues.....	181
IV. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES.....	182
IV.1 Microscopie électronique à balayage environnemental.....	182
IV.2 Microscopie confocale.....	182
V. TECHNIQUES D'ANALYSES DU PARFUM.....	183
V.1 Extraction par solvant.....	184
V.1.1 Extraction à partir de végétal frais.....	184
V.1.1.1 Les extractions aux laboratoires .....	185

V.1.1.2 Réalisation d'un absolu au laboratoire de IFF-LMR.....	185
V.1.1.3 Réalisation de micro-extractions au LBVpam.....	187
V.1.1.4 Réalisation de micro-extractions en champ en Égypte.....	188
V.2 Distillation par vapeur d'eau.....	189
V.2.1 Le principe de l'hydrodistillation et de la distillation à la vapeur d'eau.....	189
V.2.2 Obtention d'une HE de <i>Pelargonium</i> au laboratoire de IFF-LMR.....	190
V.2.3 Obtention d'une HE de <i>Pelargonium</i> en conditions industrielles en Égypte.....	192
V.2.4 Obtention d'une HE <i>Pelargonium</i> par stripping en Égypte.....	192
V.2.5 Extraction sur des eaux de distillation.....	195
V.3 Analyse des composés volatils par GC-FID et GC-MS.....	196
V.3.1 GC-FID.....	196
V.3.2 GC-MS.....	196
V.4 Identification des composés.....	197
V.5 Traitements statistiques.....	198
VI. PROTOCOLES DES ESSAIS DE CULTURE DU <i>PELARGONIUM</i> .....	199
VI.1 Traitements des 17 parcelles R&D en Egypte en 2013.....	199
VI.2 Traitements des 10 parcelles R&D en Egypte en 2014.....	200
VI.3 Comparaison des rendements en HE de jeunes feuilles et de feuilles plus âgées.....	202
VI.4 Préfanage du <i>Pelargonium</i> cv. 'rosat' à Grasse.....	202
VI.5 Culture des <i>Pelargonium</i> cv. 'rosat' en conditions contrôlées au LBVpam.....	203
<b>CHAPITRE III - RÉSULTATS I : CARACTÉRISATION DES TERPÈNE SYNTHASES.....</b>	<b>205</b>
I. CHOIX DES TERPÈNE SYNTHASES À ÉTUDIER.....	205
I.1 Analyses des VOC des huiles essentielles commerciales.....	205
II. OBTENTION D'UN TRANSCRIPTOME DE FEUILLES DE <i>PELARGONIUM</i> CV. 'ROSAT GRASSE'.....	208
II.1 Analyse de la banque de transcriptome.....	208
II.2 Recherche de séquences correspondant à des TPS.....	210
III. CLONAGE ET ANALYSES DES SÉQUENCES DES QUATRE TERPÈNE SYNTHASES.....	212
III.1 Caractérisation fonctionnelle de quatre terpène synthases.....	212
III.1.1 Expression et purification des terpène synthases.....	212
III.1.2 Test d'activité des terpène synthases.....	214
III.1.2.1 Caractérisation fonctionnelle de la géraniol synthase.....	215
III.1.2.1.1 Analyse de la séquence de <i>PhGES</i> .....	215
III.1.2.1.2 Test d'activité de la protéine <i>PhGES</i> .....	217
III.1.2.1.3 Localisation de <i>PhGES</i> .....	217
III.1.2.2 Caractérisation fonctionnelle de la 1,8-cinéole synthase.....	219
III.1.2.2.1 Analyse de la séquence de <i>PhCINS</i> .....	219
III.1.2.2.2 Test d'activité de la protéine <i>PhCINS</i> .....	219
III.1.2.3 Caractérisation fonctionnelle de la myrcène synthase.....	220
III.1.2.3.1 Analyse de la séquence de <i>PhMYS</i> .....	220
III.1.2.3.2 Test d'activité de la protéine <i>PhMYS</i> .....	220
III.1.2.4 Caractérisation fonctionnelle de la 10- $\gamma$ -épi eudesmol synthase.....	221
III.1.2.4.1 Analyse de la séquence de <i>PhEDS</i> .....	221
III.1.2.4.2 Test d'activité de la protéine <i>PhEDS</i> .....	221
III.2 Comparaison des séquences des TPS.....	224

III.3 Profils d'expression des quatre TPS de <i>Pelargonium</i> .....	227
III.3.1 Profils d'expression analysés par RT-PCR semi-quantitative.....	227
III.3.1.1 Profil d'expression de <i>PhGES</i> .....	228
III.3.1.2 Profil d'expression de <i>PhCINS</i> .....	229
III.3.1.3 Profil d'expression de <i>PhMYS</i> .....	229
III.3.1.4 Profil d'expression de <i>PhEDS</i> .....	229
III.3.2 Profils d'expression quantitative de <i>PhGES</i> et <i>PhEDS</i> .....	229
IV. EXPRESSION DES TPS <i>IN PLANTA</i> .....	232
IV.1 Expression transitoire de <i>PhGES</i> et de <i>PhEDS</i> dans les feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	232
IV.2 Expression stable de <i>PhGES</i> et de <i>PhEDS</i> in planta dans les feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i> et de <i>Pelargonium</i> .....	233
V. CONCLUSIONS.....	234
<b>CHAPITRE IV - RÉSULTATS II : DIVERSITÉ DES COV DANS LE GENRE <i>PELARGONIUM</i></b> .....	<b>235</b>
I. ANALYSES OLFACTIVES ET CHIMIQUES DES <i>PELARGONIUM</i> .....	235
I.1 Caractérisation olfactive de 64 accessions de <i>Pelargonium</i> .....	235
I.2 Caractérisation chimique de 64 accessions de <i>Pelargonium</i> .....	237
II. ANALYSE DES RÉSULTATS BRUTS.....	238
II.1 Analyse en composantes principales sur l'ensemble des accessions.....	238
II.2 Analyse sur un sous-jeu de données.....	239
II.2.1 Analyse en composantes principales.....	239
II.2.2 Analyse discriminante.....	240
II.2.3 Classification hiérarchique agglomérative.....	243
II.3 Analyses après classification des COV par voie de biosynthèse.....	246
II.3.1 Analyse en composantes principales.....	249
II.3.2 Analyse discriminante.....	249
II.3.3 Classification hiérarchique agglomérative.....	252
III. CONCLUSIONS.....	254
<b>CHAPITRE V - RÉSULTATS III : CULTURE DU <i>PELARGONIUM</i> ET PRODUCTION D'HUILE ESSENTIELLE EN ÉGYPTÉ</b> .....	<b>257</b>
I. AMÉLIORATIONS DU PROCÉDÉ D'EXTRACTION.....	257
I.1 Optimisation de la distillation.....	257
I.2 Optimisation de la distillation avec stripping.....	259
II. AMÉLIORATIONS DES PRATIQUES CULTURALES DU <i>PELARGONIUM</i> EN ÉGYPTÉ.....	263
II.1 Amélioration des paramètres de la plantation.....	263
II.2 Amélioration des paramètres de croissance .....	265
II.2.1 Rendements obtenus en 2013.....	265
II.2.2 Rendements obtenus en 2014.....	267
II.2.3 Rendements obtenus en 2015.....	268
II.3 Etude de l'impact de la taille sur le rendement en HE.....	269
II.4 Amélioration des paramètres de la récolte .....	270
II.4.1 Le préfanage.....	270
II.4.1.1 Expérience de préfanage en Égypte.....	270

- Sommaire -

II.4.1.2 Expérience de préfanage à Grasse.....	272
II.4.2 La coupe.....	274
II.4.3 La période de récolte.....	275
II.5 Etude de l'influence des conditions de culture sur la composition de l'HE pour les cultivars 'rosat'.....	276
II.5.1 Production de <i>P. cv. 'rosat Chine'</i> et <i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i> en Égypte.....	276
II.5.2 Culture des 4 <i>Pelargonium 'rosats'</i> dans des conditions de température et de substrat contrôlées au LBVpam.....	278
III. CONCLUSIONS.....	283
<b><u>CHAPITRE VI - DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>287</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	<b>299</b>
<b><u>ANNEXES</u></b> .....	<b>347</b>

## REMERCIEMENTS

Mes profonds remerciements vont tout d'abord à ma directrice de thèse, Sylvie, qui a eu la passion de me faire découvrir la biologie moléculaire et de m'avoir ainsi servi de guide durant toute la réalisation de cette thèse. Je lui suis aussi reconnaissant d'avoir accepté de travailler sur une nouvelle plante modèle, le *Pelargonium*, qui s'est révélée être un modèle très riche et passionnant pour l'étude des terpène synthases et qui je l'espère, impliquera bien d'autres collaborations.

Je souhaite aussi exprimer ici toute ma gratitude à Bernard Toulemonde, directeur de LMR-IFF, qui depuis mon entrée, il y a 7 ans, dans le petit monde des produits naturels et de la parfumerie n'a eu de cesse de me prodiguer d'excellents conseils. Merci de m'avoir particulièrement soutenu dans ce travail ambitieux qui m'a permis d'explorer de nouveaux horizons et de m'épanouir encore un peu plus au sein de mon travail de chercheur sur les plantes aromatiques.

Je remercie aussi chaleureusement mes deux rapporteurs Natalie Guivarc'h, professeur à l'université de Tours et Philippe Hugueney, directeur de recherches à l'INRA de Colmar qui ont gentiment accepté de faire partie de cette aventure. Je tiens aussi à remercier les autres membres du jury, Martine Hossaert, Directeur de recherche CNRS à Montpellier, Fabrice Foucher, directeur de recherche à l'INRA d'Angers et enfin Xavier Nesme ingénieur de recherche à l'INRA de Lyon.

---

| 1

Ce travail de thèse n'aurait pu se faire sans la passion et l'énergie de Cécile Prunier qui fut une fantastique collègue et plus encore amie de paillasse avec qui j'ai eu la chance de faire mes premiers pas en biologie moléculaire. Ce travail de thèse est un véritable travail d'équipe (Vive la Pelargo Team !). Cécile, je te remercie profondément de m'avoir assisté avec tant de joie de vivre et j'espère que l'on continuera à partager d'agréables discussions et d'acharnées soirées de jeux de société ensemble. Ce fut un plaisir de partager la même paillasse avec toi et je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite!

Un tout grand merci à toute l'équipe de joyeux lurons du laboratoire de biotechnologies végétales de Saint-Etienne qui m'ont apporté leur amitié et moult conseils durant toutes ces années. Merci à Jean-Claude Caissard qui m'a initié à la microscopie et avec qui j'ai eu l'occasion de m'extasier durant des heures, plongé dans le noir sur la beauté de l'infiniment petit, j'en garderai de précieux clichés. Merci aussi à lui pour ses nombreuses blagues et anecdotes qui ont toujours le chic de rendre l'atmosphère de travail plus agréable. Merci à Jean-Louis Magnard et à Aurélie Bony qui m'ont donné les clés des techniques de biologie moléculaire et ont su me faire progresser. Merci également à Frédéric Jullien, voisin de paillasse au rire tonitruant, avec qui j'ai pu avoir de nombreux échanges fructueux mais aussi de franches rigolades qui rendent la vie toujours plus douce. Merci aussi à Sandrine Moja pour ses

## REMERCIEMENTS

Mes profonds remerciements vont tout d'abord à ma directrice de thèse, Sylvie, qui a eu la passion de me faire découvrir la biologie moléculaire et de m'avoir ainsi servi de guide durant toute la réalisation de cette thèse. Je lui suis aussi reconnaissant d'avoir accepté de travailler sur une nouvelle plante modèle, le *Pelargonium*, qui s'est révélée être un modèle très riche et passionnant pour l'étude des terpène synthases et qui je l'espère, impliquera bien d'autres collaborations.

Je souhaite aussi exprimer ici toute ma gratitude à Bernard Toulemonde, directeur de LMR-IFF, qui depuis mon entrée, il y a 7 ans, dans le petit monde des produits naturels et de la parfumerie n'a eu de cesse de me prodiguer d'excellents conseils. Merci de m'avoir particulièrement soutenu dans ce travail ambitieux qui m'a permis d'explorer de nouveaux horizons et de m'épanouir encore un peu plus au sein de mon travail de chercheur sur les plantes aromatiques.

Je remercie aussi chaleureusement mes deux rapporteurs Natalie Guivarc'h, professeur à l'université de Tours et Philippe Hugueney, directeur de recherches à l'INRA de Colmar qui ont gentiment accepté de faire partie de cette aventure. Je tiens aussi à remercier les autres membres du jury, Martine Hossaert, Directeur de recherche CNRS à Montpellier, Fabrice Foucher, directeur de recherche à l'INRA d'Angers et enfin Xavier Nesme ingénieur de recherche à l'INRA de Lyon.

---

| 1

Ce travail de thèse n'aurait pu se faire sans la passion et l'énergie de Cécile Prunier qui fut une fantastique collègue et plus encore amie de paillasse avec qui j'ai eu la chance de faire mes premiers pas en biologie moléculaire. Ce travail de thèse est un véritable travail d'équipe (Vive la Pelargo Team !). Cécile, je te remercie profondément de m'avoir assisté avec tant de joie de vivre et j'espère que l'on continuera à partager d'agréables discussions et d'acharnées soirées de jeux de société ensemble. Ce fut un plaisir de partager la même paillasse avec toi et je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite!

Un tout grand merci à toute l'équipe de joyeux lurons du laboratoire de biotechnologies végétales de Saint-Etienne qui m'ont apporté leur amitié et moult conseils durant toutes ces années. Merci à Jean-Claude Caissard qui m'a initié à la microscopie et avec qui j'ai eu l'occasion de m'extasier durant des heures, plongé dans le noir sur la beauté de l'infiniment petit, j'en garderai de précieux clichés. Merci aussi à lui pour ses nombreuses blagues et anecdotes qui ont toujours le chic de rendre l'atmosphère de travail plus agréable. Merci à Jean-Louis Magnard et à Aurélie Bony qui m'ont donné les clés des techniques de biologie moléculaire et ont su me faire progresser. Merci également à Frédéric Jullien, voisin de paillasse au rire tonitruant, avec qui j'ai pu avoir de nombreux échanges fructueux mais aussi de franches rigolades qui rendent la vie toujours plus douce. Merci aussi à Sandrine Moja pour ses

- Remerciements -

agréables discussions et son ouverture d'esprit. Un tout grand merci à Florence Nicolè pour qui les arcanes, pourtant obscures, de la biostatistique n'ont plus de secret et qui a toujours accepté de partager ses nombreuses connaissances avec enthousiasme. Notre collaboration avait commencé sur la rose où j'avais déjà pu apprécier la qualité de son travail et s'est poursuivie sur le *Pelargonium*... J'espère que cette fructueuse collaboration n'est pas prête de s'arrêter. Un tout grand merci à Nicolas Boyer, l'homme à la main verte du labo, qui a su apprivoiser les nombreuses variétés de *Pelargonium* qui ne cessaient d'arriver du monde entier... Quel bonheur de rentrer dans les serres où m'attendait une végétation luxuriante de *Pelargonium* tous plus beaux et plus odorants les uns que les autres... Un grand merci pour tout ton travail et ta passion. Ma gratitude va aussi à Florence Gros qui m'a aidé à mettre sous bocaux mes chers protégés. Je termine par remercier Yolande Despinasse, ancienne doctorante au LBVpam qui nous a montré avec excellence la voie à suivre et qui m'a aidé à mettre en graphe mes chers *Pelargonium* odorants. Je remercie aussi Pulu Sun, actuelle doctorante au laboratoire, pour ses discussions sur son beau pays qu'est la Chine et lui souhaite bonne chance pour la poursuite de son doctorat que, j'en suis sûr, elle terminera avec brio. A tous, je vous souhaite bonheur, réussite et tout le bien que vous méritez.

Je tiens à remercier chaleureusement Sylvain Legrand, maître de conférences à l'université de Lille qui m'a apporté ses précieuses compétences en bio-informatique. Un tout grand merci, Sylvain, pour cette enrichissante collaboration.

Je voudrais également remercier Isabelle Anselme-Bertrand du Centre Stéphanois de Microscopie ainsi que Sabine Palle de la plateforme microscopie de la faculté de médecine pour leur aide et leur expertise.

Un chaleureux merci aussi à toute l'équipe de recherche de LMR : ce sont de fantastiques collègues de travail de longue date avec qui j'ai eu l'occasion et continuerai de partager d'excellents moments. Merci à Jean-Claude Bayle, responsable de la recherche du laboratoire, de m'avoir soutenu et prodigué tant de conseils avisés avec passion. Merci aux As du laboratoire sans qui LMR ne serait certainement pas pareil, Eddy Foissac, Fabienne Bettini, Vanessa Gonnot, Heidi Jennifer Amador et Sophie Palatan qui sont des collaborateurs d'excellente qualité avec lesquels j'ai un immense plaisir à travailler. J'ai hâte de retrouver le laboratoire à plein temps pour continuer à parcourir le monde et développer ensemble de nombreux extraits et passionnants nouveaux projets de recherche.

Je voudrais aussi remercier très affectueusement Fabienne Bettini, la magicienne de la chromatographie du laboratoire de recherche de LMR ainsi que les stagiaires de l'équipe de recherche, Laura Villemaire et Kévin Poirot qui m'ont particulièrement aidé dans l'analyse et le traitement des centaines d'extraits de ce projet *Pelargonium*. Je leur souhaite beaucoup de bonheur et un futur parfumé.

- Remerciements -

Toute ma reconnaissance aussi à Sébastien Rodriguez de la Roseraie Le Vignal et à Sophie Palatan pour avoir si bien pris soin de mes protégés qui se sont épanouis entre leurs mains sous le soleil grassois.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude aux parfumeurs d'IFF, Anne-Sophie Chapuis-Cariou, Dominique Ropion, Alexis Dadier et Pierre-Yves Cariou. Merci d'avoir eu l'amabilité d'évaluer olfactivement les nombreuses variétés de *Pelargonium* en frais, huile essentielle et d'absolu afin d'en déceler les nombreuses facettes olfactives complexes. L'exercice fut périlleux mais brillamment réussi.

Merci au conservatoire national du *Pelargonium* de Bourges ainsi qu'au jardin botanique du parc de la tête d'or à Lyon qui ont mis généreusement à notre disposition leur impressionnante collection de *Pelargonium*.

Mes recherches n'auraient pas été possibles sans le concours de notre partenaire égyptien. Je remercie ainsi chaleureusement Moustafa et Arm Hashem de l'entreprise Hashem Brothers. Merci de m'avoir si gentiment accueilli dans votre magnifique pays, de m'avoir fait goûter les spécialités égyptiennes dont je suis friand et de continuer à être des partenaires de grande qualité. Merci aussi à Ahmed Abouelatta, ingénieur agronome, qui fut un excellent compagnon de travail et grâce à qui j'ai pu apprécier les magnifiques levers de soleil dans le désert égyptien et connaître l'immense plaisir d'arpenter durant de nombreuses heures les allées vertes de notre champ de production et de recherche.

---

| 3

Merci aussi à mes parents, mes frères et sœur, beau-frère et belles-sœurs sans oublier la joyeuse bande de neveux et nièces qui ont rendu mes retours au pays tellement agréables ! Merci de m'avoir toujours soutenu lors de mon parcours et de m'avoir entouré de conseils avisés et d'amour. Merci pour tout !

Enfin je garde le meilleur pour la fin... Un tout grand merci à ma jeune et merveilleuse femme Sophia d'avoir supporté toutes mes absences ces dernières années. J'ai dû accumuler de nombreux kilomètres durant mes allers-retours entre les pays stéphanois et niçois et ce n'était pas toujours facile, souvent éprouvant mais tu étais toujours à mes côtés pour m'encourager avec ta joie de vivre et ton optimisme qui font mon bonheur. Merci de tout mon cœur car sans toi cette thèse n'aurait pu se passer dans de si bonnes conditions... Quel bonheur de continuer notre chemin vers de nouvelles aventures en te sachant à mes côtés.

## RÉSUMÉ

*Pelargonium sp.*, appelé aussi « géranium » à odeur de rose ou « Géranium rosat » est l'une des plantes aromatiques et médicinales les plus cultivées au niveau international, essentiellement pour son huile essentielle (HE), utilisée par les industries des cosmétiques et de la parfumerie. Cette essence est extraite des feuilles par distillation vapeur et donne une HE riche de plusieurs centaines de molécules volatiles. Cette complexité est le résultat d'un long processus évolutif et de sélections variétales. Parmi ces composés volatils, les monoterpènes comme le géraniol, le citronellol et l'isomenthone, ou les sesquiterpènes comme le 10- $\gamma$ -épi-eudesmol et le 6,9-guaiadiène, jouent un rôle prépondérant dans le parfum du *Pelargonium*. Les proportions relatives de ces différents composés sont d'ailleurs utilisées comme marqueurs de la qualité de l'HE et déterminent la typicité du parfum des différents cultivars et origines (*P. cv. 'rosat Bourbon'*, *P. cv. 'rosat Chine'*, *P. cv. 'rosat Égypte'* et *P. cv. 'rosat Grasse'*).

Malgré de très nombreux travaux portant sur la chimie de cette HE, il n'existe aucune information sur les voies de biosynthèse de ces molécules et aucun gène intervenant dans ces voies n'a été isolé. Durant cette thèse, nous avons cloné et caractérisé fonctionnellement par expression et purification des protéines recombinantes chez *Escherichia coli* des gènes codant les enzymes clés de ces voies de biosynthèse, les terpène synthases. Nous avons ainsi pu caractériser quatre terpène synthases, dont une géraniol synthase mono-produit. Nous avons isolé deux autres monoterpène synthases multi-produits, produisant pour l'une majoritairement du myrcène mais aussi trois autres monoterpènes, et pour l'autre majoritairement du 1,8-cinéole ainsi que 10 autres monoterpènes minoritaires. Enfin, une sesquiterpène multi-produit, la 10- $\gamma$ -épi-eudesmol synthase, a été caractérisée. Nous avons ensuite analysé l'expression de la géraniol synthase et de la 10- $\gamma$ -épi-eudesmol synthase dans différentes accessions de *Pelargonium* par RT-qPCR et nous avons montré la relation entre la capacité de production des différents composés volatils et le niveau d'expression dans les feuilles de ces deux terpène synthases. L'efficacité de la transformation génétique du *Pelargonium* par *Agrobacterium tumefaciens* étant élevée, des expériences de transgénése ont aussi été réalisées afin de compléter la caractérisation fonctionnelle des gènes isolés.

Dans une deuxième partie, nous avons réalisé l'analyse des essences produites par 64 espèces et cultivars de *Pelargonium* d'odeurs très diverses (citron, menthe, rose, abricot, pin, épices...). A l'aide d'analyses statistiques (ACP, analyse discriminante...), nous avons mis en évidence des relations entre la biochimie de ces cultivars, leurs odeurs et leurs proximités génétiques et cela afin de nous donner des pistes sur des croisements potentiellement intéressants.

Enfin, un dernier chapitre est consacré à l'amélioration de la production d'HE en Égypte. Grâce à ce programme commencé il y a trois ans, nous améliorons chaque année la qualité et le rendement en HE de plus de 10 Ha de plantation de *Pelargonium* en Égypte. Un travail d'optimisation de la distillation ainsi que des améliorations des pratiques culturales, nous ont permis de produire une HE de qualité avec un rendement de plus de 60 kg.Ha<sup>-1</sup> d'HE. D'autres expériences présentées dans ce chapitre soulignent l'influence de l'environnement et notamment de la température sur le ratio entre le citronellol et le géraniol ainsi que sur la biosynthèse de l'isomenthone, du 10- $\gamma$ -épi-eudesmol et du 6,9-guaiadiène.

## ABSTRACT

*Pelargonium sp.*, also named rose scented « geranium » or « Geranium rosat » is one of the the most cultivated aromatic and medicinal plant worldwide, especially for its essential oil (EO), which is used by cosmetic and perfumery industries. This essence is extracted from leaves by steam distillation and gives an EO containing several hundreds of organic volatile compounds (VOC). This complexity is the result of a long evolutive process and varietal selections. Among these VOC, the monoterpenes like geraniol, citronellol and isomenthone and the sesquiterpenes like 10- $\gamma$ -epieudesmol and 6,9-guaiadiene, play an important role for the *Pelargonium* fragrance. The relative proportions of these compounds are used as EO quality markers and determine the different cultivars origins (*P. cv. 'rosat Bourbon'*, *P. cv. 'rosat Chine'*, *P. cv. 'rosat Egypt'* and *P. cv. 'rosat Grasse'*).

Despite the important researches on the chemistry of these EO, there is no information on the biosynthesis pathways for these molecules and no genes involved in the pathways have been isolated. During this PhD thesis, we have functionally characterized by recombinant proteins expression and purification in *Escherichia coli*, four genes, three monoterpene and one sesquiterpene synthases, coding for key enzymes in terpene biosynthesis pathway. The first enzyme is a mono-product geraniol synthase. The second enzyme is a multi-product enzyme with a major peak of myrcene and 3 minor peaks of other monoterpenes. The third enzymes is also a multi-product protein, producing 1,8-cineol as major product and 10 others monoterpenes. The last one is a multi-products sesquiterpene synthase producing mainly the 10- $\gamma$ -epi-eudesmol and other sesquiterpenes. We have also analyzed the level of expression of the geraniol and 10- $\gamma$ -epi-eudesmol synthases in several *Pelargonium* accessions by RT-qPCR and we have demonstrated the relationship between the level of expression of these two terpene synthases and the quantity of the related terpenes produced in leaves. *Pelargonium* transformation efficiency by *Agrobacterium tumefaciens* was tested in order to complete the functional characterization of the genes.

In a second part, we have analyzed the essence of 64 species and cultivars of *Pelargonium* having very different fragrances like lemon, mint, rose, apricot, pine, spices... With different statistical tools (PCA, discriminant analysis...), we have highlighted the links between the biochemistry of these species and cultivars, their odors and their phylogenetic relationships. This worked gave us some interesting ideas for some new crossings.

Finally, the last chapter concerns the EO production improvements in Egypt. Thanks to these researches, started 3 years ago, we are improving year after year our EO yield and quality in our 10 Ha R&D plantation. An important work was done to optimize the distillation process and improve the agricultural practices which abled us to reach a yield of 60 kg of EO per hectare. Some other experiments show the effect of the environmental factors such as the temperature on the biosynthesis of several important molecules like citronellol and geraniol, 6,9-guaiadiene and 10- $\gamma$ -epi-eudesmol.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC-transporteur	ATP-binding cassette transporteur
ACoP	Analyse en coordonnées principales
ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AOS	Allène oxide synthase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
BVOC	Composés organiques volatils d'origine biologique
C4H	Cinnamic acid-4-hydrolase
CIV	Culture <i>in vitro</i>
COV	Composés Organiques Volatils
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
DO <sub>600</sub>	Densité Optique pour une $\lambda$ de 600 nm
DTPS	Diterpène synthases
DXP	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate
DXR	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase
DXS	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase
FPP	Farnésyl diphosphate
FPPS	Farnésyl diphosphate synthase
FT	Facteurs de transcription
GAP	D-glycéraldehyde 3-phosphate
GC-FID	Chromatographie en phase gazeuse - Détecteur à ionisation de flamme
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse
GC-O	Chromatographie en phase gazeuse - Olfaction
GFP	Green fluorescent protein
GGPP	Géranylgeranyl diphosphate
GGPPS	Géranylgeranyl diphosphate synthase
GPP	Géranyl diphosphate
GPPS	Géranyl diphosphate synthase
GLV	Green leaf volatiles
GUS	$\beta$ -glucuronidase
HE	Huile Essentielle
HPLS	Hydroperoxydase lyase
HR	Humidité relative (%)
IAA	Indole-3-acetic acid
ABA	Indole-3-butyric acid
IDI	Isopentényl diphosphate isomérase
IDS	Isopentényl diphosphate synthase
IFF-LMR	International Flavors & Fragrances - Laboratoire Monique Rémy
IP	Isopentényl phosphate
IPK	Isopentényl phosphate kinase
IPP	Isopentényl diphosphate
IPTG	IsoPropyl $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside
ISIPCA	Institut Supérieur International du Parfum, de la Cosmétique et de l'Aromatique
KI	Indice de Kovats

- Liste des abréviations -

LBVpam	Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales
LOX	Lipoxygénase
MEB	Microscopie électronique environnementale à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
MPD	Phosphomévalonate décarboxylase
MTPS	Monoterpène synthase
MVAP	Mévalonate 5-phosphate
OGM	Organisme génétiquement modifié
OPR	Oxophytodiénoate reductase
<i>P. cv. 'rosat Égypte'</i>	<i>Pelargonium x hybridum</i> cultivar 'rosat Égypte'
PAL	Phénylalanine-amonia lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PhCINS	<i>Pelargonium x hybridum</i> 1,8-cinéole synthase
PhEDS	<i>Pelargonium x hybridum</i> 10-γ-épi-eudesmol synthase
PhGES	<i>Pelargonium x hybridum</i> géraniol synthase
PhMYS	<i>Pelargonium x hybridum</i> myrcène synthase
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RE	Réticulum endoplasmique
RI	Indice de rétention
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcriptase
RT	Temps de rétention
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STPS	Sesquiterpène synthase
TB	Terrific broth
TPS	Terpène synthase

## LISTE DES FIGURES

Figure 1   Analyse des coûts de production réels pour une plantation de <i>Pelargonium</i> en Égypte.....	48
Figure 2   Photographies du projet <i>Pelargonium</i> égyptien sous le partenariat IFF-LMR et Hashem Brothers.....	49
Figure 3   Schéma des interactions des plantes avec leur environnement au moyen des COV.....	52
Figure 4   Relation entre la fleur de l'orchidée <i>Ophrys sphegodes</i> et son pollinisateur, un mâle de l'espèce solitaire d'abeille <i>Andrena nigroaenea</i> .....	54
Figure 5   Types de défenses chez la plante.....	56
Figure 6   Modèle d'accumulation de nicotine dans les feuilles de tabac ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) induite par un herbivore.....	58
Figure 7   Changements transcriptionnels dans la pousse et les racines d'un maïs attaqué par l'herbivore <i>Spodoptera littoralis</i> .....	59
Figure 8   Interactions entre les plantes, les herbivores et les ennemis des herbivores au moyen des terpènes volatils.....	61
Figure 9   Schéma de la détection des plantes compétitives par les plantes dans une végétation dense.....	63
Figure 10   Les plantes sont exposées à une variété de stress abiotiques.....	65
Figure 11   Génération des ROS par transferts d'énergie.....	67
Figure 12   Production et neutralisation des ROS dans la plante.....	68
Figure 13   Facteurs influençant les émissions des COV par les plantes.....	71
Figure 14   Diagramme schématique résumant les connaissances actuelles des rôles des COV biologiques dans le système terrestre.....	77
Figure 15   Chemin des émissions des COV et concentrations calculées en COV requises pour supporter le modèle de diffusion passive.....	78
Figure 16   Hypothèses expliquant le trafic intracellulaire des COV dans les plantes.....	80
Figure 17   Exemples de structures spécialisées dans la sécrétion et/ou le stockage des huiles essentielles.....	83
Figure 18   Glandes sécrétrices de lavande observées en MEB et schéma de glande peltée de menthe.....	85
Figure 19   Mise en place des trichomes chez <i>Mentha x piperita</i> .....	86
Figure 20   Etapes de la différenciation des glandes peltées de <i>Mentha x piperita</i> .....	86
Figure 21   Illustrations des canaux laticifères et résinifères chez l'hévéa ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) et chez le pin ( <i>Pinus taiwanensis</i> Hayata).....	87
Figure 22   Résumé des voies de biosynthèses contrôlant les émissions des COV des plantes.....	88
Figure 23   Synthèse des COV benzénoïdes et phénylpropanoïdes.....	90
Figure 24   Synthèse des COV dérivés d'acides gras.....	92
Figure 25   Sève de pin maritime ( <i>Pinus pinaster</i> ).....	93
Figure 26   Exemples de structures de terpènes importants.....	94
Figure 27   Synthèse des COV du groupe des terpénoïdes.....	96

- Liste des figures -

Figure 28   Voies classiques et alternatives pour la synthèse d'IPP chez les Archaea.....	98
Figure 29   Mécanisme du carbocation pour la synthèse des GPP, FPP et GGPP.....	101
Figure 30   Schéma de la formation des terpénoïdes catalysée par les différents types de terpène synthases.....	104
Figure 31   Analyse GC-MS des sesquiterpènes générés par l'activité de la patchoulol synthase de <i>Pogostemon cablin</i> .....	105
Figure 32   Mécanismes de réaction des monoterpène synthases.....	107
Figure 33   Arbre phylogénétique illustrant les relations entre différentes terpène synthases.....	109
Figure 34   Analyses de l'expression de <i>RhNUDX1</i> chez <i>Rosa x hybrida</i> .....	111
Figure 35   Schéma de biosynthèse hypothétique pour la formation du géraniol libre dans les pétales de rose.....	112
Figure 36   Voie de biosynthèse et localisation subcellulaire de la synthèse du (-)-menthol dans les glandes sécrétrices de la menthe poivrée.....	114
Figure 37   Schéma du métabolisme du d <sub>6</sub> -géraniol.....	114
Figure 38   Le système olfactif chez l'homme.....	116
Figure 39   Schéma de la réponse chez le rat de neurones individuels (1-6) à des odorants (A-H).....	117
Figure 40   Principaux organes sensoriels chez le papillon <i>Bombyx Mori</i> .....	118
Figure 41   Intérêt des biotechnologies dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, et dans la parfumerie.....	121
Figure 42   Représentation schématique de la place des biotechnologies dans l'industrie de la parfumerie.....	122
Figure 43   L'intérêt de la dihydrokaranone en parfumerie.....	123
Figure 44   Molécules odorantes d'intérêt appartenant aux 3 grandes voies métaboliques.....	124
Figure 45   Schéma d'une cellule sécrétrice de <i>Mentha x piperita</i> illustrant la voie de biosynthèse du menthol.....	131
Figure 46   Comparaison d'une analyse GC-MS des sesquiterpènes de l'HE de patchouli extraite de <i>Pogostemon cablin</i> avec le produit Clearwood™.....	135
Figure 47   Comparaison d'une HE de bois de santal avec un bioproduit de bois de santal produit par biotechnologie.....	135
Figure 48   Etapes successives de la conversion du GGPP (1) en sclaréol (4) par deux diterpènes synthases venant de <i>Salvia sclarea</i> (SsLPS et SsScS).....	136
Figure 49   Production de sclaréol en fermenteur par <i>E. coli</i> coexprimant la GGPPS, et la sclaréol synthase.....	136
Figure 50   Golden Rice et Voie de biosynthèse du β-carotène.....	138
Figure 51   Mécanisme catalytique de la taxadiène synthase.....	139
Figure 52   Cultures de <i>Pelargonium</i> odorants à Saint-Etienne, à Grasse et en Égypte.....	148
Figure 53   Carte du vecteur de clonage pGEMT®-easy et carte du vecteur pCR®-Blunt.....	151
Figure 54   Schéma du principe du système Gateway™.....	152
Figure 55   Carte du vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO®.....	153
Figure 56   Vecteurs d'expression construits par Busso et al. ....	153

- Liste des figures -

Figure 57   Cartes des plasmides pMDC32, pMDC45 et pMDC83 utilisés dans l'expression des TPS dans le tabac ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ) .....	154
Figure 58   Carte des vecteurs pK7FWG2 et pKEGW7 utilisés dans les clonages.....	155
Figure 59   Etape BP du clonage utilisant la technologie Gateway™ .....	168
Figure 60   Etape LR du clonage utilisant la technologie Gateway™ .....	169
Figure 61   Système d'expression utilisé dans <i>E. coli</i> (Rosetta DE3 pLysS) .....	172
Figure 62   Schéma du principe de purification d'affinité sur colonne de nickel.....	175
Figure 63   Agro-infiltration d'une feuille de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	178
Figure 64   Schéma simplifié des principaux procédés physico-chimiques d'extraction et de purification ainsi que leurs extraits associés, destinés à la parfumerie et aux arômes alimentaires.....	183
Figure 65   Schéma et montage d'un appareil soxhlet pour l'extraction à l'aide d'un solvant organique d'une matière première solide à destination de la parfumerie.....	187
Figure 66   Schéma et montage d'un appareil de distillation vapeur de laboratoire pour la fabrication d'HE.....	191
Figure 67   Schéma représentant les principales étapes de la distillation du <i>Pelargonium</i> en Égypte.....	193
Figure 68   Unité de Stripping utilisée pour extraire l'eau à saturation en COV venant de la distillation du <i>Pelargonium</i> .....	194
Figure 69   Extraction liquide-liquide des eaux de distillation avec un solvant organique (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) .....	195
Figure 70   Expérimentation sur la culture du <i>Pelargonium</i> en Egypte.....	201
Figure 71   Représentation des feuilles utilisées pour la quantification de l'HE par g de matière fraîche.....	202
Figure 72   Classification fonctionnelle des séquences 454 uniques de <i>P. cv. 'rosat Grasse'</i> .....	209
Figure 73   Gel SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie des tests d'expression de la protéine recombinante PhEDS.....	212
Figure 74   Gel SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie des tests d'expression de la protéine recombinante PhGES.....	213
Figure 75   Gel SDS-PAGE coloration au bleu de coomassie des tests d'expression des protéines recombinantes PhCINS, PhMYS et PhEDS.....	214
Figure 76   Comparaison de différentes séquences protéiques de géranol synthases caractérisées.....	216
Figure 77   Test d'activité <i>in vitro</i> de PhGES recombinante utilisant le GPP comme substrat.....	217
Figure 78   Observations en microscopie confocale de feuilles de tabac ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ) transformées de manière transitoire avec <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformée avec le construit PhGES-GFP.....	218
Figure 79   Test d'activité <i>in vitro</i> de la protéine PhCINS recombinante utilisant le GPP comme substrat.....	219
Figure 80   Test d'activité <i>in vitro</i> de la protéine PhMYS recombinante utilisant le GPP comme substrat.....	220
Figure 81   Comparaison des séquences protéiques de la 10-γ-épi eudesmol synthase de <i>Pelargonium</i> (PhEDS) et de la β-eudesmol synthase de <i>Zingiber zerumbet</i> (ZSS2) .....	222
Figure 82   Test d'activité <i>in vitro</i> de la protéine PhEDS recombinante utilisant le FPP comme substrat.....	223

- Liste des figures -

Figure 83   Arbre des voisins non-enraciné montrant les relations entre les terpène synthases de <i>Pelargonium hybridum</i> cv. 'rosat Grasse' (en rouge) et les autres terpène synthases proches.....	226
Figure 84   Profils d'expression par RT-PCR semi-quantitative pour les quatre TPS.....	227
Figure 85   Profil d'expression par RT-PCR semi-quantitative de <i>PhGES</i> avec quatre couples d'amorces sur l'ADNc de feuilles de <i>P.</i> cv. 'Toussaint'.....	228
Figure 86   Expression relative normalisée de <i>PhGES</i> dans des jeunes feuilles de différents <i>Pelargonium</i> .....	231
Figure 87   Expression relative normalisée de <i>PhEDS</i> dans des jeunes feuilles de différents <i>Pelargonium</i> .....	231
Figure 88   GC-MS de feuilles de tabac ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ) transformé transitoirement avec la construction 35S:: <i>PhGES</i> .....	232
Figure 89   Expérience de transformations stable de feuilles de <i>Pelargonium x hybridum</i> cv. 'rosat Grasse' avec le construit 35S::GUS.....	233
Figure 90   ACP des 64 accessions de <i>Pelargonium</i> (1 individu par accession) .....	238
Figure 91   ACP de 56 accessions de <i>Pelargonium</i> (1 individu par accession) .....	239
Figure 92   Analyse discriminante sur 56 accessions de <i>Pelargonium</i> .....	240
Figure 93   Cercle des corrélations des composés les plus discriminants (coefficient VIP supérieur à 1) .....	241
Figure 94   Dendrogramme issu d'une classification hiérarchique effectuée avec une distance euclidienne et avec une méthode de liaison complète.....	244
Figure 95   Classement des principaux composés (monoterpènes, benzénoïdes/phénylpropanoïdes et dérivés d'acide gras) fonction de leurs voies de biosynthèse et de leur MTPS putatives.....	247
Figure 96   Classement des principaux sesquiterpènes présents dans les extraits de <i>Pelargonium</i> en fonction de leurs sesquiterpène synthases putatives.....	248
Figure 97   Analyse discriminante de 56 <i>Pelargonium</i> après classification des composés selon les voies de biosynthèse.....	250
Figure 98   Cercle des corrélations des composés les plus discriminantes (coefficient VIP supérieur à 1) .....	250
Figure 99   Dendrogramme issu d'une classification hiérarchique effectuée avec une distance euclidienne et avec une méthode de liaison complète.....	253
Figure 100   Cinétique de distillation du <i>Pelargonium</i> .....	257
Figure 101   Analyse de la composition moyenne des eaux de distillation après une distillation de 60 min.....	259
Figure 102   Cinétique de distillation du <i>Pelargonium</i> et concentration minimale en COV de l'eau de distillation pour une distillation équipée ou non d'une unité de stripping.....	261
Figure 103   Analyse de la composition des eaux de distillation après 60 et 90 min de distillation.....	262
Figure 104   Rendements en kg d'HE par Ha obtenus sur les différentes parcelles expérimentales en 2013.....	266
Figure 105   Rendements en kg d'HE par Ha obtenus sur les parcelles expérimentales en 2014.....	268
Figure 106   Schéma représentant l'effet hypothétique d'une coupe précoce sur le développement des jeunes feuilles chez le <i>Pelargonium</i> .....	269
Figure 107   Quantification de quatre composés majeurs dans les jeunes feuilles et les feuilles âgées extraites à l'hexane.....	269

- Liste des figures -

Figure 108   Suivi de la perte en eau et en HE pendant l'opération de préfanage.....	271
Figure 109   Suivi des pertes en citronellol et en géraniol pendant l'opération de préfanage.....	272
Figure 110   Suivi de la perte en eau pendant l'opération de préfanage à Grasse.....	273
Figure 111   Suivi de la perte en citronellol, géraniol et 6,9-guaiadiène pendant l'opération de préfanage.....	273
Figure 112   Expérience de transplantation des cultivars <i>P. cv. 'rosat Chine'</i> et ' <i>rosat Bourbon</i> ' en Égypte.....	276
Figure 113   Concentrations (% GC-FID) du 6,9-guaiadiène et du 10- $\gamma$ -épi eudesmol dans l'HE de <i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i> et ' <i>rosat Chine</i> ' cultivés en Égypte.....	277
Figure 114   Suivi de la proportion (% GC-FID) du géraniol et du citronellol dans l'HE de <i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i> et ' <i>rosat Chine</i> ' cultivés en Égypte.....	277
Figure 115   Quantification absolue et relative de la menthone et de l'isomenthone (ppm et %) du <i>P. 'rosat Egypte'</i> dans des conditions de température, d'humidité et de substrat contrôlées.....	279
Figure 116   Quantification absolue et relative du citronellol (ppm et %) du <i>P. 'rosat Grasse'</i> dans des conditions de température, d'humidité et de substrat contrôlées.....	280
Figure 117   Quantification absolue et relative du géraniol (ppm et %) du <i>P. 'rosat Egypte'</i> dans des conditions de température, d'humidité et de substrat contrôlées.....	281
Figure 118   Quantification absolue et relative du 10- $\gamma$ -épi eudesmol et du 6,9-guaiadiène (ppm et %) du <i>P. 'rosat Bourbon'</i> dans des conditions de température, d'humidité et de substrat contrôlées.....	282
Figure 119   Analyse des rendements en HE par Ha de plantation de <i>Pelargonium</i> en Égypte pour les années 2012 à 2015.....	283
Figure 120   Coût total de production par kg d'HE de <i>Pelargonium</i> en Égypte pour les années 2012 à 2015.....	283
Figure 121   Analyse détaillée des coûts de production par kg d'HE de <i>Pelargonium</i> en Égypte.....	284
Figure 122   Hypothèses concernant les voies de biosynthèse du géraniol et de ses dérivés chez les plantes.....	289
Figure 123   Classification des <i>Pelargonium</i> selon la compositions chimique de leurs HE, en lien avec l'activité de leurs enzymes hypothétiques.....	290

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1   Composés dits 'secondaires' des plantes.....	56
Tableau 2   Répartition des voies du MVA et du MEP dans les organismes.....	97
Tableau 3   Caractérisation des enzymes GPPS, FPPS et GGPPS chez les plantes.....	100
Tableau 4   Fonction et distribution taxonomique des sous-familles des TPS des plantes.....	108
Tableau 5   Exemples d'essais d'ingénierie métabolique sur les monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes et leurs précurseurs et dérivés.....	132
Tableau 6   Collection de <i>Pelargonium</i> odorants des serres du LBVpam de l'université de Saint-Étienne.....	149
Tableau 7   Génotypes des différentes souches de bactéries utilisées.....	150
Tableau 8   Amorces utilisées pour la qPCR.....	166
Tableau 9   Avantages et inconvénients de l'extraction par solvant.....	185
Tableau 10   Avantages et inconvénients de la distillation vapeur.....	190
Tableau 11   Traitements des différentes parcelles expérimentales en 2014.....	200
Tableau 12   Conditions de cultures (Température et humidité relative) relevées durant l'expérience.....	203
Tableau 13   Expérience pour mettre en évidence l'influence du substrat et/ou de la température sur la qualité de l'HE des différents <i>Pelargonium</i> .....	203
Tableau 14   Analyses GC-MS ou GC-FID des HE commerciales de <i>Pelargonium</i> cv. 'rosat'.....	206
Tableau 15   Classification fonctionnelle des séquences 454 uniques de <i>P. cv. 'rosat Grasse'</i> .....	209
Tableau 16   Classification spécifique des séquences 454 reliées au métabolisme des terpènes.....	210
Tableau 17   Analyse des séquences caractéristiques des TPS.....	224
Tableau 18   Expressions attendues de <i>PhGES</i> et <i>PhEDS</i> pour plusieurs variétés de <i>Pelargonium</i> , en fonction de la composition des HE.....	230
Tableau 19   caractérisation olfactive des 64 accessions de <i>Pelargonium</i> odorants.....	236
Tableau 20   Pourcentages de 6,9-guaiadiène et de 10- $\gamma$ -épi eudesmol dans les extraits de <i>Pelargonium</i> .....	242
Tableau 21   Pourcentages de l' $\alpha$ -phellandrène, du $\beta$ -phellandrène et du para-cymène pour des <i>Pelargonium</i> à odeur boisé et autres.....	242
Tableau 22   Composition chimique (en % du total des composés) des <i>Pelargonium</i> à odeur de rose et de citron, avec un focus sur les molécules potentiellement issues de l'activité de PhGES.....	245
Tableau 23   Données concernant les coûts, les paramètres de distillation et le prix de l'HE.....	258
Tableau 24   Comparaison de la composition, analysée par GC-FID (%), des HE de qualité conventionnelle (HE <sub>conv</sub> ) avec l'HE produite en 2015 à Regwa récoltée précocement (HE <sub>Regwa</sub> ).....	275

- Avant-propos -

## AVANT-PROPOS

L'introduction de cette thèse est volontairement assez large et détaillée car elle est destinée tout d'abord à des experts en biologie moléculaire et familiers du monde des terpènes mais qui sont probablement moins au fait de la recherche industrielle dans le monde de la parfumerie. Les deuxièmes destinataires de cette thèse sont les acteurs de l'industrie de la parfumerie pour lesquels ce domaine de la biologie moléculaire est un axe de recherche tout à fait original et extrêmement prometteur mais qu'ils connaissent mal.

Ainsi, la première partie de cette introduction rassemble sous la forme d'une revue publiée dans le journal *Phytochemical review*, l'ensemble des connaissances actuelles sur la botanique, l'agronomie et la biotechnologie des hybrides de *Pelargonium* à odeur de rose.

La deuxième partie aborde le contexte dans lequel cette thèse a été initiée et supportée par mon entreprise. Il y sera notamment souligné l'importance de l'HE de *Pelargonium* dans la parfumerie et l'appropriation par les parfumeurs des extraits de *Pelargonium*. Enfin, notre partenariat avec la société Hashem Brothers et la réalité du marché et de la production de l'HE du *Pelargonium* y seront abordés.

Le cœur de cette thèse étant la caractérisation des terpène synthèses du *Pelargonium*, il m'a semblé important d'introduire la notion de COV<sup>1</sup>. Loin d'être de simples métabolites secondaires, ceux-ci ont une importance déterminante pour la survie de la plante. Ainsi, leurs voies de biosynthèse, les facteurs influençant leur production, leur stockage, leur émission et leur perception par les animaux sont autant de questions qu'il m'a paru important de présenter brièvement.

Enfin, il me tenait à cœur d'introduire dans la dernière partie l'impact des biotechnologies végétales. En effet, ces nouvelles technologies prennent de plus en plus d'importance au sein de l'industrie de la parfumerie et des arômes alimentaires. Cette nouvelle voie de recherche et développement aura très certainement un impact d'envergure dans le futur sur les ingrédients naturels mais plus encore sur les ingrédients synthétiques. Nous verrons que les premières applications viennent déjà modifier notre industrie et que d'autres applications sont certainement à venir. Ainsi la caractérisation des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse du *Pelargonium* peuvent mener à plusieurs applications qu'il me paraissait intéressant d'envisager dans cette introduction. C'est une voie en pleine expansion qu'il est maintenant nécessaire de prendre en compte dans le développement des ingrédients naturels.

---

<sup>1</sup> COV pour Composés Organiques Volatils

# I. BOTANY, AGRONOMY AND BIOTECHNOLOGY OF *PELARGONIUM* USED FOR ESSENTIAL OIL

Phytochem Rev  
DOI 10.1007/s11101-015-9441-1



## Botany, agronomy and biotechnology of *Pelargonium* used for essential oil production

B. Blerot · S. Baudino · C. Prunier ·  
F. Demarne · B. Toulemonde · J.-C. Caissard



Received: 9 July 2015 / Accepted: 29 September 2015  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

**Abstract** *Pelargonium* is one of the seven genera belonging to the Geraniaceae family, and includes almost 280 species mainly coming from South Africa. Some of these species have a strong rose scent mostly due to geraniol and citronellol. For a long time, hybrids between *P. graveolens* or *P. radens* and *P. capitatum*, have been used for essential oil (EO) production. Nowadays, EOs of *Pelargonium* species are produced mainly in China and Egypt. Hybrids are male sterile and propagated through cuttings. Their adaptability to different soils and climates (tropical, semi-tropical, mediterranean, or arid) is remarkable, even if cultivation parameters still have to be improved. Methods for genetic transformation of *Pelargonium* are available and, due to the growing knowledge of biosynthetic pathways and the cloning of terpene synthase genes in angiosperms, new

strategies to improve EO yield or to modify EO composition could be imagined. For example, new crossings driven by biotechnological tools, creation of genetically modified *Pelargonium* with strong promoters upstream of terpene synthase genes, and batch production of *Pelargonium* terpenoids through recombinant yeasts or bacteria, are very promising approaches to develop EOs.

**Keywords** Aromatic plant · Essential oil · Geraniol · 'Pelargonium rosat' · Terpenes

### Introduction

Hybrids of *Pelargonium* with a rose scent are cultivated around the world mainly for the production of essential oils (EOs) and absolutes. EOs and absolutes are used in perfumery and cosmetics as well as in aromatherapy and the food industry (Lis-Balchin 1988, 2002a; Burdock 2009). EOs are obtained by steam distillation of leaves with a production of nearly 300 tons in one year. Absolutes are extracted with an organic solvent (hexane) and purified with alcohol. Isolates like rhodinol, a blend of geraniol and  $\beta$ -(DL)-citronellol, or an isolate with high concentration of geraniol or  $\beta$ -(DL)-citronellol can also be prepared and consumed by the industry.

*Pelargonium* EOs are most often used to replace *Rosa × damascena* EO, which is very expensive. For example, in 2014, *Rosa* EO price reached \$7500 kg<sup>-1</sup>,

B. Blerot (✉) · S. Baudino · C. Prunier · J.-C. Caissard  
Laboratoire BVpam, EA3061, Université de Lyon/Saint-Étienne,  
23 Rue du Dr Michelon, 42000 Saint-Étienne,  
France  
e-mail: Bernard.Blerot@iff.com

B. Blerot · B. Toulemonde  
International Flavors and Fragrances - Laboratoire  
Monique Rémy (IFF-LMR), P.I des Bois de GRASSE,  
Av. Louison Bobet, 06130 Grasse, France

F. Demarne  
Gattefossé Holding, 36 Chemin de Genas, CS70070,  
69804 Saint-Priest Cedex, France

Published online: 31 October 2015

Springer

while *Pelargonium* EO costs about \$120 kg<sup>-1</sup>. Thus, since the nineteenth century, *Pelargonium* EO has interested perfumers, flavorists, and other industrials. The first trials of distillation were done in Lyon, France in 1819 and the first plantations were initiated in Grasse, France in 1844 (Gildemeister and Hoffmann 1900). In 1847, production was delocalized to Algeria and in 1880 the plantations were transferred to Reunion Island, a French island located in the Indian Ocean, which became the largest producer. Due to rising interest, many countries attempted to produce *Pelargonium* EO, e.g. Spain, Morocco, Belgian Congo, U.S.S.R., Egypt, and Kenya. At the present time, the production is led by China and Egypt.

Currently, only 150 tons out of the total of 300 tons are available on the market and mainly produced by China in the Yunnan region and Egypt in the Bani Sweif and Fayoum regions. Production levels are more or less equal between the two countries, even if the Chinese production is decreasing year after year in favour of the Egyptian production. India, Russia, and Brazil also produce *Pelargonium* EO, but this production is totally absorbed by the domestic market. Small quantities are also produced in France (on Reunion Island), Madagascar, South Africa, and Israel. The main importers of *Pelargonium* EO are France and the U.S. The price, often subject to intense speculation, is slightly higher for Chinese EO than for Egyptian EO. Production levels are mainly determined by small producers who go to a distillery and pay for price of distillation in oil or money. They sell their product to intermediaries who have the power to discuss prices with the final buyer and export the product out of China or Egypt.

Industry has invested in research and development of the genus *Pelargonium*. Areas of research include initiation of new crossings, modification of growing and harvesting conditions of cultivars, enhancement of yields for perfumery and food industry, diversification of EO compositions, and investigation of pharmaceutical, pesticidal, or anti-microbial uses (Lis-Balchin 1988; Lis-Balchin et al. 1996a, b, c; Lis-Balchin and Hart 1997; Lis-Balchin et al. 1998; Lalli 2005; Boukhatem et al. 2010; Chen and Viljoen 2010; Boukhatem et al. 2013; Boukhris et al. 2013a; Afifi et al. 2014; Cerempei et al. 2014; Mahmoud and Amber 2014). In addition, some work on flavones and anti-oxidant EO compounds are now available, thus opening new areas of research (Colling et al. 2010;

Cavar and Maksimovic 2011; Mnif et al. 2011; Ben Slima et al. 2013; Petlevski et al. 2013).

The aim of this review is to summarize literature on interesting hybrids and cultivars of *Pelargonium*. Another aim is to present recent developments and future challenges of molecular biology and biotechnology in the use of *Pelargonium* EOs, absolutes, and other compounds.

## Botany of *Pelargonium*

### Taxonomy and phylogeny

Most *Pelargonium* species known today originated from South Africa and from nearby countries. The majority of *Pelargonium* species grow naturally in the Cape region, making it the third largest angiosperm genus in this region (Goldblatt and Manning 2000; Bakker et al. 2005). They were discovered by Dutch people during the seventeenth century and were rapidly introduced in Europe (Demarne 1989). In the mid eighteenth century, traceability of *Pelargonium* species became very disordered due to the enthusiasm of botanists for creating hybrids. Today, they are classified in the *Geraniaceae* family, which contains seven genera (*Geranium*, *Pelargonium*, *Erodium*, *Monsonia*, *Hypseocharis*, *Rhynchotheca* and *Sarcocaulon*). *Pelargonium* genus consists of 280 species and contains a range of variation in floral morphologies and life forms (Van der Walt and Ward-Hilhorst 1977; Van der Walt et al. 1981, 1988; Van der Walt 1990). Within the sixteen sections of the *Pelargonium* genus, two are extremely important for the ornamental plant market. Indeed the majority of the decorative pelargoniums derive from the section *Ciconium*. More specifically, the species *P. zonale* and *P. inquinans* are considered to be the major parents of zonale cultivars and the species *P. peltatum* has given ivy-leaved cultivars. The section *Pelargonium* is more and more important in term of sales with scented pelargoniums (Miller 2002; James 2002).

The sixteen infrageneric sections are currently grouped according to the morphological characters (Table 1) (Miller 2002). Karyological investigations suggest a split of the genus in two majors clades, one with large chromosomes (>1.5 µm in length) and another one with small chromosomes (<1.5 µm in length, 80 % of the species) (Albers 1988). Other traits

**Table 1** Summary of different classifications of scented *Pelargonium* species

Sections	Karyotype	Odorant species	Ploidy (X)	Odor	References for solvent extract analysis	
Hoarea	A2	– <sup>a</sup>	11 and 19	–		
Ligularia s.str.		–	11 and 19	–		
Magnistipulaceae		–	11	–		
Otidia		–	11	–		
Polyactium		–	11	–		
Cortusina s. str.		–	11	–		
Campylia	A1	–	11			
Pelargonium		<i>betulinum</i>	11	Camphoreous	Lalli et al. (2006)	
		<i>capitatum</i>	11	Rose	Demarne et al. (1993), Viljoen et al. (1995a, b)	
		<i>citronellum</i>	11	Lemon	Demarne and Van der Walt (1993)	
		<i>crispum</i>	11	Lemon, lime	(Lalli et al. 2006)	
		<i>cucullatum</i>	11	Spices	Lalli et al. (2006)	
		<i>denticulatum</i>	11	Lemongrass	Unpublished result	
		<i>glutinosum</i>	11	Balsamic	Lalli et al. (2006)	
		<i>graveolens</i>	11	Mint	Van der Walt and Demarne (1988), Lis-Balchin (1991)	
		<i>hispidum</i>	11	Fruity	Lalli et al. (2006)	
		<i>papilionaceum</i>	11	Lemon	Lalli et al. (2006)	
		<i>quercifolium</i>	11	Nutmeg, spices	Widmer and Collins (1991)	
		<i>pseudoglutinosum</i>	11	Balsamic	Lalli et al. (2006)	
		<i>radens</i>	11	Mint	Van der Walt and Demarne (1988), Lis-Balchin (1991)	
		<i>scabrum</i>	11	Apricot, lemon	Lalli et al. (2006)	
		<i>scabroide</i>	11	Soap	Lalli et al. (2006)	
		<i>tomentosum</i>	11	Mint	Hefendehl (1972), Demarne et al. (1986), Fuchs et al. (2001)	
		<i>vitifolium</i>	11	Lemon balm, lemongrass	Demarne and van der Walt (1992)	
	Reniformia	B	<i>extipulatum</i>	8	Cedarwood, camphoreous	Karawya et al. (1982), Lis-Balchin and Roth (2000)
			<i>odoratissimum</i>	8	Green apple, clove	Karawya et al. (1982), Lis-Balchin and Roth (2000)
Isopetalum		–	11	–		
Peristera		<i>grossularioides</i>	19	Coconut, pear	Lis-Balchin (1993)	
Myrrhidium	C1	–	11	–		
Chorisma		–	11	–		
Jenkinsonia		<i>trifidum</i>	9	Lemon, green	Unpublished result	
		<i>praemorsum</i>	9	Patchouli, moss	Unpublished result	
		<i>mutans</i>	11	Pepper	Unpublished result	
Ciconium	C2	<i>peltatum</i>	9	Green	Unpublished result	
Subsucculentia		<i>otaviense</i>	10	Fruity	Unpublished result	

<sup>a</sup> No odorant species and no odor

were also investigated to clarify the classification of *Pelargonium* genus: the ploidy level (2, 4, 6 or 8) and the basic chromosome number ( $x = 8, 9, 10, 11, 17$  and 19) (Knically 1964; Gibby and Westfold 1986; Yu and Horn 1988; Gibby et al. 1990, 1996). Further phylogenetic studies divided the genus into five supported clades (A1, A2, B, C1, C2), with A and B corresponding to the small chromosome clade and C to the large one (Bakker et al., 1999a, 2004). These recent studies have established the phylogenetic relationships of *Pelargonium* species using plastidic (*trnL-trnF* intergenic spacer), mitochondrial (*nad1* exon b/c), and nuclear Internal Transcribed Spacer (ITS) markers (Bakker et al. 1999a, 2000, 2004). Other studies highlight that the genus *Pelargonium* is interesting for its high heterogeneity in substitution rates in plastids and mitochondria, and show that changes in genome size were accompanied by changes in chromosome size (Weng et al. 2012). Such substitution rates are an exception in angiosperms (Parkinson et al. 2005; Guisinger et al. 2008). Clade C (chromosome  $>1.5 \mu\text{m}$ ) and clade A + B (chromosome  $<1.5 \mu\text{m}$ ) had significantly different genome sizes, and a transition of genome size was detected in the ancestral node of clade C (Bakker et al. 1999b, 2005). Most of the fragrant *Pelargonium* species belong to clades A1 and are classified in the *Pelargonium* section (Table 1).

Several authors have also tried to highlight the chemotaxonomic approach based on phenolic compounds (Williams et al. 2000) or terpene compounds (Lis-Balchin 1997; Lalli et al. 2006) but these approaches lack the accuracy of the molecular results. A recent analysis of floral morphology (nectar guides and petal-size ratios), leaf phenolic constituents, as well as plastids, mitochondrial, and nuclear markers converged on four major clades (A, B, C1 and C2) instead of the five classically admitted, showing that the *Pelargonium* classification is still a challenge (Röschbleck et al. 2014).

Links between morphology and ecology have also been studied in relation to evolutionary markers of the *Pelargonium* genus. *Pelargonium* species are pollinated by several animals such as bees (60 %), long-proboscid hovering flies (25 %), butterflies (7 %), hawkmoths (2–4 %), and birds (1 %). The heterogeneity of structural blossom types and pollination syndromes seems to indicate convergent and divergent adaptations (Struck 1997). Furthermore, leaf traits in

the Cape region seem to be adaptations to climate and water availability with three different strategies: evergreenness, deciduousness, and an intermediate and less integrated set of traits involving greater water use efficiency (Jones et al. 2009, 2013).

#### Trichome diversity among *Pelargonium* species

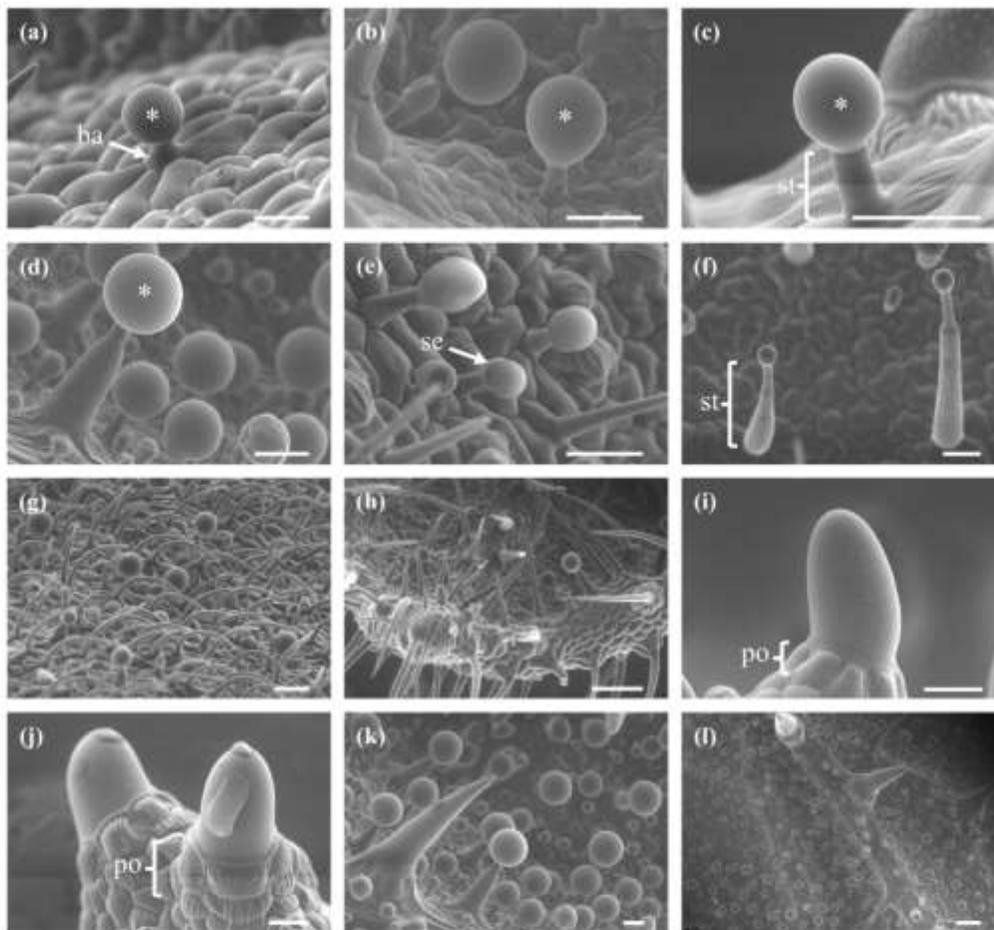
*Pelargonium* leaves are covered with trichomes, which are known to be adaptations to biotic and abiotic stresses (Wagner et al. 2004; Harada et al. 2010; Glas et al. 2012). *Pelargonium* species present a high diversity of glandular and non-glandular trichomes. For a long time, researchers were interested in *Pelargonium* trichomes as taxonomic tools for varietal selection and improvement (Payet 1982; Oosthuizen 1983; Yoshida and Tamai 1958; Foucque-de-Cambiaire 1986; Boukhris et al. 2013b), or to understand the mechanisms involved in the EO production and yield (Oosthuizen and Coetzee 1983, 1984).

Some scientists argued that different trichomes types could help with species identification and for parent determination of hybrids. Unfortunately, they did not categorize trichomes, probably due to the number of species that were studied and because of difficulties found in attributing trichomes to a specific type or stage of development. For example, Oosthuizen (1983) studied 134 *Pelargonium* species among all the sections and have found six non-glandular trichome types and five glandular trichome types, but Foucque-de-Cambiaire (1986) studied 45 accessions of *Pelargonium* and found seven non-glandular types and eleven glandular types. None of these trichomes are specific to one species. Nevertheless, the combination of different trichome types helped to classify *Pelargonium* into the sections and sometimes into species. Trichome types also helped to name parents of some hybrids, but because of the unknown heritability and genetics of this trait, such conclusions are highly speculative. Nevertheless, the work of Payet (1982), with numeric taxonomy methods, gave very strong relations between many cultivated *Pelargonium* and *P. graveolens*. In this work, they used 25 criteria combining trichome characteristics but also ploidy, plant shape, leaf anatomy, flower description, and fecundity.

Concerning the *Pelargonium* section itself, we investigated the trichome diversity in 20 species. We were able to describe five major types of glandular trichomes and five types of non-glandular trichomes

(Fig. 1). The glandular trichomes are formed by a basal cell, a stalk comprising of one to five cells and a secretive cell surrounded by a thin cuticle protecting the excreted EO. Some pedicels present a hypertrophied basal cell. The five glandular types differ by their size and by their cell morphologies: short trichomes with a small globular head, and a stalk consisting of two to four cells (Type I, Fig. 1a), short trichomes with a small globular head, and a stalk consisting of two to four cells (Type II, Fig. 1b, c), long trichomes with large globular and a stalk consisting of three to numerous cells (Type III, Fig. 1d), short trichomes with a small bulb-shaped head, and a stalk consisting of two to five cells (Type IV, Fig. 1e) and long trichomes with small bulb-shaped head, and a stalk consisting of three to numerous cells (Type V, Fig. 1f). The non-glandular trichomes are formed by one to five cells and are

consisting of one to four cells (Type II, Fig. 1b, c), long trichomes with large globular and a stalk consisting of three to numerous cells (Type III, Fig. 1d), short trichomes with a small bulb-shaped head, and a stalk consisting of two to five cells (Type IV, Fig. 1e) and long trichomes with small bulb-shaped head, and a stalk consisting of three to numerous cells (Type V, Fig. 1f). The non-glandular trichomes are formed by one to five cells and are



**Fig. 1** Environmental scan electronic micrographies of scented *Pelargonium* species and cultivars of **a** *P. graveolens* (glandular type I); **b** *P.* cv. 'Toussaint' (glandular type II); **c** *P.* cv. 'Toronto' (glandular type II); **d** *P. citronellum* (glandular type III); **e** *P.* cv. 'Clorinda' (glandular type IV); **f** *P. capitatum* (glandular type V); **g** *P. fragrans* (non-glandular type VI); **h** *P.*

*tomentosum* (non-glandular types VII & VIII); **i** *P.* cv. 'Toussaint' (non-glandular type IX); **j** *P. glutinosum* (non-glandular Type IX); **k**, **l** *P. citronellum* (non-glandular type X). *ba* basal cell, *po* podium, *sc* secretive cell, *st* stalk cells; asterisk (\*) storage cavity of EO; Scale bars 50  $\mu$ m excepted **h**, **k** 200  $\mu$ m

Species	Section	Glandular trichomes types					Non-glandular trichomes types				
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
<i>P. grossularioides</i>	Peristera	x					x				
<i>P. odoratissimum</i>	Reniformia	x					x				
<i>P. denticulatum</i>	Pelargonium			x	x			x		x	
<i>P. glutinosum</i>	Pelargonium			x	x			x		x	
<i>P. quercifolium</i>	Pelargonium	x	x	x	x			x		x	
<i>P. hispidum</i>	Pelargonium	x	x					x	x		x
<i>P. tomentosum</i>	Pelargonium	x	x			x	x	x	x		
<i>P. papilionaceum</i>	Pelargonium		x					x		x	x
<i>P. graveolens</i>	Pelargonium	x	x					x	x		
<i>P. radens</i>	Pelargonium	x	x	x				x	x	x	x
<i>P. capitatum</i>	Pelargonium		x			x	x		x	x	
<i>P. vitifolium</i>	Pelargonium		x					x			x
<i>P. citronellum</i>	Pelargonium	x		x		x	x		x		x
<i>P. cucullatum</i>	Pelargonium	x				x	x		x	x	
<i>P. scabrum</i>	Pelargonium	x		x				x	x		

**Fig. 2** Simplified consensus tree topology of scented *Pelargonium* species (modified from Bakker et al. (2004) and from Röschenbleck et al. (2014)), combined with trichomes characteristics

surrounded by a thick cuticle. Some have a podium at the base. Some of these trichomes are thin and present variable lengths: short (type VI, Fig. 1g), middle (type VII, Fig. 1h) and long (type VIII, Fig. 1h); others are thick and present different characteristics. Type IX (Fig. 1k, l) has a round tip and type X (Fig. 1i, j) is hooked.

Trichome density on leaves has also been strongly correlated with EO yields in cultivated and wild species (Yoshida and Tamai 1958; Payet 1982). Indeed, it is well known that glandular trichomes are the site of terpene synthesis, and that terpenes accumulate in an extracellular pocket between the cell wall and the cuticle (Turner et al. 2000). The glandular trichomes of *Pelargonium* are mainly distributed on the leaves and are more abundant on the lower epidermis than on the upper epidermis. They are located on the entire surface of the leaf while the non-glandular trichomes are located only in the area between the veins and leaf margin (Oosthuizen and Coetzee 1983, 1984). As in all species, the rate of trichome initiation seems to decrease during leaf development as leaf expansion increases (Turner et al. 2000). Thus, the density of glandular trichomes is higher in young leaves than in matured leaves (Yoshida and Tamai 1958; our unpublished results).

Differences in production of secondary metabolites in the glandular trichome types and/or during differentiation and aging have never been studied in *Pelargonium*. Such differences have been

demonstrated in other species, like *Mentha* × *piperita* for example (Voinin and Bayet 1996; Turner et al. 2000). Recently, high-throughput analytical methods were used to study the metabolome, proteome and transcriptome of different glandular trichome types in *Solanum lycopersicum* (Schillmiller et al. 2010; McDowell et al. 2011). These analyses showed that, in this species, two types of glandular trichomes have the same pattern, another type differs by the quantity of metabolites and another one is not involved in the production of such metabolites. In *Pelargonium*, it could be very interesting to link trichome types and EO profiles. Lorenzo Tejedor et al. (2009) performed a single-cell analysis of metabolites by nano-electrospray ionization. Unfortunately, they used *Pelargonium* × *hortorum*, a non-scented hybrid, and analysed an epidermal cell, not a glandular trichome. Nevertheless, they found the monoterpene geraniol, proving that it could be possible to perform the analysis of this very important compound of the EO of scented *Pelargonium*.

Analyses of trichome types from Oosthuizen (Oosthuizen 1983), Foucque de Cambiaire (Foucque-de-Cambiaire 1986) and our unpublished observations were combined with the phylogenetic trees of Bakker et al. (2004) and Röschenbleck et al. (2014) (Fig. 2). In *P. grossularioides* and *P. odoratissimum*, which do not belong to the *Pelargonium* section, but are also very odorant, only two types of trichomes (I and VII) were observed. *P. denticulatum*, *glutinosum* and

*quercifolium* present the same type of trichomes (IV), which is rare in other species. These trichomes probably give a sticky characteristic to the leaves of these species. *P. citronellum* and *P. cucullatum* are the only species which present trichome type V. Thus, even if the use of trichome types as a taxonomic tool is hazardous, some of these types are common to some species and this variety highlights the rich diversity within the genus *Pelargonium*.

*Pelargonium* cultivars used for essential oil production

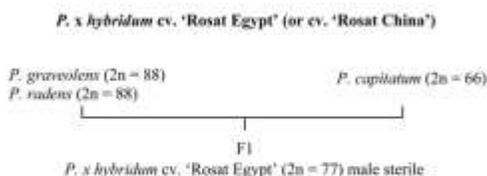
Rose-scented *Pelargonium* are improperly named 'geranium rosat' or *Pelargonium graveolens*, because they do not belong to the genus *Geranium* and *P. graveolens* is only one of the putative parents of these complex hybrids. Thereafter, we will use the general name 'pelargonium rosat' or rose-scented *Pelargonium* to talk about the hybrids cultivated for their rose-scented EO, but we will name each cultivar independently when possible (e.g. *Pelargonium* × *hybridum* cv. 'Rosat Egypt'). It is admitted that the cultivars used to produce EO are coming from hybrids created in Grasse and re-exported. Cytological evidence (Daker 1969; Payet 1982) and studies in EO composition (Guenther 1977; Demarne 1989; Foucque-de-Cambaire 1986) showed that hybridization was done between the botanical species *P. graveolens*, *P. radens* and *P. capitatum* for the rose-scented cultivars (Fig. 3) and between *P. graveolens*, *P. radens* and *P. vitifolium* for mint-lemon scented cultivars. All of these species belong to the genus *Pelargonium* section *Pelargonium*. Nevertheless, the actual crossings and the exact origin of cultivars, which have been exported all over the world, are unknown (Demarne 2002). RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) marking or molecular fingerprinting of *P. × hybridum* cv. 'Rosat Egypt', 'Rosat Algeria', 'Rosat Kelkar' and 'Rosat

Bourbon' have shown that cultivated hybrids have different genotypes and could come from different crossings (Ochocka et al. 2002; Shasany et al. 2002; Tembe and Deodhar 2010). A proper selection of the best cultivar, synthesizing the highest quality and quantity of oil, and producing an important biomass, could help farmers to maximize the plant yield and oil production.

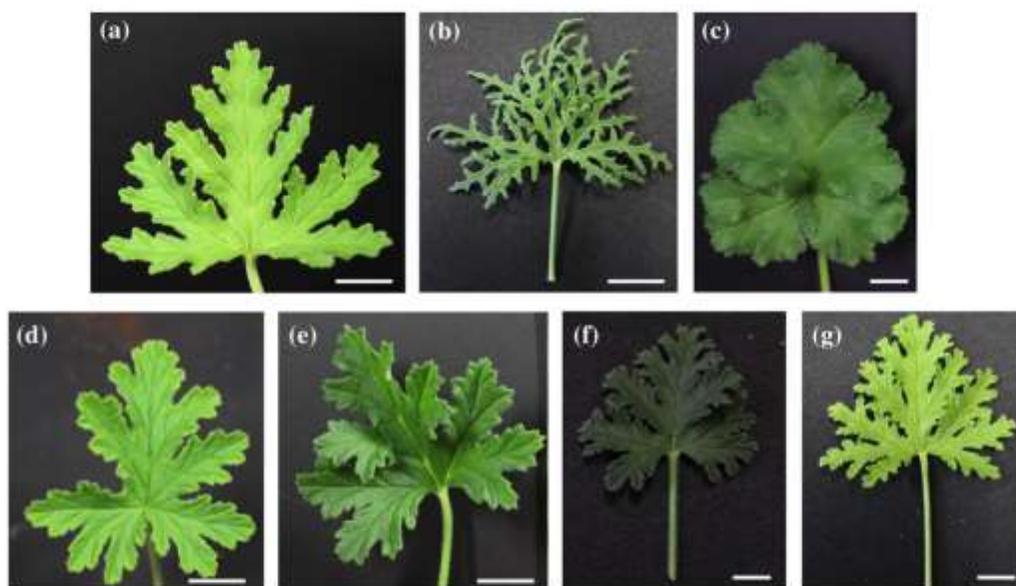
'*Pelargonium rosat*' (2n = 7x = 77) are F1 hybrids of *P. graveolens* or *P. radens* (2n = 88) and *P. capitatum* (2n = 66) (Demarne 1989). They are rose-scented shrubs, erect, up 1 m tall and 1.5 m spread. Leaves are soft to the touch, with a variable indumentum but always with numerous glandular trichomes. Their EO yields vary from 0.1 to 0.4 % (v/w). The smell is rosy, lightly minty, and citrusy. The EO composition is dominated by monoterpene alcohols like geraniol and citronellol. The main cultivars are *P. × hybridum* cv. 'Rosat Egypt' (Fig. 4d), 'Rosat Bourbon' (Fig. 4e), 'Rosat Chine' (Fig. 4f), and 'Rosat Grasse' (Fig. 4g). Plants are male sterile due to ploidy levels. To obtain fertile plants, doubling of chromosome number has been done with colchicine. The treated plants had 144 chromosomes and were male fertile (Tamai et al. 1958; Michellon 1981) but the agronomical traits and the chemical constituents of EO were different, making these plants useless for production (Qingyuan et al. 2013). Agronomical traits of the different cultivars were inherited from their parents with variations.

*P. graveolens* is a shrub, erect, up to 1.3 m tall and 1 m spread. Leaves are soft to the touch, with a variable indumentum and with numerous glandular trichomes (Fig. 4a). Its ploidy level is 2n = 8x = 88. EO yield is always high but varies from 0.1 to 0.9 % (v/w) and has a minty odor. *P. graveolens* is sometimes described as having a rosy odor, but this is due to the confusion with cultivated hybrids (Van der Walt and Ward-Hilhorst 1977). Indeed, the composition of the EO is relatively constant and dominated by the monoterpenes menthone and isomenthone (Van der Walt and Demarne 1988; Demarne 1989).

*P. radens* is a shrub, erect, up to 1.5 m tall and less than 1 m wide. Leaves are hard to the touch (almost scabrous), hirsute, and have many interspersed glandular trichomes (Fig. 4b). Its ploidy level is 2n = 8x = 88. EO yield is always very high, from 0.5 to 1.2 % (v/w). The smell is minty, very similar to *P. graveolens*. The oil composition is also dominated



**Fig. 3** Genealogy of *Pelargonium* × *hybridum* 'Rosat' cultivars



**Fig. 4** Scented *Pelargonium* species or cultivars leaves **a** *P. graveolens*; **b** *P. radens*; **c** *P. capitatum*; **d** *P. × hybridum* cv. 'Rosat Egypt'; **e** *P. × hybridum* cv. 'Rosat Bourbon'; **f** *P. × hybridum* cv. 'Rosat Chine'; **g** *P. × hybridum* cv. 'Rosat Grasse'; Scale bars 10 mm

by the monoterpenes menthone and isomenthone (Van der Walt and Demarne 1988; Demarne 1989).

*P. capitatum* is a faintly rose-scented subshrub, decumbent, up 1 m tall and 1.6 m wide. Leaves are villous to densely villous with interspersed glandular trichomes (Fig. 4c). Its ploidy level is  $2n = 6x = 66$ . EO yield is always very low, from 0.01 to 0.05 % (v/w) and has a very faint rose scent. The composition also varies from one individual to another, and 8 different chemotypes have been described (Demarne et al. 1993; Viljoen et al. 1995a, b). This EO diversity, which contrasts with homogeneity in morphological traits, is of particular importance for breeding and selection of new cultivars.

In order to better understand the origins of different cultivars and also to improve the varietal selection of 'pelargonium rosat' in the long-term, authors have made new crosses between *P. graveolens*, *P. radens*, and *P. capitatum* (Demarne 1989). *P. graveolens* and *P. radens* are two closed species within the section *Pelargonium* and natural hybrids can be found in the wild. Hybrids are very homogenous, with ploidy levels of  $2n = 88$ . The resulting shrub is very dense, with

dark green leaves and can reach 1.5 m tall. Stems and leaves are rough and covered with many glandular trichomes. The leaves are two to three times bigger than the parent leaves and can reach 200 mm of length and width. Their shape is similar to *P. graveolens* but present the typical internal margin coiling of *P. radens*. The flowers are fully fertile carrying anthers with abundant pollen. Seeds were observed during the free fecundation but the partial fertility of hybrids, however, indicates that the parents are indeed different species. The EO yield is very high [ $1.00 \pm 0.80$  % (v/w)] and often overtakes the parents' yields. The characteristics of EO are very similar to the parents (Van der Walt and Demarne 1988; Demarne 1989).

*P. graveolens × P. capitatum* and *P. radens × P. capitatum* hybrids are morphologically very similar and look like all the cultivated 'pelargonium rosat', with a ploidy of  $2n = 77$ . They are male-sterile. Their EO yields vary from 0.1 to 0.4 % (v/w). The oil is either minty or rosy, depending on the chemotype of *P. capitatum* used for the crossing. Indeed, some progeny have 50–60 % of isomenthone in the EO, like *P. radens* and *P. graveolens* and others have 45–60 % of

geraniol, citronellol, and linalool. This trait appears like an epistatic effect with possible transgressions (Demarne 1989). Indeed, *P. capitatum* has never more than 10 % of these desired chemicals and the two other parents have always less than 0.5 %. As a consequence, crossings should be done with well-selected clones of *P. capitatum* to steer the EO composition.

### Agronomy of *Pelargonium*

#### Cultivation

In 1922, industrials at Chiris factory were the first to use *Pelargonium* for EO extraction. Since then, many researchers have been working to improve the plant material, agronomical strategies, and EO extraction methods. 'Pelargonium rosat' cultivars are easy to grow on many soils and to propagate through cuttings. They resistant to dryness and heat as well as some diseases. After harvest, plants can grow again, making several harvests per year possible. Nevertheless, the plant yield and the EO yield per surface area, as well as the quality of EO may vary highly. It is known that ecological factors strongly influence the morphological and physiological characteristics of 'pelargonium rosat' (Swain 1974; Guenther 1977; Chakib 1998). Thus, to have a profitable crop, all the parameters have to be optimized, even if the most interesting cultivars are selected in terms of growth and mortality rates (Ram et al. 2004).

The agronomical traits that must be finely tuned before harvest concern propagation, planting, location, fertilization, irrigation, and pest and weed control. Concerning propagation of plantlets, some regions, like Reunion Island, propagate the plants in nursery before transplantation in the fields (Demarne 1992a). Other countries, like Egypt, plant cuttings directly in the field. Usually, terminal stem cuttings are used, but any part of the stem may also be used (Rajeswara Rao 2002a). The mortality rate of the plantlets should be as low as possible because planting is not mechanized and demands a lot of human work. Cultivars are selected in this way, and rooting agents derived from auxin and ethylene as well as fungicides are used when necessary (Michellon 1975; Demarne 1992a; Rajeswara Rao et al. 1993) The periods when the cuttings are propagated are important but depend on the country, climate

(the optimal temperatures are 20–27 °C during the day and 12–18 °C at night), and water supplies (Raman et al. 1977; Thimmappa and Bhattacharjee 1990; Reddy and Chandrasekar 2008; Bhuse et al. 2003; Motsa et al. 2006).

The rose-scented *Pelargonium* plantations are diverse and each country has its own practices. Generally, they are grown like a monoculture even if they may grow with other vegetables as garlic, onion (Verma et al. 2011; Singh et al. 2013), or mint (Rajeswara Rao 2002b). Intercropping helps to reduce land cost and may influence the yield (Prakasa Rao et al. 1984a). Plantings may be annual and last up to 10 years in order to save on planting cost. The density of the plants is directly correlated with the plant yield and highly influences productivity and quality of 'pelargonium rosat' (Prakasa Rao and Singh 1988; Singh et al. 2007). 'Pelargonium rosat' growth and EO quantity and quality strongly depend on the soil (Chakib 1998; Nejad and Ismaili 2014), climate (Prakasa Rao et al. 1995; Rajeswara Rao et al. 1990a, 1996; Bhattacharya et al. 1993, Verma et al. 2013a), and altitude (Michellon 1980; Verma et al. 2008; Khan et al. 2009). 'Pelargonium rosat' are also very resistant to pollution and under certain conditions, they could even be used for depollution of soil (Seema et al. 2014).

Fertilizers are crucial to increase EO production (Singh 1999), especially for long periods of culture. Before planting, lime, clay, and manure are used to obtain an alkaline pH, enhance water retention and improve mechanical structure of the soil (Garin 1987; Michellon 1987; Araya et al. 2011). Where irrigation is needed, farmers prefer to use chemical fertilizers in a fertilization-irrigation system. Fertilization is highly dependent on the soil, but providing nitrogen and phosphorous is often very important (Fritz 1976; Prakasa Rao and Singh 1988; Rajeswara Rao et al. 1990b; Singh et al. 1996; Ram et al. 2003; Araya et al. 2006). Fertilizing the soil with compost enriched with zinc and iron (Misra et al. 2005; Chand et al. 2007) or spraying micronutrients directly on leaves are useful practices to enhance plant growth and EO yield (Prakasa Rao et al. 1984b; Ram et al. 2006; Prasad et al. 2008). The positive effect of growth hormones, like polyamines or brassinosteroid derivatives, was also shown (Bhattacharya et al. 1995; Rajeswara Rao et al. 1997; Tajuddin et al. 1997; Swamy and Rao 2009, 2010; Ayad et al. 2010).

The irrigation parameters have to be well managed as rose-scented *Pelargonium* are sensitive to excess of water, and, even if they are resistant to dryness, a water stress could have a negative impact on plant growth and EO yield (Talha et al. 1980a, b; Putievsky et al. 1990; Singh et al. 1996; Singh 1999; Eiasu et al. 2008). In many countries, like China and France (specifically, Reunion Island), the atmospheric humidity is sufficient to hydrate the plants. Indeed, due to their high stem and leave pilosity, pelargoniums are able to benefit from night precipitation like fog or mist and are able to survive under dry conditions and grow in draining soil like sand. In South Africa, pelargoniums are naturally growing close to rivers and coasts, but in Egypt where the humidity is very low, irrigation is done by regular flooding with an irrigation system near the Nile. In Egyptian and Israeli deserts, a drip system is used (Sanderovich et al. 1983; Koriesh and Atta 1986). Hydroponic cultures in open air are not competitive (Mairapetyan 1982; Mezhunts and Mairapetyan 1985).

#### Harvest

Rose-scented *Pelargonium* harvest takes place only one time per year in Egypt (fields are planted after other crops like basil, maize...) or two to four times per year in China, Reunion Island, and India. The multiple harvests have an effect on yield and quality (Singh et al. 2007) and require a good regrowth, which strongly influences the way the plants have to be cut (Michellon 1978). Due to the lack of research and low cost labour, manual harvesting with pruning shears, knives, or sickles is preferred to mechanical harvesting which was only developed in Reunion Island with mixed results (Demarne 1992b, c). Usually, 'pelargonium rosat' are harvested during blooming and several parameters have to be controlled properly to maximize the yield and EO quality (Fleisher and Fleisher 1985). These parameters are the previous agronomical culture conditions, but also the post-harvest characteristics like temperature, dampness and duration of storage (Weiss 1967; Yoshida et al. 1968; Mani et al. 1981; Rajeswara Rao et al. 1992). Some parameters have to be well controlled to maximize the yield per surface area of a plantation. The EO content may decrease after several years if the plantation is not regenerated (Kaul et al. 1998; unpublished results) as an old bush produces fewer

leaves in favour of stems which do not contain oil (Mallavarapu et al. 1997; Rana and Blazquez 2010; Verma et al. 2010). Furthermore, the young leaves located at the tip of the branches are bearing more EO than old ones (Yoshida and Tamai 1958; Kaul and Rajeswara Rao 1999; Sastry et al. 2001b). Consequently, it is necessary to have some early architectural cuts in order to initiate the production of multiple stems carrying younger leaves. Harvesting time during the day and weather conditions are also important parameters (Weiss 1967; Yoshida et al. 1968; Mani et al. 1981; Rajeswara Rao et al. 2001). For example, a sunny day and high temperatures are preferred. After the cut, as the EO is protected under a thin wax layer, the plant material can be left in the field for a few hours only, in order to remove the water content. If the vegetal stems are laying too long in the field, this affects yield negatively and changes the EO quality by increasing the citronellol/geraniol ratio, especially under high temperatures (Doimo et al. 1999a; Sastry et al. 2001a; Ram et al. 2005; Verma et al. 2013b; Rajeswara Rao et al. 1992). EO quality is thus deeply influenced by harvest practises (Yoshida et al. 1968; Mani et al. 1981; Rajeswara Rao et al. 2001).

#### Diseases and weeds control

A general survey (Quilici et al. 1992) of harmful insects in the Reunion Island revealed that *Pelargonium* is attacked by at least fourteen different species belonging to the Hemiptera (6 species), Coleoptera (3 species), and Lepidoptera (5 species). Among the most important pests are the white grubs of *Hoplochelus marginalis* Fairmaire (Coleoptera, Scarabaeidae), the cockchafers *Cratopus humeralis* Boh. and *C. angustatus* Boh. (Coleoptera, Curculionidae), the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera, Aleyrodidae), the scale insect *Pseudaulacaspis pentagona* Targioni-Tozzetti (Hemiptera, Diaspididae) and the defoliating caterpillar *Lobesia vanillana* (Lepidoptera, Tortricidae) (Demarne 2002). An efficient integrated control of these insects exists as a combination of light trapping, agronomy controls (minimum three tillages, cover-crops...), chemical controls (insecticide spraying, chemical trapping...), and biological controls (with insects and fungi which parasitize the larva) (Quilici et al. 1992). Pest and diseases are also very different from one country to another and have an impact on the EO yield

(Rajeswara Rao et al. 1999). In Egypt, farmers are not exposed to problems with insects, nematodes, fungi, and bacteria because the desert reduces the possibility of their spreading from one field to another. In India, the major issue concerns the leaf disease probably caused by mycoplasma infection, which leads to a reduction of leaf and petiole sizes, yellowing and bunching of leaves and cessation of growth, resulting in plant mortality and reduced oil yield (Rajeswara Rao et al. 2000). Wilt disease is probably caused by bacteria (Rajeswara Rao et al. 1999) and root damage by nematodes (Doraswamy et al. 1979). Fungal and bacterial diseases are also numerous and very virulent. Wilt, dieback, leaf blight, leaf spot, root and stem rot, anthracnose are common and can be ascribed to several species of fungus (*Colletotrichum*, *Botrytis*, *Septoria*, *Cercospora*, *Armillaria*, *Rosellinia*, *Phomopsis*, *Pythium*, *Fusarium*...) and bacteria (*Pseudomonas solanacearum*). Certain of those pathogens cause severe damages leading sometimes to the total destruction of the crop and the impossibility of growing geranium again on the same plot (e.g. Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*) (Demarne 2002). Some treatments using Chlorothalonil were successful against leaf blight caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Kalra et al. 1998).

Weeds may modify both the EO yield and quality by co-distillation of odoriferous plants (Trémel 1992; Rajeswara Rao and Bhattacharya 1997; Kothari et al. 2002). Weeds are growing very fast under tropical and sub-tropical climates, competing with the space, light, nutrients and water with 'pelargonium rosat'. Hand weeding (3 times after 30, 60 and 90 days of plantation), hoeing and mulching, and herbicide control are used (Trémel 1992; Kothari et al. 2002). Mulching or plasticulture are interesting because they also keep the soil warm when plants are not cultivated in the desert (Doraswamy et al. 1982; Tajuddin 1999; de Carvalho Silva et al. 2014). Furthermore, traces of herbicides in EO are restricted or prohibited by laws.

### **Pelargonium products**

EO produced by steam distillation has a strong rose odor. The EO is clear with a green-yellowish color. In Egypt and India, farmers are bringing their 'pelargonium rosat' productions to factories, distillation stills are big (from 3000 to 7000 L), and the steam is

produced by a separate boiler. In China and in Madagascar, distillation stills are smaller (1000 L) and steam is produced with a naked flame. The distillation, depending of the steam flow, takes between 90 and 150 min. Distillation time has an effect on the EO composition (isomerization and hydrolysis of esters to alcohols and acids). For example, linalool concentration increases, from 0.3 up to 10.0 %, and geraniol concentration decreases, from 28 to 16 %, with increased distillation time (Yoshida et al. 1968; Demarne et al. 1984; Demarne 1992d; Babu and Kaul 2005; Rabesiaka et al. 2013). Several parameters influence the EO yield and quality like the distilled plant part. It has been shown that, compared to branches, leaves contain the majority of the EO (Mallavarapu et al. 1997; Rana and Blazquez 2010; Verma et al. 2010). The localization of leaves on the plant also seems important, with upper leaves leading to a better oil yield and quality (Yoshida and Tamai 1958; Sastry et al. 2001b). The different distillation techniques (Kaul et al. 1995; Babu and Kaul 2005) and the weather temperature influence the geraniol/citronellol ratio (Doimo et al. 1999a). After decantation, the hydrolate still contains some valuable compounds (Rajeswara Rao et al. 2002), which can be recovered by different techniques like stripping or using polymeric adsorbents (Amin et al. 2002). Some studies tried to increase the yield and/or improve the EO quality by adding cellulolytic enzyme mixtures containing glucosidases (Jinsong et al. 2009) or using different extraction methods like supercritical CO<sub>2</sub> (Peterson et al. 2006; Gomes et al. 2007) or microwave extraction (Shi and Wang 2001).

Even if the biggest part of EO production is used pure, the EO may be reworked to give natural isolates. The first isolate was called rhodinol and is now produced in China by EO fractionation. It is a blend of geraniol and  $\beta$ -(DL)-citronellol. As the fractionation with columns becomes more efficient, it is now possible to separate  $\beta$ -(DL)-citronellol and geraniol to have an 80 % pure citronellol product. These products are used by the flavor industries where natural aromas are important, e.g. aroma for yogurt, drinks or jam and chewing gums.

The absolute, extracted with an organic solvent, and with a strong green color, is obtained with a slightly higher yield than the EO. The smell is rosy with greener notes than the EO. The absolute also has a higher long-lasting character, due to some heavy

molecules which fix the olfactive notes. The concrete of 'pelargonium rosat' is obtained after three cold washes of the plant with hexane followed by evaporation of hexane under vacuum. This concrete is heated, diluted in alcohol, filtered and evaporated to remove the insoluble molecules and to give the absolute. The production of 'pelargonium rosat' absolute is very small and only takes place in Egypt. A comparison between an organic solvent extract (hexane) with an EO was made by Demarne et al. (1984). It showed that the solvent extract is closer to the essence stored in the plant. During the distillation process, alteration of compounds occurs, like formation of linalool, probably caused by an allylic transposition of geraniol. Another advantage of a solvent extract is the possibility to make analyses with very small quantities of leaves and save time in a selection process (Demarne et al. 1984).

*Pelargonium* genus contains many species, which are remarkable for their odor diversity (lemon, mint, rose, carrot, fruity, butyric, floral, spicy, camphorous...). This is one of the reasons why the EO compositions of these species were investigated by many groups. Some authors have worked more specifically on the development of accurate methods for the compounds analyses. Various methods were used like Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GCMS) (Vernin and Metzger 1983; Shellie and Marriott 2003; Milchard et al. 2004), High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) (Kritika et al. 2012), vibrational spectroscopy (Sandasi et al. 2011) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (Guerrini et al. 2011). Chirality of compounds was also investigated (Ravid et al. 1992; Wüst et al. 1998; Wüst and Mosandl 1999; Doimo et al. 1999b; Fuchs et al. 2001). The most important goals are to standardize the EO composition, analyse EO purity and absence of adulteration with synthetic geraniol and citronellol or with other cheaper natural oils like citronella or palmarosa (Pieribattesti et al. 1979; Lis-Balchin 2002b). Another important goal is to assess the effect of EO storage on its composition. Indeed, geraniol content may decrease strongly and the citronellol content increases when the oil is not properly stored (Kaul et al. 1997).

The EO composition of the different cultivars (cv. 'Rosat Bourbon', 'Rosat China', 'Rosat Egypt', 'Rosat Algeria'...) has been intensively studied (Peyron 1962; Heuss et al. 1969; Garnerio 1974; Demarne

et al. 1984; Guérère and Demarne 1985; Guerere et al. 1985; Lis-Balchin 2002c; Williams and Harborne 2002; Gauvin et al. 2004; Saxena et al. 2004; Qingyuan et al. 2008; Verma et al. 2010). Table 2 shows a representative analysis on the three major 'pelargonium rosat' cultivars EO (our unpublished results). 'Pelargonium rosat' EO is composed mainly of monoterpenes and sesquiterpenes. The eight major compounds of 'pelargonium rosat' EO are citronellol, geraniol, citronellyl formate, geranyl formate, linalool, isomenthone, 6,9-guaiadiene, 10-epi- $\gamma$ -eudesmol. The minimum and maximum levels of these compounds are registered by Association French Normalization (AFNOR) standard (NF ISO 4731).

Some EO characteristics are very important to trace its geographic origin. First, the Geraniol/Citronellol (G/C) ratio is different from one cultivar to another (Table 2). The highest ratio is found in *Pelargonium*  $\times$  *hybridum* cv. 'Rosat Bourbon' (~0.8) and the lowest in cv. 'Rosat China' (~0.2). This is why the Chinese EO is mainly used to obtain citronellol by fractionation. This ratio also depends on temperature and freshness of the raw distilled material. It will be higher at low temperature (Yoshida 1969; Doimo et al. 1999a).

The sesquiterpene 10-epi- $\gamma$ -eudesmol and 6,9-guaiadiene are key components to trace the EO origin, which is very important as the prices varies depending on the origin and the fluctuation can double. Indeed, the 10-epi- $\gamma$ -eudesmol is more concentrated in cv. 'Rosat Egypt' than in cv. 'Rosat Bourbon' and cv. 'Rosat China' and on the contrary, 6,9-guaiadiene is an important component of cv. 'Rosat Bourbon' and cv. 'Rosat China' oils, but is present in limited quantity or traces in cv. 'Rosat Egypt' oil.

## Biotechnology of *Pelargonium*

### In vitro cultures

*Pelargonium* in vitro cultures could be used for three purposes: (1) obtaining plantlets in keeping with the mother-plant and/or healthy clones, (2) obtaining genetically modified plants by somaclonal variations, somatic fusion, or by genetic transformation, and (3) producing metabolites of interest. Unfortunately, not all these approaches have been tested on scented *Pelargonium*. It has been shown that undifferentiated

**Table 2** *Pelargonium* EO composition of the three most important cultivars

Name	Skeleton	Area % <sup>a</sup>		
		<i>P. × hybridum</i> cv. 'Rosat Bourbon'	<i>P. × hybridum</i> cv. 'Rosat China'	<i>P. × hybridum</i> cv. 'Rosat Egypt'
<i>cis</i> -3-Hexenol	Fatty acid deriv. <sup>b</sup>	0.03	0.04	TR <sup>z</sup>
$\alpha$ -Pinene	Cycl. mono & deriv. <sup>c</sup>	0.75	0.28	0.35
$\beta$ -Pinene	Cycl. mono & deriv.	0.02	0.01	TR
$\alpha$ -Phellandrene	Cycl. mono & deriv.	0.12	0.04	0.04
$\alpha$ -Terpinene	Cycl. mono & deriv.	0.02	TR	TR
<i>para</i> -Cymene	Cycl. mono & deriv.	0.10	0.05	0.05
$\beta$ -Phellandrene	Cycl. mono & deriv.	0.11	0.05	ND <sup>h</sup>
Limonene	Cycl. mono & deriv.	0.25	0.09	0.14
Terpinolene	Cycl. mono & deriv.	0.09	0.02	0.03
Menthone	Cycl. mono & deriv.	0.54	1.79	0.80
Isomenthone	Cycl. mono & deriv.	8.02	3.88	4.95
Menthol	Cycl. mono & deriv.	0.17	0.10	0.11
$\alpha$ -Terpineol	Cycl. mono & deriv.	1.17	0.21	0.36
Bois de rose oxide	Acycl. mono & deriv. <sup>d</sup>	0.26	0.06	0.08
Myrcene	Acycl. mono & deriv.	0.29	0.06	0.05
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimene	Acycl. mono & deriv.	0.25	0.07	0.05
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimene	Acycl. mono & deriv.	0.26	0.04	0.07
Linalool oxide I	Acycl. mono & deriv.	0.37	0.10	0.17
Linalool oxide II	Acycl. mono & deriv.	0.21	0.04	0.10
Linalool	Acycl. mono & deriv.	9.24	2.30	4.73
Rose oxide <i>cis</i>	Acycl. mono & deriv.	0.72	1.21	0.81
Rose oxide <i>trans</i>	Acycl. mono & deriv.	0.27	0.48	0.32
Citronellol	Acycl. mono & deriv.	18.22	34.66	28.37
Piperitone	Acycl. mono & deriv.	0.11	0.13	0.06
Geraniol	Acycl. mono & deriv.	14.11	6.77	15.06
Geranial	Acycl. mono & deriv.	0.87	0.46	0.90
Citronellyl formate	Acycl. mono & deriv.	9.40	12.15	7.32
Neryl formate	Acycl. mono & deriv.	0.27	0.12	0.10
Geranyl formate	Acycl. mono & deriv.	6.10	2.07	3.39
Citronellyl acetate	Acycl. mono & deriv.	0.26	0.44	0.25
Neryl acetate	Acycl. mono & deriv.	0.02	0.01	ND
Geranyl acetate	Acycl. mono & deriv.	0.51	0.16	0.47
Citronellyl propionate	Acycl. mono & deriv.	0.42	0.82	0.30
Geranyl propionate	Acycl. mono & deriv.	1.49	0.61	0.80
Geranyl isobutyrate	Acycl. mono & deriv.	0.43	0.44	0.32
Citronellyl butyrate	Acycl. mono & deriv.	0.49	0.72	0.41
Geranyl butyrate	Acycl. mono & deriv.	1.49	0.83	1.47
Geranyl valerate	Acycl. mono & deriv.	0.10	0.26	0.18
Citronellyl caproate	Acycl. mono & deriv.	0.05	0.13	0.08
Citronellyl tiglate	Acycl. mono & deriv.	0.27	1.00	0.35
Geranyl tiglate	Acycl. mono & deriv.	1.65	1.65	1.50
Geranyl caproate	Acycl. mono & deriv.	0.08	0.05	0.12
$\alpha$ -Cubebene	Sesqui & deriv. <sup>e</sup>	0.07	0.11	0.17

Table 2 continued

Name	Skeleton	Area % <sup>a</sup>		
		<i>P. × hybridum</i> cv. 'Rosat Bourbon'	<i>P. × hybridum</i> cv. 'Rosat China'	<i>P. × hybridum</i> cv. 'Rosat Egypt'
$\alpha$ -Copaene	Sesqui & deriv.	0.33	0.43	0.57
$\beta$ -Bourbonene	Sesqui & deriv.	0.95	1.12	1.16
$\beta$ -Caryophyllene	Sesqui & deriv.	1.09	1.30	1.30
$\alpha$ -trans-Bergamotene	Sesqui & deriv.	0.22	0.01	0.01
Guaia-1(5),11-diene	Sesqui & deriv.	0.47	0.53	0.01
6,9-Guaiadiene	Sesqui & deriv.	5.95	7.68	0.37
Aromadendrene	Sesqui & deriv.	0.50	0.66	0.52
$\alpha$ -Caryophyllene	Sesqui & deriv.	0.30	0.35	0.28
Alloaromadendrene	Sesqui & deriv.	0.12	0.38	0.24
$\beta$ -Cubebene	Sesqui & deriv.	0.14	0.26	0.23
Germacrene d	Sesqui & deriv.	0.97	1.14	1.56
$\beta$ -Selinene	Sesqui & deriv.	0.15	0.37	0.16
Viridiflorene	Sesqui & deriv.	0.16	1.20	0.73
$\gamma$ -Cadinene	Sesqui & deriv.	0.15	0.25	0.31
Calamenene	Sesqui & deriv.	0.16	0.72	0.52
$\delta$ -Cadinene	Sesqui & deriv.	0.51	0.92	1.03
Furopolargone	Sesqui & deriv.	0.63	0.62	ND
$\beta$ -Caryophyllene oxide	Sesqui & deriv.	0.14	0.17	0.14
<i>epi</i> - $\gamma$ -Eudesmol	Sesqui & deriv.	ND	0.11	6.75
$\gamma$ -Eudesmol	Sesqui & deriv.	ND	ND	0.14
Phenethyl propionate	Phenylpropanoid deriv. <sup>f</sup>	0.12	0.03	0.03
$\beta$ -Phenethyl isobutyrate	Phenylpropanoid deriv.	0.15	0.06	0.07
Phenethyl tiglate	Phenylpropanoid deriv.	0.69	0.72	1.01
Total identified		93.57	93.54	91.97

<sup>a</sup> Analysis were done on apolar column GC-MS (unpublished results)

<sup>b</sup> Fatty acid derivatives

<sup>c</sup> Cyclic monoterpenes and derivatives

<sup>d</sup> Acyclic monoterpenes and derivatives

<sup>e</sup> Sesquiterpenes and derivatives

<sup>f</sup> Phenylpropanoid derivatives

<sup>g</sup> Traces <0.01 %

<sup>h</sup> Not detected <0.005 %

aggregated and immobilized cells of *Pelargonium* are able to synthesize EO (Brown and Charlwood 1986a, b; Takemoto et al. 1989; Noriyuki and Jun 2002). However these techniques could only be interesting if costs were lower than with classical field cultivation.

Micropropagation of *Pelargonium* may start from stem cuttings (Hamdorf 1976; Chisowa and Chishimba 1999; Kumar et al. 2008), bud tips (Cassells and Minas 1983), or meristem culture (Debergh and Maene 1977;

Charlwood and Lis-Balchin 2002; Dorion et al. 2010; Arrigoni-Blank et al. 2011). It allows quick multiplication of the best individual clones (Gupta et al. 2002b) and may be a useful tool for the conservation (Moyo and Van Staden 2014). In vitro culture could also help to test and select the best genotypes for drought tolerance in a very short time (Hassanein 2010). Comparison of *P. graveolens* EO propagated by tissue culture or cuttings showed that yields were the same,

but that citronellol concentration was higher for cuttings (Janick et al. 1977; Chisowa and Chishimba 1999). Furthermore, culture of shoot tips or meristems should give non-infected and clean plantlets. Indeed, different workers have succeeded in obtaining virus-free plants by in vitro culture (Abo El-Nil and Hildebrandt 1971, 1973; Hamdorf 1976; Debergh and Maene 1977).

Numerous plant regeneration protocols from callus or protoplasts have also been published on *P. × hortorum* and *P. × domesticum* (Dunbar and Stephens 1989; Robichon et al. 1997; Agarwal and Ranu 2000; Nassour and Dorion 2002; Kour and Singh 2006; Zhou et al. 2007), and on some other species (Dorion et al. 2010; Sukhumpinij et al. 2010). Plantlets regenerated with these protocols can be genetically identical to the mother plant, with the same ploidy level (Nassour et al. 2003; Sukhumpinij et al. 2010). Nevertheless, such protocols can also give somaclonal variations. For example, Hassanein et al. (2005), working on *P. capitatum*, *P. graveolens*, and *P. × hortorum*, obtained tetraploid somaclones of *P. × hortorum*. Many authors have obtained *P. graveolens* somaclones with different amounts of citronellol, geraniol, isomenthone, or 10-epi- $\gamma$ -eudesmol (Kulkarni et al. 1997, 2012, 2014; Saxena et al. 2000, 2008a, 2009; Gupta et al. 2001, 2002a). Somaclones resistant to the leaf blight disease, *Alternaria alternata*, have also been obtained (Saxena et al. 2008b). Finding plants resistant to *Xanthomonas hortorum* pv. *Pelargonii* is a great challenge for industry (Dunbar and Stephens 1992). For example, Nassour and Dorion (2003) fused protoplasts of *P. × hortorum* (susceptible to *Xanthomonas hortorum* pv. *Pelargonii*) and *P. × domesticum* (resistant) and obtained calli resistant to this bacterial disease. Somaclonal embryogenesis protocols have also been set up for *P. × hortorum* and *P. × domesticum* (Marsolais et al. 1991; Murthy et al. 1996; Madakadze and Senaratna 2000; Haensch 2007) but have never been tested for bacteria resistance or on scented *Pelargonium*. However, such protocols are known to induce high levels of somaclonal variations and some of these variations could be very interesting to test.

Development of efficient genetic transformation systems can provide opportunities to improve EO yield and quality in *Pelargonium*. In this framework, several directions have been studied such as transformation systems using leaf discs and *Agrobacterium*

binary vectors (KrishnaRaj et al. 1997; Boase et al. 1998; Hassanein et al. 2005; Benazir et al. 2013), transformation of roots by *Agrobacterium rhizogenes* (Pellegrineschi and Davolio-Mariani 1996; Saxena et al. 2007) or direct gene transfer by electroporation into mesophyll protoplasts (Hassanein et al. 2009). These techniques helped, for example, to show the impact of the overexpression of a gene on height, branching, and flowering behavior (Hamama et al. 2012). Tepfer et al. (1997) applied for a patent about a method for genetically transformation of several *Pelargonium* species with *Agrobacterium rhizogenes* to improve their ornamental characteristics. These plants had more globular shapes, unwrinkled leaves, were more fragrant, and, under certain conditions, more resistant to yellowing flowers than controls. García-Sogo et al. (2012) have also improved the morphological traits of a long-life and male sterile *Pelargonium*. They succeed in delaying leaf senescence, increasing branching and reducing internodal length by a gene transfer via *Agrobacterium tumefaciens*.

In vitro methods offer opportunities to monitor *Pelargonium* diseases and fragrances. Industrials have to manage these biotechnology tools and, if needed, have to adapt them to scented *Pelargonium* species.

#### Biochemical pathways of EO compounds

Terpenes are the largest group of plant natural products, comprising at least 30,000 compounds, including hormones, pigments, volatiles and defense compounds. 'Pelargonium rosat' EO is composed mainly of monoterpenes and sesquiterpenes. The biochemical terpenoid pathways always begin by the condensation of isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, these subunits are biosynthesized through two different pathways located in two different cell compartments: the cytosolic mevalonic acid pathway and the plastidic methylerythritol 4-phosphate pathway (Flesch and Rohmer 1988; Rohmer et al. 1993; Lichtenthaler et al. 1997; Laule et al. 2003; Schuhr et al. 2003). Further condensations of subunits are made by prenyltransferases and terpene synthases. No such enzyme has been cloned in Geraniaceae, but candidate genes can be supposed. Indeed, monoterpenoids are generally synthesized by geranyl diphosphate synthase and monoterpene synthases in plastids and,

sesquiterpenoids, by farnesyl diphosphate synthase and sesquiterpene synthases in the cytosol (Pulido et al. 2012; Vranova et al. 2012; Chang et al. 2013). A prenyltransferase has been purified from 'pelargonium rosat' leaves, but the gene has not been cloned yet (Suga and Endo 1991). The main reason for terpene diversity is the large number of different terpene synthases, some of which produce multiple products (Tholl et al. 2005; Degenhardt et al. 2009). For example, only one terpene synthase is responsible for the production of at least 13 sesquiterpenes of patchouli oil (Deguerry et al. 2006). These products may then undergo various modifications like oxidations by cytochrome P450 or dehydrogenases (Bouwmeester et al. 1999; Chen et al. 2014), methylations of hydroxyl groups or carboxyl groups (Wang et al. 1997; Lavid et al. 2002; Noel et al. 2003), and acetylations (Shalit et al. 2003). The diversity of terpenoids produced in 'pelargonium rosat' and in other scented *Pelargonium*, has never been studied in terms of putative biosynthetic pathways. However, observation of key compounds could highlight some putative genes.

The first pathway, which is most probably present in *Pelargonium* species, concerns acyclic monoterpenoids and their derivatives (Table 2). More than ten geraniol synthases have been already characterized in several plants such as *Ocimum basilicum* (Ijima et al. 2004) and *Cinnamomum tenuipilum* (Yang et al. 2005). About the conversion from geraniol to citronellol, four old yellow enzyme genes were cloned from yeast and plants, for industrial biocatalysis applications (Yuan et al. 2011). The proteins were expressed in *Escherichia coli* and the recombinant proteins displayed a catalytic activity of converting geraniol to citronellol as a sole product. However, no study was made on the protein activities in plants. Another important enzyme is linalool synthase, which was first characterized in *Clarkia breweri* (Pichersky et al. 1995). Such enzymes could be involved in biosynthesis of acyclic monoterpenoids in *Pelargonium*.

The second putative pathway found in *Pelargonium* species is the cyclic monoterpene pathway (Table 2) leading to menthone and isomenthone, which are probably derived from limonene (Rajaonarivony et al. 1992). Numerous genes have been cloned in this pathway, especially in mint (e.g. see Turner and Croteau 2004 and ref therein). The pathway begins

with the biosynthesis of limonene by a limonene synthase and ends by the biosynthesis of menthol isomers by reductases and isomerases. Menthone and iso-menthone are present in very large amounts in two parents of 'pelargonium rosat' (*P. graveolens* and *P. radens*) (Van der Walt and Demarne 1988) and in *P. tomentosum* (Demarne and Van der Walt 1990). In mint, they are directly synthesized from pulegone by a pulegone reductase. Cloning of such enzymes (upstream limonene synthase or downstream pulegone reductase) in *Pelargonium* and making transgenic plants with reduced enzymatic activities could be interesting to modify EO composition, as these monoterpenoids are unwanted for perfumes. Other cyclic monoterpene synthases could be present in 'pelargonium rosat' like myrcene synthase (Bohlmann et al. 2000), 1,8-cineol synthase (Shimada et al. 2005), sabinene synthase (Peters and Croteau 2003), and ocimene synthase (Bohlmann et al. 2000; Shimada et al. 2005). All these compounds can serve as key backbones to design new olfactory molecules by synthesis. Characterization of these genes will allow biotechnological companies to produce these terpenes in high amounts and at reduced cost, which could be used directly or transformed into other odorant molecules by chemists, as it was done for the vanillin by Evolva and IFF (Hansen et al. 2009, 2013).

An important difference between *P. × hybridum* cv. 'Rosat Egypt', *P. × hybridum* cv. 'Rosat China', and *P. × hybridum* cv. 'Rosat Bourbon' results from the biosynthesis of 6,9-guaiadiene and 10-epi- $\gamma$ -eudesmol which mark olfactively the EO. The cultivar from Egypt contains large quantity of 10-epi- $\gamma$ -eudesmol (3–7 %) and not 6,9-guaiadiene while the cultivars from China and Bourbon island haven't got any 10-epi- $\gamma$ -eudesmol but contain important quantities of 6,9-guaiadiene (3–9 %). These differences contribute to distinguish the EO origin. In the literature, only one eudesmol synthase has been characterized in *Zingiber zerumbet* (Yu et al. 2008). One guaiadiene synthase sequence from *Ixeris dentate* is also found in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database (AY082672). In *Pelargonium*, the functioning of these two enzymes is probably the key to the specificities of the different cultivar oils. The expression of these two enzymes could be regulated by environmental factors (temperature, humidity) as 6,9-guaiadiene is only produced under Chinese and Reunion Island conditions and

10-*epi*- $\gamma$ -eudesmol only in dryer and warmer Egyptian conditions (Table 2).

### Conclusions and Perspectives

*Pelargonium* species have very interesting medicinal properties and play an important role in perfumery and flavour industries.

In the South African traditional medicine, a root extract of two *Pelargonium* species (*P. reniforme* and *P. sidoides*) is used for its curative and palliative effects against hepatic dysfunction, gastrointestinal disorder, and respiratory tract disorder. An ethanolic extract is now produced and distributed in Europe (Kolodziej 2002). Many other properties of *Pelargonium* EO like food preservation, antibacterial activity, pharmacological activity and others are being evaluated and we can assume that the full potential of these species has only begun to emerge (Lis-Balchin 2002d).

As was described in this review, a large amount of work has been done to improve the agronomical practices of *Pelargonium* on Reunion Island (mechanization, fertilization, irrigation...) but unfortunately not in China and Egypt. Moreover, because of its high ploidy level, it is extremely difficult to obtain good results on varietal selection improvement. Nevertheless, the yield of EO per hectare is good and the cultivation practices are not constraining and time demanding. With a little bit of extra research, we can assume that *Pelargonium* EO has a great future and many possibilities to make its cultivation even more attractive.

In perfumery, only the rosat cultivars are used to produce EO. We have evaluated with IFF perfumers (unpublished results) more than 50 different botanical species or cultivars and some were very promising in terms of olfactive notes (lactones, carrots, white flowers, spicy, fruity, soapy notes ...). The high variety of terpenes produced should be investigated and could inspire perfumers for new olfactive directions, chemists for new identifications, and biochemists for new pathways.

Indeed, *Pelargonium* is also a very promising model to study the production of EO starting from the genes involved in biosynthetic pathways, to the excretion by trichome cells. *Pelargonium* species have the advantages of high production of various

terpenes and dramatic differences between cultivars. So far, only few species within this genus have really been studied deeply. Increased knowledge of terpene biosynthesis in 'pelargonium rosat' will open new possibilities for the uses of this important crop. For example, production of selected compounds could be made by overexpressing terpene synthase genes in heterologous systems such as bacteria or yeasts. A better understanding of the regulation of these crucial genes could also lead new crossings and improved varietal selections.

**Acknowledgments** We thank T.V. John and Diana Klaser Cheng (IFF) for critical reading of the manuscript and English correction and Fabienne Bettini and Laura Villenaire (IFF-LMR) for the EO analysis. We also thank 'Le Jardin Botanique de Lyon' and 'Le Conservatoire National du Pelargonium' for providing plant material, Latifa Hamama from INRA Angers for her micropropagation advice and the microscopy center from Saint-Etienne University for help with microscopy. We also thank F. Gros, A. Bony, and N. Boyer for technical assistance.

### References

- Abo El-Nil MM, Hildebrandt AC (1971) Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus. *Plant Dis Report* 55:1017–1020
- Abo El-Nil MM, Hildebrandt AC (1973) Origin of androgenetic callus and haploid geranium plants. *Can J Bot* 51:2107–2109
- Afifi FU, Kasabri V, Abu-Dahab R et al (2014) Chemical composition and in vitro studies of the essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* growing in Jordan for hypoglycaemic and hypolipidemic properties. *Eur J Med Plants* 4:220–233
- Agarwal PK, Ranu RS (2000) Regeneration of plantlets from leaf and petiole explants of *Pelargonium*  $\times$  *hortorum*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:392–397
- Albers F (1988) Strategies in chromosome evolution in *Pelargonium* (Geraniaceae). *Monogr Syst Bot Mo Bot Gard* 25:499–502
- Amin LP, Pangarkar VG, Beenackers AACM (2002) Recovery of valuable perfumery compounds from a geranium steam distillation condensate using polymeric adsorbents. *Sep Sci Technol* 36:3639–3655
- Araya HT, Soundy P, Steyn JM et al (2006) Response of herbage yield, essential oil yield and composition of South African rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) to conventional and organic nitrogen. *J Essent Oil Res* 18:111–115
- Araya HT, Soundy P, Steyn JM (2011) Liming improves herbage yield, essential oil yield and nutrient uptake of rose-scented geranium (*Pelargonium capitatum*  $\times$  *P. radens*) on acidic soils. *N Z J Crop Hort Sci* 39:175–186
- Arrigoni-Blank MF, Almeida SA, Oliveira ACL et al (2011) Micropropagation and acclimatization of geranium

- (*Pelargonium graveolens* L.). Rev Bras Plantas Med 13:271–275
- Ayad HS, Reda FA, Abdalla MSA (2010) Effect of putrescine and zinc on vegetative growth, photosynthetic pigments, lipid peroxidation and essential oil content of geranium (*Pelargonium graveolens* L.). World J Agric Sci 6:601–608
- Babu KGD, Kaul VK (2005) Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. Flavour Fragr J 20:222–231
- Bakker FT, Culham A, Daugherty LC et al (1999a) A trnL-F based phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosomes. Plant Syst Evol 216:309–324
- Bakker FT, Culham A, Gibby M (1999b) Phylogenetics and diversification in *Pelargonium*. In: Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ (eds) Molecular systematics and plant evolution. Taylor and Francis, London
- Bakker FT, Culham A, Pankhurst CE et al (2000) Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). Am J Bot 87:727–734
- Bakker FT, Culham A, Hettiarachi P et al (2004) Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes. Taxon 53:17–28
- Bakker FT, Culham A, Marais AM et al (2005) Nested radiation in Cape *Pelargonium*. In: Bakker FT, Chartrou LW, Gravendeel B, Pielsner PB (eds) Plant species-level systematics: new perspectives on pattern and process. Gantner Verlag KG, Liechtenstein
- Ben Slima A, Ben Ali M, Brakkallah M et al (2013) Antioxydant properties of *Pelargonium graveolens* L'Her essential oil on the reproductive damage induced by deltamethrin in mice as compared to alpha-tocopherol. Lipids Health Dis 12:30–38
- Benazir JF, Suganthi R, Chandrika P et al (2013) *In vitro* regeneration and transformation studies on *Pelargonium graveolens* (geranium)—an important medicinal and aromatic plant. J Med Plants Res 7:2815–2822
- Bhattacharya AK, Kaul PN, Rajeswara Rao BR et al (1993) Composition of the oil of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) grown under the semiarid tropical climate of the south India. J Essent Oil Res 5:229–231
- Bhattacharya AK, Rajeswara Rao BR, Kaul PN et al (1995) Response of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) to plant growth regulators. Indian Perfum 39:99–101
- Bhuse VH, Lad BL, Patil DK et al (2003) Effect of time of planting, type of cutting and plant growth regulators on rooting in *Pelargonium graveolens* L. Herit. Indian J Agric Res 3:29–33
- Boase MR, Bradley JM, Borst NK (1998) An improved method for transformation of regal *Pelargonium* (*Pelargonium* × *domesticum* Dubonnet) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci 139:59–69
- Bohlmann J, Martin D, Oldham NJ et al (2000) Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/(E)- $\beta$ -ocimene synthase1. Arch Biochem Biophys 375:261–269
- Boukhatem MN, Said HM, Fairouz S et al (2010) Extraction, composition et valorization de l'eau aromatique de geranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermatopharmacie. Nat Technol 2:59–64
- Boukhatem MN, Kameli A, Saidi F (2013) Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. Food Control 34:208–213
- Boukhris M, Simmonds MSJ, Sayadi S et al (2013a) Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*. Phytother Res 27:1206–1213
- Boukhris M, Moughiba BNA, Mezghani I et al (2013b) Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Her. (Geraniaceae). Ind Crop Prod 50:604–610
- Bouwmeester HJ, Konings MCJM, Gershenzon J et al (1999) Cytochrome P-450 dependent (+)-limonene-6-hydroxylation in fruits caraway (*Carum carvi*). Phytochemistry 50:243–248
- Brown JT, Charlwood BV (1986a) The control of callus formation and differentiation in scented *Pelargonium*. J Plant Physiol 123:409–417
- Brown JT, Charlwood BV (1986b) The accumulation of essential oils by tissue cultures of *Pelargonium fragrans* (Willd.). FEBS 204:117–120
- Burdock GA (2009) Fenaroli's handbook of flavor ingredients, 6th edn. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London
- Cassells AC, Minas G (1983) Plant and in vitro factors influencing the Micropropagation of *Pelargonium* cultivars by bud-tip culture. Sci Hortic 21:53–65
- Cavar S, Maksimovic M (2011) Antioxydant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. Food Control 23:263–267
- Cerempei A, Muresan EI, Cimpoescu N (2014) Biomaterials with controlled release of geranium essential oil. J Essent Oil Res 26:267–273
- Chakib S (1998) Les essences de geranium: influences pédo-climatique et saisonnière sur les essences marocaines, classification par les méthodes d'analyse de données. Dissertation, Université d'Aix-Marseille III
- Chand S, Pande P, Prasad A et al (2007) Influence of integrated supply of Vermicompost and zinc-enriched compost with two graded levels of iron and Zinc on the productivity of Geranium. Commun Soil Sci Plan 38:2581–2599
- Chang WC, Song H, Liu HW et al (2013) Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. Curr Opin Chem Biol 17:571–579
- Charlwood BV, Lis-Balchin M (2002) Micropropagation and biotechnological approaches to tissue culture of *Pelargonium* species and production of essential oils of scented leaf variants. In: Lis-Balchin M (ed) Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 218–223
- Chen W, Viljoen AM (2010) Geraniol—a review of a commercially important fragrance material. S Afr J Bot 76:643–651
- Chen X, Su P, Wang X et al (2014) Research progress relating to the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of terpenoids in medicinal plants. Appl Microbiol Biotechnol 98:2371–2383

- Chisowa EH, Chishimba WK (1999) A comparison of the oils of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) propagated by tissue culture and cuttings. *J Essent Oil Res* 11:461–464
- Colling J, Groenewald JH, Makunga NP (2010) Genetic alterations for increased coumarin production lead to metabolic changes in the medicinally *Pelargonium sidoides* DC (Geraniaceae). *Metab Eng* 12:561–572
- Daker MG (1969) Chromosome numbers of *Pelargonium* species and cultivars. *R Hort Soc* 94:346–353
- de Carvalho Silva A, Blank AF, Melo dos Santos W et al (2014) Fertilization and colors of Plastic mulch affect biomass and essential oil of sweet-scented Geranium. *Sci World J* 2014:1–7
- Debergh P, Maene L (1977) Rapid clonal propagation of pathogen-free *Pelargonium* plants starting from shoot tips and apical meristems. *Acta Hort* 78:449–454
- Degenhardt J, Köllner T, Gershenzon J (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70:1621–1637
- Deguerry F, Pastore L, Wu S et al (2006) The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Arch Biochem Biophys* 454:123–136
- Demarne F (1989) L'amélioration variétale du «Geranium Rosat» (*Pelargonium* sp.) contribution systématique, cytologique, et biochimique. Dissertation, Université de Paris-Sud centre d'Orsay
- Demarne F (1992a) Le bouturage. In: Hauts CA (ed) Le géranium rosat à la réunion. Graphica, Saint-Denis (Réunion Island), pp 39–43
- Demarne F (1992b) Les opérations de récolte. In: Hauts CA (ed) Le géranium rosat à la réunion. Graphica, Saint-Denis (Réunion Island), pp 91–96
- Demarne F (1992c) Influence du mode de récolte sur la distillation du géranium rosat. *Agron Trop* 46(2):161–163
- Demarne F (1992d) La distillation. In: Hauts CA (ed) Le géranium rosat à la réunion. Graphica, Saint-Denis (Réunion Island), pp 97–102
- Demarne F (2002) 'Rose-scented geranium' a *Pelargonium* grown for the perfumery industry. In: Lis-Balchin M (ed) Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 194–211
- Demarne F, Van der Walt JJA (1990) *Pelargonium tomentosum*: a potential source of peppermint-scented essential oil. *S Afr J Plant Soil* 7:36–39
- Demarne F, Van der Walt JJA (1992) Composition of the essential oil of *Pelargonium vitifolium* (L.) L'Hérit. (Geraniaceae). *J Essent Oil Res* 4:345–348
- Demarne F, Van der Walt JJA (1993) Composition of the essential oil of *Pelargonium citronellum* (Geraniaceae). *J Essent Oil Res* 5:233–238
- Demarne F, Guerere M, Durillon M (1984) Interet de la chromatographie en phase gazeuse des extraits hexaniques pour la selection des *Pelargonium* à parfum. *Agron Trop* 39:346–349
- Demarne FE, Garnerio J, Mondon JM (1986) L'Huile essentielle de *Pelargonium tomentosum* jacquin (Geraniaceae). *Parfums, cosmétiques, arômes* 70:57–60
- Demarne F, Viljoen AM, Van der Walt JJA (1993) A study of the variation in the essential oil and morphology of *Pelargonium capitatum* (L.) L'Hérit. (Geraniaceae). Part I. The composition of the oil. *J Essent Oil Res* 5:493–499
- Doimo L, Mackay DC, Rintoul GB et al (1999a) Citronellol: geraniol ratios and temperature in geranium (*Pelargonium* hybrid). *J Hort Sci Biotechnol* 74:528–530
- Doimo L, Fletcher RJ, D'Arcy BR (1999b) Chiral excess: measuring the chirality of the geographically and seasonally different geranium oils. *J Essent Oil Res* 11:291–299
- Doraswamy K, Sundaram M et al (1979) Root knot nematode control in scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit.). *Madras Agric J* 66:205–206
- Doraswamy K, Sundaram M et al (1982) Geranium cultivation in south India. Culture and utilization of aromatic plants. CSIR, New Delhi, pp 573–577
- Dorion N, Ben Jouira H, Gallard A et al (2010) Methods for in vitro propagation of *Pelargonium × hortorum* and others: from meristems to protoplasts. In: Jain SM, Ochatt SJ (eds) Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology, vol 589. Humana Press, pp 197–211
- Dunbar KB, Stephens CT (1989) Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium × hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium × domesticum*) from primary callus cultures. *Plant Cell Tiss Org* 19:13–21
- Dunbar KB, Stephens CT (1992) Resistance in seedlings of the family Geraniaceae to bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii*. *Plant Dis* 76:693–695
- Eiasu BK, Steyn JM, Soundy P (2008) Growth and essential oil yield of rose-scented geranium (*Pelargonium capitatum × P. radens* 'Rose') as affected by withholding irrigation at different times during regrowth. *N Z J Crop Hort Sci* 36:285–294
- Fleisher A, Fleisher Z (1985) Yield and quality of essential oil from *Pelargonium graveolens* cultivated in Israel. *J Sci Food Agric* 36:1047–1050
- Flesch G, Rohmer M (1988) Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between triterpenes and D-ribose. *Eur J Biochem* 175:405–411
- Fouque-de-Cambiaire E (1986) Etude des espèces à feuilles odorantes du genre *Pelargonium*: Intérêt taxonomique de l'observation des trichomes, et de l'analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse. Dissertation, Université Paris-Sud-Orsay
- Fritz J (1976) Effect of nitrogenous fertilizing on rose geranium production. *Agron Trop* 31:369–374
- Fuchs S, Montag V, Mosandl A (2001) Menthone and isomenthone biosynthesis in *Pelargonium tomentosum* jacq. *Enantiomer* 6(319):327
- García-Sogo B, Pineda B, Roque E, Antón T, Atarés A, Borja M, Beltrán JP, Moreno V, Cañas LA (2012) Production of engineered long-life and male sterile *Pelargonium* plants. *BMC Plant Biol* 12:156–171
- Garin P (1987) Systèmes de culture et itinéraires techniques dans les exploitations à base de geranium dans les hauts de l'ouest de La Réunion. *Agron Trop* 42:289–300
- Garnero J (1974) Etude de deux huiles essentielles complexes: Les essences de geranium et les essences de vetiver. Document Ets. Robertet, Grasse, France, 49 pp

- Gauvin A, Lecompte H, Smadja J (2004) Comparative investigations of the essential oils of two scented geranium (*Pelargonium* sp.) cultivars grown on reunion island. *Flavour Frag J* 19(5):455–460
- Gibby M, Westfold J (1986) A cytological study of *Pelargonium* sect. *Eumorpha* (Geraniaceae). *Plant Syst Evol* 153:205–222
- Gibby M, Albers F, Prinsloo B (1990) Karyological studies in *Pelargonium* sect. *Ciconium*, *Dibrachya* and *Jenkinsonia* (Geraniaceae). *Plant Syst Evol* 170:151–159
- Gibby M, Hinnah S, Marais EM et al (1996) Cytological variation and evolution within *Pelargonium* section *Hoarea* (Geraniaceae). *Plant Syst Evol* 203:111–142
- Gildemeister E, Hoffmann F (1900) In: *Les Huiles essentielles* (ed) Brockhaus & Tognol, Leipzig & Paris
- Glas JJ, Schimmel BCJ, Alba JM et al (2012) Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int J Mol Sci* 13:17077–17103
- Goldblatt P, Manning J (2000) Cape plants. A conspectus of the cape flora of South Africa. *Strelitzia* 9:743
- Gomes PB, Mata VG, Rodrigues AE (2007) Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *J Supercrit Fluids* 41:50–60
- Guenther E (1977) Essential oils of the plant family Geraniaceae: oil of geranium. In: *The essential oils* (chap. 6), vol IV. D. Van Nostrand Company, Toronto, New-York, London, pp 671–737
- Guérére M, Demarne F (1985) Caractérisation de l'huile essentielle de «geranium bourbon» par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. *Ann Fals Exp Chim* 78:183–188
- Guérére M, Demarne F, Mondon JM et al (1985) Etude d'huiles essentielles de geranium bourbon obtenues de trois façons différentes. *Ann Fals Exp Chim* 78:131–136
- Guerrini A, Rossi D, Paganetto G et al (2011) Chemical characterization (GC/MS and NMR fingerprint) and bioactivities of South-African *Pelargonium capitatum* (L.) L'Her. (Geraniaceae) essential oil. *Chem Biodivers* 8:624–642
- Guisinger MM, Kuehl JV, Boore JL et al (2008) Genome-wide analyses of Geraniaceae plastid DNA reveal unprecedented patterns of increased nucleotide substitutions. *PNAS* 105:18424–18429
- Gupta R, Mallavarapu GR, Banerjee S et al (2001) Characteristics of an isomenthone-rich somaclonal mutant isolated in a geraniol-rich rose-scented geranium accession of *Pelargonium graveolens*. *Flavour Frag J* 16:319–324
- Gupta R, Banerjee S, Mallavarapu GR et al (2002a) Development of a superior somaclone of rose-scented Geranium and a protocol for inducing variants. *HortScience* 37:632–636
- Gupta R, Gupta SK, Banerjee S et al (2002b) Micropropagation of elite cultivars of Rose-scented Geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit.) for industrial production of propagules. *Indian J Biotechnol* 1:286–291
- Haensch KT (2007) Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium × domesticum* cv. Madame Loyal. *Electron J Biotechnol* 10:69–77
- Hamama L, Naouar A, Gala R et al (2012) Overexpression of RoDELLA impacts the height, branching, and flowering behaviour of *Pelargonium × domesticum* transgenic plants. *Plant Cell Rep* 31:2015–2029
- Hamdorf G (1976) Propagation of *Pelargonium* varieties by stem-tip culture. *Acta Hort* 59:144–151
- Hansen EH, Möller BL, Kock GR et al (2009) De novo biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Appl Environ Microbiol* 75:2765–2774
- Hansen J, Hansen EH, Sompalli HP et al (2013) Composition and methods for the biosynthesis of vanilline or vanilline beta-d-glucoside. WO2013022881 A8, 21 March 2013
- Harada E, Kim J-A, Meyer AJ et al (2010) Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol* 51:1627–1637
- Hassanein AMA (2010) Establishment of efficient *in vitro* method for drought tolerance evaluation in *Pelargonium*. *J Hort Sci Ornament Plants* 2:8–15
- Hassanein A, Chevreau E, Dorion N (2005) Highly efficient transformation of zonal (*Pelargonium × hortorum*) and scented (*P. capitatum*) geraniums via *Agrobacterium tumefaciens* using leaf discs. *Plant Sci* 169:532–541
- Hassanein A, Hamama L, Loridon K et al (2009) Direct gene transfer study and transgenic plant regeneration after electroporation into mesophyll protoplasts of *Pelargonium × hortorum*, 'panaché Sud'. *Plant Cell Rep* 28:1521–1530
- Hefendehl FW (1972) Biogenesis of essential oils. Composition of essential oils of *Pelargonium tomentosum*. *Planta Med* 22:378–386
- Heuss A, Kapetanidis I, Mirimanoff A (1969) Etude par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle d'un géranium rosat (*Pelargonium × asperum* Ehrhart ex Willdenow). *Plantes Méd Phytothér* 3:28–43
- Ijima Y, Gang DR, Fridman R et al (2004) Characterization of a geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Plant Physiol* 134:370–379
- James J (2002) Cultivation and sales of *Pelargonium* plants for ornamental use in the UK and worldwide. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 80–91
- Janick J, Skirvin RM, Janders RB (1977) Comparison of *in vitro* and *in vivo* tissue culture systems in scented geranium. *J Hered* 68:62–64
- Jinsong Z, Kaiguo X, Hongtao R (2009) Geranium's (*Pelargonium graveolens* L.) branches and leaves treated with exogenous enzyme bring about some effect of yield of essential oil and aroma. *Xiangliao Xiangjing Huazhuangpin* 3:10–12
- Jones CS, Bakker FT, Schlichting CD et al (2009) Leaf shape evolution in the South African genus *Pelargonium* L'Hér. (Geraniaceae). *Evolution* 63:479–497
- Jones CS, Martínez-Cabrera HI, Nicotra AB et al (2013) Phylogenetic influences on leaf trait integration in *Pelargonium* (Geraniaceae): convergence, divergence, and historical adaptation to a rapidly changing climate. *Am J Bot* 100:1306–1321
- Kalra A, Parameswaran TN, Ravindra NS (1998) Relative efficacy of chlorothalonil for controlling leaf blight (*Colletotrichum gloeosporioides*) of scented geranium (*Pelargonium graveolens*). *Indian J Agric Sci* 68:364–366
- Karawya MS, Hifnawy MS, El-Hawary SS (1982) Study of essential oil of *Pelargonium fragrans* L., growing in Egypt. *Egypt J Pharm Sci* 20:139–145

- Kaul PN, Rajeswara Rao BR (1999) Quality variations in the essential oils of young and old leaves of three varieties of rose-scented geranium (*Pelargonium* species). *Fafai J* 1:35–37
- Kaul PN, Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK et al (1995) Volatile constituents of three cultivars of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) as influenced by method of distillation. *Pafai J* 17:6–21
- Kaul PN, Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK et al (1997) Changes in chemical composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) oil during storage. *J Essent Oil Res* 9:115–117
- Kaul PN, Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK et al (1998) Relationship between crop age, essential oil concentration and its composition in rose-scented geranium (*Pelargonium* species). *J Essent Oil Bear Plants* 1:88–92
- Khan R, Karandikar A, Wagle A et al (2009) Changes in terpenoid profile in *Pelargonium graveolens* when cultivated at sea level. *Fafai J* 11:55–58
- Knically WW (1964) Chromosome numbers and crossability studies in the genus *Pelargonium*. Dissertation, Pennsylvania State University
- Kolodziej H (2002) *Pelargonium reniforme* and *Pelargonium sidoides*: their botany, chemistry and medicinal use. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 262–290
- Koriesh EM, Atta SKH (1986) Relationship between irrigation intervals and soil conditioner application on growth and oil yield of geranium plant (*Pelargonium graveolens*, L'Hérit.). *Ann Agric Sci Moshtohor* 24:447–454
- Kothari SK, Singh CP, Singh K (2002) Weed control in rose-scented geranium (*Pelargonium* spp.). *Pest Manag Sci* 58:1254–1258
- Kour G, Singh J (2006) In vitro regeneration system for Indian grown geranium cultivar. *Adv Plant Sci* 19:341–343
- KrishnaRaj S, Bi Y, Saxena PK (1997) Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp. 'Frensham'). *Planta* 201:434–440
- Kritika M, Jai M, Vinod G (2012) Development of HPTLC Method for quantitative estimation of geraniol in volatile oil of *Pelargonium graveolens*. *Int J Rec Adv Pharm Res* 2:24–30
- Kulkarni RN, Baskaran K, Ramesh S et al (1997) Intra-clonal variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cuttings of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). *Ind Crop Prod* 6:107–112
- Kulkarni SS, Ravindra NS, Srinivas KVNS et al (2012) A somaclonal variant of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) with moderately high content of isomenthone in essential oil. *Nat Prod Commun* 7:1223–1224
- Kulkarni SS, Ravindra NS, Srinivas KVNS et al (2014) In Vitro chemical mutagenesis in exclusively vegetatively-propagated rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). *J Hortic Sci Biotechnol* 89:173–178
- Kumar A et al (2008) In-vitro system of Micropropagation of rose-scented *Pelargonium graveolens*, of Bourbon type. *US Patent* 7,470,832, 30 Dec 2008
- Lalli JYY (2005) *In Vitro* pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous *Pelargonium* (Geraniaceae) species. Dissertation, University of the Witwatersrand
- Lalli JYY, Viljoen AM, Baser KHC et al (2006) The essential oil composition and chemotaxonomical appraisal of South African *Pelargoniums* (Geraniaceae). *J Essent Oil Res* 18:85–105
- Laule O, Fürholz A, Chang H et al (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 100:6866–6871
- Lavid N, Wang J, Shalit M (2002) O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol* 129:1899–1907
- Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant* 101:643–652
- Lis-Balchin M (1988) The commercial usefulness of the Geraniaceae, including their potential in the perfumery, food manufacture and pharmacological industries. In: Vorster P (ed) *Proceedings of the international Geraniaceae symposium*, South Africa, 1990
- Lis-Balchin M (1991) Essential oil profiles and their possible use in hybridization of some common scented geranium. *J Essent Oil Res* 3:99–105
- Lis-Balchin M (1993) The essential oils of *Pelargonium grossularioides* and *Erodium cicutarium* (Geraniaceae). *J Essent Oil Res* 5:317–318
- Lis-Balchin M (1997) A chemotaxonomic study of the *Pelargonium* (Geraniaceae) species and their modern cultivars. *J Hortic Sci* 72:791–795
- Lis-Balchin M (2002a) History of nomenclature, usage and cultivation of *Geranium* and *Pelargonium* species. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 5–10
- Lis-Balchin M (2002b) Geranium essential oil: standardization, ISO; adulteration and its detection using GC, enantiomeric columns, toxicity and bioactivity. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 184–192
- Lis-Balchin M (2002c) Essential oils from different *Pelargonium* species and cultivars: their chemical composition (using GC, GC/MS) and appearance of trichomes (under EM). In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 147–165
- Lis-Balchin M (2002d) New research: possible uses of various *Pelargonium* leaf oils and extracts as food preservatives. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 251–261
- Lis-Balchin M, Hart S (1997) Pharmacological effect of essential oils on the uterus compared to that on the other tissue types. In: Franz C, Mathé A, Buchbauer G (ed) *Proceedings of the 27th international symposium on essential oils*, Vienna, 1997
- Lis-Balchin M, Roth G (2000) Composition of the essential oils of *Pelargonium odoratissimum*, *P. exstipulatum*, and *P. × fragrans* (Geraniaceae) and their bioactivity. *Flavour Frag J* 15:391–394

- Lis-Balchin M, Deans SG, Hart S (1996a) Bioactivity of geranium oils from different commercial sources. *J Essent Oil Res* 8:281–290
- Lis-Balchin M, Hart S, Deans SG et al (1996b) Comparison of the pharmacological and antimicrobial action of commercial plant essential oils. *J Herbs Spices Med Plants* 4:69–86
- Lis-Balchin M, Hart S, Deans SG et al (1996c) Potential agrochemical and medicinal usage of essential oils of *Pelargonium* species. *J Herbs Spices Med Plants* 3:11–22
- Lis-Balchin M, Patel J, Hart S (1998) Studies on the mode of action of essential oils of scented-leaf *Pelargonium* (Geraniaceae). *Phytother Res* 12:215–217
- Lorenzo Tejedor M, Mizuno H, Tsuyama N et al (2009) Direct single-cell molecular analysis of plant tissues by video mass spectrometry. *Anal Sci* 25:1053–1055
- Madakadze RM, Senaratna T (2000) Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium × hortorum*) somatic embryos. *Plant Growth Regul* 30:55–60
- Mahmoud MT, Amber S (2014) In Vitro antimicrobial activities of some Egyptian plant's essential oils with medicinal applications. *J Drug Discov* 4:32–40
- Mairapetyan SK (1982) Hydroponic culture of essential oil producing plants. *Agrokhimiya* 7:107–110
- Mallavarapu GR, Rajeswara Rao BR, Kaul PN et al (1997) Contribution of the essential oils of leaf, petiole and stem of scented geranium to the odour of geranium oil. *JMAPS* 19:1020–1023
- Mani AK, Mohandass S, Kumar N et al (1981) Effect of storage time of the herbage prior distillation on oil recovery and its quality in geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit.). *Indian Perfum* 25:35–36
- Marsolais AA, Wilson DPM et al (1991) Somatic embryogenesis and artificial seed production in Zonal (*Pelargonium × hortorum*) and Regal (*Pelargonium × domesticum*) geranium. *Can J Bot* 69:1188–1193
- McDowell ET, Kapteyn J, Schmidt A et al (2011) Comparative functional genomic analysis of solanum glandular trichome types I. *Plant Physiol* 155:524–539
- Mezhunts BK, Mairapetyan SK (1985) Some physiological indexes of the rose geranium under conditions of open-air hydroponics. *Biologicheskii Zhurnal Armenii* 38:607–613
- Michellon R (1975) Essais de bouturage du Géranium rosat. In: Report IRAT, Saint-Denis (Réunion)
- Michellon R (1978) Le géranium rosat à la Réunion: L'intensification de sa culture et les perspectives d'amélioration génétique. *Agron Trop* 33:80–89
- Michellon R (1980) Influence de l'altitude sur le comportement et la composition de l'huile essentielle du Géranium rosat. In: Report IRAT, Saint-Denis (Réunion)
- Michellon R (1981) Contribution de l'amphiploidie à l'amélioration génétique du géranium rosat. *Agron Trop* 36:323–328
- Michellon R (1987) Amélioration des systèmes de culture à base de géranium. In: Report IRAT, Saint-Denis (Réunion)
- Milchard MJ, Clery R, Da Costa N et al (2004) Application of gas-liquid chromatography to the analysis of essential oils: fingerprints of 12 essential oils. *P&F* 29:28–36
- Miller DM (2002) The taxonomy of *Pelargonium* species and cultivars, their origins and growth in the wild. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium*. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 49–79
- Misra A, Srivastava A, Srivastava NK et al (2005) Zn-acquisition and its role in growth, photosynthesis, photosynthetic pigments, and biochemical changes in essential monoterpene oil(s) of *Pelargonium graveolens*. *Photosynthetica* 43:153–155
- Mnif W, Dhifi W, Jelali N et al (2011) Characterization of leaves essential oil of *Pelargonium graveolens* originating from Tunisia: chemical composition, antioxidant and biological activities. *J Essent Oil Bear Plants* 14:761–769
- Motsa NM, Soundy P, Steyn JM et al (2006) Plant shoot age and temperature effects on essential oil yield and oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) grown in South Africa. *J Essent Oil Res* 18:106–110
- Moyo M, Van Staden J (2014) Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sisoides* DC. *J Ethnopharmacol* 152:243–255
- Murthy BN, Singh RP, Saxena PK (1996) Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) cotyledonary cultures. *Plant Cell Rep* 15:423–426
- Nassour M, Dorion N (2002) Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium × hortorum* 'Alain': effect of some environmental and medium factors on protoplast system efficiency. *Plant Sci* 163:169–176
- Nassour M, Dorion N (2003) Somatic hybridisation between *Pelargonium × hortorum* and *P. × domesticum* towards resistance to *Xanthomonas pelargonii*. *Acta Hort* 612:75–81
- Nassour M, Chassériaux G, Dorion N (2003) Optimization of protoplast-to-plant system for *Pelargonium × hortorum* 'Alain' and genetic stability of the regenerated plant. *Plant Sci* 165:121–128
- Nejad AR, Ismaili A (2014) Changes in growth, essential oil yield and composition of geranium (*Pelargonium graveolens* L.) as affected by growing media. *J Sci Food Agric* 94:905–910
- Noel JP, Dixon RA, Pichersky E et al (2003) Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. In: Romero JT (ed) *Recent advances in phytochemistry*, vol 37. Elsevier Science, Oxford, pp 37–58
- Noriyuki Y, Jun H (2002) Essential oil production by tissue culture of rose geranium (*Pelargonium graveolens*). *Meijo Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku* 38:15–22
- Ochocka JR, Bogdan A, Piotrowski A et al (2002) Phylogenetic relationship within the genus *Pelargonium* based on the RAPD-PCR method of DNA analysis correlated with the essential oil composition. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium*. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 174–183
- Oosthuizen L (1983) The taxonomic value of the trichomes in *Pelargonium* L'hérit. (Geraniaceae). *J S Afr Bot* 49:221–242
- Oosthuizen L, Coetzee J (1983) Morphogenesis of trichomes of *Pelargonium scabrum*. *S Afr J Bot* 2:305–310
- Oosthuizen L, Coetzee J (1984) Trichome initiation during leaf growth in *Pelargonium scabrum*. *S Afr J Bot* 3:50–54

- Parkinson C, Mower J, Qiu Y et al (2005) Multiple major increases and decreases in mitochondrial substitution rates in the plant family Geraniaceae. *BMC Evol Biol* 25:1253–1256
- Payet J (1982) Caractères morphologiques, anatomiques des *Pelargoniums* à feuilles odorantes et essai de classification numérique. Dissertation, Université Paris-Sud-Orsay
- Pellegrineschi A, Davolio-Mariani O (1996) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of scented geranium. *Plant Cell Tiss Org* 47:79–86
- Peters RJ, Croteau RB (2003) Alternative termination chemistries utilized by monoterpene cyclases: chimeric analysis of bornyl diphosphate, 1,8-cineole, and sabinene synthases. *Arch Biochem Biophys* 417:203–211
- Peterson A, Machmudah S, Roy BC et al (2006) Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *J Chem Technol Biot* 81:167–172
- Petlevski R, Flajs D, Kalodera Z et al (2013) Composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic *Pelargonium radula* extracts. *S Afr J Bot* 85:17–22
- Peyron L (1962) Contribution à l'étude de l'essence de geranium rosat. *Parf Cos Sav* 5:1–4
- 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*. *Arch Biochem Biophys* 316:303–307
- Pieribattesti J, Conan JY, Guerere M (1979) Study of certain anomalies observed in geranium Bourbon essential oil. *Riv Ital Ess Prof Piante Off Arom Syn Sap Cosm Aerosol* 61:119–122
- Prakasa Rao EVSM, Singh M (1988) Effect of plant spacings and nitrogen levels on herb and essential oil yields and nutrient uptake in geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit. Ex Ait.). *Int J Trop Agric* 6:95–101
- Prakasa Rao EVSM, Singh M, Ganesha Rao RS (1984a) Intercropping studies in geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hér. Ex Ait.). *J Agric Sci* 102:499–500
- Prakasa Rao EVSM, Singh M, Chandrasekhara G et al (1984b) Micronutrient studies in geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit.) and davana (*Artemisia pallens* Wall.). *Indian Perfum* 28:88–90
- Prakasa Rao EVSM, Ganesha Rao RS, Srinivasaiyer R (1995) Seasonal variation in oil content and its composition in two chemotypes of scented geranium (*Pelargonium* sp.). *J Essent Oil Res* 7:159–163
- Prasad A, Chattopadhyay A, Yadav A et al (2008) Variation in the chemical composition and yield of essential oil of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) by the foliar application of matallic salts. *Flavour Frag J* 23:133–136
- Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M (2012) New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol Plant* 5:964–967
- Putievsky E, Ravid U, Dudai N (1990) The effect of water stress on yield components and essential oil of *Pelargonium graveolens* L. *J Essent Oil Res* 2:111–114
- Qingyuan Y, Dongguang S, Ming J et al (2008) Research advances of essential oil from rose scented *Pelargonium*. *Xiangliao Xiangjing Huazhuangpin* 52:40–43
- Qingyuan Y, Ming J, Yanqiong Y et al (2013) Chemical constituents of essential oils from different ploidy seedlings of *Pelargonium graveolens*. *Xiangliao Xiangjing Huazhuangpin* 3:21–23
- Quilici S, Vercambre B, Bonnemorr C (1992) Les insectes ravageurs. In: Hauts CA (ed) *Le géranium rosat à la Réunion*. Graphica, Saint-Denis (Reunion Island), pp 79–90
- Rabesiaka JR, Pierre RH, Razanamparany B (2013) Optimization and extrapolation to pilot scale of essential oil extraction from *Pelargonium graveolens*, by steam distillation. *J Food Process Technol* 4:1–6
- Rajaonarivony JIM, Gershenzon J, Croteau R (1992) Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha × piperita*). *Arch Biochem Biophys* 298:49–57
- Rajeswara Rao BR (2002a) Cultivation and distillation of Geranium oil from *Pelargonium* species in India. In: Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 212–217
- Rajeswara Rao BR (2002b) Biomass yield, essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with coriander (*Mentha arvensis* L.f. piperascens Malinv. Ex Holmes). *Ind Crop Prod* 16:133–144
- Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK (1997) Yield and chemical composition of the essential oil of rose scented geranium (*Pelargonium* sp.) grown in the presence and absence of weeds. *Flavour Frag J* 12:201–204
- Rajeswara Rao BR, Sastry KP, Prakash REVS et al (1990a) Variation in yields and quality of geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit. Ex Ait.) under varied climatic and fertility conditions. *J Essent Oil Res* 2:73–79
- Rajeswara Rao BR, Singh K, Bhattacharya AK et al (1990b) Effect of prilled urea materials on yield and quality of geranium (*Pelargonium graveolens* L. Her.). *Fert Res* 23:81–85
- Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK, Kaul PN et al (1992) The essential oil profiles of rose scented geranium (*Pelargonium* sp.) biomass dried prior to distillation. *Indian Perfum* 36:238–240
- Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK, Kaul PN et al (1993) Behaviour of rose geranium (*Pelargonium* species) cuttings in response to IBA treatment. *Indian Perfumer* 37:194–196
- Rajeswara Rao BR, Kaul PN, Mallavarapu GR et al (1996) Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species). *Biochem Syst Ecol* 24:627–635
- Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK, Singh K et al (1997) Growth, biomass production and essential oil profile of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) as influenced by plant growth regulators. *Fafai J* 19:11–15
- Rajeswara Rao BR, Bhattacharya AK, Singh HB et al (1999) The impact of wilt disease on yield and quality of two cultivars of rose-scented geranium (*Pelargonium* species). *J Essent Oil Res* 11:769–775
- Rajeswara Rao BR, Kaul PN, Mallavarapu GR et al (2000) First observation of little leaf disease and its impact on the yield and composition of the essential oil of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.). *Flavour Frag J* 15:137–140

- Rajeswara Rao BR, Bhattacharya A, Kaul PN et al (2001) Yield and chemical composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) oil at different times of harvesting. *J Essent Oil Res* 13:456–459
- Rajeswara Rao BR, Kaul PN, Syamasundar KV et al (2002) Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) essential oil. *Bioresour Technol* 84:243–246
- Ram M, Ram D, Roy SK (2003) Influence of organic mulching on fertilizer nitrogen use efficiency and herb and essential oil yields in geranium (*Pelargonium graveolens*). *Bioresour Technol* 87:273–278
- Ram P, Kumar B, Srivastava N et al (2004) Productivity and quality assessment of different chemotypes of geranium under tarai of Uttaranchal. *JMAPS* 26:482–485
- Ram P, Kumar B, Naqvi AA et al (2005) Post-harvest storage effect on quantity and quality of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp. cv. 'Bourbon') oil in Uttaranchal. *Flavour Frag J* 20:666–668
- Ram M, Singh R, Ram D (2006) Foliar applications of phosphate and zinc sulphate increase yield of essential oil in geranium (*Pelargonium graveolens*). *Indian Perfum* 50:45–48
- Raman KR, Veerannah L, Balakrishnan R et al (1977) Effect of certain growth regulators on the rooting of Geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit). *Cult Util Arom Plant* 10:566–569
- Rana VS, Blazquez MA (2010) Essential oil composition of aerial parts of *Pelargonium graveolens* at different growth stages. *Indian Perfum* 54:22–25
- Ravid U, Putievsky E, Katzir I et al (1992) Determination of the enantiomeric composition of citronellol in essential oils by chiral GC analysis on a modified gamma-cyclodextrin phase. *Flavour Frag J* 7:235–238
- Reddy CP, Chandrasekar R (2008) Effect of NAA on rooting of cuttings of scented geranium (*Pelargonium graveolens* L. Herit) in different months. *Indian J Agric Res* 42:140–143
- Robichon MP, Renou JP, Jalouzet R (1997) Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 49:209–212
- Rohmer M, Knani M, Simonin P et al (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295:517–524
- Röschenbleck J, Albers F, Müller K et al (2014) Phylogenetics, character evolution and a subgeneric revision of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *Phytotaxa* 159:31–76
- Sandasi M, Kamatou GPP, Gavgughan C et al (2011) A quality control method for geranium oil based on vibrational spectroscopy and chemometric data analysis. *Vib Spectrosc* 57:242–247
- Sanderovich D, Putievsky E, Ravid U (1983) Irrigation of aromatic plants: *Pelargonium graveolens*. *Hassadeh* 63:1980–1983
- Sastry KP, Krishnan KR, Radha K et al (2001a) Influence of time and method of storage of harvested herbage before distillation on the oil content and quality of essential oil in rose scented geranium *Pelargonium graveolens* chemotypes. *JMAPS* 22–23:352–355
- Sastry KP, Krishnan KR, Radha K et al (2001b) Differences in the quality of the essential oil hydrodistilled from leaves from different positions on the growing branches of rose scented geranium *Pelargonium graveolens*. *JMAPS* 22–23:34–36
- Saxena G, Banerjee S, Rahman L et al (2000) An efficient in vitro procedure for Micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium*. *Plant Sci* 155:133–140
- Saxena G, Banerjee S, Gupta R et al (2004) Composition of the essential oil of a new isomenthone-rich variant of geranium obtained from geraniol-rich cultivar of *Pelargonium* species. *J Essent Oil Res* 16:85–88
- Saxena G, Banerjee S, Maiq-ur-Rahman et al (2007) Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri-insertion for improved essential oil quality. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 90:215–223
- Saxena G, Rahman L, Verma PC et al (2008a) Field performance of somaclones of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her Ex Ait.) for evaluation of their essential oil yield and composition. *Ind Crop Prod* 27:86–90
- Saxena G, Verma PV, Rahman L et al (2008b) Selection of leaf blight-resistant *Pelargonium graveolens* plants regenerated from callus resistant to a culture filtrate of *Alternaria alternata*. *Crop Prot* 27:558–565
- Saxena G, Banerjee S, Rahman L et al (2009) New and distinct somaclonal variety of rose scented geranium. *US Patent* PP20,149 P2, 7 Jul 2009
- Schillmiller AL, Miner DP, Larson M et al (2010) Studies of a biochemical factory: tomato trichome deep EST sequencing and proteomics. *Plant Physiol* 153:1212–1223
- Schuh CA, Radykewicz T, Sagner S et al (2003) Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem Rev* 2:3–16
- Seema D, Kumar SA, Abdul S et al (2014) Impact of growth promoting *Pseudomonas monteilii* PsF84 and *Pseudomonas plecoglossicida* PsF610 on metal uptake and production of secondary metabolite (monoterpenes) by rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* cv. Bourbon) grown on tannery sludge amended soil. *Chemosphere* 117:433–439
- Shalit M, Guterman I, Volpin H et al (2003) Volatile ester formation in roses: identification of an acetyl-CoA: geraniol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiol* 131:1868–1876
- Shasany AK, Aruna V, Daroka MP et al (2002) RAPD marking of three *Pelargonium graveolens* genotypes with chemotypic differences in oil quality. *JMAPS* 24:729–732
- Shellie RA, Marriott PJ (2003) Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of *Pelargonium graveolens* essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry. *Analyst* 128:879–883
- Shi R, Wang GL (2001) Essential oil of *Pelargonium graveolens* L', Hérit extracted by microwave method. *Dalian Ligong Daxue Xuebao* 41:542–544
- Shimada T, Endo T, Fujii H et al (2005) Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8 cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc. *Plant Sci* 168:987–995
- Singh M (1999) Effect of soil moisture regime, nitrogen and modified urea materials on yield and quality of geranium

- (*Pelargonium graveolens*) grown on alfisols. *J Agr Sci* 133:203–207
- Singh M, Chandrashekhara RS, Ganesh Rao RS et al (1996) Effect of irrigation and levels of nitrogen on herb and oil yield of geranium (*Pelargonium* sp.) under semiarid tropical India. *J Essent Oil Res* 8:653–656
- Singh V, Ambia LK, Kaul VK et al (2007) Effect of plant density and multiple harvesting on productivity and quality of scented geranium. *Indian Perfum* 51:42–46
- Singh M, Singh UB, Ram M et al (2013) Biomass yield, essential oil yield and quality of geranium (*Pelargonium graveolens* L. Her.) as influenced by intercropping with garlic (*Allium sativum* L.) under subtropical and temperate climate of India. *Ind Crop Prod* 46:234–237
- Struck M (1997) Floral divergence and convergence in the genus *Pelargonium* (Geraniaceae) in southern Africa: ecological and evolutionary considerations. *Plant Syst Evol* 208:71–97
- Suga T, Endo T (1991) Geranyl diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium Roseum*. *Phytochem* 30:1757–1761
- Sukhumpinij P, Kakihara F, Kato M (2010) In vitro regeneration from mature leaf explants of *Pelargonium rapaceum* (L.) L'Hérit. *Sci Hortic* 126:385–389
- Swain R (1974) Aromatic pelargoniums. *Arnold Arbor Harv Univ* 34:97–124
- Swamy KN, Rao SSR (2009) Effect of 24-epibrassinolide on growth, photosynthesis, and essential oil content of *Pelargonium graveolens* (L.) Herit. *Russ J Plant Physiol* 56:616–620
- Swamy KN, Rao SSR (2010) Influence of 28-homobrassinolide on growth, photosynthesis metabolite and essential oil content of geranium [*Pelargonium graveolens* (L.) Herit.]. *Am J Plant Physiol* 5:212–218
- Tajuddin YM (1999) Plasticity effects on growth and essential oil yield of rose scented geranium under north Indian plains. *JMAPS* 21:1015–1019
- Tajuddin YM, Ram D, Singh K (1997) Effect of growth hormones on the yield and quality of geranium (*Pelargonium graveolens*). *Int J Trop Agric* 15:137–142
- Takemoto S, Katagi H, Takahashi E et al (1989) The production of *Pelargonium graveolens* oil by shoot and plant tissue culture. *J Essent Oil Res* 1:101–105
- Talha M, Reda F, El-Toni EM (1980a) The combined effect of irrigation frequencies and cycocel treatments on *Pelargonium graveolens* L. I. Vegetative growth and yield of oil. *Egypt J Soil Sci* 20:111–120
- Talha M, Aziz MA, El-Toni EM (1980b) The combined effect of irrigation frequencies and cycocel treatments on *Pelargonium graveolens* L. II. Evapotranspiration and water economy. *Egypt J Soil Sci* 20:121–136
- Tamai T, Tokumasu S, Shinohara K (1958) Studies on the breeding of *Pelargonium* species used for the essential oil production (I): artificially induced tetraploid plant in *Pelargonium roseum*. *Jpn J Breed* 7:131–140
- Tembe RP, Deodhar MA (2010) Chemical and molecular fingerprint of different cultivars of *Pelargonium graveolens* (L'Hérit.) viz., Reunion, Bourbon and Egyptian. *Biotechnology* 9:485–491
- Tepfer DA, Damon J, Pellegrineschi A (1997) Ornamental character of scented geraniums by genetic transformation. *US Patent* 5,648,598, 15 Jul 1997
- Thimmappa DK, Bhattacharjee SK (1990) Standardisation of propagation of scented geranium from stem cuttings. *Indian Perfum* 34:56–60
- Tholl D, Chen F, Petri J et al (2005) Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J* 42:757–771
- Trémel L (1992) La lutte contre les mauvaises herbes. In: Hauts CA (ed) *Le géranium rosat à la réunion*. Graphica, Saint-Denis, pp 63–67
- Turner GW, Croteau R (2004) Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiol* 136:4215–4227
- Turner GW, Gershenzon J, Croteau R (2000) Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol* 124:655–663
- Van der Walt JJA (1990) Taxonomic revision of *Pelargonium*: contribution of the Stellenbosch research team. In: Vorster P (ed) *Proceedings of the international Geraniaceae symposium*, University of Stellenbosch
- Van der Walt JJA, Demarne F (1988) *Pelargonium graveolens* and *P. radens*: a comparison of their morphology and essential oils. *S Afr J Bot* 54:617–622
- Van der Walt JJA, Ward-Hilhorst E (eds) (1977) *Pelargoniums of South Africa*, vol 1. Purnell & Sons, Cape Town
- Van der Walt JJA, Vorster P, Ward-Hilhorst E (eds) (1981) *Pelargoniums of South Africa*, vol 2. Juta & Co Pub, Cape Town
- Van der Walt JJA, Vorster P, Ward-Hilhorst E (eds) (1988) *Pelargoniums of South Africa*, vol 3. National Botanic Gardens Kirstenbosch, Cape Town
- Verma RK, Rahman L, Kukreja AK et al (2008) Performance of rose scented geranium (*Pelargonium* species) cultivated on farmers field in the western Himalayan region of Uttarakhand, India. *Indian Perfum* 52:33–36
- Verma RS, Rahman L, Verma RK et al (2010) Essential oil composition of four cultivars of rose-scented geranium flowers. *Indian Perfum* 54:29–32
- Verma RK, Verma RS, Chauhan A et al (2011) Biomass yield, essential oil yield and oil quality of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* L.), intercropped with vegetables. *J Agric Res* 6:830–839
- Verma RS, Rahman L, Verma RK et al (2013a) Essential oil composition of *Pelargonium graveolens* L'Her. Ex Ait. Cultivars harvested in different seasons. *J Essent Oil Res* 25:372–379
- Verma RS, Rahman L, Verma RK et al (2013b) Post-harvest Storage method for rose-scented Geranium (*Pelargonium graveolens* L'Hérit. Ex Ait.). *J Essent Oil Bear Plants* 16:693–698
- Vernin G, Metzger J (1983) Etude des huiles essentielles par GC-SM-banque Specma: essence de geranium. *Parfum Cosmet Arômes* 52:51–60
- Viljoen AM, Van der Walt JJA, Swart JPJ et al (1995a) A study of the variation in the essential oil of *Pelargonium capitatum* (L.) L'Hérit. (Geraniaceae). Part II. The chemotypes of *capitatum*. *J Essent Oil Res* 7:605–611
- Viljoen AM, Van der Walt JJA, Demarne F et al (1995b) A study of the variation in the essential oil and morphology of

- Pelargonium capitatum* (L.) L'Hérit. (Geraniaceae). Part III: geographical variation in essential oil composition and floral structure. *S Afr J Bot* 61:105–113
- Voirin B, Bayet C (1996) Developmental changes in the monoterpene composition of *Mentha × piperita* leaves from individual peltate trichomes. *Phytochem* 43:573–580
- Vranova E, Coman D, Gruissem W (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant* 5:318–333
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW (2004) New approaches for studying and exploiting and old protuberance, the plant trichome. *Ann Bot* 93:3–11
- Wang J, Dudareva N, Bhakta S et al (1997) Floral scent production in *Clarkia breweri* (Onagraceae). *Plant Physiol* 114:213–221
- Weiss EA (1967) Effect of nitrogen, phosphate and time cutting on green material and oil yields from geranium (*Pelargonium* hybrid) in west Kenya. *Exp Agric* 3:99–103
- Weng M, Ruhlman TA, Gibby M et al (2012) Phylogeny, rate variation, and genome size evolution of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Mol Phylogenet Evol* 64:654–670
- Widmer WW, Collins RP (1991) Analysis of essential oils from selected cultivars of *Pelargonium quercifolium* by GC/MS. *J Essent Oil Res* 3:331–340
- Williams CA, Harborne JB (2002) Phytochemistry of the genus *Pelargonium*. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles, vol 27, pp 99–115
- Williams CA, Newman M, Gibby M (2000) The application of the leaf phenolic evidence for systematic studies within the genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *Biochem Syst Ecol* 28:119–132
- Wüst M, Mosandl A (1999) Important chiral monoterpene ethers in flavours and essential oils—enantioselective analysis and biogenesis. *Eur Food Res Technol* 209:3–11
- Wüst M, Beck T, Mosandl A (1998) Stable isotope labelling and enantioselective analysis in biosynthetic studies of rose oxide in *Pelargonium* species. Natural product analysis: chromatography, spectroscopy, biological testing, Germany, pp 281–288
- Yang T, Li J, Wang H et al (2005) A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry* 66:285–293
- Yoshida T (1969) On characteristics and some problems in cultivation of *Pelargonium* species. *J Agric Res* 4:23–29
- Yoshida T, Tamai T (1958) Physiological and ecological studies on the secretory function of the essential oil in *Pelargonium* species. I. The relation between the distribution of the oil glands and the percentage yield of the essential oil. *Jpn J Breed* 7:235–240
- Yoshida T, Ikawa S, Morisada S (1968) Seasonal variation in both the percentage yield of essential oil and the chemical composition in *Pelargonium* species. *Nippon Sakumotsu Gakkai Kiji* 37:565–569
- Yu S, Horn WAH (1988) Additional chromosome numbers in *Pelargonium* (Geraniaceae). *Plant Syst Evol* 159:165–171
- Yu F, Harada H, Yamasaki K et al (2008) Isolation and functional characterization of a  $\beta$ -eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *FEBS Lett* 582:565–572
- Yuan T, Chen Q, Zhao P et al (2011) Identification of enzymes responsible for the reduction of geraniol to citronellol. *Nat Prod Bioprospect* 1:108–111
- Zhou J, Ma G, Bunn E, Zhang X (2007) *In vitro* shoot organogenesis from *Pelargonium × Citrosium Vanleeni* leaf and petiole explants. *Floriculture Ornament Biotechnol* 1:147–149

## II. LE PROJET *PELARGONIUM* EN ÉGYPTE

De par sa puissance, sa fraîcheur ainsi que ses notes rosées caractéristiques, l'HE de *Pelargonium* est très appréciée des parfumeurs et est très utilisée en parfumerie aussi bien fonctionnelle qu'alcoolique. IFF étant un acteur mondial majeur de la parfumerie et donc un gros consommateur de ce produit, il était stratégique que l'entreprise IFF-LMR<sup>2</sup>, spécialisée dans l'extraction et la valorisation des extraits naturels pour la parfumerie et les arômes s'y intéresse. Plusieurs objectifs sont poursuivis dans cet important projet sur le *Pelargonium*. L'objectif premier est, à terme, d'assurer à IFF un approvisionnement en HE soutenable, de très bonne qualité, à un prix compétitif et stable d'année en année. La quantité minimale d'HE à produire équivaut à la consommation annuelle d'IFF, c'est-à-dire environ 10 T d'HE. Un autre objectif très important est l'acquisition de connaissances en biotechnologies végétales ainsi que l'internalisation de compétences qui permettront par la suite le développement de nos filières via une amélioration du végétal. Nous pensons que c'est une direction majeure que doit maintenant prendre la recherche d'IFF-LMR et le *Pelargonium* semblait être un modèle idéal pour soutenir ce nouvel axe.

Afin de réaliser ces objectifs ambitieux, IFF-LMR a donc été amené à initier plusieurs partenariats. Le premier a été réalisé avec l'université de Saint-Etienne et a été initié dans le cadre de cette thèse afin de mieux comprendre les voies de biosynthèse des composés de l'essence de *Pelargonium*, ainsi que le végétal lui-même dans son ensemble. En effet, le laboratoire LBVpam<sup>3</sup> nous apparaissait comme le partenaire idéal pour mener à bien ce projet. Le deuxième partenariat concerne une entreprise égyptienne spécialisée dans la production d'extraits naturels à destination de la parfumerie : la compagnie Hashem Brothers.

Dans ce chapitre, j'ai voulu retracer dans les grandes lignes l'histoire du *Pelargonium* cv. 'rosat', les principaux produits et leurs utilisations en parfumerie ainsi que l'évolution du marché. Je consacrerai aussi une partie à la production conventionnelle de l'HE en Égypte. Je présenterai enfin brièvement notre partenariat avec l'entreprise Hashem Brothers, pour introduire le chapitre de la thèse consacré aux avancées réalisées jusqu'ici dans les pratiques agronomiques.

---

<sup>2</sup> IFF-LMR pour International Flavors and Fragrances - Laboratoire Monique Rémy. La société LMR, fondée en 1983 à Grasse et spécialisée dans la production d'extraits naturels à destination de la parfumerie, a été rachetée en 2000 par IFF.

<sup>3</sup> LBVpam pour Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales

## II.1 Le *Pelargonium* dans la parfumerie

L'HE de *Pelargonium* cv. 'rosat' est improprement appelée HE de 'géranium rosat' par les parfumeurs. Travaillant depuis maintenant sept ans pour une grande industrie de la parfumerie, à Grasse dans la capitale des matières premières, ayant été initié à l'olfaction lors de mes études en parfumerie, je suis très sensible à la finalité de cette HE et à la place importante que celle-ci occupe sur l'orgue des parfumeurs. De plus, j'ai la chance de côtoyer quotidiennement des parfumeurs de renom, habitués à utiliser cette HE et qui en connaissent les moindres subtilités et facettes olfactives. Je n'ai donc pas pu résister à leur poser quelques questions sur l'HE du *Pelargonium* cv. 'rosat'. Quelle est sa spécificité ? Comment est-elle utilisée ? Dans quelle proportion ? Dans quel parfum ?...

### II.1.1 L'histoire de la culture du *Pelargonium*

Le 'géranium rosat', que nous nommerons désormais dans le reste de la thèse par son nom scientifique *Pelargonium* cv. 'rosat' est depuis la moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle une importante matière première pour l'industrie de la parfumerie. La culture du *Pelargonium* cv. 'rosat' a été initiée dans le Pays de Grasse, puis s'est fortement développée dans des zones plus favorables, dans les dernières décennies du XX<sup>ème</sup> siècle, pour des raisons climatiques et économiques. Le *Pelargonium* cv. 'rosat' aurait été importé du Cap de Bonne Espérance vers 1690, et distillé initialement en 1819 à Lyon. Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, la rose de Damas (*Rosa x damascena* Mill.) devenant rare et le prix de son HE très élevé, les parfumeurs furent contraints de rechercher de nouvelles sources d'essences à odeur de rose. Il s'en-suivit des essais de culture de *Pelargonium* cv. 'rosat' par Demerson et les premières plantations dans la région de Grasse pour la production d'HE. La culture s'accommodant mal des contraintes climatiques et économiques du sud de la France, très rapidement, sous l'impulsion de sociétés grassoises comme Chiris, de nouvelles plantations furent développées en Afrique du Nord, et à la Réunion, l'île Bourbon. En 1880, A. Chiris met en place à Boufarik (Algérie) de très grandes plantations et une usine, sous la direction de Gros et Monk. A la Réunion, dès 1880, les cultures se développent et en 1882 les premières distillations sont initiées par Arnoux. L'origine des plants de *Pelargonium* cv. 'rosat' pour la parfumerie n'est pas certaine. En effet, les boutures ayant servi à réaliser les premières plantations sont soit issues de pieds mères introduits d'Afrique du Sud, soit proviennent de sélections réalisées en France ou en Angleterre par quelques jardiniers perspicaces, deux hypothèses que l'on trouve dans la littérature ancienne. Cependant, la plupart des sources s'accordent pour dire que les plantations établies dans le monde à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle proviennent de boutures réalisées dans le Sud de la France.

## II.1.2 Les produits issus du *Pelargonium*

L'HE est l'extrait du *Pelargonium* cv. 'rosat' le plus utilisé en parfumerie. L'HE s'est fortement développée à partir du XIX<sup>ème</sup> siècle, pour remplacer l'HE de rose ayant atteint un prix prohibitif, notamment pour son utilisation dans des produits de moins grande valeur. En effet, l'HE de *Pelargonium* étant peu sensible à l'agressivité alcaline des constituants des savons et des détergents, celle-ci était souvent employée pour les parfumer. A présent, l'HE est aussi bien utilisée en parfumerie dite 'fonctionnelle' (détergents, savons, lessives...) qu'en parfumerie 'fine' (parfums alcooliques). On distingue les différentes HE de *Pelargonium* cv. 'rosat' en fonction de leurs origines géographiques. Ainsi, les trois HE commerciales les plus répandues sur le marché par ordre décroissant sont les HE d'origine Égypte, Chine et enfin Bourbon. Chaque HE a un profil olfactif et analytique bien spécifique (**annexe 1**). En général, c'est l'HE de type Bourbon la plus appréciée car elle a une odeur plus fine de rose, florale et moins mentholée et peut être utilisée pour les parfums féminins et masculins. L'HE d'origine Égypte a une odeur plus verte, épicée mais aussi plus fruitée. Elle pourra être utilisée pour souligner une note fruitée de tête « type lychee » ou donner du caractère à une note rosée. L'HE de Chine aura une facette « menthe » plus marquée mais aussi une odeur de citronellol très prononcée et très florale. L'HE de Chine étant plus aromatique sera donc préférentiellement utilisée pour les parfums masculins. Ces HE seront utilisées à hauteur maximum de 1% dans les parfums masculins très aromatiques et plutôt à une concentration de 0,1% dans les parfums féminins.

Le rhodinol est constitué principalement de trois monoterpènes acycliques : le géraniol, le citronellol et le nérol. Ceux-ci sont obtenus à partir de l'HE par distillation fractionnée sous haut vide. L'extrait final a une odeur de rose beaucoup plus prononcée que l'HE puisque les terpènes responsables des notes mentholées et autres ont été éliminés. Le rhodinol est principalement utilisé en parfumerie fine.

L'isolat « Citronellol » provient aussi d'un fractionnement de l'HE. Ce fractionnement est cependant encore plus fin. L'isolat a une odeur très forte de citronellol et est principalement utilisé comme composant naturel pour recréer des arômes naturels de type framboise, rose ou citron.

Le dernier extrait est l'absolu de *P.* cv. 'rosat Egypte' produit exclusivement en Égypte et ne représentant qu'une très petite production. La méthode d'extraction utilisée n'étant pas la distillation mais une extraction au solvant, les facettes olfactives sont différentes de celles de l'HE. L'absolu sera donc moins frais, tonique mais plus fruité, avec une facette « lychee ». Il aura aussi l'avantage d'apporter une substantivité plus importante au parfum. Les rendements en l'HE et en l'absolu sont néanmoins très similaires.

### II.1.3 L'utilisation des produits issus du *Pelargonium*

La réussite de l'HE de *Pelargonium* vient en partie du succès de l'accord « fougère » très en vogue pour les parfums masculins à la fin du XIXème siècle et qui fait partie des sept grandes familles olfactives en parfumerie. La dénomination de cette famille ne se rapporte pas à l'odeur des fougères elles-mêmes mais fait référence à un parfum « Fougère Royale » créé par Houbigant en 1882 et qui est devenu le chef de file d'une grande famille de parfums masculins. Ce parfum a innové grâce à cet accord : lavande, géranium, fève Tonka. Aujourd'hui, l'accord « fougère » a quelque peu évolué et comprend des notes lavandées, boisées, mousse de chêne, coumarine, bergamote et géranium. Cet accord peut être nuancé, et intégré dans un parfum de différentes manières à condition que le schéma de base soit respecté. Une description olfactive de la note « géranium » et son utilisation dans les parfums « fougères » sont présentées en **annexe 2**.

Quelques parfums connus renferment de l'HE de *Pelargonium* cv. 'rosat' : Miss Dior de Dior (1947), Calèche d'Hermès (1961), Brut de Fabergé (1964), Habit rouge de Guerlain (1965), Kouros d'YSL (1977) et Déclaration de Cartier (1998). L'emploi du *Pelargonium* cv. 'rosat' est très répandu en parfumerie et trois parfums récents qui lui font la part belle sont décrits plus spécifiquement en annexe : Géranium pour Monsieur de Frédéric Malle (2009) (**annexe 3**), Géranium Odorata de Dypitique (2014) (**annexe 4**) et Equipage Geranium de Hermès (2015) (**annexe 5**).

## II.2 L'état actuel de la culture du *Pelargonium* égyptien

### II.2.1 La production conventionnelle à Beni-Souef

Le *Pelargonium* (appelé simplement *Pelargonium* dans ce paragraphe sur la culture en Egypte) est cultivé principalement de façon traditionnelle au Sud du delta du Nil dans la région de Beni-Souef. Le modèle de production est un modèle de type 'paysannat' avec beaucoup de petits producteurs cultivant de multiples productions vivrières (maïs, blé, riz, tomate, pastèque, oignon, ail...) et seulement pour une petite partie de leurs revenus, des plantes aromatiques destinées à la distillation (*Pelargonium*, basilic, camomille...). La région du delta du Nil, plus fertile et plus humide, accueille des cultures plus fragiles (arbres fruitiers, fraises, jasmin, violettes...) mais très peu de *Pelargonium* car le terrain y est très cher.

Les plantations de *Pelargonium* couvrent souvent de petites surfaces (souvent < 0,5 Ha) pouvant accueillir plusieurs productions différentes à la suite selon la saison par un système de rotation car la terre en Égypte est chère et restreinte. Ainsi les boutures de *Pelargonium* sont souvent plantées en même temps que des oignons car la reprise de la bouture est assez lente et lorsque la croissance du *Pelargonium* augmente, les oignons ont suffisamment grandi pour être récoltés (annexe 6). La coupe se fera en juillet et le champ pourra laisser la place à d'autres cultures comme par exemple le maïs ou le basilic.

Les boutures de *Pelargonium* sont plantées directement dans le sol sans passer par une étape de pépinière avec des espaces interlignes de 30 cm et intralignes de 10 cm car la mortalité est d'environ 60%. L'irrigation se fait par inondation totale du terrain une fois par semaine de novembre à avril et enfin jusqu'à deux fois par semaine sous les fortes chaleurs jusqu'à la récolte, de mai à juillet. Le mode d'irrigation par inondation oblige les paysans à planter le *Pelargonium* sur des buttes afin que l'eau puisse s'écouler facilement dans les sillons sans noyer les *Pelargonium* sensibles à l'humidité. Ce type d'irrigation est extrêmement consommateur d'eau mais peu coûteux à installer.

Durant la croissance du *Pelargonium*, un important travail de désherbage est nécessaire, surtout au début lorsque la couverture du terrain par la plante est faible. La récolte se fait à la main à l'aide d'une serpette et le *Pelargonium* est ensuite laissé en tas pour un préfanage de 1 à 2 jours (annexe 6). Le préfanage permet de réduire de façon importante la quantité d'eau contenue dans les végétaux et donc de faciliter le transport et d'augmenter la charge par alambic de distillation. L'agriculteur transporte ensuite sa récolte dans une distillerie privée, comme on en rencontre un grand nombre dans la région de Beni-Souef. Le distillateur, après avoir effectué la distillation, prélèvera une quantité fixe d'HE pour 60 min de distillation. Ce prélèvement en nature et dont la quantité est fixe encourage les agriculteurs à

laisser préfaner le *Pelargonium* plus longuement, quitte à perdre un peu d'huile lors de ce séchage. A la fin de la distillation, le paysan pourra vendre directement la totalité de son huile au distillateur ou essayer d'en tirer un meilleur prix par lui-même. Les distillateurs revendent leurs productions à des intermédiaires jusqu'aux exportateurs qui sont en relation directe avec les entreprises de parfumerie et cosmétique.

### II.2.2 Le marché de l'HE du *Pelargonium* égyptien

Deux graphiques présentent l'évolution du marché de l'HE de *Pelargonium* produite en Égypte (**annexe 7**). Le premier couvre une période qui va de janvier 1985 à janvier 2010. Le deuxième présente la période la plus récente de janvier 2010 à janvier 2014.

On observe sur le premier graphique une très forte volatilité d'une année sur l'autre. En effet, La culture du *Pelargonium* étant annuelle, la production peut s'adapter rapidement d'une année sur l'autre. En conséquence, les prix fluctuent beaucoup en fonction de l'offre et de la demande. Cette instabilité d'une année à l'autre tend à diminuer avec la mondialisation car les paysans sont rapidement au courant par exemple du marché de l'HE en Chine. De plus, la filière se structure de plus en plus autour de gros importateurs qui essaient de stabiliser le marché en constituant des stocks stratégiques pour éviter cet effet de balancier.

Le deuxième graphique met en évidence la spéculation sur l'HE. La production mondiale est d'environ 300 T et la quantité disponible sur le marché d'environ 200 T au maximum. Le prix de l'HE étant relativement bas, quelques collecteurs et gros exportateurs peuvent constituer des stocks importants pendant plusieurs mois pour faire monter les cours. Ces crises, fréquentes dans plusieurs productions d'HE (patchouli, vétiver...), obligent les grands groupes de la parfumerie à se constituer des stocks stratégiques pour absorber ces crises. En réponse à ces crises répétées, ils essaient aussi de reconstituer, le plus fidèlement possible, les extraits naturels afin de pouvoir mieux contrôler la stabilité des prix. Ils s'investissent aussi plus en amont dans les filières afin de contrôler la qualité et les prix. Par exemple, suite à une crise importante en 2010-2011, IFF-LMR a initié un vaste programme de recherche sur le *Pelargonium* et un partenariat avec un acteur majeur du marché des extraits pour la parfumerie en Égypte.

### II.3 Le partenariat IFF-LMR et Hashem Brothers

L'objectif ambitieux de ce partenariat est une réduction de 50% des coûts de production de l'HE de *Pelargonium* égyptien dans une durée de 5 ans. La production de cette HE devra fournir au minimum l'intégralité des besoins d'IFF (10 tonnes) et devra aussi être certifiée comme étant produite de façon soutenable. Pour cela, il a été convenu que la société Hashem Brothers fournirait les surfaces cultivables et l'appareillage de distillation ainsi que le personnel nécessaire à la production de végétal et d'HE. La société IFF-LMR fournirait quant à elle son expertise en technique de distillation, son expertise agronomique, s'engagerait à travailler sur le végétal et achèterait l'intégralité de la production d'HE. Les bénéfices réalisés par le travail de R&D sur la baisse du coût de production de l'HE seraient alors répartis entre les deux parties.

Une analyse des coûts réels a donc été réalisée sur une petite plantation pilote en 2012 et ceux-ci sont présentés dans la **figure 1**. Les progrès accomplis en termes de rendement et de coûts seront présentés dans le chapitre V – Résultats III.

Pour ce projet, nous avons aussi construit une nouvelle unité de distillation située à Regwa dans le désert égyptien. Regwa se trouve sur le parcours de l'ancien lit du deuxième bras du Nil, ce qui nous permet d'avoir accès à de l'eau non salée à une profondeur raisonnable (80 mètres). La situation géographique ainsi que la construction de la distillerie et le début des plantations sont présentés sur la **figure 2**.

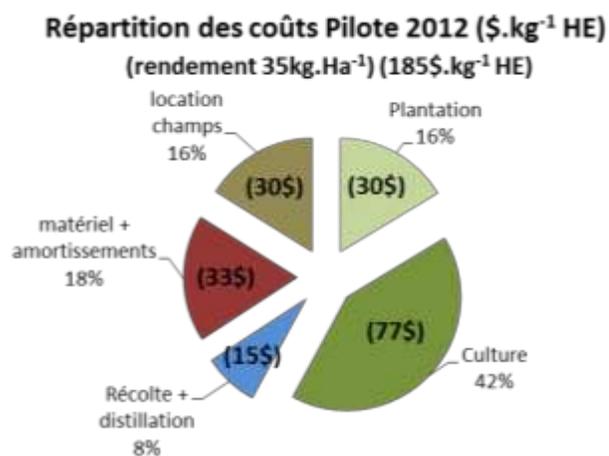
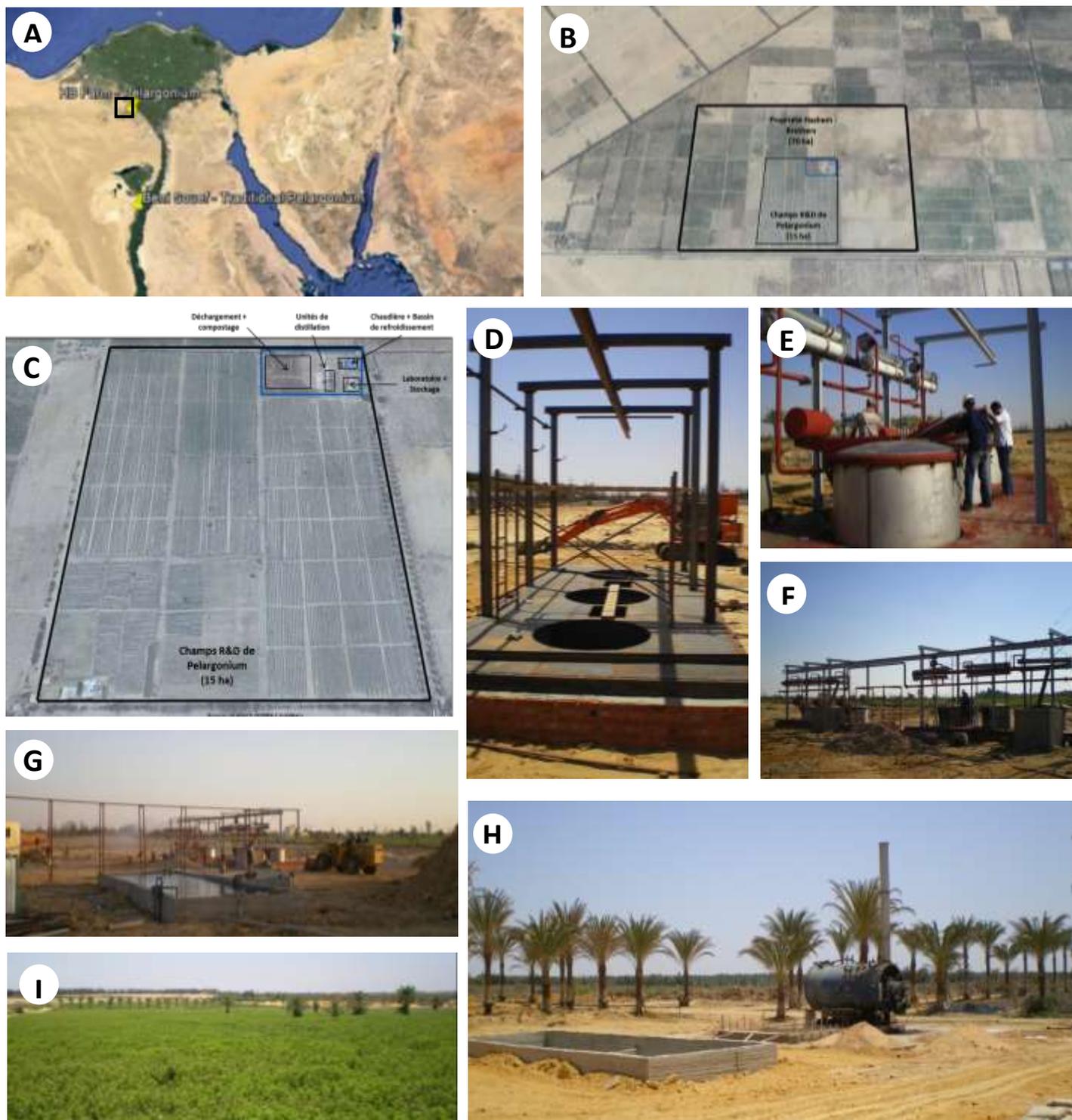


Figure 1 | Analyse des coûts de production réels pour une plantation de *Pelargonium* en Égypte



**Figure 2 | Photographies du projet *Pelargonium* égyptien sous le partenariat IFF-LMR et Hashem Brothers.** A – Localisation de la culture du *Pelargonium* traditionnelle (Beni-Souef) et du Projet *Pelargonium* Égypte avec la compagnie Hashem Brothers situé dans le désert à 60 km à l’ouest du Caire. B – La surface potentielle du site est de 75 Ha. C – Le champ de *Pelargonium* expérimental est de 15 Ha avec la nouvelle distillerie située dans la propriété. D – Construction de la distillerie. E – Installation des alambics de distillation (3000 et 5000 L). F – Vue d’ensemble des unités de distillation. G – Construction du bassin de refroidissement d’eau. H – Installation de la chaudière pour la génération de vapeur d’eau. I – Plantations de *Pelargonium*.

### III. LES COV

Les COV ont tous en commun d'avoir une pression de vapeur élevée et une faible masse moléculaire, ces propriétés les rendent donc très volatils et ils passent spontanément à l'état gazeux sous pression atmosphérique et à température ambiante. Les COV sont le plus souvent lipophiles et seraient capables de traverser les membranes cellulaires pour être émis facilement dans l'atmosphère par les plantes (*Niinemets et Reichstein 2003*). Actuellement, les spécialistes estiment qu'ils représentent environ 1% des métabolites dit secondaires, c.a.d. ne participant pas aux fonctions essentielles des végétaux comme la respiration et la photosynthèse, et dont la variété et la quantité sont fortement influencées par les facteurs biotiques et abiotiques (*Pichersky et Gershenzon 2002; Dudareva et al. 2006*). Si certaines fonctions ont pu être attribuées avec certitude aux COV (décrites ci-dessous), des études postulent que certains composés dépourvus de fonction propre sont des sous-produits de voies métaboliques importantes ou des composés ayant perdu leur fonction au cours de l'évolution (*Levin et al. 2003; Owen and Penuelas 2005, 2006; Pichersky et al. 2006*). Les COV provenant des plantes se classent en 3 grandes familles : Les terpènes et dérivés (terpenoïdes ou isoprénoïdes), les dérivés d'acides gras (oxylipides) et enfin les phénylpropanoïdes et benzénoïdes. Les émissions des COV des plantes varient énormément en fonction de l'espèce, des organes, du stade de développement et des conditions environnementales. En particulier, les facteurs environnementaux, à la fois biotiques et abiotiques, ont un impact important sur le relargage des COV par les parties végétatives des plantes (*Holopainen et Gershenzon 2010*).

### III.1 Le rôle des COV

Les COV produits par les plantes sont impliqués dans leur croissance, leur reproduction et leur défense vis-à-vis des agresseurs (*Peñuelas J et Staudt M 2009*). Les plantes étant des organismes sédentaires, elles doivent constamment s'adapter à leur environnement. Ainsi, elles ont besoin de se défendre contre les prédateurs et parasites, d'attirer les pollinisateurs et les disséminateurs de graines. Elles doivent communiquer entre elles pour réagir à un événement, recycler/réguler une énergie photochimique reçue trop importante ou encore se protéger contre un stress extérieur (*Dudareva et al. 2006*) (**figure 3**). Pour ce faire, elles émettent dans l'atmosphère à partir de leurs feuilles, fleurs et fruits ou dans la lithosphère à partir de leurs racines et rhizomes, des mélanges de molécules organiques volatiles issues de leur métabolisme secondaire. Ces molécules jouent donc un rôle crucial dans la survie de la plante et de l'espèce (*Dudareva et Negre 2005*) mais aussi dans l'évolution de celle-ci (*de Vega et al. 2014 ; Dicke et Baldwin 2010*). On dénombre ainsi plus de 1000 COV synthétisés par les plantes qui attirent les pollinisateurs ou les prédateurs et repoussent les herbivores (*Fürstenberg-Hägg et al. 2013*). Cependant, au sein de la communauté scientifique, il existe toujours un débat quant au rôle exact notamment des isoprénoïdes dit 'non-essentiels' (**annexe 8**) puisque certaines plantes n'en produisent pas et sont pourtant tout à fait capables de résister à des stress et de se reproduire (*Owen, Penuelas 2005 ; Pichersky et al. 2006 ; Owen et Penuelas 2006, Firn et Jones 2006, Owen et Penuelas 2006b*). Néanmoins, certains rôles ont tout de même été démontrés de façon expérimentale chez certaines espèces (*Pichersky et al. 2006b ; Gershenzon et Dudareva 2007*). Le sujet du rôle des COV fait l'objet de nombreuses recherches multidisciplinaires comme en témoignent un nombre croissant de publications (**annexe 9**).

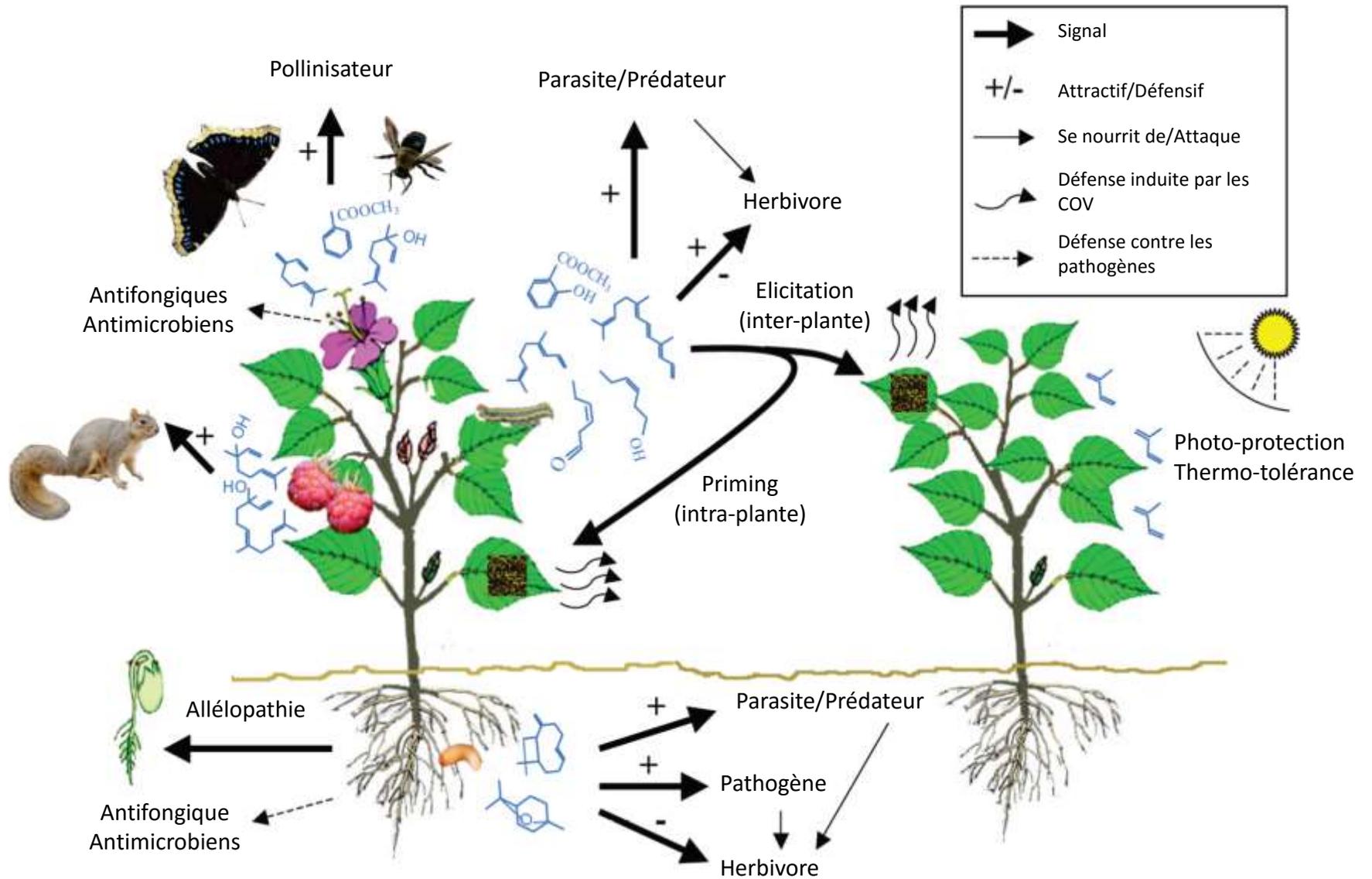


Figure 3 | Schéma des interactions des plantes avec leur environnement au moyen des COV (adapté d'après Dudareva *et al.* 2006)

### III.1.1 L'attraction des pollinisateurs

En émettant des COV, les plantes fournissent aux pollinisateurs des fleurs une signature moléculaire leur permettant non seulement d'être localisées précisément par ceux-ci mais aussi de leur donner des informations d'intérêts alimentaires (nourriture, nectar) ou reproductifs (phéromones identiques au partenaire sexuel). La plante va ainsi diffuser dans son milieu certaines molécules, qui, en rentrant en contact avec les organes récepteurs de l'animal cible, vont exciter spécifiquement les récepteurs olfactifs. Ce message olfactif ou chimique va alors induire une action d'attraction de l'animal cible vers la plante soit pour y trouver de la nourriture, un « logement » ou encore un partenaire sexuel rendant bien souvent la « collaboration » cruciale à la fois pour la plante mais aussi pour le pollinisateur qui s'y nourrit, s'y reproduit ou pense s'y reproduire.

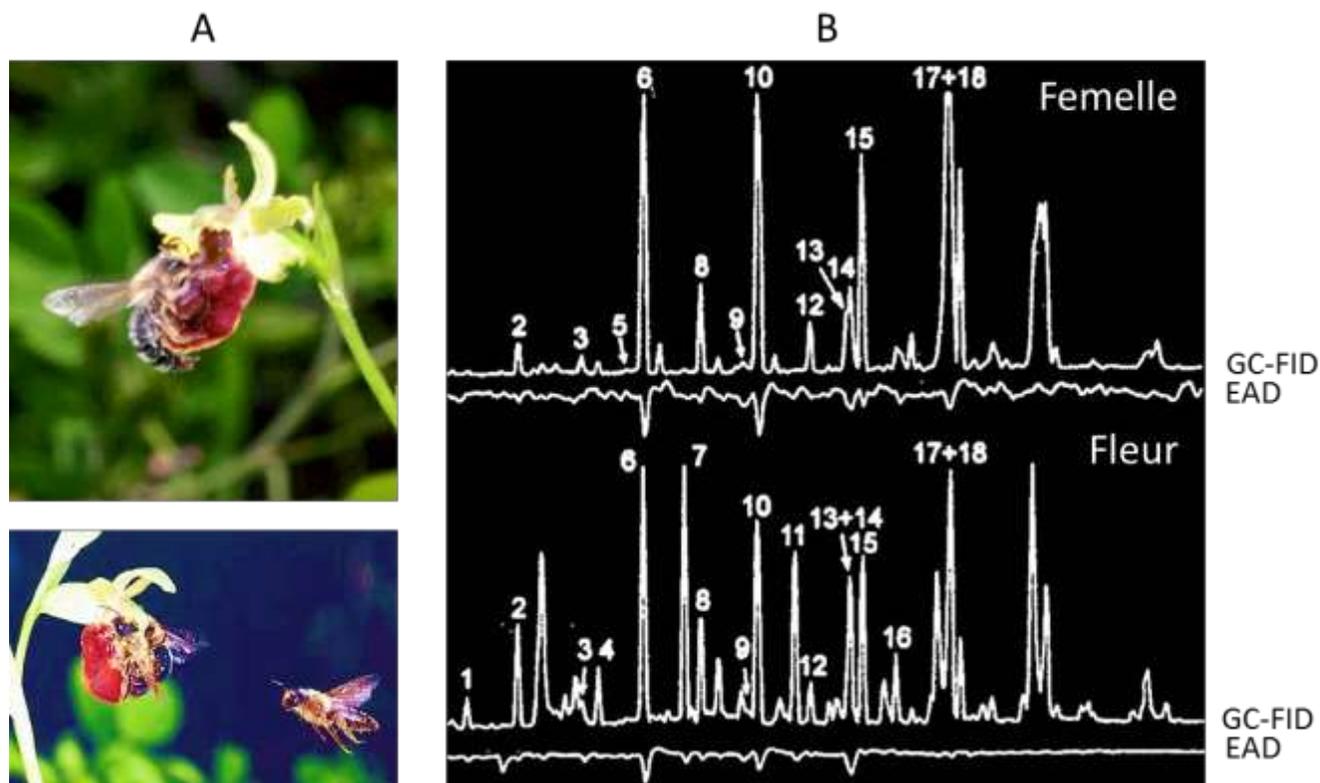
Ainsi par exemple le benzylacétate ou d'autres esters benzyliques sont émis principalement par les fleurs pollinisées par des papillons, qui sont attirés préférentiellement par ces composés (*Raguso et al. 1996*).

La plupart des orchidées emploient différentes stratégies d'attraction dites décevantes pour des pollinisateurs. Dans la plupart de ces stratégies, la plante mime l'odeur et l'aspect d'une nourriture (*Ackermann 1986*) mais peut aussi mimer un site de reproduction ou d'abri pour les insectes. Néanmoins, l'exemple le plus spectaculaire est une stratégie de déception sexuelle (*Ayasse 2006*). L'orchidée *Ophrys sphegodes* pollinisée par l'abeille *Andrena nigroaenea* (*Schiestl et al. 2003*) illustre parfaitement le cas d'une pollinisation active, c'est-à-dire que la fleur et l'insecte ont acquis des caractères comportementaux et/ou morphologiques assurant la pollinisation (*Thompson 1989*). Il est acquis depuis longtemps que l'orchidée mime la couleur et la forme de l'abeille (*Borg-Karlson 1990*) mais plus récemment il a aussi été montré l'importance du mimétisme de l'odeur du partenaire sexuel (*Schiestl et al. 1999, Ayasse 2006*). L'orchidée peut aussi changer le profil et/ou l'intensité de l'émission de ses COV en fonction de la pollinisation. En effet, avant la pollinisation, la fleur émet certains COV, principalement des composés aliphatiques et des terpènes, qui miment ceux que la femelle abeille émet quand elle est réceptive à l'accouplement (*Stöckl 2005*). L'illusion, renforcée par la forme et la couleur de la fleur, trompe le mâle qui vient se poser sur la fleur et enclenche un comportement pseudocopulatoire, pollinisant ainsi l'orchidée (**figure 4**). Une fois fécondée, l'orchidée change son profil de COV en émettant notamment du farnésyl hexanoate, caractéristique de l'émission d'une abeille femelle non réceptive. Le mâle évitera ainsi la fleur déjà fécondée et diminuera ainsi des dégâts potentiels aux fleurs. Notons que ce leurre chimique est souvent très spécifique. Ainsi une espèce d'*Ophrys* sera visitée par

seulement une ou quelques espèces de pollinisateurs, la rendant aussi très dépendante de ces derniers (Paulus et Gack, 1990).

Il a également été montré que les pollens de fleurs ont une odeur souvent bien plus prononcée lorsque la plante est pollinisée par les insectes que lorsque celle-ci est pollinisée par le vent ou les oiseaux (Dobson et Bergström 2000). La synthèse des COV pourrait aussi avoir un rôle protecteur du pollen vis-à-vis des micro-organismes (Pascoal et al. 2014).

D'autres plantes attirent leur pollinisateur par la promesse d'un lieu de reproduction. En effet, dans le genre *Ficus*, de nombreuses espèces sont pollinisées de façon active par une guêpe qui se reproduit dans le fruit du figuier. Dans ce cas, il s'agit d'un mutualisme interspécifique où chaque espèce a besoin de l'autre pour assurer sa survie (Grison-Pigé et al. 2002a, b).



**Figure 4 | Relation entre la fleur de l'orchidée *Ophrys sphegodes* et son pollinisateur, un mâle de l'espèce solitaire d'abeille *Andrena nigroaenea* (d'après Schiestl et al., 1999).** (A) La fleur mime l'apparence et les odeurs d'une femelle réceptive, induisant chez le mâle un comportement pseudocopulatoire. (B) Chromatogrammes obtenus après analyse des composés volatils par GC-FID émis par une femelle réceptive et la fleur et détection électro-antennographique (EAD). La majorité des composés sont émis par la femelle réceptive et par la fleur prête à être pollinisée.

### III.1.2 La défense contre les agresseurs

Beaucoup d'organismes, incluant des insectes herbivores et d'autres pathogènes, attaquent les plantes dans le but d'utiliser la matière organique qu'elles produisent. Les plantes ont ainsi dû développer des systèmes de défense adéquats incluant notamment une défense dite chimique telle que la synthèse de protéines de défense, de toxines, de COV répulsifs ou attractifs... (Mithöfer et Boland 2012) (tableau 1). Ces défenses peuvent être divisées en défenses constitutives ou inductibles et en défenses directes ou indirectes (Dicke et al. 2003).

Les défenses constitutives forment la première ligne et fournissent une réponse généraliste contre la plupart des nuisibles (Fürstenberg-Hägg et al. 2013) alors que les défenses inductibles sont plus spécifiques et interviennent après la reconnaissance du type d'agresseur (Pieterse et al. 2012) (figure 5). Les défenses constitutives sont opérationnelles à n'importe quel moment alors que les défenses induites sont activées lors de l'attaque du nuisible (Kant et al. 2015). L'utilisation des défenses induites pourrait servir à économiser de l'énergie ainsi qu'à prévenir une auto-intoxication de la plante, au prix d'un délai avant que ces défenses ne deviennent opérationnelles (Kant et al. 2015). Elles devraient donc être mobilisées quand : (1) Les défenses sont coûteuses; (2) Il y a une variabilité spatiale et temporelle dans la distribution des pathogènes et/ou des herbivores et les plantes ne sont pas continuellement attaquées ; (3) Il y a un effet de la défense qui augmente en même temps la sensibilité d'un autre nuisible (Frost et al. 2008).

Tableau 1 | Composés dits 'secondaires' des plantes (d'après Mithöfer et Boland 2012)

Composés	Exemple	Plante source typique	Nombre approximatif de composés connus
<b>Terpénoïdes</b>	(E)-β-Farnésène	Toutes	> 30000
<b>Stéroïdes</b>	Phytoecdysone	Ranunculaceae	~ 200
<b>Cardioïdes</b>	Digoxigénine	Plantaginaceae	~ 200
<b>Alcaloïdes</b>	Nicotine	Solanaceae	> 12000
<b>Acides gras et dérivés</b>	(3Z)-Hexénylacétate	Tous	n.d.
<b>Glucosinolates</b>	Sinigrine	Capparales	~ 150
<b>Glucoside cyanogénique</b>	Dhurrine	Rosaceae, Fabaceae	~ 60
<b>Composés phénoliques</b>	Lignine, tannin	Toutes	> 9000
<b>Polypeptides</b>	Inhibiteur Trypsique	Toutes	n.d.
<b>Aminoacides non protéiques</b>	Acide γ-Aminobutyrique	Fabaceae	> 200
<b>Silice</b>	SiO <sub>2</sub>	Poaceae	1
<b>Latex</b>	Emulsion indéfinie	Euphorbiaceae	c.v.

n.d. = non déterminé ; c.v.= composition variée

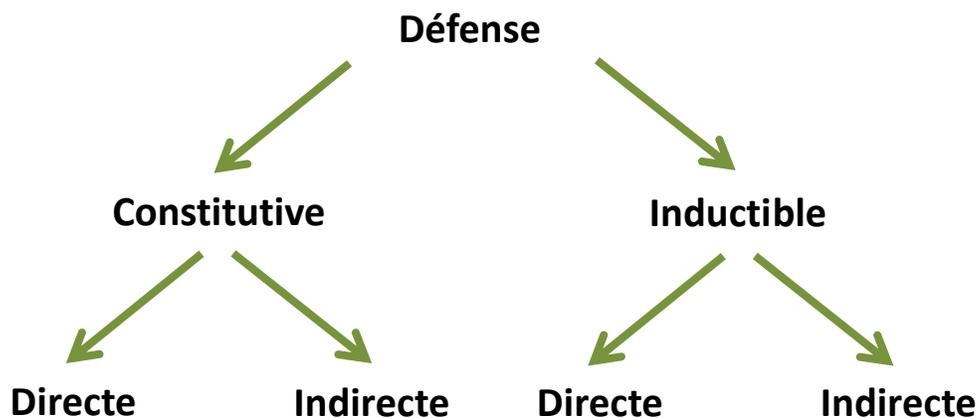


Figure 5 | Types de défenses chez la plante (d'après Fürstenberg-Hägg et al. 2013).

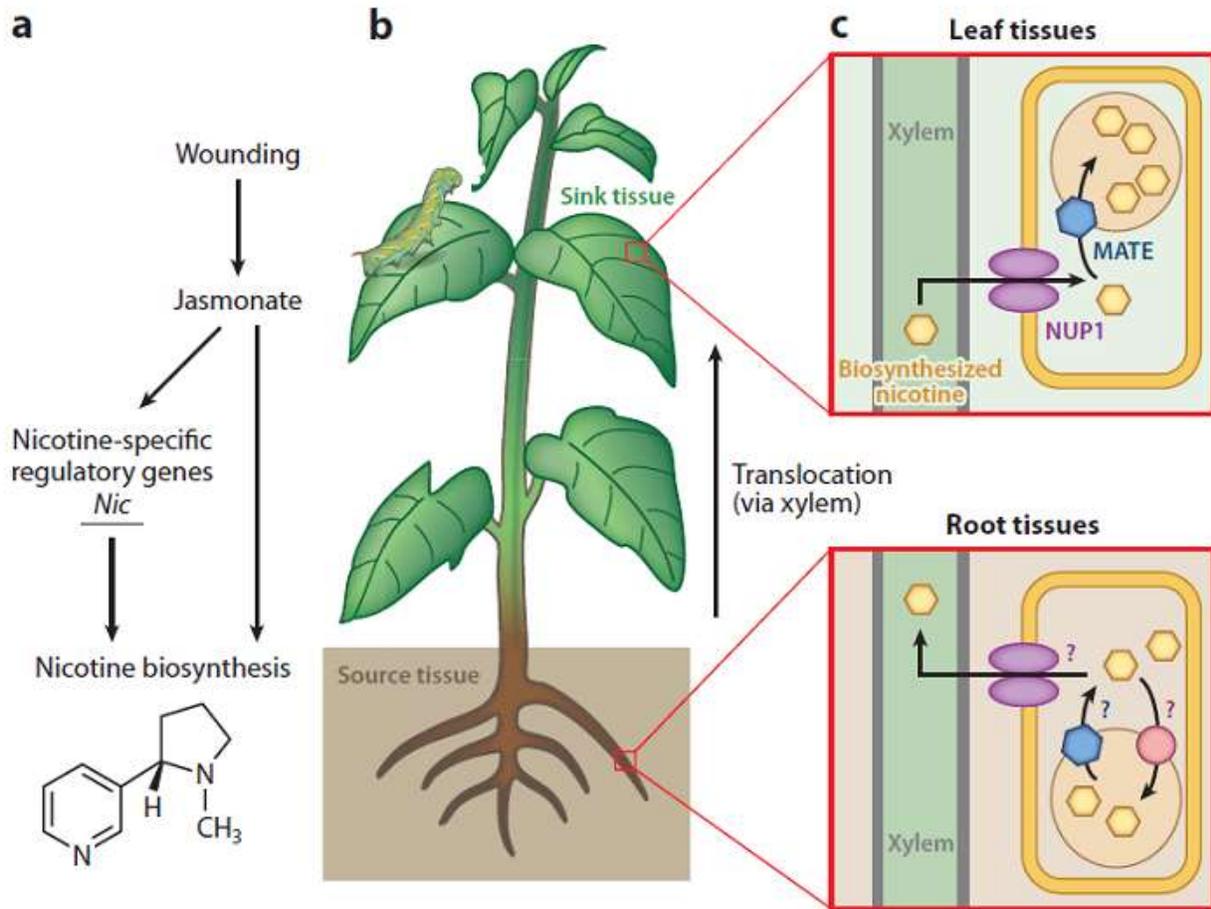
### III.1.2.1 La défense directe

Les COV émis par l'appareil végétatif (feuilles, racines) peuvent faire partie du système de défense constitutif de la plante et ceux-ci ont alors très souvent un caractère répulsif vis-à-vis des herbivores (ex : l'HE stockée dans les trichomes glandulaires des *Pelargonium*). Ceux-ci jouent donc le rôle de système de défense constitutif direct.

Ces émissions des organes directement endommagés ou non peuvent se prolonger plusieurs heures voire plusieurs jours (*Paré et Tumlinson 1998*). Lors d'une attaque d'un herbivore par exemple, la plante peut émettre directement des COV à partir de l'organe attaqué (*Unsicker et al. 2009*). Elle peut aussi communiquer le danger à d'autres organes afin que ceux-ci répondent plus rapidement et efficacement à une attaque future du même prédateur. Ce phénomène s'appelle le priming. Les émissions de COV par une plante ou un organe au moment d'une attaque par un herbivore peuvent constituer une défense directe et instantanée ou être différées dans le temps et préparer ainsi les attaques futures (*Dudareva et al. 2006, Unsicker et al. 2009, Troncoso et al. 2012*).

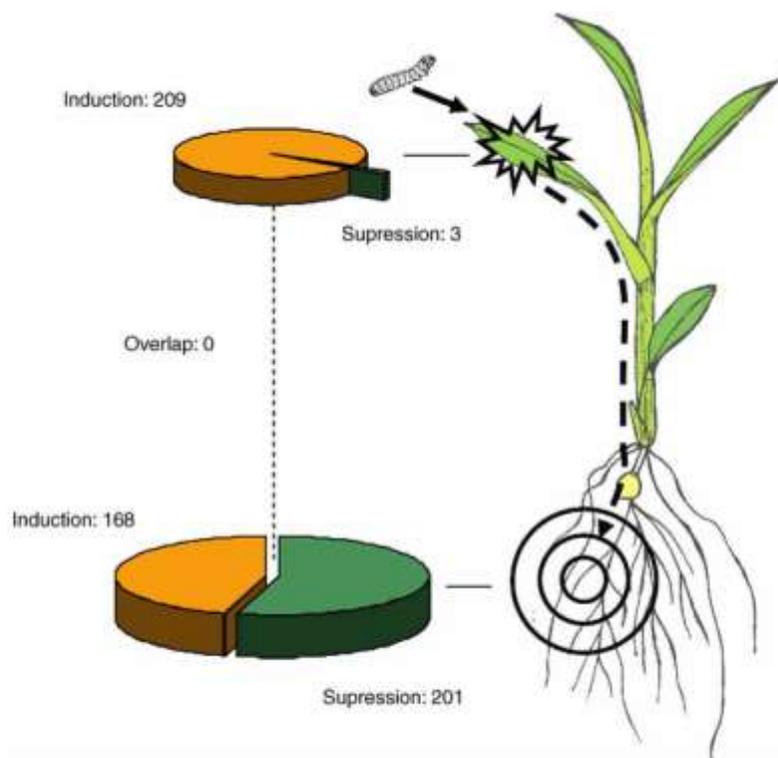
Certains des composés défensifs qu'elle synthétise peuvent parfois être dangereux pour la plante elle-même. Celle-ci peut alors les stocker sous forme de précurseurs moins toxiques, qui seront ultérieurement activés et transformés en molécules toxiques sous l'action de l'herbivore (*Howe et Jander 2008*). Le stockage de ces molécules peut être compartimenté dans des cellules spécialisées comme les trichomes ou autres comme nous le verrons plus loin.

Les feuilles ne sont pas les seules à être mobilisées pour la défense directe de la plante et le rôle des racines est aussi très important dans la résistance et la tolérance à l'attaque des feuilles par les insectes herbivores et les pathogènes. En effet, les racines sont souvent responsables de la production de toxines comme les alcaloïdes (*Ziegler et Facchini 2008*). Ainsi, la biosynthèse de la nicotine qui a lieu dans les racines de tabac sera *in fine* transportée et stockée dans les feuilles (*Morita et al. 2009*). Il a ainsi été démontré que la synthèse de nicotine s'accroissait lors des attaques foliaires par des insectes, augmentant ainsi la concentration dans les feuilles et améliorant de ce fait la résistance aux nuisibles (*Baldwin et al. 1994, Ohnmeiss et al. 1997*) (**Figure 6**). L'attaque des feuilles par les herbivores a donc un impact direct sur la biosynthèse et la concentration de certains composés dans les racines (*Kaplan et al. 2008*).



**Figure 6 | Modèle d'accumulation de nicotine dans les feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) induite par un herbivore** (d'après Mithöfer et Boland, 2012) (a) La phytohormone (acide jasmonique) induite par l'herbivore est transportée dans le phloème jusqu'aux racines et initie la biosynthèse de la nicotine en augmentant la régulation des transporteurs requis. (b) Illustration des voies de transport empruntées par les transporteurs dans le tabac. (c) La nicotine biosynthétisée (hexagone jaune) est chargée dans la vacuole par l'induction via l'acide jasmonique d'un multi extracteur de composés toxiques (MATE). Dans les feuilles, un deuxième transporteur appelé nicotine transporteur perméase (NUP1) transfère l'alcaloïde du xylème dans la cellule de la feuille. Les trois transporteurs des racines ne sont pas encore identifiés et sont indiqués par un point d'interrogation.

Lors d'une attaque d'un pathogène, il peut y avoir non seulement une augmentation du système de défense mais aussi une diminution ou suppression du métabolisme afin de lutter plus efficacement. Ainsi, lors d'une attaque des feuilles, il y a non seulement une induction de transcrits dans les racines mais aussi un nombre important de suppressions de transcrits ce qui suppose une réorientation du métabolisme de la plante (Erb et al. 2009) (figure 7). Par exemple, chez *Nicotiana attenuata*, la croissance des racines est notamment ralentie lors d'une attaque d'herbivores (Hummel et al. 2007). Chez *Eucalyptus grandis*, c'est aussi le métabolisme primaire qui est ralenti aussi au profit du métabolisme secondaire notamment la biosynthèse des molécules défensives (toxines, terpènes...) (Oates et al. 2015). Il reste à comprendre si ce ralentissement de croissance des racines et des feuilles est une stratégie de la plante pour réduire sa croissance et garder des réserves pour une repousse après l'attaque ou si cela peut aider la plante à libérer des ressources additionnelles pour renforcer ses défenses foliaires (ex : synthèse de terpènes, alcaloïdes...).



**Figure 7 | Changements transcriptionnels dans la pousse et les racines d'un maïs attaqué par l'herbivore *Spodoptera littoralis* (d'après Erb et al. 2009).** Les plantules de maïs ont été infestées avec 20 larves au stade L2 pour 18 heures, les racines et les pousses ont ensuite été récoltées et analysées utilisant le génome entier une gamme d'oligo de 57K. L'infestation des pousses entraîne une induction de 209 transcrits (en orange) et la suppression de trois transcrits (en vert) pour la partie aérienne. Le résultat d'une réponse systémique dans les racines est encore plus prononcé avec 168 transcrits induits et 201 transcrits éteints au niveau des racines. Il n'y a pas de superposition des changements transcriptomiques entre les deux tissus indiquant que la réponse racinaire est profondément différente de la réaction locale de la plante.

### III.1.2.2 La défense indirecte

Lorsqu'elle est attaquée par un herbivore, la plante peut aussi se défendre en émettant des COV qui, par l'attraction d'organismes se nourrissant de ses propres prédateurs, jouent ainsi le rôle de système de défense indirecte. Il faut noter que ce cocktail de molécules est souvent spécifique et dépend du type d'herbivore, de son âge, de son abondance et de son type d'alimentation (McCormick et al. 2012). Les terpènes sont souvent majoritaires dans ce cocktail (Tholl et al. 2011). La plante, en attirant des insectes carnivores qui peuvent manger l'herbivore indésirable ou le parasiter, réduit de façon indirecte des dommages futurs (Degenhardt et al. 2003) (figure 8).

Ainsi, Kessler et Baldwin ont montré que grâce aux défenses indirectes et à l'attraction d'un prédateur des larves de papillon, la plante a réduit de 90% le nombre d'herbivores (Kessler et Baldwin 2001).

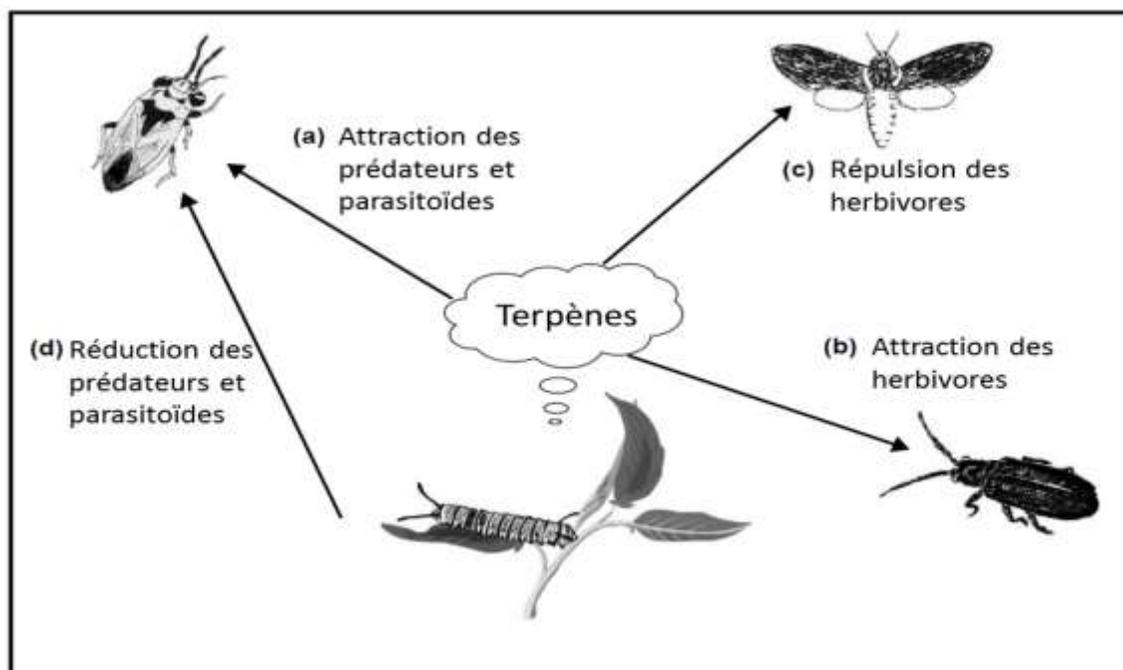
Les défenses indirectes ne sont pas l'apanage de la partie aérienne. Par exemple, le maïs se défend contre la larve du coléoptère *Diabrotica virgifera* en synthétisant du (E)- $\beta$ -caryophyllène et ainsi attire un nématode, prédateur naturel de la larve. La souche américaine du maïs a perdu cette capacité de synthétiser du (E)- $\beta$ -caryophyllène, probablement durant le processus de sélection variétale (Rasmann et al. 2005), la rendant ainsi plus vulnérable à une attaque.

| 60

Dans leur lutte contre les insectes, les racines peuvent aussi servir d'organes de stockage permettant ainsi une nouvelle croissance une fois l'attaque passée (Erb et al. 2009), comme c'est par exemple le cas pour le maïs après une infestation de sauterelles (Holland et al. 1996). Cette mobilisation des ressources et la préservation de celles-ci dans un organe jouent aussi en quelque sorte le rôle de défense indirecte.

Suite à ces observations sur les interactions plante-insecte et les méthodes de défense indirecte des plantes, la technique de la co-culture a été remise au goût du jour et a pu montrer tout son potentiel. En effet, si la plante d'intérêt n'émet pas directement les composés terpéniques l'aidant à se défendre de manière directe ou indirecte, une co-culture avec une plante émettrice peut améliorer les performances en champ de la plante cultivée (Khan et al. 1997). Il est intéressant de préciser que beaucoup de monoterpènes et de sesquiterpènes ne sont émis spécifiquement qu'en réponse à l'attaque d'un herbivore et non après un simple dommage mécanique (Turlings et al. 1998). La reconnaissance par la plante de la salive de l'herbivore est donc nécessaire pour initier la défense.

Les connaissances dans ce domaine de recherche ont donc beaucoup progressé ces dernières années même si la question de l'influence exacte des herbivores n'est pas encore totalement éclaircie et reste une question passionnante, au centre des préoccupations de nombreux spécialistes (Schwachtje et Baldwin 2008, Mithöfer et Boland 2012, Oates et al. 2015).



**Figure 8 | Interactions entre les plantes, les herbivores et les ennemis des herbivores au moyen des terpènes volatils.** (d'après Degenhardt et al. 2003). (a) Après une attaque d'herbivore, il y a libération de terpènes qui attirent les prédateurs et/ou les parasites qui mangent l'herbivore ou se servent de son corps comme hôte pour leurs larves. Ces mêmes terpènes peuvent aussi affecter le comportement d'autres herbivores soit en (b) les attirant pour la nourriture, soit en (c) les repoussant pour la nourriture ou l'oviposition. (d) Il faut noter aussi que les caractères impliqués dans la défense directe (trichomes glandulaires, toxines...) peuvent affecter négativement le succès des prédateurs ou des parasites. Les tentatives pour améliorer l'émission des terpènes chez les plantes cultivées doivent favoriser les avantages (a et c) et défavoriser les désavantages (b et d).

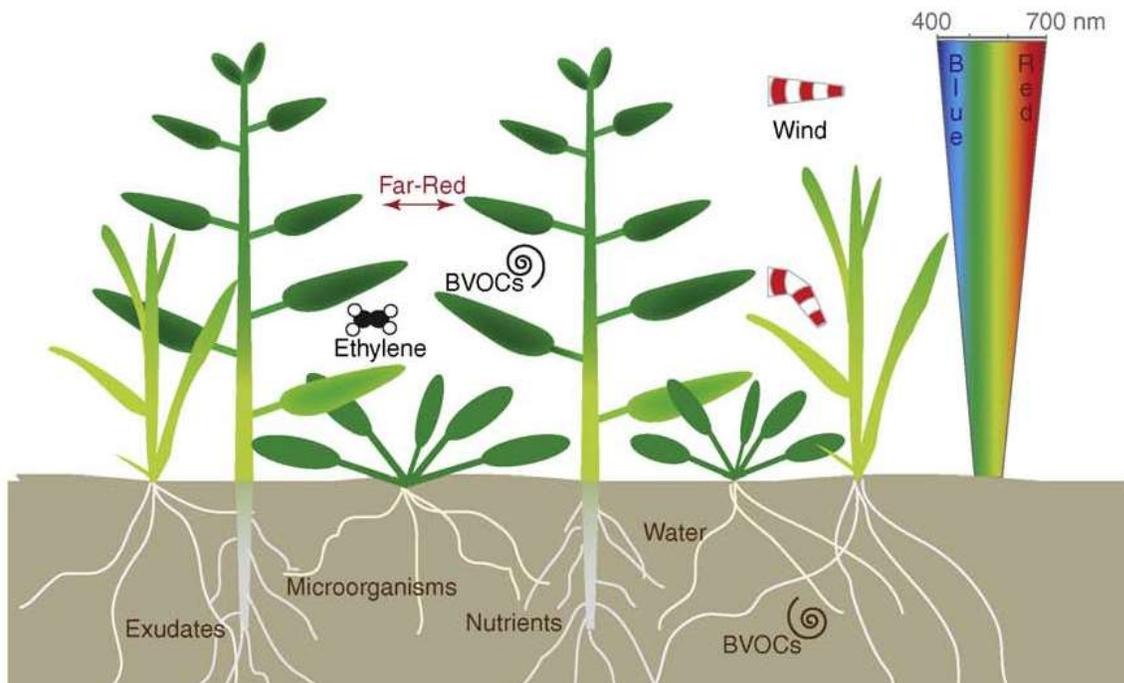
### III.1.3 La communication entre plantes

La relative rareté des ressources essentielles pour la croissance des plantes (eau, lumière, nutriments...) est souvent responsable d'un stress, ce qui induit une compétition importante entre les individus partageant ces ressources. Les plantes ont ainsi développé des stratégies afin de s'assurer un accès optimal à ces ressources. Ces stratégies sont dites défensives si la réponse est une action ayant un effet sur la plante elle-même et n'ayant pas d'effet direct sur son environnement. La plante peut, par exemple, augmenter sa croissance racinaire en cas de faible disponibilité en nutriments et/ou en eau ou accroître l'élongation de ses entre-nœuds et sa surface foliaire si l'exposition à la lumière est compétitive. A l'inverse, la plante pourra choisir une stratégie plus offensive en inhibant les performances d'un autre organisme (ex : allélopathie). Ainsi, certains monoterpènes comme le carvacrol et le *D*-limonène ont un rôle allélopathique en inhibant la respiration, en bloquant le cycle de l'azote ou encore en inhibant la croissance et la germination des graines des plantes voisines (Maffei et al. 2011).

La plante reçoit différents signaux qui la renseignent sur une éventuelle concurrence pour les ressources. La **figure 9** présente les COV émis, indiquant la présence ou non d'une plante concurrente mais pouvant aussi renseigner sur l'identité de la plante ainsi que sur sa croissance (Kegge et Pierik 2009). Certaines plantes, comme le maïs, émettent une quantité totale de COV plus faible dans un sol pauvre que dans un sol riche même si certains composés comme le linalol peuvent être émis en plus grandes quantités (Kegge et Pierik 2009). Les émissions de COV sont aussi chez certaines plantes très dépendantes de la lumière. Ainsi, une plante de maïs attaquée par un herbivore aura une réponse très fortement dépendante de la lumière comparativement à une plante saine (Gouinguene et Turlings 2002). L'émission des terpènes est augmentée chez des plantes méditerranéennes cultivées en monoculture (Ormeno et al. 2007a) alors que les émissions de terpènes sont plus réduites lorsque la compétition n'est pas d'ordre interspécifique (Ormeno et al. 2007b).

Les plantes attaquées sont aussi capables de communiquer avec d'autres plantes et de les alerter sur une éventuelle attaque future (Engelberth et al. 2004, Baldwin et Schulz 1983). Ainsi une piste intéressante pour réduire l'utilisation de pesticides serait d'augmenter la production de molécules de défense par la plante, grâce à un signal extérieur comme par exemple l'acide jasmonique qui induit les défenses de la plante (Lombardero et al. 2013). Plusieurs expériences montrent que les plantes savent reconnaître un signal provenant d'une plante voisine attaquée et peuvent ainsi activer leurs propres défenses plus rapidement (Shulaev et al. 1997 ; Kost et Heil 2006). Puisqu'il y a un échange de signaux et

une communication entre les plantes, celles-ci doivent être capables de percevoir et d'interpréter ces signaux venant des autres plantes. Malheureusement, les mécanismes sous-jacents à la reconnaissance des COV sont encore complètement inconnus, même s'il est vraisemblable qu'ils impliquent des récepteurs (Maffei et al. 2011).



**Figure 9 | Schéma de la détection des plantes compétitives par les plantes dans une végétation dense.** (d'après *Kegge et Pierik 2009*). Les indices peuvent être de différentes natures comme : la diminution de la lumière bleue et rouge consommée par la photosynthèse, la réflexion de la lumière rouge lointaine réfléchiée par les plantes, la présence d'éthylène ou d'autres COV, la diminution de l'exposition au vent, la consommation des réserves en eau et en nutriments du sol, la présence d'exsudats provenant de racines voisines, la présence/absence d'une flore microbactérienne spécifique. BOVCs : Biogenic organic volatile compounds

### III.1.4 La défense face aux stress abiotiques

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la relation entre l'émission et la production des COV et les stress que subit la plante est clairement démontrée. Nous l'avons vu pour des stress biotiques comme l'attaque d'un herbivore par exemple mais la plante réagit aussi pour se protéger des stress abiotiques comme de hautes températures, une grande luminosité, une faible disponibilité en eau, une concentration en sels minéraux trop importante ou encore un milieu atmosphérique avec de fortes concentrations en ozone (**figure 10**) (*Holopainen et Gershenson 2010 ; Suzuki et al. 2014*).

Lors d'un stress, la synthèse de terpènes et d'autres métabolites secondaires peut être initiée et cela, en dépit de l'extrême mobilisation en carbone et en énergie issus de la photosynthèse que cette synthèse requiert (*Loreto et al. 1996*). Ainsi, un stress abiotique a généralement pour effet d'inhiber la photosynthèse en réduisant l'absorption en CO<sub>2</sub> et la diffusion à l'intérieur des feuilles jusqu'au site de fixation (*Loreto et Schnitzler 2010*) mais également de favoriser le métabolisme secondaire. Pourquoi la plante utiliserait-elle de l'énergie à produire des « métabolites secondaires » et quel est son intérêt à réduire la photosynthèse?

#### III.1.4.1 Les COV peuvent détourner un excès d'énergie

Lors d'un manque d'eau, sous une forte chaleur et une intense luminosité, la plante suspend sa croissance mais continue à recevoir cette énergie lumineuse excédentaire. Elle doit donc essayer d'en limiter la capture sous peine que cet excès d'énergie ne produise des molécules agressives comme les radicaux libres. La plante développe ainsi plusieurs stratégies physiques ou biochimiques pour limiter cet apport d'énergie. Certaines plantes peuvent ainsi réorienter leurs feuilles afin de les exposer moins directement aux rayons du soleil, d'autres font migrer leurs pigments chlorophylliens dans les parties les moins exposées au soleil... Les plantes xérophytes<sup>4</sup> qui vivent dans des climats très chauds se sont spécialisées dans cette lutte contre le manque d'eau et l'excès d'énergie.

---

<sup>4</sup> Xérophyte du grec *xeros* : sec ; *phyton* : plante

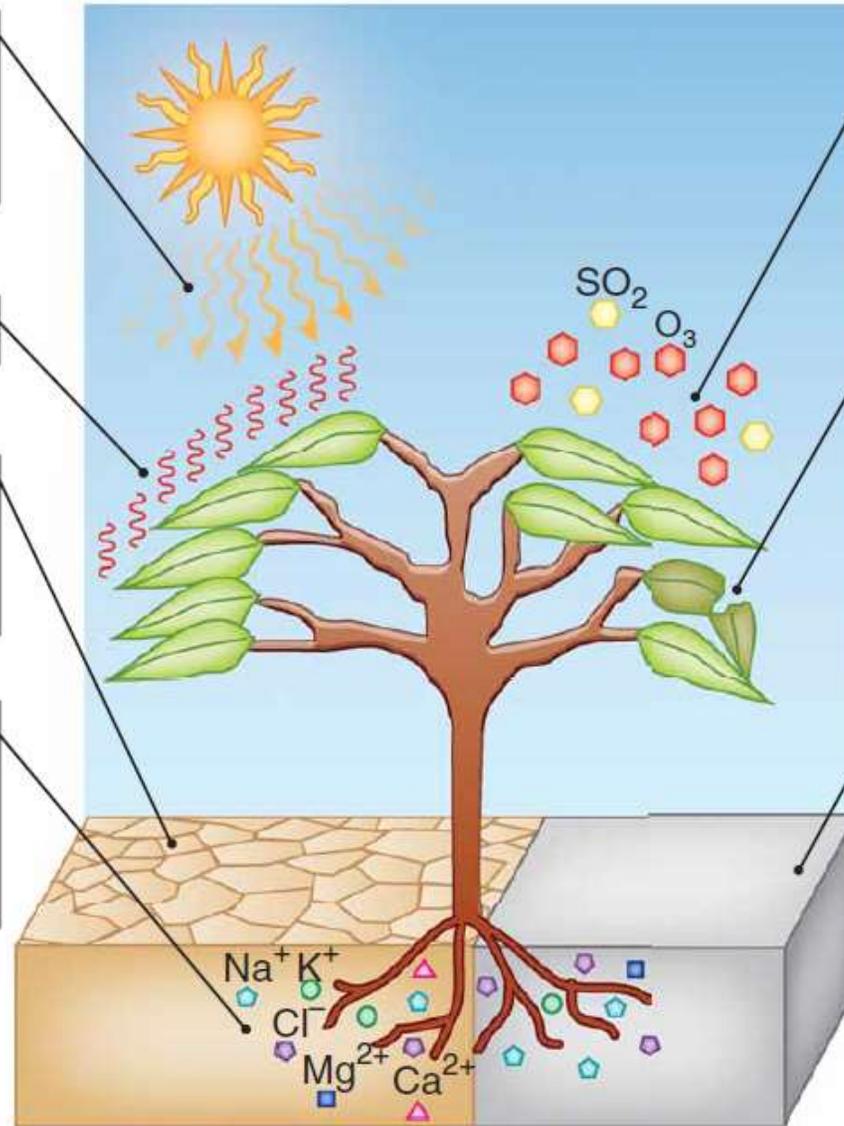
- Introduction -

Un rayonnement important cause une production excessive d'énergie d'excitation des centres réactionnels de la photosynthèse. Ceci a pour conséquence une accumulation directe d'espèces d'oxygène réactives (ROS).

De hautes températures dénaturent les protéines et causent la peroxydation des lipides.

Le stress hydrique, ou la sécheresse, interfère avec le métabolisme. Les ROS produites pendant la sécheresse initient un signal qui génère une réponse défensive de la plante.

La salinité du sol est habituellement causée par un excès de chlore et de sulfate. Le stress salin a comme conséquence une cytotoxicité des ions et un stress osmotique ainsi qu'une diminution de la captation de nutriments. Cela a comme résultat un métabolisme non équilibré donnant lieu à un stress oxydatif.



La pollution de l'air avec des espèces oxydantes (ozone et acide sulfurique) cause des dommages directs sur les tissus. Il y a une réponse locale et systémique de la plante.

Les dommages mécaniques, à la fois biotiques (ex: par les insectes) ou abiotiques (ex: le vent) augmentent l'expression des gènes de défense.

Le stress dû à de basses températures interfère avec les processus métaboliques (particulièrement avec l'activité des enzymes) et altère les propriétés des membranes. Le gel peut sévèrement endommager les tissus lors de la formation de glace. La formation extracellulaire de glace peut aussi provoquer un manque de disponibilité en eau.

**Figure 10 | Les plantes sont exposées à une variété de stress abiotiques** (d'après Vickers et al. 2009) Un excès de lumière et de chaleur ainsi qu'une exposition à une atmosphère trop oxydante provoque une accumulation directe de ROS (Reactive Oxygen Species). De hautes températures coïncident souvent avec un stress lumineux. La sécheresse entraîne un stress osmotique et d'un manque d'eau intracellulaire ; le stress salin et le stress thermique (surtout lors d'un gel) provoquent aussi un manque de disponibilité en eau pour la plante et la réponse moléculaire sera donc similaire (même si elle n'est pas identique). Quand ces stress sont combinés, la réponse est souvent amplifiée. Les ROS sont particulièrement importants car ils initient une réponse en cascade qui augmente la transcription des gènes de défense et une réponse d'adaptation. Les phytohormones sont aussi importantes dans cette réponse et sont impliquées dans les voies de signalisation. Ainsi l'ABA (acide abscissique) est particulièrement important lors d'un stress hydrique et l'éthylène, l'acide salicylique et l'acide jasmonique sont souvent impliqués dans la réponse à un dommage mécanique causé par les herbivores.

Une des stratégies biochimiques mise en place par la plante est le détournement de cette énergie du métabolisme primaire au profit du métabolisme secondaire. Ces molécules issues du métabolisme secondaire (terpénoïdes...) sont complexes et demandent pour leur synthèse une grande consommation d'énergie. Cela permet à la plante de détourner ainsi une partie de son trop-plein d'énergie. Le peuplier dans de bonnes conditions environnementales ( $1200 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ ) favorise sa croissance (80% d'augmentation de sa biomasse) et diminue sa production d'isoprène (21%) alors que dans des conditions moins favorables ( $800 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ ), il diminue sa croissance (60%) et favorise la synthèse d'isoprène (41%). La plante est donc capable de moduler les allocations de carbone fixé par la photosynthèse en fonction des conditions extérieures.

Ce détournement d'énergie aura aussi un intérêt pour le contrôle de la température foliaire de la plante puisque la vaporisation d'un composé est très coûteuse en énergie. La plante se refroidit donc en transpirant mais lors d'un manque d'eau, sous de fortes températures, la plante peut produire des molécules hautement énergétiques et les émettre dans l'atmosphère.

Ainsi, on voit que l'augmentation de la production d' $\alpha$ -pinène par le pin (*Pinus halepensis*) et le chêne (*Quercus ilex*) est directement liée à la température de la feuille et est maximale vers  $35^\circ\text{C}$  (Blanch et al. 2011). Ces augmentations d'émission de monoterpènes et sesquiterpènes ont été observées maintes fois pour d'autres espèces modèles (Loreto et al. 1996 ; Duhl et al. 2008).

A l'inverse, une plante transformée, dont la capacité à produire de l'isoprène a été supprimée, lorsqu'elle est soumise à des températures élevées, va voir augmenter sa température foliaire et réduire son taux de photosynthèse, comparativement à une autre plante capable d'émettre de l'isoprène (Sharkey et Singsaas 1995 ; Vickers et al. 2009).

Ces augmentations d'émission peuvent s'expliquer par un processus purement physique. En effet, les températures hautes vont avoir comme effet d'augmenter la pression de vapeur des COV et donc d'augmenter leurs émissions. Mais l'augmentation de l'émission des COV s'explique surtout par une augmentation du taux de biosynthèse des COV à haute température (Holopainen et Gershenson 2010).

### III.1.4.2 Les COV peuvent agir comme antioxydants

Lors d'un stress hydrique, salin ou à cause d'un excès d'énergie, la plante tend à augmenter sa photorespiration et la réaction de Melher, entraînant une surproduction d'espèces d'oxygène réactives ROS<sup>5</sup> (Miller et al. 2010). Les ROS sont principalement produites dans le chloroplaste, le peroxysome et la mitochondrie et comprennent les espèces réactives suivantes : l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), le superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (figure 11 et 12). De par leur grande réactivité et leur faible durée de vie, les ROS peuvent produire d'autres ROS par des réactions en chaîne, arracher un hydrogène à un substrat organique, arracher un électron à une molécule ou encore s'additionner sur les doubles liaisons (Gardès-Albert et al. 2003). Ces réactions ont des conséquences fâcheuses pour la plante telles que l'oxydation de l'ADN et de l'ARN (mutations), des protéines (inactivation d'enzymes), des lipides (peroxydation des lipides et donc déstabilisation des membranes), ces réactions pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. La plante a donc développé des moyens de lutte enzymatiques (SOD<sup>6</sup>, ascorbate peroxydase et glutathion peroxydase...) (figure 12) (Apel et Hirt 2004) et non enzymatiques (ascorbate, glutathion,  $\alpha$ -tocophérol, caroténoïdes, flavonoïdes et polyphénols) (Gill et Tuteja 2010) pour neutraliser ces espèces réactives.

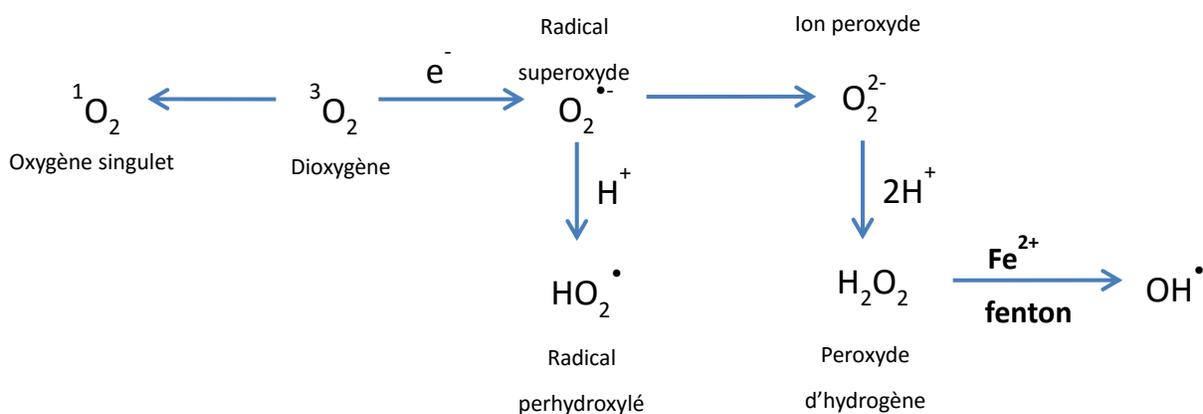


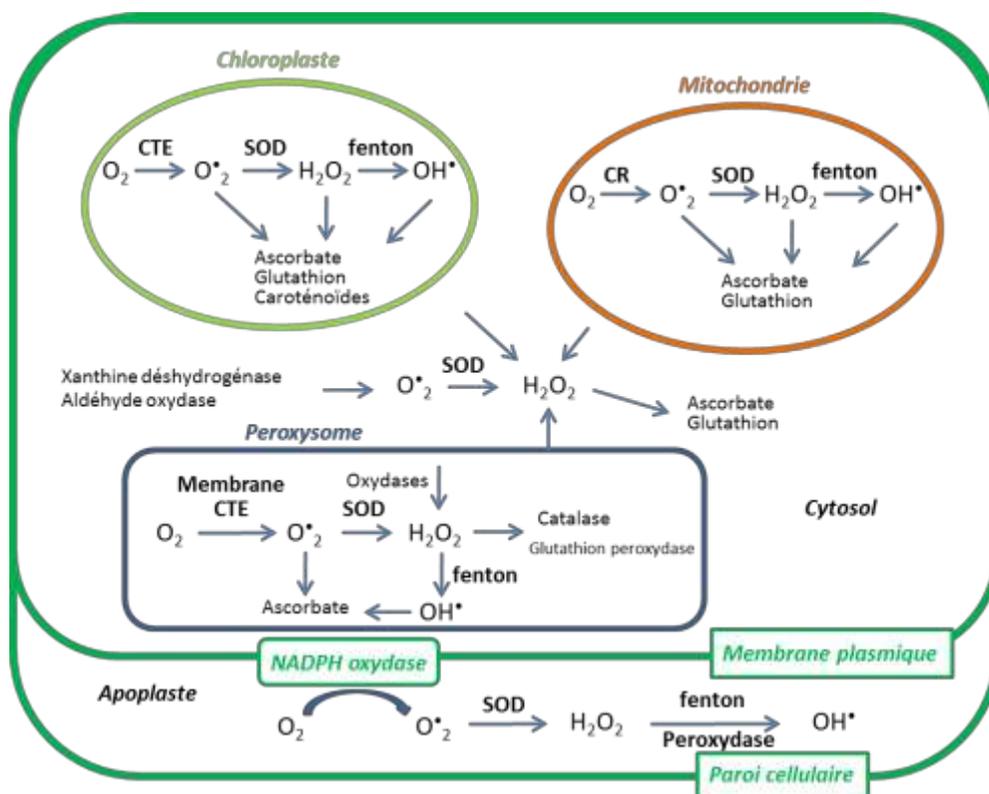
Figure 11 | Génération des ROS par transferts d'énergie (d'après Gill et Tuteja 2010)

Le rôle de certains terpénoïdes comme les caroténoïdes et l' $\alpha$ -tocophérol est très bien conservé chez tous les organismes photosynthétiques. Au contraire, d'autres terpénoïdes comme l'isoprène, les monoterpènes et les sesquiterpènes ne sont pas présents chez toutes les plantes. Ils pourraient représenter une voie pour augmenter la plasticité dans la photo-protection (annexe 10) (Penuelas et

<sup>5</sup> ROS pour Reactive Oxygen Species

<sup>6</sup> SOD pour Superoxyde dismutase

Munné-Bosch 2005). Tous les terpénoïdes montrent les mêmes traits de photo-protection due à leur structure chimique. Ils possèdent tous une double liaison nécessaire pour la désactivation des ROS et pour certains, un groupement hydroxyle responsable de la désactivation chimique des ROS. Les COV pourraient donc jouer un rôle dans la protection contre le stress photo-oxydatif et la thermo-tolérance (Peñuelas et Munné-Bosch 2005 ; Sasaki et al. 2007).



**Figure 12 | Production et neutralisation des ROS dans la plante** (d'après Jajic et al. 2015). SOD : Superoxyde dismutase; Fenton : décomposition du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle hautement réactif en présence de fer; CR : Chaîne de respiration ; CTE : Chaîne de transport d'électrons.

Chez *Arabidopsis*, on observe que si les ROS viennent de différents stress abiotiques, ce sont des gènes différents qui répondent (Mittler et al. 2004). A chaque stress abiotique correspond une réponse spécifique et à chaque combinaison de plusieurs stress abiotiques correspond une réponse tout aussi spécifique (Mittler 2006). Les annexes 11 et 12 (Mittler et al. 2006) illustrent la réponse de la plante lors d'un stress hydrique ou thermique. Quand les deux stress sont combinés, seuls certains phénomènes sont affectés (Rizhsky et al. 2002, 2004).

Certain COV réagissent très rapidement avec ces ROS. Les plantes pourraient donc utiliser ces molécules pour se protéger des effets négatifs des hautes températures, d'une lumière trop forte et de l'ozone

(*Holopainen et Gershenzon 2010*). Certes les ROS sont potentiellement dangereux pour la plante mais un changement dans la production de ROS lors d'un stress peut agir comme un signal (*Mittler et al. 2011*), qui aura un impact sur la transcription des gènes impliqués dans la réponse de la plante à ce stress (*Jajic et al. 2015*).

#### III.1.4.3 Les COV peuvent agir comme stabilisateurs membranaires

Ce sont *Sharkey et Singaas (1995)* qui émettent pour la première fois l'hypothèse d'une stabilisation mécanique de la membrane par l'isoprène. L'isoprène étant hydrophobe, il passe spontanément dans la phase lipidique de la membrane des thylakoïdes des plastes. Le mécanisme protectif de stabilisation est décrit comme purement physique, par des interactions hydrophobes (lipide-lipide, lipide-protéine et/ou protéine-protéine). Certaines expériences vont d'ailleurs dans le sens de cette hypothèse et montrent une amélioration de la stabilité des membranes lors d'une exposition à de hautes températures (*Velikova et al. 2011, 2012*).

Cependant, de nombreux doutes persistent quant à la réalité de cette hypothèse que d'autres expériences contredisent. L'isoprène étant extrêmement hydrophobe ( $K_H \sim 3.1$  eau de mer) (*Milne et al. 1995*), il passe rapidement dans la membrane du plaste jusqu'à saturer complètement celle-ci. Des expériences consistant à augmenter la production d'isoprène devraient donc simplement avoir comme résultat une augmentation d'émission de celui-ci mais pas une augmentation de la concentration dans la membrane puisque celle-ci est déjà complètement saturée. La fumigation d'isoprène ne devrait donc pas conférer une protection supérieure à la plante comme le montrent certaines études (*Logan et Monson 1999 ; Logan et al. 1999*). De plus, si ce phénomène de stabilisation est uniquement mécanique, cette stabilisation devrait être indépendante de l'espèce. Or, la stabilisation est observée uniquement pour des espèces ne produisant pas naturellement de l'isoprène (*Vickers et al. 2009*).

Il a par contre été prouvé que des molécules comme l' $\alpha$ -tocophérol pouvaient piéger les ROS par leur action antioxydante et ainsi éviter la peroxydation des lipides, dommageable pour l'intégrité des membranes (*Munné-Bosch 2005*).

### III.1.5 La combinaison des stress

Lors de l'apparition simultanée de multiples stress, la plante doit hiérarchiser sa réponse en fonction du stress le plus critique pour sa survie. Un maïs attaqué par des insectes et soumis à un stress abiotique peut privilégier la réponse à l'herbivorie (*Dicke et al. 2009*) ou peut diminuer cette réponse pour lutter contre le stress abiotique (*Ibrahim et al. 2008*). La combinaison de différents stress peut aussi activer différentes voies de biosynthèse du métabolisme comme celles de l'auxine et de l'éthylène, qui ont une action sur la croissance de la plante (*Rasmussen et al. 2013*). En fonction de la perturbation environnementale, un stress pourra être qualifié de « non stress », stress léger ou stress intense. La réponse et la nature de l'émission des COV par la plante seront très différentes selon l'intensité du stress (*Niinemets 2009*).

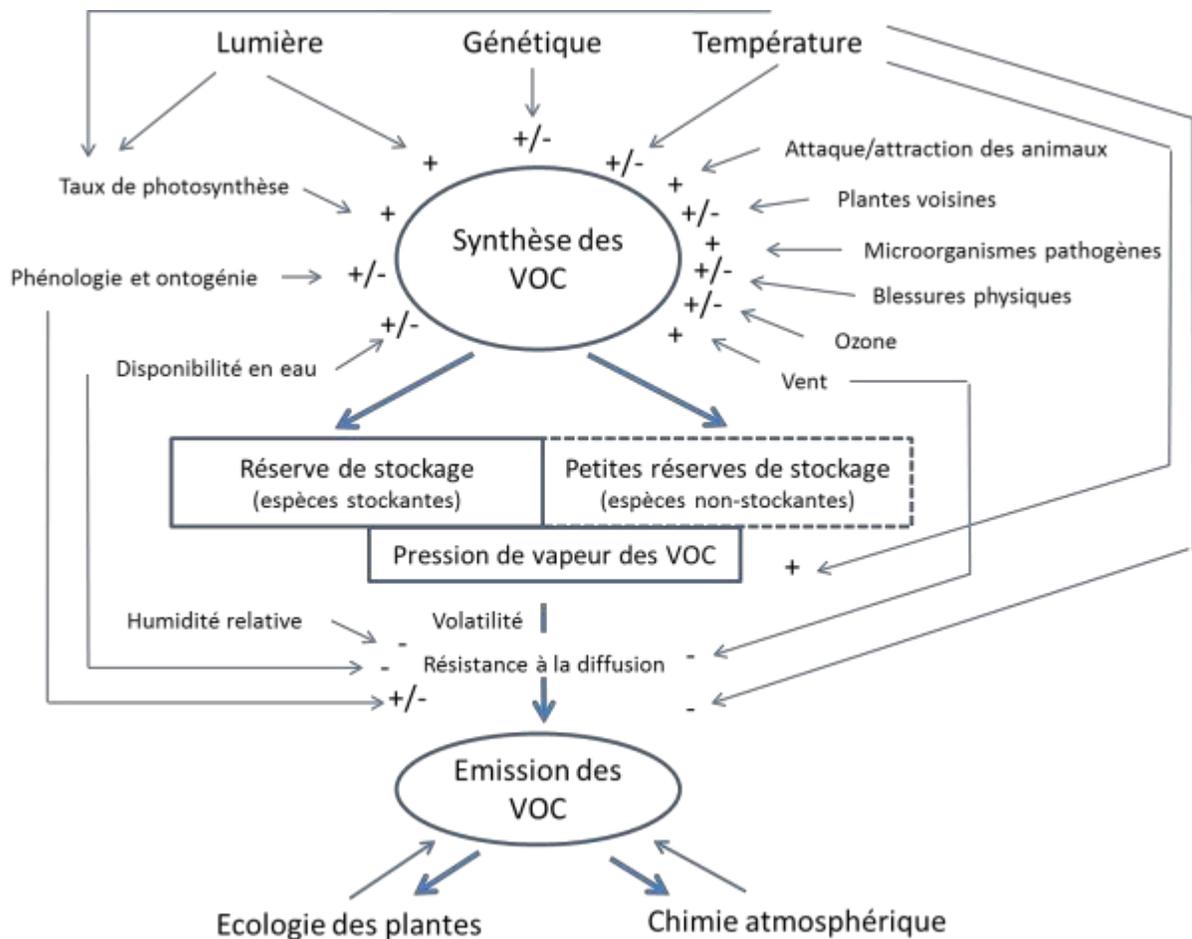
L'étude de l'impact des stress abiotiques sur la production des COV est difficile *in planta* car la plante est un modèle complexe soumis à de nombreux stimulus extérieurs et qui ne répond pas de la même façon à tous les stress et surtout à une combinaison de ceux-ci. Les résultats des études dépendent fortement de la méthodologie appliquée, de l'espèce, de l'organe et de la période de mesure. Il est donc extrêmement difficile de comparer les études et des résultats contradictoires sont parfois obtenus. De plus, tous ces stress biotiques et abiotiques ont surtout été étudiés en conditions de laboratoire et un par un, alors qu'une combinaison de ces stress est souvent à l'œuvre dans les conditions naturelles. Néanmoins, un consensus se dégage pour dire qu'un stress d'intensité moyenne aura pour conséquence une augmentation de la production de terpènes par la plante alors qu'un stress prolongé et d'intensité forte diminuera celle-ci (*Niinemets 2010, Selmar et Kleinwächter 2013, Kleinwächter 2015*).

La raison pour laquelle un composé volatil unique est incapable de diminuer l'impact de plusieurs stress en même temps n'est pas connue (*Sharkey et Singaas 1995*). L'isoprène, par exemple, n'est pas efficace pour contrer l'attaque d'un herbivore. Au contraire, sa quantité diminue lors d'une attaque, au profit des monoterpènes et sesquiterpènes. Il apparaît donc que chaque COV a un rôle spécifique en fonction des différents stress.

En conclusion, se protéger des stress biotiques et abiotiques nécessite une dépense supplémentaire pour la plante mais ces défenses induites ou constitutives sont suffisamment efficaces pour qu'elle choisisse de rediriger une partie de son carbone vers la production de COV.

### III.2 Les facteurs influençant l'émission des COV

Alors que certaines plantes stockent les COV dans des compartiments spécialisés, d'autres les émettent continuellement ou de façon induite, pour se défendre, pour attirer un pollinisateur ou pour se protéger des stress abiotiques. L'étude des émissions des COV a donc un grand intérêt pour la physiologie, l'écologie des plantes ainsi que pour la chimie atmosphérique. Ces émissions dépendent très fortement de facteurs internes (génétiques et biochimiques) ainsi que de facteurs externes abiotiques (température, luminosité, disponibilité en eau, vent, concentration en ozone...) ou biotiques (interactions entre les plantes, les animaux et les micro-organismes) qui sont résumés dans la **figure 13**.



**Figure 13 | Facteurs influençant les émissions des COV par les plantes** (d'après Penuelas et Llusia 2001). Les étapes principales de la production et de l'émission des COV ainsi que les facteurs les mieux connus et déjà décrits par des modélisations sont en gras (flèches). Les autres facteurs moins connus, ou ayant un effet de moindre intensité ne sont pas pris en compte par les algorithmes des modèles standards. La complexité du réseau et le nombre de facteurs expliquent l'importante variabilité temporelle et spatiale des émissions de COV mesurées en conditions naturelles (+ effet augmentant; - effet diminuant).

### III.2.1 Les facteurs physiques

Les COV sont principalement des liquides lipophiliques avec une grande pression de vapeur et pouvant, en absence de barrières spécifiques, passer librement les membranes cellulaires et être émis dans l'atmosphère (*Pichersky et al. 2006b*). L'émission des COV peut représenter jusqu'à 10% du total du carbone fixé par la plante (*Oikawa et Lerdaou 2013*) en conditions normales et les émissions de terpènes volatils représenteraient plus de 50% du total des émissions de COV (*Guenther et al. 1995*). Durant une période de stress sévère, comme une sécheresse par exemple, la plante peut même devenir une émettrice nette de carbone pour se protéger contre le stress oxydatif notamment.

La répartition des COV entre la phase liquide et la phase gazeuse est fonction de leur constante de Henry ( $k_H$ ) qui est souvent très importante (ex :  $k_H \sim 7500 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$  à 25°C pour l'isoprène). L'équilibre entre la phase gazeuse et liquide varie donc avec la température et il y aura une augmentation des COV émis dans l'atmosphère lors d'une augmentation de la température (*Niinemets et al. 2004*). Cet effet direct de la température sur l'émission des COV est néanmoins modulé par les résistances à la diffusion rencontrées au niveau du site de biosynthèse à l'intérieur de la feuille jusqu'à l'atmosphère. Les COV qui sont stockés dans des structures spécialisées peuvent atteindre des concentrations bien supérieures à celles rencontrées dans la cellule productrice et sont séparés du milieu intracellulaire par une couche imperméable (*Gershenzon et al. 2000*). Par contre, les plantes ne possédant pas ces structures de stockage n'ont qu'une réserve peu importante et très temporaire de COV (*Loreto et al. 1998 ; Niinemets et al. 2004*).

Dans la feuille, la diffusion des COV peut cependant être influencée par l'ouverture ou la fermeture des stomates. En effet, ceux-ci peuvent s'ouvrir afin de réguler la température de la feuille par la transpiration mais ils peuvent aussi se fermer lors d'un stress hydrique afin d'éviter une perte en eau trop importante. Néanmoins, ces ouvertures/fermetures ne vont pas affecter directement la diffusion des monoterpènes qui ont un  $k_H$  très important (*Fall et Monson 1992 ; Brüggemann et Schnitzler 2002*). Par contre, la diffusion des gaz qui sont principalement partitionnés dans la phase liquide comme les COV oxygénés (méthanol, aldéhydes en C6 et alcools) est très dépendante de l'ouverture ou non des stomates (*Loreto et Schnitzler 2009*). Précisons encore que les températures élevées vont aussi jouer sur l'activité enzymatique des terpène synthases qui ont en général un optimum d'activité autour de 40-45°C (*Monson et Fall 1989 ; Singaas et al. 1999*). Une plus grande production de terpènes favorisera donc une plus grande émission (*Loreto et al. 2006*).

### III.2.2 Les facteurs biologiques

La plante ne synthétise pas les COV de façon uniforme, que ce soit en qualité ou en quantité. Cette production peut varier en fonction de facteurs locaux, comme la saison et la température (*Angioni et al. 2006, Atti-Santos et al. 2004, Verma et al. 2013*). Le stade de développement des organes qui effectuent la biosynthèse influence également l'émission des COV (*Dudareva et al. 2006*).

Ainsi les fruits produiront la majorité des COV à maturité (*Aharoni et al. 2004*). Dans les feuilles, la composition de l'essence pourra varier en qualité et/ou quantité en fonction de l'âge et de la position sur la plante (*Rana and Blazquez 2010; Verma et al. 2010, Gershenzon et al. 2000, Muñoz-Bertomeu et al. 2008*), de la composition du sol (*Chakib 1998; Nejad and Ismaili 2014*), de l'altitude (*Verma et al. 2008; Khan et al. 2009*) et de beaucoup d'autres facteurs. Le même phénomène s'observe dans les fleurs. Ainsi pour la rose par exemple, le pic d'émission se produit lorsque la fleur est épanouie (*Bergougnoux et al. 2007, Magnard et al. 2015*) et varie au cours de la journée. Il y a un rythme circadien calé sur l'activité des pollinisateurs pour optimiser l'impact des COV (*Hendel-Rahmanim et al. 2007*). Il est aussi intéressant de montrer comme nous l'avons mentionné plus haut que l'émission peut s'arrêter après la pollinisation (*Negre et al. 2003*). Chez le narcisse, l'émission des COV est aussi très dépendante de l'âge et du moment dans la journée (*Ruíz-Ramón et al. 2014*). Le même phénomène est observé chez l'ylang-ylang (*Benini et al. 2014, Jin et al. 2015*) et d'autres plantes (*Wilkinson et al. 2006 ; Loivamaïki et al. 2007 ; Aros et al. 2012*).

### III.2.3 L'impact du changement climatique sur les futures émissions de COV

La modification des émissions de COV par la plante peut aussi être envisagée d'une manière plus globale, prenant en compte plusieurs facteurs tels que : le réchauffement climatique, la sécheresse, l'utilisation du territoire, l'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> et de l'ozone atmosphérique ainsi que des radiations UV (*Niinemets et al. 2010*). Les modèles actuels prédisent que l'impact anthropogénique ne va pas seulement augmenter les moyennes des températures mais aussi la fréquence et l'amplitude des sécheresses et des inondations, les conditions oxydantes dues à l'élévation de la concentration de l'ozone (*Holopainen et Gershenson 2010*). Les modifications des émissions de COV dépendent fortement des espèces de COV et de l'amplitude des changements environnementaux. Cependant, au vu de l'impact des COV sur les autres organismes, sur les propriétés chimiques et physiques de l'atmosphère et donc sur l'ensemble la biosphère, il est très important de se pencher sur l'impact du changement climatique sur les émissions de COV (*Peñuelas et Staudt 2014*).

L'augmentation de la température moyenne mondiale a été de 0,76°C durant le XXème siècle et les prédictions pour le XXIème siècle tablent sur une augmentation de min 2,0°C dans la plupart des scénarii envisagés (*IPCC 2014*). Or nous savons maintenant qu'une augmentation de la température, au moins à court terme, aura pour effet une augmentation exponentielle des taux d'émissions des COV par les plantes (*Filella et al. 2007*). Cette augmentation d'émission vient non seulement d'une augmentation de production des COV via une activité enzymatique supérieure (*Lorento et Schnitzler 2009 ; Blanch et al. 2011*) mais aussi d'une augmentation de la pression de vapeur des COV et donc d'une diminution de la résistance à la diffusion (*Tinger et al. 1991*). Avec le réchauffement climatique, les émissions des COV pourraient donc augmenter nettement, jusqu'à 30-45%, dans le futur (*Peñuelas et Staudt 2014*). Un autre effet indirect de l'augmentation des températures sur l'émission globale de COV est par exemple une plus grande couverture végétale due à des hivers plus doux entraînant une augmentation des émissions de 7 à 22% (*Niinements et Peñuelas 2008*). L'augmentation de la litière végétale aura aussi pour conséquence un apport supplémentaire en nutriments et donc une ressource additionnelle pour la production des COV (*Cornelissen et al. 2007 ; Rinnan et al. 2008*). Par contre, des épisodes prolongés de sécheresse ou de précipitations intenses ralentiront la décomposition du sol dans les champs situés en climat tempéré (*Walter et al. 2013*). Les spécialistes s'attendent aussi à des ravages ponctuels des insectes beaucoup plus importants dans le futur avec des dégâts considérables sur les forêts de conifères par exemple, entraînant ainsi une perte de captation du CO<sub>2</sub> par ces mêmes forêts (*Kurz et al. 2008 ; Arneeth et Niinemets 2010*).

La couverture des sols et leurs utilisations affectent aussi de façon importante l'émission de COV. Ainsi, la culture intensive d'espèces économiquement intéressantes est la cause la plus importante de la modification de la couverture des sols, bien plus encore que les modifications dues au changement climatique. Ainsi, dans les régions tropicales, il se produit une disparition importante des forêts naturelles au profit de grandes plantations de palmiers à huile de palme en Malaisie et en Indonésie (*Wilkinson et al. 2006*) ou de caoutchouc comme en Chine (*Wang et al. 2007*). Ces plantations augmentent de façon très importante l'émission de COV puisqu'en effet, une surface plantée par ces monocultures émet jusqu'à dix fois plus de COV qu'une forêt naturelle (*Wang et al. 2007*). Dans nos régions, nous assistons plutôt à une adaptation de la flore aux changements climatiques et les plantes méditerranéennes, grandes émettrices de COV (isoprène et monoterpènes), remontent vers des longitudes et altitudes plus importantes, changeant la couverture des sols ainsi que les espèces dominantes (*Niinements et Peñuelas 2008 ; Keenan et al. 2009*). L'augmentation de la température mondiale va aussi avoir un impact sur les stress biotiques comme une augmentation du nombre d'insectes, ce qui augmentera les émissions de COV en réponse à leurs attaques (*Kurz et al. 2008*).

L'effet du CO<sub>2</sub> sur les émissions des COV est mal connu à l'heure actuelle. Ainsi l'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> pourrait avoir comme effet une meilleure productivité de la biomasse et ainsi augmenter de la même façon l'émission des COV (*Sun et al. 2013*). A l'inverse, de récentes études montrent qu'une forte concentration en CO<sub>2</sub> pourrait inhiber l'émission de l'isoprène au niveau des feuilles, notamment à cause de la consommation plus importante d'acétyl co-enzyme A, précurseur commun au métabolisme primaire et secondaire (*Possell et al. 2005 ; Arneth et al. 2007, 2011 ; Young et al. 2009*). La quantité d'ozone troposphérique va aussi augmenter dans les prochaines années et aura des effets positifs et négatifs sur les émissions de COV, notamment à cause d'une augmentation du stress oxydatif subi par les plantes (*Peñuelas et al. 1999*).

La dégradation et l'oxydation des COV dans l'atmosphère en de multiples produits et finalement en CO<sub>2</sub> (*Atkinson R et Arey J 2003*) ont des implications sur la capacité oxydative de l'atmosphère ainsi que sur la formation des polluants. Les COV sont oxydés dans l'atmosphère et influencent ainsi la concentration des constituants atmosphériques tels que les aérosols organiques secondaires (SOA<sup>7</sup>), les radicaux hydroxyles (OH) et l'ozone troposphérique (O<sub>3</sub>) (*Kanakidou et al. 2005*) (**annexe 13**, *Yuan et al. 2009*). La formation des SOA pourrait avoir un effet net de refroidissement, en réfléchissant les radiations solaires

---

<sup>7</sup> SOA pour Secondary Organic Aerosol

et en bloquant celles-ci par la formation de noyaux de condensation des nuages (CCN<sup>8</sup>) (*Oikawa et Lerdau 2013*).

Un tableau en **annexe 14** résume l'impact possible du changement climatique sur les signaux écologiques liés aux COV (*Yuan et al. 2009*).

En conclusion, la biosphère terrestre, en produisant et en émettant des COV biologiques dans l'atmosphère, tisse des liens très étroits entre la surface de la terre, l'atmosphère et le climat. Comment et pourquoi les plantes synthétisent ces COV intéressent donc au premier chef les spécialistes des plantes et les écologistes à cause des fonctions de ces composés pour la plante. De plus, les entomologistes et microbiologistes les étudient en tant que signaux de la plante vers le monde animal et les microorganismes. Enfin, leurs rôles dans la biosphère concernent les chimistes de l'atmosphère et les climatologues car les COV ont des effets sur la composition de l'atmosphère. Toutes ces interactions sont résumées dans la **figure 14** de *Laothawornkithul et al. (2009)*.

---

<sup>8</sup> CCN pour Cloud Condensation Nuclei

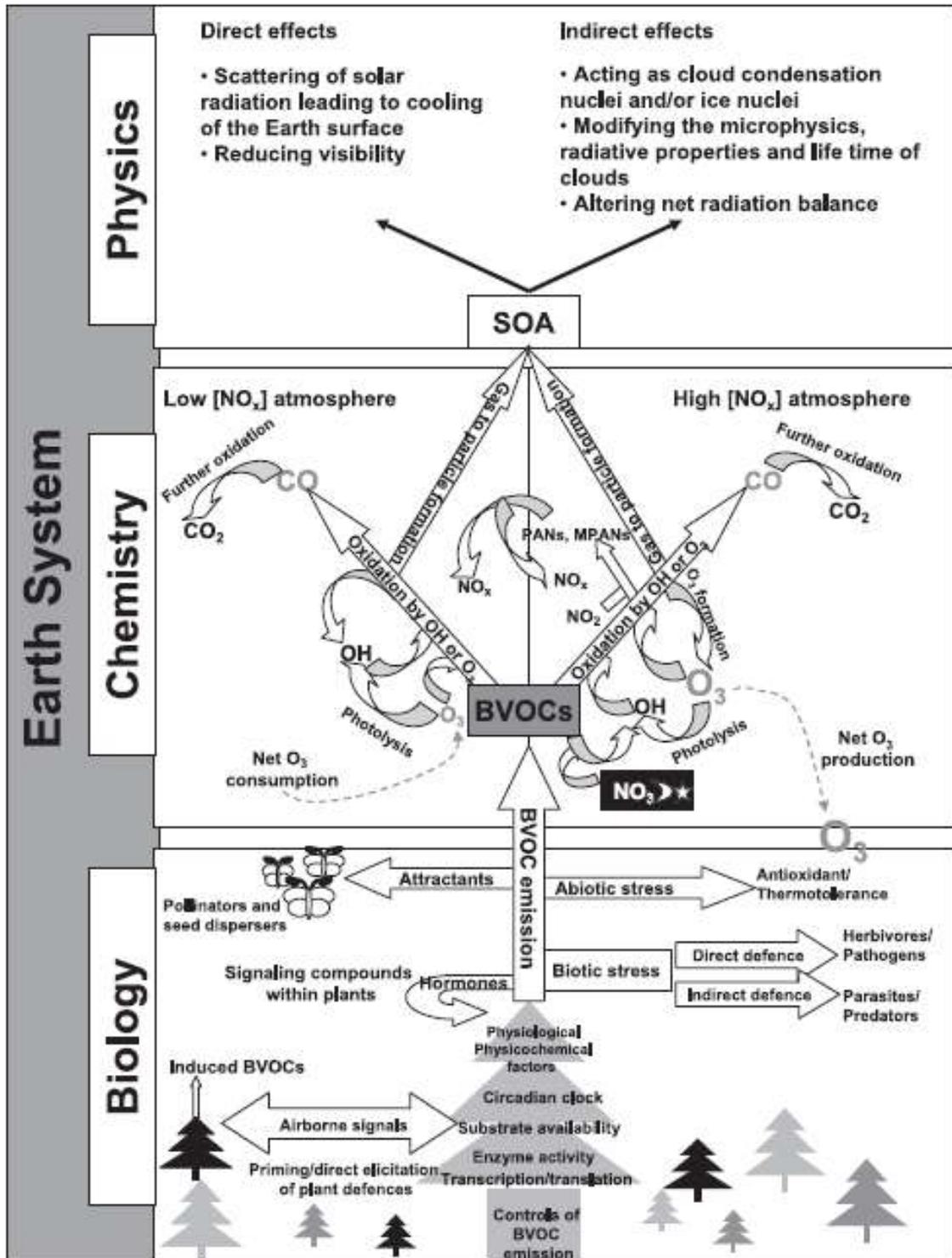


Figure 14 | Diagramme schématique résumant les connaissances actuelles des rôles des COV biologiques dans le système terrestre (d'après Laothawornkithul et al. 2009). Les COV biologiques exercent leurs rôles au niveau biologique, chimique et physique du système terrestre et fournissent une connection entre la biosphère et l'atmosphère. L'utilisation des trois compartiments notés biologie, chimie et physique n'implique pas qu'il n'y a pas aussi des processus chimiques et physiques dans le biosphère. SOA = Secondary Organic Aerosol et  = pendant la nuit

### III.3 Le stockage et l'émission des COV

#### III.3.1 Le transport des COV dans la cellule

Avant d'être émis dans l'atmosphère, les COV doivent traverser une ou plusieurs membranes, une paroi cellulaire aqueuse et chez certaines plantes, une cuticule de cire. Il a longtemps été admis que les COV diffusaient passivement au travers de ces barrières, cependant plusieurs indices tendent à remettre en question, au moins partiellement, cette hypothèse (Widhalm et al. 2015). En effet, les COV, de caractère lipophile, devraient rester piégés entre la bicouche des membranes jusqu'à atteindre une concentration très importante avant de diffuser contre ce gradient. Des calculs théoriques effectués sur la fleur de muflier (*Antirrhinum majus*) montrent que la concentration en COV dans la membrane plasmique devrait être plus élevée d'un facteur 100 par rapport à la concentration du cytosol ou de la paroi cellulaire (figure 15). Cette concentration aurait probablement des effets très destructurants pour la membrane qui seraient certainement létaux pour la cellule. La seule explication d'une augmentation de la température durant le jour qui jouerait sur la solubilité et la volatilité des COV ne suffit pas pour justifier une diffusion passive. En effet, pourquoi dès lors certaines plantes n'émettraient-elles que la nuit en phase avec leurs pollinisateurs ? On peut argumenter que la production de COV serait finement régulée. Cependant, l'hypothèse d'une émission des COV sous l'influence de mécanismes biologiques actifs, qui existent pour d'autres composés hydrophobes (lipides, cires, diterpènes) est postulée à l'heure actuelle. Cela permettrait notamment d'expliquer la faible concentration intramembranaire des COV observée, ainsi que bien d'autres observations.

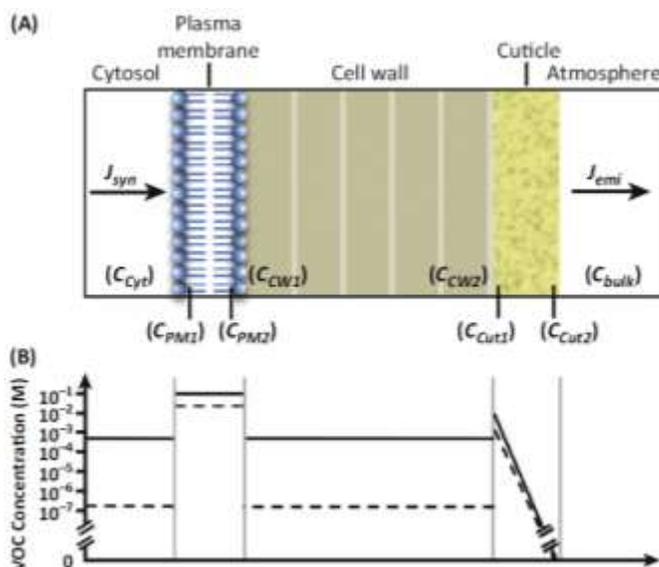


Figure 15 | Chemin des émissions des COV et concentrations calculées en COV requises pour supporter le modèle de diffusion passive (d'après Widhalm et al. 2015). (A) Diagramme montrant les barrières à l'émission des COV chez la fleur de muflier (*Antirrhinum majus*) (B) Concentrations en COV simulées nécessaires pour franchir chaque barrière suivant le modèle de diffusion passive afin d'atteindre les niveaux d'émission observés pour le méthyle benzoate (ligne continue) et le nérolidol (ligne discontinue).

Les hypothèses qui ont été proposées permettant d'expliquer le transport et l'émission des COV sont les suivantes :

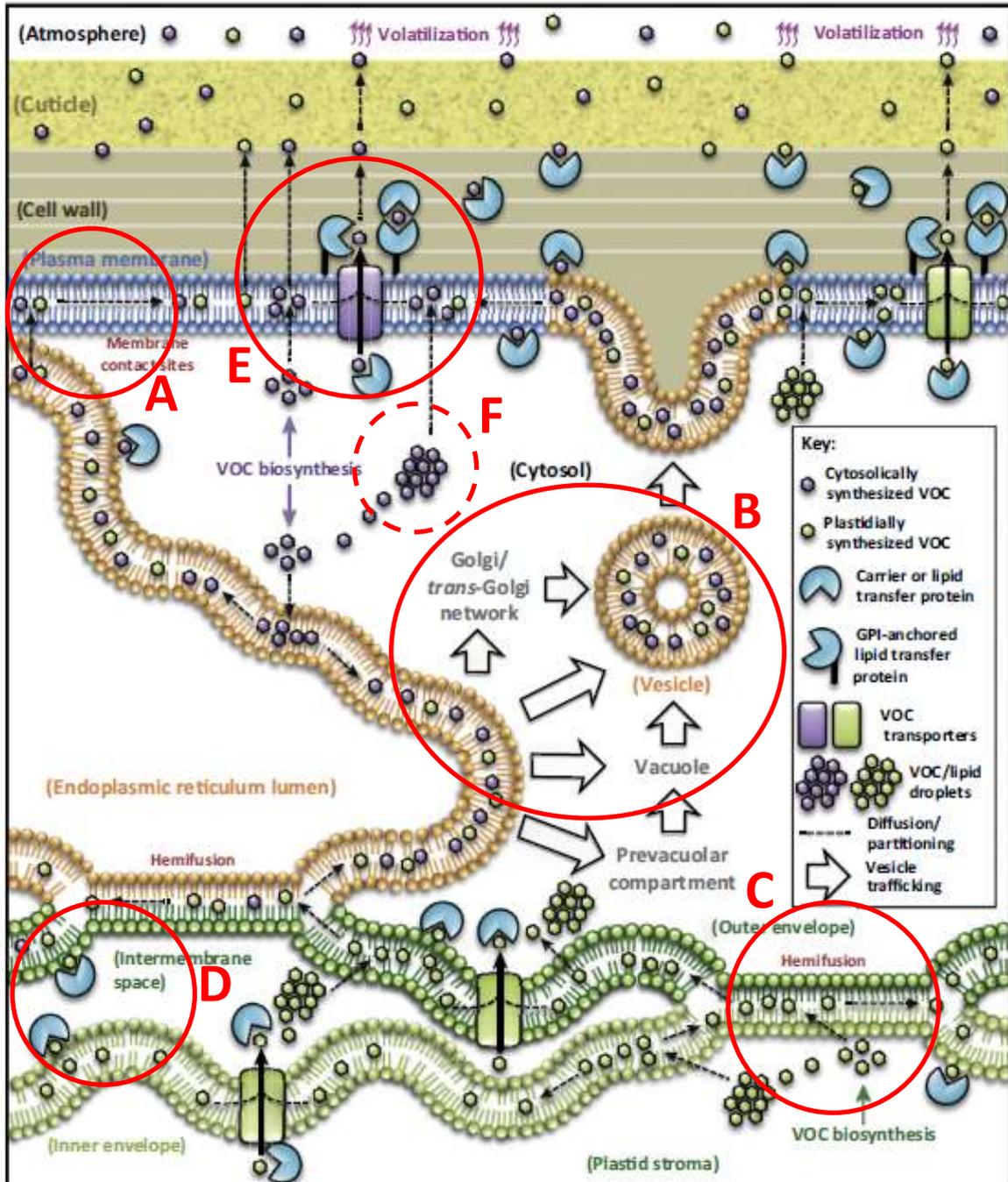
- Les COV, produits à la surface du réticulum endoplasmique ou RE<sup>9</sup>, circulent librement dans le plasma de la membrane de celui-ci. Cette membrane peut alors fusionner avec la membrane plasmique. Cette hypothèse avait été décrite initialement par Fahn (**A figure 16**) (Fahn 1979).
- Les COV circulent librement à l'intérieur de l'appareil de Golgi et/ou du RE et sont évacués via le réseau trans-golgien ou via des vacuoles bourgeonnantes. Cette possibilité avait également été émise par Fahn (**B figure 16**) (Fahn 1979).
- Les COV produits dans les plastes (ex : monoterpènes) rejoignent le RE via une hémifusion des membranes du RE et du plaste (**C figure 16**). Ce n'est que très récemment qu'est apparue cette hypothèse (Mehrshahi et al. 2012, 2013).
- Les COV sont escortés par des protéines de transport contenant une poche hydrophobe capable de transporter des molécules hydrophobes dans une phase aqueuse (**D figure 16**) (Samuels et McFarlane 2012).
- Les COV sont exportés hors de la cellule via un transporteur transmembranaire de type ABC-transporteur<sup>10</sup> (McFarlane et al. 2010). Ce transport actif grâce à de l'ATP<sup>11</sup> a d'ailleurs été démontré pour le transport du sclaréol, un terpène non volatil, dans les feuilles de tabac (**E figure 16**) (Jasinski et al. 2001).
- Les COV sont transportés par l'intermédiaire des oléosomes. Ces organites seraient alors à la fois des organites de stockage, mais aussi un moyen de transport de COV. Dans la **figure 16 (F)**, cette hypothèse est mentionnée mais la membrane des oléosomes n'est pas figurée (**F figure 16**) (Caissard et Baudino 2012).

---

<sup>9</sup> RE pour Réticulum Endoplasmique

<sup>10</sup> ABC-transporteur pour ATP-Binding Cassette transporteur

<sup>11</sup> ATP pour Adénosine Triphosphate



**Figure 16 | Hypothèses expliquant le trafic intracellulaire des COV dans les plantes** (d'après Widhalm et al. 2015). Les COV pourraient diffuser à travers chaque barrière de façon passive ou pourraient circuler au moyen de mécanismes biologiques encore inconnus mais similaires à ceux observés pour d'autres composés hydrophobiques. Les caractéristiques physicochimiques des VOC semblent jouer en défaveur d'une diffusion passive uniquement. Les flèches blanches montrent un chemin possible pour la circulation des COV dans le cytosol via des vésicules. Les protéines de transfert lipidiques (LTP) ou d'autres types de protéines pourraient contribuer au transfert des COV à travers le stroma des plastes, du cytosol et/ou de la paroi cellulaire. Les transporteurs localisés dans la membrane plasmique pourraient jouer un rôle dans l'exportation des VOC du cytosol ou de la membrane plasmique vers la paroi cellulaire. Les VOC diffusent alors à travers la cuticule pour être émis dans l'environnement. D'autres mécanismes non schématisés ici ne peuvent être exclus. GPI, Glycosylphosphatidylinositol.

### III.3.2 Le stockage des COV

Certaines plantes synthétisent, stockent et émettent des COV dans des structures spécialisées afin que l'organisme ne soit pas mis en danger par leur toxicité (*Wagner 1991*). Les structures les plus connues sont les trichomes qui sont des protubérances différenciées de l'épiderme et qui sont spécialisés dans la production de grandes quantités de composés. D'autres types de structures existent, comme les canaux résinifères très présents chez les conifères mais aussi chez les arbres à caoutchouc ou produisant du latex (*Schilmiller et al. 2012*).

#### III.3.2.1 Le stockage intracellulaire

Les oléosomes, organites spécialisés dans le stockage des lipides (ex : triglycérides), sont formés d'une membrane lipidique provenant du décollement des deux feuillettes phospholipidiques de la membrane du RE et stabilisés par des protéines spéciales (généralement des oléosines) entourant une matrice lipidique. On trouve notamment beaucoup d'oléosomes dans les graines où ils assurent un stockage important de lipides. Les COV sont aussi des molécules très lipophiles et pourraient donc être stockés dans ceux-ci (*Caissard et Baudino 2012*). Ainsi, dans certaines cellules sécrétrices de fleurs, il a été observé des vésicules de terpènes de taille comparables à celles des oléosomes (*Caissard et al. 2004 ; Bergougnoux et al. 2007*). Chez d'autres plantes comme l'Arum, il a été montré que des vésicules se collent ensuite à la membrane plasmique et se vident au moment de l'émission des terpènes (*Skubatz et al. 1995, Leguet et al. 2014*). Chez la vigne, il a été observé dans les grains de pollen une sesquiterpène synthase (valencène synthase) localisée sur des oléosomes. C'est via ces corps lipidiques que seraient transportés ces sesquiterpènes (*Martin et al. 2009*).

Les COV peuvent aussi être stockés dans un milieu aqueux. Ceux-ci doivent alors être sous forme glycosylée et seront stockés dans la vacuole. Un traitement avec une enzyme de type  $\beta$ -glucosidase permet de libérer une grande partie de ces molécules et ainsi de les rendre disponibles pour une récupération éventuelle (*Francis et Allcock 1969 ; Strauss et al. 1986 ; Luan et al. 2005 ; Rivas et al. 2013*).

### III.3.2.2 Les structures spécialisées de stockage et d'émission

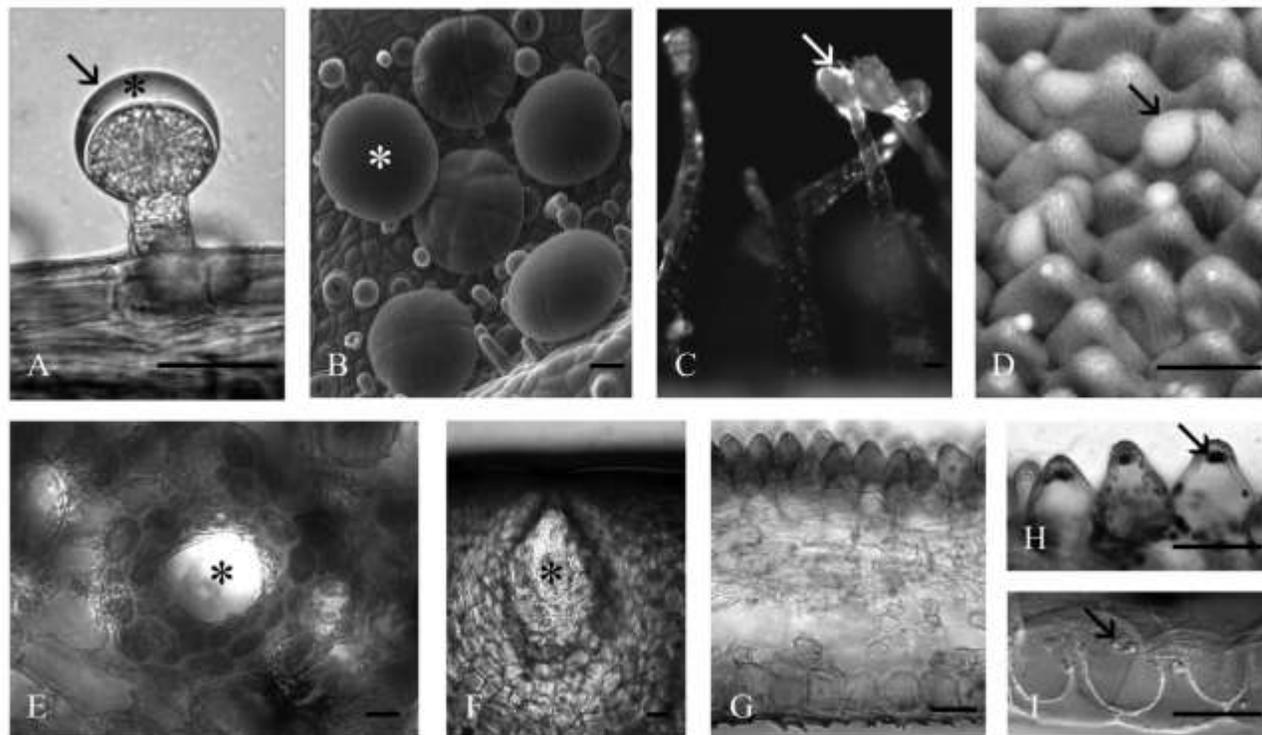
Chez de nombreuses espèces, il a été montré que les COV sont synthétisés *de novo* dans les cellules sécrétrices à partir desquelles ils sont émis (Dudareva et Pichersky 2000 ; Gang et al. 2001 ; Kolosova et al. 2001 ; Chen et al. 2004).

Cependant les cellules productrices des COV peuvent soit mettre en place une stratégie d'accumulation de ces produits souvent toxiques, soit les émettre directement. Ces accumulations pourront alors servir plutôt comme système de défense constitutif. Les feuilles sont alors souvent dotées de trichomes glandulaires et stockent les VOC hors de la cellule mais sous une cuticule imperméable. C'est notamment le cas chez les Lamiacées (menthe, *Mentha sp.* ; sauge, *Salvia sp.* ; basilic, *Ocimum sp.* ; thym, *Thymus sp.*) (figure 17 A et B). Un autre type de trichome glandulaire peut aussi servir de défense contre les insectes mais produira un mélange d'une composition différente, plus collant. Dans ce cas, il n'y a pas de stockage de la substance visqueuse sous la cuticule mais celle-ci est diffusée en continu comme c'est le cas chez le tabac (*Nicotiana sylvestris*) (figure 17 C). Le mélange de COV sera plutôt composé de molécules plus grosses et moins volatiles puisqu'elles sont destinées à rester sur la feuille.

D'autres plantes, qui utilisent les COV non plus comme répulsifs mais comme attracteurs d'insectes pollinisateurs peuvent être dotées de cellules épidermiques émettant en continu comme les pétales de nombreuses fleurs. Ces cellules épidermiques, souvent coniques, libèrent directement les COV dans l'air (figure 17 D). Elles peuvent être dans certains cas localisées dans une zone particulière du pétale, on parle alors d'osmophores comme chez les Orchidacées (Antón et al. 2012).

D'autres cellules spécialisées tapissent l'intérieur des canaux comme dans les feuilles et les tiges des Apiacées (céleri, *Apium graveolens* ; anis, *Pimpinella anisum* ; fenouil, *Foeniculum vulgare* ; carotte, *Daucus carota*...) et des conifères (E figure 17). C'est aussi ce même type de cellules qui tapissent l'intérieur des glandes et poches sécrétrices dans la peau des agrumes (F figure 17).

La capacité d'excréter des COV n'est pas restreinte à ce type de cellules. Toutes les cellules sont potentiellement capables d'émettre des COV. Par exemple, chez la rose (*Rosa x hybrida*), l'épiderme inférieur à cellules plates émet autant de COV que l'épiderme supérieur à cellules coniques (Figure 17 G, H et I) (Bergougnoux et al. 2007).



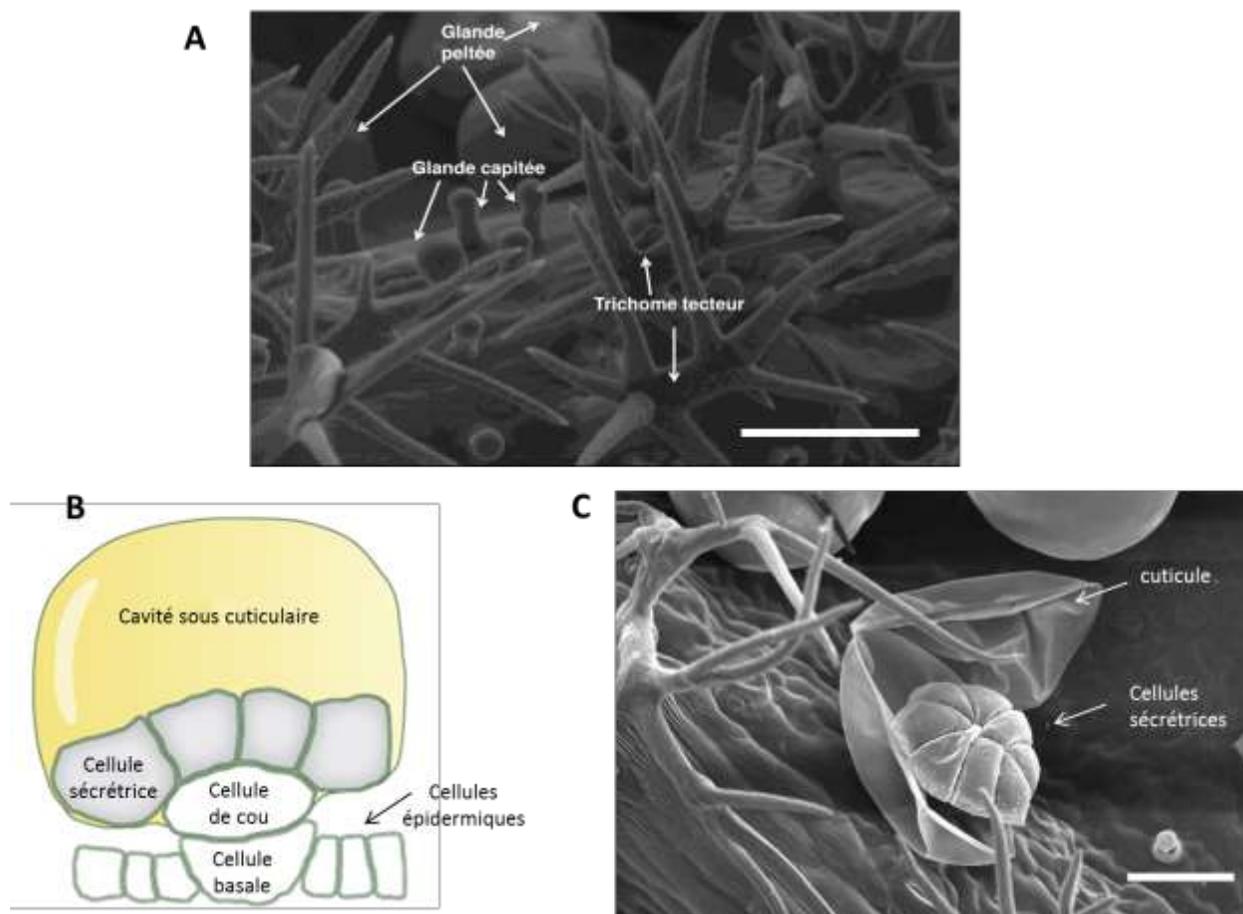
**Figure 17 | Exemples de structures spécialisées dans la sécrétion et/ou le stockage des huiles essentielles (d'après Caissard et Baudino 2012).** **A** – Micrographie photonique d'une glande capitée de *Lamium maculatum* (le décollement de la cuticule permet un stockage extra-cellulaire de l'HE); **B** – Micrographie électronique environnementale de la surface d'une feuille de *Mentha spicata* (les glandes les plus grosses correspondent à des glandes peltées et les plus petites à des glandes capitées); **C** – Micrographie photonique à fluorescence de trichomes glandulaires de *Nicotiana sylvestris* (les zones blanches correspondent à des composés lipophiles colorés par le Nile Red, colorant spécifique des lipides neutres et coulant de la tête du trichome); **D** – Micrographie électronique environnementale de la surface d'un pétale de *Rosa x hybrida* (les gouttelettes correspondent à l'HE sécrétée par les cellules coniques); **E** – Micrographie photonique d'une jeune pousse de *Pseudotsuga menziesii* (la cavité correspond à la lumière d'un canal sécréteur de résine); **F** – Micrographie photonique d'une coupe de péricarpe du fruit de *Citrus sp.* (la cavité correspond à une poche sécrétrice vidée de son HE); **G** – Micrographie photonique d'une coupe de pétale de *Rosa x hybrida* (l'épiderme supérieur présente des cellules coniques alors que l'épiderme inférieur présente des cellules plates); **H** – Micrographie photonique d'une coupe d'épiderme supérieur de pétale de *Rosa x hybrida* (les gouttelettes noires intracellulaires correspondent à des terpènes colorés par la réaction de NaDi); **I** – Micrographie photonique par contraste interférentiel d'une coupe d'épiderme inférieur de pétale de *Rosa x hybrida* (les gouttelettes réfringentes correspondent à des corps lipidiques intracellulaires). Légendes : étoile, zone de stockage extra-cellulaire de l'HE; flèche, gouttelettes lipophiles et/ou d'huiles essentielles; barres d'échelle 20  $\mu\text{m}$ .

### III.3.2.2.1 Les trichomes glandulaires

Les trichomes sont de petites protubérances d'origine épidermique situées à la surface des feuilles et d'autres organes de nombreuses plantes. Leurs tailles, leurs formes, leurs nombres et leurs morphologies sont très variables d'une espèce à l'autre. Cela va de la longue fibre présente dans les fruits de coton aux trichomes de forme arrondie à la surface des feuilles (*Schillmiller et al. 2008*). Les trichomes des *Pelargonium* sont décrits dans la revue présentée au début du chapitre I-Introduction (*Blerot et al. 2015*). Il existe deux types de trichomes, les trichomes tecteurs servant à la défense physique de la plante et les trichomes glandulaires servant à la défense chimique de la plante et produisant les composés qui nous intéressent. Nous allons donc nous focaliser sur ce type de trichomes.

Les trichomes glandulaires sont épidermiques et situés sur les parties aériennes de la plante. Ils consistent souvent en une ou plusieurs cellules basales qui ancrent le trichome dans l'épiderme, des cellules de cou, et une tête souvent multicellulaire représentant l'ensemble des cellules sécrétrices (*Fahn 2000*). Des études récentes montrent que la formation des trichomes est régulée par l'activité de facteurs de transcription et de promoteurs spécifiques (*Gutiérrez-Alcanà et al. 2005 ; Shangguan et al. 2008 ; Kim et al. 2008*). Typiquement, les métabolites sont sécrétés à partir des cellules de tête vers une cavité de stockage sous-cuticulaire où l'essence est maintenue sous pression. La moindre action sur la cuticule aura pour conséquence de la rompre et de répandre l'HE sur le ravageur ou le parasite. Une partie de l'HE peut néanmoins diffuser lentement au travers de la cuticule. Comme nous l'avons mentionné plus haut, certains trichomes comme ceux du tabac produisent une substance visqueuse qui s'écoule le long des trichomes et se répand sur les feuilles ralentissant ainsi les ravageurs.

Deux grandes familles de trichomes glandulaires existent : les trichomes capités et les trichomes peltés (**figure 18 A**). Les glandes capitées sont constituées d'une cellule basale insérée dans l'épiderme, de plusieurs cellules de cou et d'une ou deux cellules de têtes. Ces glandes ne participent que très peu à la synthèse des COV car les molécules traversent rapidement la fine couche cireuse formant la cuticule. Les glandes peltées sont le véritable centre de biosynthèse des COV. Elles sont constituées d'une cellule basale, d'une cellule de cou et de 4 à 16 cellules de tête (**figure 18 B**). L'essence synthétisée sera stockée sous la cuticule jusqu'à l'explosion éventuelle de celle-ci, provoquée par un choc mécanique, qui mettra donc à nu l'essence libre de diffuser dans l'atmosphère (**figure 18 C**).



**Figure 18 | Glandes sécrétrices de lavande observées en MEB et schéma de glande peltée de menthe (d'après Guiton 2010; Lange 2015). A – Trois types de trichomes sur calice de *Lavandula angustifolia* (MEB x500 12 kV); B – Représentation schématique d'une glande peltée de menthe poivrée, *Mentha x piperita*; C - Détail des huit cellules sécrétrices d'une glande peltée sur le calice de *Lavandula lanata* (MEB x500, 8kV). Barres d'échelle 100  $\mu$ m.**

La densité et la distribution des trichomes sont connues pour varier entre les organes aériens et dépendent du stade de développement de la plante (Turner et al. 2000 a, b). Cette distribution est aussi largement influencée par les conditions environnementales comme la température et la photopériode (Kennedy et al. 1981 ; Gianfagna et al. 1992), l'état nutritionnel de la plante (Barbour et al. 1991) ainsi que les stress biotiques et abiotiques (Wikens et al. 1996). Les phytohormones ont aussi une grande influence puisque le jasmonate est nécessaire chez la tomate pour l'initiation des trichomes du fruit (Li et al. 2004) et chez le concombre, les niveaux d'éthylène influencent la morphologie et la densité des trichomes (Kazama et al. 2004). A noter aussi que le diamètre des glandes ne semble pas être corrélé avec la capacité d'accumulation en essence mais cette capacité serait plutôt à mettre en relation avec la densité des glandes (Dell et McComb 1978 ; Wagner 1991).

Les glandes peltées se forment grâce à l'émergence d'une cellule épidermique. Chez les menthes, cette cellule subit deux divisions périclines successives (figure 19 et 20). La cellule supérieure donne alors naissance à huit cellules de tête grâce à une série de divisions anticlines. Ces cellules sont le siège de la biosynthèse de l'essence riche en terpènes. Cette essence est excrétée hors des cellules sécrétrices pour être stockée dans l'espace sous cuticulaire. Une fois la pression trop forte ou lors d'un choc mécanique violent, la cuticule se rompt libérant ainsi l'essence, c'est la phase de sénescence (figure 20).

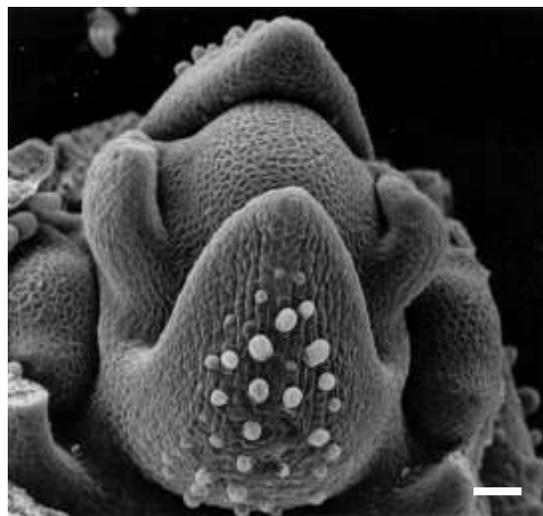


Figure 19 | Mise en place des trichomes chez *Mentha x piperita* (photo M. Colson) (D'après Caissard 2007) Croissance cellulaire localisée des trichomes sécréteurs. Barre d'échelle 50 µm.

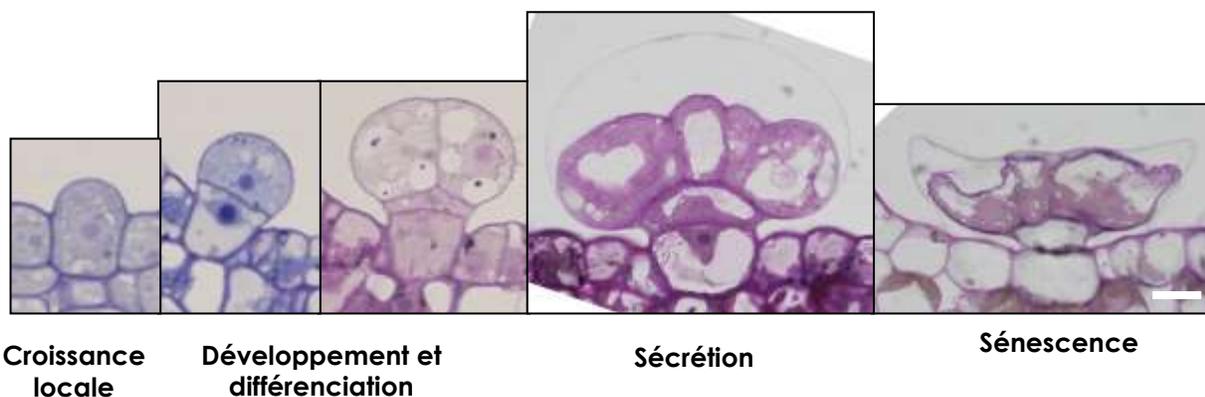


Figure 20 | Etapes de la différenciation des glandes peltées de *Mentha x piperita* (d'après Caissard 2007). Barre d'échelle 10 µm.

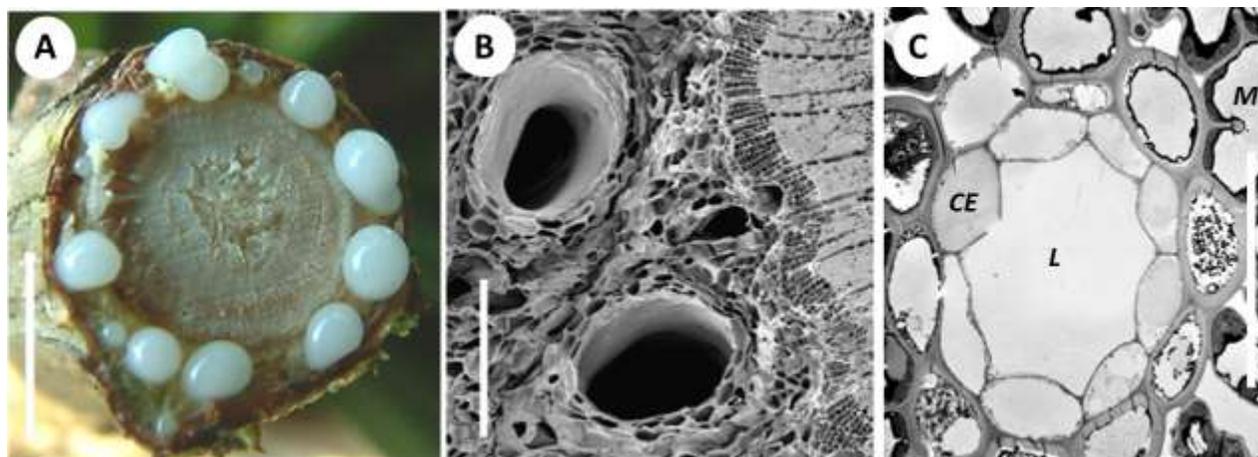
Les trichomes, situés à la surface de l'épiderme sont facilement accessibles pour l'isolement et la caractérisation des enzymes impliquées dans la synthèse des VOC. Beaucoup de plantes importantes dans l'industrie agroalimentaire ont ainsi été étudiées comme la tomate (McDowell et al. 2011), la menthe (Rios-Esteva et al. 2008), le houblon (Wang et al. 2008) ou encore le cannabis (Marks et al. 2009). D'autres plantes utilisées dans l'industrie de la parfumerie sont aussi à l'étude comme la sauge (Schmiederer et al. 2008 ; Caissard et al. 2012), le patchouli (Deguerry et al. 2006) ou le *Pelargonium*.

### III.3.2.2.1 Les canaux résinifères

Les cellules sécrétrices peuvent aussi être isolées et réparties dans le bois de la plante (**figure 21**). En effet, les cellules sécrétrices des conifères produisent des oléorésines qui sont un mélange de terpénoïdes et de composés phénoliques et stockent cette résine sous pression dans la lumière des espaces intercellulaires appelés conduits/canaux (**figure 21 A & B**) (Phillips et Croteau 1999).

Les cellules des canaux résinifères sont notamment impliquées dans le transport des terpènes. Lors d'une attaque, la fraction volatile (mono et sesquiterpènes) a souvent un rôle de répulsif et une fois évaporée, la fraction acide résiduelle, sous l'action d'une polymérisation oxydative, peut piéger et tuer l'insecte envahisseur (Maffei et al. 2011), jouant alors un rôle de défense physique. Les canaux laticifères jouent un rôle similaire et se retrouvent chez plus de 10% des angiospermes (Agrawal et al. 2009).

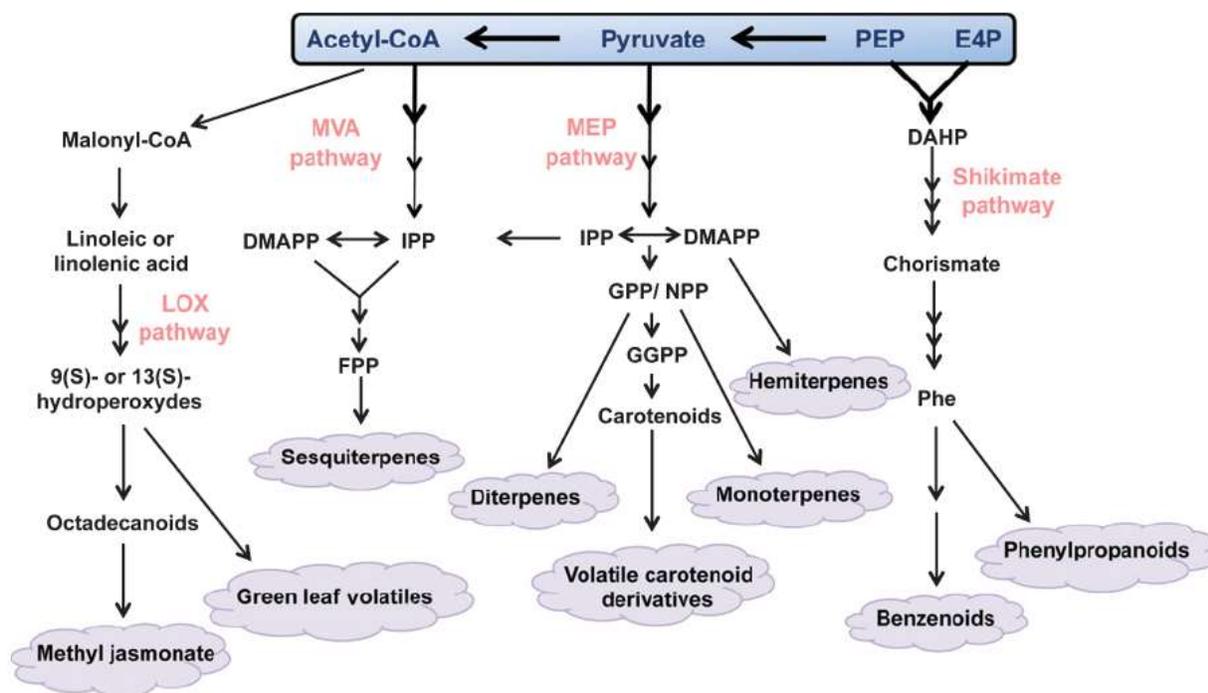
Les canaux résinifères par contre sont beaucoup moins accessibles que les trichomes pour une purification des cellules productrices de métabolites même si des techniques de microdissection par laser commencent à être disponibles (Abbott et al. 2010).



**Figure 21 | Illustrations des canaux laticifères et résinifères chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) et chez le pin (*Pinus taiwanensis* Hayata) (d'après Sheue et al. 2003) A – Branche d'hévéa illustrant le latex sous pression; B et C Ultrastructure d'un canal de résine dans le mésophylle. CE : Cellule épithéliale; M : mésophylle; L : Lumière du canal de résine. Barre d'échelle A= 10 mm; B et C = 200  $\mu$ m**

### III.4 La biosynthèse des COV

Les COV, constitués des terpénoïdes, des composés aromatiques (phénylpropanoïdes/benzénoïdes) et des dérivés d'acide gras, ne représentent qu'environ 1% des composés issus du métabolisme secondaire ou spécialisé des plantes (Dudareva et al. 2004). A ce jour, plus de 1700 COV émis par les plantes de plus de 90 familles ont déjà été caractérisés (Knudsen et Gershenzon 2006) (Annexe 15). Certaines estimations montrent que les plantes utilisent même jusqu'à 36% de la photosynthèse pour produire et émettre ces COV (Kesselmeier et al. 2002). Il y a un petit nombre de voies biochimiques impliquées dans la biosynthèse de ces COV, les trois principales étant : La voie des terpénoïdes qui nous intéresse plus particulièrement et comprend 2 branches principales (voie de l'acide mévalonique ou MVA et voie du méthylérythritol phosphate ou MEP), la voie de l'acide shikimique qui donnera les composés aromatiques et la voie des oxylipides ou des lipoxygénases (LOX pathway) produisant les dérivés d'acides gras ou Green Leaf Volatiles (Loreto et Schnitzler 2010) (figure 22).



**Figure 22 | Résumé des voies de biosynthèses contrôlant les émissions des COV des plantes** (d'après Dudareva et al. 2012). Les précurseurs des COV des plantes sont issus du métabolisme primaire (rectangle bleu). Les 4 voies de biosynthèse majeures des COV, nommées voies du Shikimate (shikimate pathway), de l'acide mévalonique (MVA pathway), du méthylérythritol phosphate (MEP pathway) et des lipoxygénases (LOX pathway) contrôlent l'émission des composés benzénoïdes/phénylpropanoïdes, des sesquiterpènes, monoterpènes, hémiterpènes, diterpènes, des composés dérivés des caroténoïdes et du méthyle jasmonate et des « green leaf volatiles » (GLV). Les flèches en séries indiquent plusieurs réactions enzymatiques. Les COV sont soulignés avec un fond gris. DAHP, 3-déoxy-D-arabinoheptulose-7-phosphate; DMAPP, diméthylallyl pyrophosphate; E4P, érythrose 4-phosphate; FPP, farnésyl diphosphate; GGPP, géranylgeranyl diphosphate; GPP, géranyl diphosphate; IPP, isopentényl diphosphate; NPP, néryl diphosphate; PEP, phosphoénolpyruvate; Phe, phénylalanine.

### III.4.1 La biosynthèse des phénylpropanoïdes/benzénoïdes

Les voies de biosynthèses des phénylpropanoïdes et benzénoïdes ont été en partie élucidées chez *Petunia hybrida* cv Mitchell par *Dudareva et Pichersky (2000)* et *Boatright et al. (2004)*. Ceux-ci ont utilisé un précurseur, la phénylalanine, marquée avec du deutérium isotopique ( $^2\text{H}_5\text{-Phe}$ ), pour suivre la formation des composés.

La première étape de cette voie de biosynthèse, commune à plusieurs voies, est la désamination de la phénylalanine par l'enzyme PAL<sup>12</sup> donnant l'acide trans-cinnamique.

La deuxième étape est la conversion de l'acide trans-cinnamique en acide para-coumarique par l'enzyme C4H<sup>13</sup>. L'acide *p*-coumarique donnera ensuite soit des composés comme les tanins, la lignine ou les flavonoïdes, soit les phénylpropanoïdes comme l'eugénol, le méthyleugénol, le chavicol ou encore le méthylchavicol. Il faut aussi noter que l'acide *p*-coumarique peut aussi provenir directement chez les monocotylédones de la tyrosine. Cette réaction est catalysée par la TAL<sup>14</sup> (*Croteau et al. 2000*).

La voie des benzénoïdes à partir de l'acide trans-cinnamique requiert l'élimination de deux atomes de carbone de la chaîne latérale. Cette opération peut se faire via différentes voies qui sont encore pour certaines hypothétiques mais qui sont soit CoA-dépendante et  $\beta$ -oxydative, soit CoA indépendante et non  $\beta$ -oxydative soit une combinaison des deux (**figure 23**). A noter que plusieurs voies peuvent avoir lieu simultanément comme chez le pétunia par exemple (*Boatright et al. 2004*). Ces différentes voies mènent donc à différents composés (benzaldéhyde, alcool benzylique, méthylbenzoate...) qui peuvent être soit des composés finaux soit des intermédiaires pour d'autres produits.

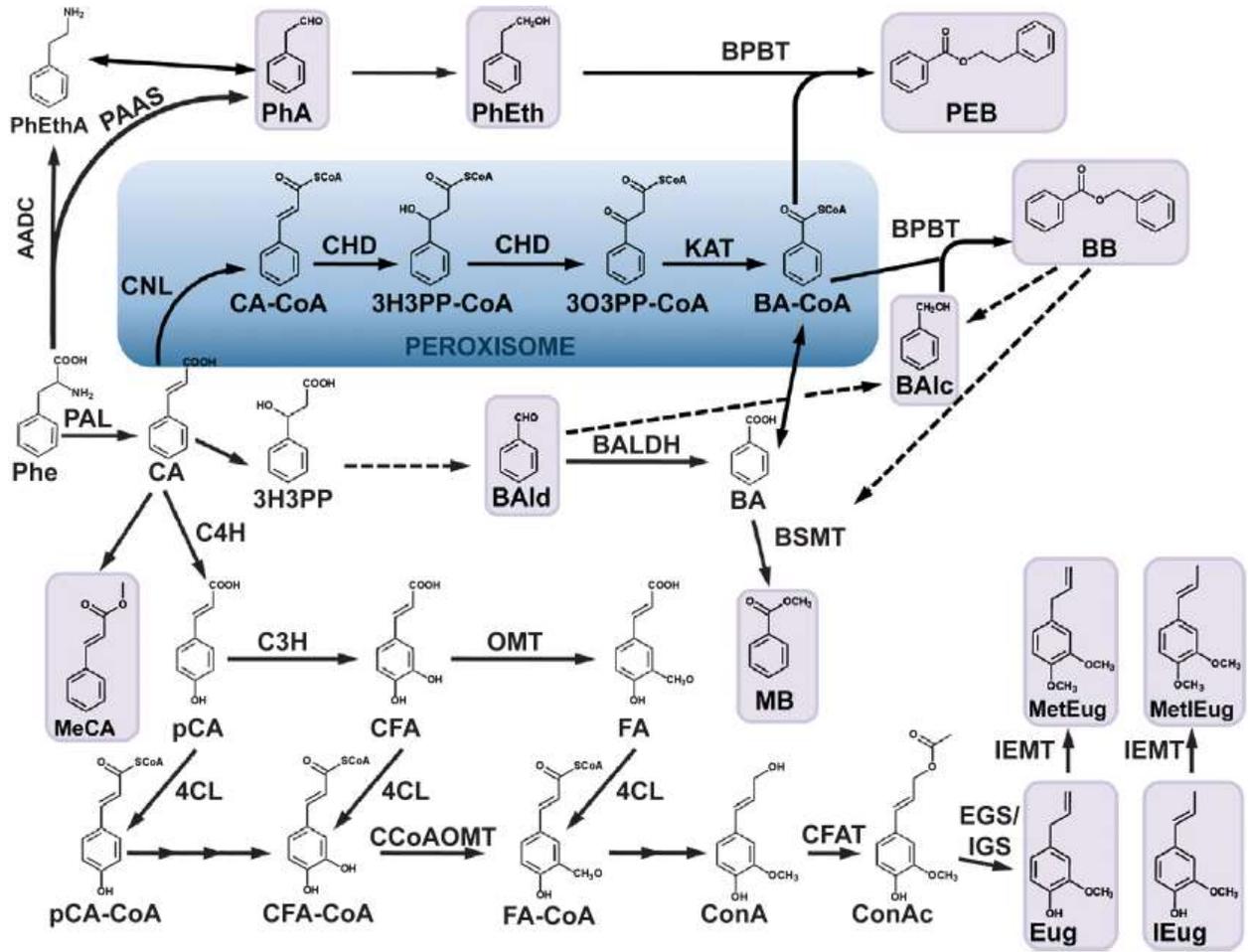
Ces composés se retrouvent ainsi dans beaucoup de tissus de la plante : dans les fleurs de rose (2-phényléthanol, eugénol,...) (*Scalliet et al. 2008*), dans l'écorce de cannelle (aldéhyde cinnamique...) (*Paranagama et al. 2001*), dans les feuilles du giroflier (eugénol, méthyleugénol) (*Srivastava et al. 2005*), dans les fruits comme les noix de muscade (safrole) (*Muchtaridi et al. 2010*) ou les fèves tonka (coumarine...) (*Bourgaud et al. 2006*) ou encore les gousses de vanille (vanilline...) (*Zhang et al. 2014*).

---

<sup>12</sup> PAL pour L-phénylalanine-aminase

<sup>13</sup> C4H pour cinnamic acid-4-hydroxylase (C4H)

<sup>14</sup> TAL pour L-tyrosine-aminase



| 90

**Figure 23 | Synthèse des COV benzénoïdes et phénylpropanoïdes** (d'après Dudareva et al. 2012) Les benzénoïdes et les phénylpropanoïdes sont dérivés du précurseur commun qu'est la phénylalanine, synthétisée dans les plantes par la voie du shikimate. La voie oxydative du peroxysome (en bleu) et la voie non-oxydative sont responsables de la formation de l'acide benzoïque, un précurseur central pour de nombreux benzénoïdes volatils. Les flèches continues indiquent les voies biochimiques bien établies alors que celles qui sont hypothétiques sont représentées par des flèches discontinues. Les flèches en séries montrent que plusieurs enzymes sont impliquées. Les composés volatils benzénoïdes/phénylpropanoïdes sont soulignés par un fond gris. AADC, aromatic amino acid décarboxylase; BA, benzoic acid; BA-CoA, benzoyl-CoA; BAld, benzylalcohol; BAld, benzaldéhyde; BALDH, benzaldéhyde déhydrogénase; BB, benzylbenzoate; BPBT, benzoyl-CoA:benzylalcohol/2-phényléthanol benzoyltransférase; BSMT, benzoic acid/salicylic acid carboxyl méthytransférase; CA, cinnamic acid; CA-CoA, cinnamoyl-CoA; CFA, caffeic acid; CFA-CoA, caffeoyl-CoA; CFAT, coniferyl alcohol acétyltransférase; C3H, p-coumarate-3-hydroxylase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA 3-O-méthyltransférase; ConA, coniferyl alcohol; ConAc, coniferyl acetate; 4CL, 4-coumaroyl-CoA ligase; CNL, cinnamoyl-CoA ligase; EGS, eugenol synthase; Eug, eugenol; FA, ferulic acid; FA-CoA, feruloyl-CoA; IEug, isoeugénol; IEMT, (iso)eugénol O-méthyltransférase; IGS, isoeugénol synthase; 3H3PP, 3-hydroxy-3-phénylpropionique acid; 3H3PP-CoA, 3-hydroxy-3-phénylpropionyl-CoA; KAT, 3-kétoacyl-CoA thiolase; MeCA, methylcinnamate; MB, méthylbenzoate; 3O3PP-CoA, 3-oxo-3-phénylpropionyl-CoA; OMT, O-méthyltransférase; PAAS, phénylacétaldéhyde synthase; PAL, phénylalanine ammonia lyase; pCA, p-coumaric acid; pCA-CoA, p-coumaroyl-CoA; PEB, phényléthylbenzoate; PhA, phénylacétaldéhyde; Phe, L-phénylalanine; PhEth, 2-phényléthanol; PhEthA, phényléthylamine.

### III.4.2 La biosynthèse des dérivés d'acides gras (voie des oxylipides)

La peroxydation lipidique est commune à tous les systèmes biologiques, apparaissant à la fois dans des procédés régulés par le développement de la plante et par l'environnement. Les produits qui en découlent sont des peroxydes d'acides gras polyinsaturés et les métabolites dérivés nommés communément oxylipides (*Liavonchanka et Feussner 2006*). Ces derniers peuvent provenir d'une oxydation chimique (*Mueller 2004*) ou d'une réaction enzymatique sous l'action des lipoxygénases (*Brash 1999, Andreou et Feussner 2009*).

Nous l'avons vu plus haut, ces molécules peuvent avoir un rôle de molécule signal comme l'acide jasmonique ou anti-pathogène comme les aldéhydes ou les alcools présents dans les feuilles. Ceux-ci sont communément dénommés GLV<sup>15</sup> et ont une odeur verte de feuille ou d'herbe coupée (*Paré et Tumlinson 1999, Fürstenberg-Hägg et al. 2013*). Ainsi, les GLV peuvent représenter jusqu'à 50% des COV lors d'un dommage de la plante et sont émis 1 ou 2 secondes après le dommage. Certaines jeunes feuilles non endommagées peuvent aussi émettre des GLV indiquant ainsi que cette voie des oxylipides ou voie des LOX<sup>16</sup> peut être activée dans des feuilles intactes (*Spinelli et al. 2011*).

Les dérivés d'acides gras sont donc produits par des dégradations d'acides gras polyinsaturés par la voie des oxylipides (**figure 24**). La première étape est la peroxydation des acides linoléique et linoléique par la LOX. La synthèse des acides 9- ou 13-hydroxylinoléique et des acides 9- ou 13-hydroxylinoléique dépend des conditions de réaction et des LOX en présence (*Fauconnier et Marlier 1997*). Les 9-LOX partagent entre elles une séquence d'acides aminés identiques importante (~60%) alors que les 13-LOX ne partagent qu'environ 35% de cette séquence (*Andreou et Feussner 2009, Park et al. 2010*). Les hydroperoxydes peuvent ensuite servir de substrats pour les enzymes AOS<sup>17</sup> et OPR<sup>18</sup> et donner des produits impliqués dans des rôles physiologiques essentiels pour la plante comme l'acide jasmonique (*Schaller et Stinzi 2009*) (**figure 24**) ou dans le cas qui nous intéresse, des composés responsables de l'odeur verte caractéristique des feuilles (aldéhydes et alcools en C<sub>6</sub> et C<sub>9</sub>). Ces composés sont formés par une réaction faisant intervenir une HPLS<sup>19</sup> (**figure 24**) (*Fauconnier et Marlier 1997; Matsui et al. 2000*).

---

<sup>15</sup> GLV pour Green Leaf Volatiles

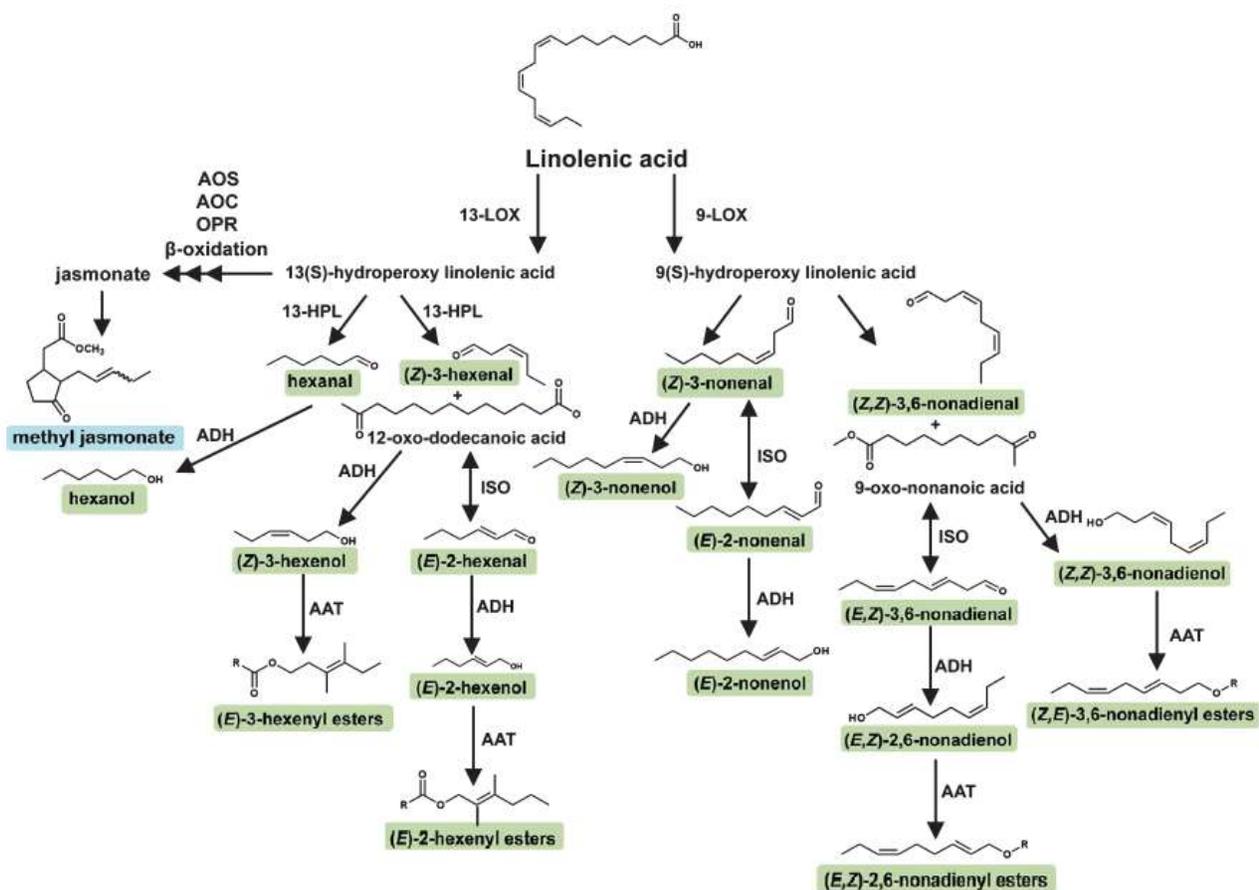
<sup>16</sup> LOX pour Lipoxygénases

<sup>17</sup> AOS pour Allene Oxide Synthase

<sup>18</sup> OPR pour Oxophytodienoate Reductase

<sup>19</sup> HPLS pour Hydroperoxydase lyase

Chez la tomate, *Chen et al. (2004)* ont démontré qu'il existait 5 isoformes de LOX et qu'une de ces isoformes (TomloxC) était impliquée dans la formation des dérivés d'acides gras dans le fruit et notamment dans les composés en C<sub>5</sub>, très appréciés des consommateurs, et C<sub>6</sub> (*Chen et al. 2004 ; Shen et al. 2014*). Les auteurs ont ensuite suivi l'adressage de l'enzyme en la couplant à la GFP<sup>20</sup> et montré qu'elle était fonctionnelle aussi bien avec de l'acide linoléique qu'avec l'acide linolénique comme substrats (*Chen et al. 2004 ; Rambla et al. 2014*).



| 92

**Figure 24 | Synthèse des COV dérivés d'acides gras** (d'après *Dudareva et al. 2012*) Les acides linoléique et linolénique servent de précurseurs pour une variété de COV dérivés d'acide gras. Ces précurseurs entrent dans la voie des lipoxygénases (LOX) et sont oxydés en intermédiaires 9-hydroperoxydes et 13-hydroperoxydes qui seront ensuite convertis en composés volatils par des hydroperoxydes lyases et des alcool deshydrogénases. Les flèches en série illustrent l'implication de plusieurs réactions enzymatiques. Les GLV sont soulignés par la couleur verte. AAT, alcool acyltransférase; ADH, alcool deshydrogénase; AOC, allène oxide cyclase; AOS, allène oxide synthase; 9-HPL, 9-hydroperoxide lyase; 13-HPL, 13- hydroperoxide lyase; ISO, isomérase; 9-LOX, 9-lipoxygénase; 13-LOX, 13-lipoxygénase; OPR, 12-oxophytodiénoate réductase.

<sup>20</sup> GFP pour Green Fluorescent Protein

### III.4.3 La biosynthèse des terpènes et terpénoïdes

Une voie métabolique nous intéresse particulièrement dans cette thèse : la voie des terpénoïdes.

L'essence de térébenthine provenant de la distillation de l'oléorésine du pin (**figure 25**) est peu intéressante olfactivement mais donne pourtant son nom à la plus grande classe de métabolites secondaires avec plus de 30 000 molécules identifiées à ce jour (*Connolly et Hill 1991; Mithöfer et Boland 2012*) dont une partie sont volatils et très odorants : les terpènes et terpénoïdes (*Breitmaier 2006*). Ces molécules ont souvent un rôle important pour l'environnement et comprennent des molécules de hautes valeurs pour différentes industries : molécules odorantes (géraniol, patchouli...), principes actifs contre le cancer (taxadiène) ou la malaria (artémisinine), pigments et antioxydants (caroténoïdes) ou encore caoutchoucs (**figure 26**) (*Flesch et Rohmer 1988 ; Dudareva et Pichersky 2000 ; Dudareva et al. 2004*).

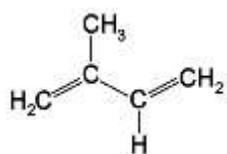


**Figure 25 | Sève de pin maritime (*Pinus pinaster*)** comprenant de nombreux monoterpènes ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -myrcène,  $\alpha$ -terpinolène), des sesquiterpènes ( $\alpha$ -humulène, *trans*-caryophyllène...) et autres diterpènes (*Lombartero et al. 2013*)

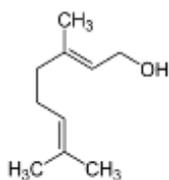
Ces molécules sont toutes constituées de sous-unités d'isoprène à 5 carbones ( $C_5H_8$ ) qui peuvent aller de 1 à 8 ou dans le cas des polyterpènes jusqu'à plusieurs milliers. La classification des classes de terpènes se fait d'ailleurs en fonction de ce nombre et on distingue donc les hémiterpènes, composés d'une unité d'isoprène ( $C_5H_8$ ) ; les monoterpènes de deux ( $C_{10}H_{16}$ ) ; les sesquiterpènes de trois ( $C_{15}H_{24}$ ) ; les diterpènes de quatre ( $C_{20}H_{32}$ ) ; les triterpènes de six ( $C_{30}H_{48}$ ) ; les tétraterpènes de huit ( $C_{40}H_{64}$ ) et enfin les polyterpènes ( $(C_5H_8)_n$ ) (*Banthorpe et al. 1972 ; Goodwin 1977 ; Spurgeon et Porter 1981 ; Gershenzon et Croteau 1993*).

La biosynthèse des terpénoïdes peut être subdivisée en quatre étapes clés successives : a) La formation des sous-unités isopentényl diphosphate (IPP) et diméthylallyl diphosphate (DMAPP) ; b) La formation par condensation des précurseurs, les prényl diphosphates ; c) La formation des terpènes et d) La formation des terpénoïdes par modifications du type dimérisation, cyclisation...

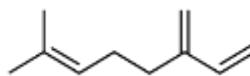
- Introduction -



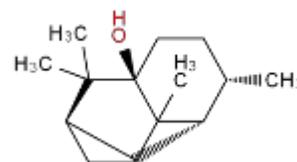
Isoprène (C5)  
hémiterpène



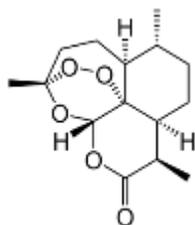
Géraniol (C10)  
monoterpène



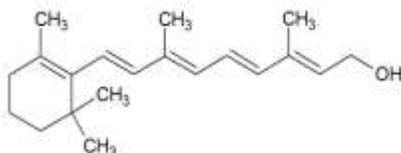
Myrcène (C10)  
monoterpène



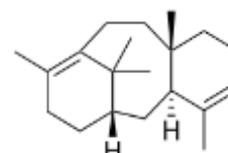
Patchouliol (C15)  
sesquiterpène



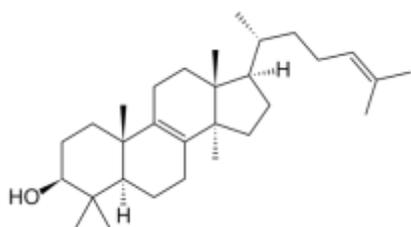
Artémisinine (C15)  
sesquiterpène



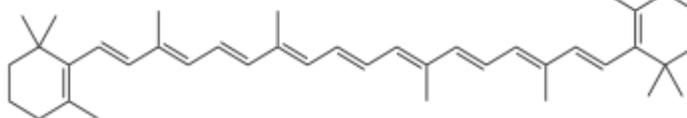
Rétinol ou Vitamine A (C20)  
diterpène



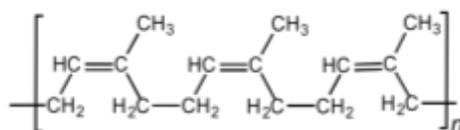
Taxadiène (précurseur du Taxol)  
(C20) diterpène



lanostérol (précurseur des  
stéroïdes) (C30) triterpène



β-carotène (C40)  
tétraterpène



caoutchouc naturel (C5)<sub>n</sub>  
polyterpène

Figure 26 | Exemples de structures de terpènes importants

### III.4.3.1 La formation de l'IPP et du DMAPP

Au début des recherches sur les isoprénoïdes, une seule voie de biosynthèse était connue pour la formation des monomères en C<sub>5</sub>, l'IPP et son isomère allylique le DMAPP. Cette voie de biosynthèse est la voie cytosolique de l'acide mévalonique (MVA<sup>21</sup>). Il est toutefois nécessaire de préciser ici que cette voie n'est pas uniquement cytosolique mais aurait lieu aussi, pour certaines étapes en tout cas, dans le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (*Simkin et al. 2011 ; Pulido et al. 2012*). La voie du MVA consiste en six réactions enzymatiques et commence par une condensation progressive de trois molécules d'acétyl-CoA en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA qui seront réduites par deux phosphorylations subséquentes et une décarboxylation/élimination pour donner l'IPP comme produit final (*Lange et al. 2000*). L'IPP est enfin converti en partie en DMAPP grâce à l'enzyme IPP isomérase (**figure 27**).

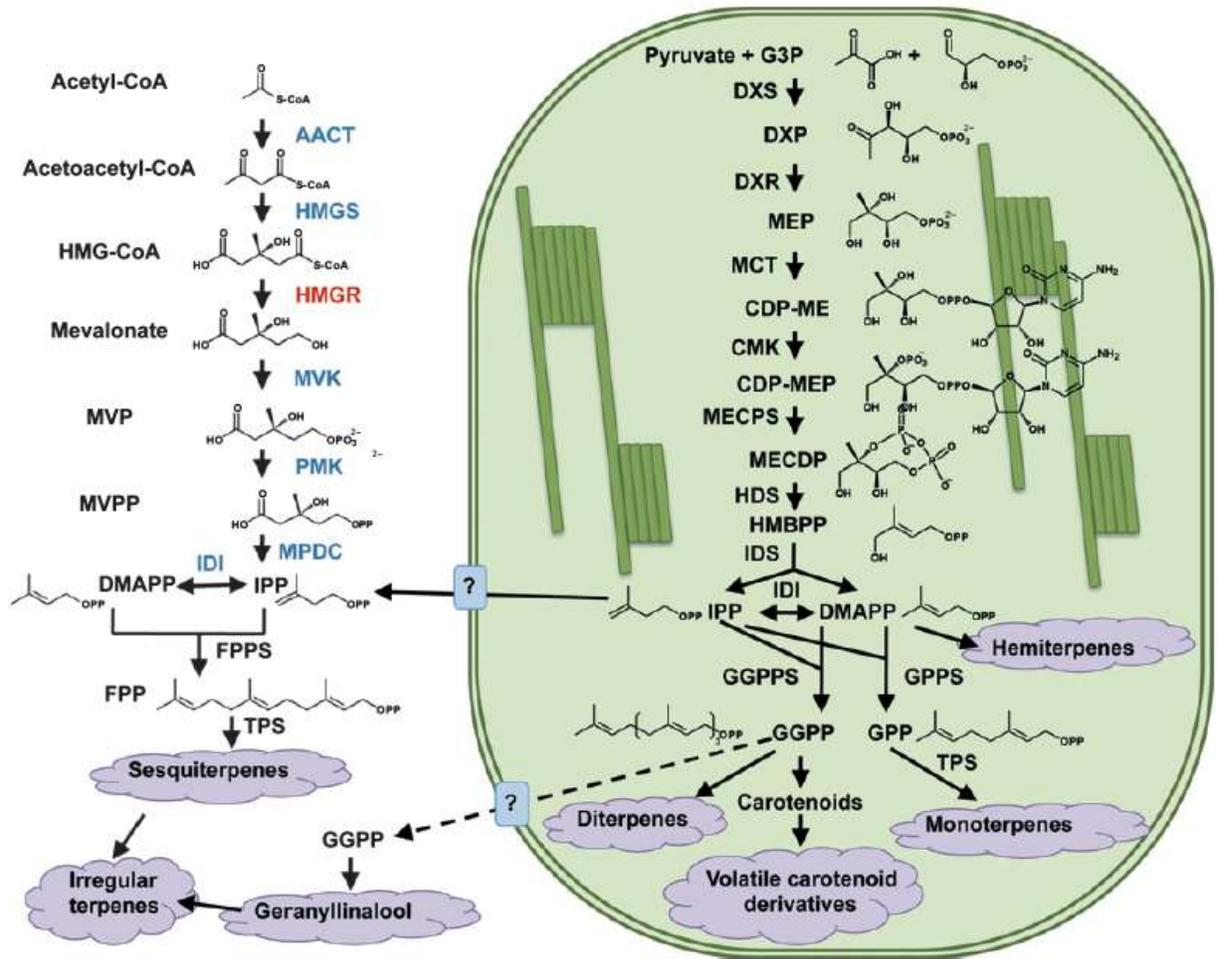
Au milieu des années 1990, une seconde voie de biosynthèse a été découverte chez les eubactéries, les algues vertes et les chloroplastes des plantes. Cette voie est la voie du méthylérythritol 4-phosphate (MEP<sup>22</sup>) (*Flesch et Rohmer 1988 ; Rohmer et al. 1993 ; Lichtenthaler et al. 1997*). Cette voie est plastidiale et produit simultanément de l'IPP et du DMAPP (*Rohdich et al. 2003*). La voie du MEP implique sept étapes enzymatiques et commence avec la condensation du GAP<sup>23</sup> et du pyruvate pour produire le 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate, lequel est ensuite soumis à une isomérisation/réduction avec la formation de l'intermédiaire caractéristique, le MEP. Cinq étapes consécutives sont ensuite nécessaires pour convertir le MEP en IPP et DMAPP. Le GAP et le Pyruvate sont des molécules venant directement du métabolisme primaire. A l'heure actuelle, l'origine du pyruvate dans les chloroplastes est mal expliquée. En effet, l'activité des enzymes clés comme la phosphoglycérate mutase et l'é nolase est faible et ces enzymes ne devraient pas être en mesure de fournir assez de pyruvate pour la production des isoprénoïdes (*Andriotis et al. 2010 ; Joyard et al. 2010 ; Bayer et al. 2011*). Alors que la voie du MVA ne produit que de l'IPP, la voie du MEP produit directement de l'IPP et du DMAPP, dans un ratio de 6 : 1 (*Rohdich et al. 2003*).

---

<sup>21</sup> MVA pour Mevalonic acid pathway

<sup>22</sup> MEP pour Methylerythritol 4-phosphate

<sup>23</sup> GAP pour D-glyceraldehyde 3-phosphate



**Figure 27 | Synthèse des COV du groupe des terpénoïdes** (d'après Dudareva et al. 2012). Les terpénoïdes sont synthétisés via la voie cytosolique de l'acide mévalonique (MVA) et via la voie plastidiale du méthylérythritol phosphate (MEP). La première voie donne les sesquiterpènes, les terpènes irréguliers et le géranylinalool. La deuxième voie donne les monoterpènes, les hémiterpènes, les diterpènes et les dérivés volatils des caroténoïdes. Des croisements entre les deux voies sont facilités par l'exportation de l'isopentényl diphosphate (IPP) du plaste vers le cytosol. Les flèches continues représentent des étapes de biosynthèse bien établies alors que les flèches en pointillés pointent des étapes hypothétiques. Les terpénoïdes volatils sont soulignés au moyen d'un fond gris. Les enzymes en bleu sont localisées dans le peroxyssome et celle en rouge est localisée dans le réticulum endoplasmique. AACT, acétyl-CoA acétyltransférase; CDP-ME, 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol; CDP-MEP, CDPME 2-phosphate; CMK, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase; DMAPP, diméthylallyl pyrophosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5- phosphate; DXS, DXP synthase; DXR, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase; FPP, farnésyl diphosphate; FPPS, FPP synthase; G3P, glycéraldéhyde 3-phosphate; GGPP, géranylgéranyl diphosphate; GGPPS, GGPP synthase; GPP, géranyl diphosphate; GPPS, GPP synthase; HDS, 4-hydroxy-3-méthylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase; HMBPP, (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-en-1-yl diphosphate; HMG-CoA, hydroxyméthylglutaryl-CoA; HMGR, HMG-CoA réductase; HMGS, HMG-CoA synthase; IDI, isopentényl diphosphate isomérase; IDS, isopentényl diphosphate synthase; IPP, isopentényl pyrophosphate; MCT, 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidilyltransferase; MECDP, 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate; MECPS, MECDP synthase; MVK, mévalonate kinase; MPDC, mévalonate diphosphate décarboxylase; MVP, mévalonate 5-phosphate; MVPP, mévalonate 5-diphosphate; PMK, phosphomévalonate kinase; TPS, terpène synthase.

Nous l'avons vu, les deux voies du MVA (cytosol, RE, peroxysomes) et du MEP (chloroplastes) sont localisées dans des compartiments différents et responsables de la synthèse de classes de terpènes différentes (Pulido et al. 2012 ; Vranova et al. 2012). La voie du MVA conduit à l'obtention des sesquiterpènes et des triterpènes alors que la voie du MEP synthétise les hémiterpènes, les monoterpènes, quelques sesquiterpènes (Sallaud et al. 2009), les diterpènes et les tétraterpènes. Cependant, même si ces deux voies de biosynthèse sont théoriquement indépendantes, des connexions existent et permettent à la voie du MEP, souvent plus productive, de supporter en flux de carbone la voie du MVA pour la synthèse de terpènes dans le cytosol (Paetzold et al. 2010, Flores-Perez et al. 2010 ; Ward et al. 2011). C'est notamment le cas par le transport d'IPP du chloroplaste vers le cytosol (Laule et al. 2003, Schuhr et al. 2003). Il faut noter qu'à ce jour, les transporteurs ne sont toujours pas connus. La preuve en a été apportée par une expérience utilisant deux inhibiteurs, la lovastatine (pour la voie du MVA) et la fosmidomycine (pour la voie du MEP). Avec la lovastatine, la quantité de stérols a chuté drastiquement au début puis est remontée progressivement au niveau de l'échantillon contrôle, preuve que de l'IPP est passé du chloroplaste où la voie de biosynthèse fonctionnait normalement vers le cytosol où il n'était plus produit. Pour la fosmidomycine, tous les métabolites étaient en proportion plus faible (stérols, caroténoïdes, chlorophylle...). Les niveaux d'expression des gènes impliqués n'ont pas été affectés, ce qui laisse penser que les modifications post-transcriptionnelles pourraient jouer un rôle important dans la régulation du flux de métabolites de la voie des isoprénoïdes (Laule et al. 2003).

**Tableau 2 : Répartition des voies du MVA et du MEP dans les organismes**

	MVA	MEP
<b>Animaux</b>	+	-
<b>Plantes</b>	+	+
<b>Champignons</b>	+	-
<b>Eubactéries (la plupart)</b>	-	+
<b>Algues vertes</b>	-	+
<b>Archaea</b>	partiel	-

Le **tableau 2** montre que seules les plantes possèdent les deux voies. En effet, elles ont acquis aussi la voie du MEP lors de l'endosymbiose des eubactéries. Il est aussi très étonnant de constater que les algues vertes n'ont pas la voie du MVA alors que les plantes l'ont, peut-être l'ont-elles perdue... De plus, la plupart des Archaea ont perdu les 2 dernières étapes enzymatiques de la voie du MVA. Chez les Archaea, il existe une voie de substitution impliquant une MPD<sup>24</sup> transformant le MVAP<sup>25</sup> en IP<sup>26</sup> puis une

<sup>24</sup> MPD pour Phosphomevalonate decarboxylase

IPK<sup>27</sup> donnant de l'IPP (*Vannice et al. 2014*). Cette nouvelle voie permettrait aussi d'augmenter la production en terpènes car l'IPK augmenterait la formation d'IPP en réinjectant dans la voie de biosynthèse des terpènes le réservoir non-utilisé des IP/DMAP. Ceci pourrait être une piste sérieuse pour l'amélioration végétale en dopant potentiellement la voie du MEP (*Henry et al. 2015*). Cette hypothèse présuppose des voies de passage dans les deux sens de l'IPP entre le cytosol et le plaste (**Figure 28**).

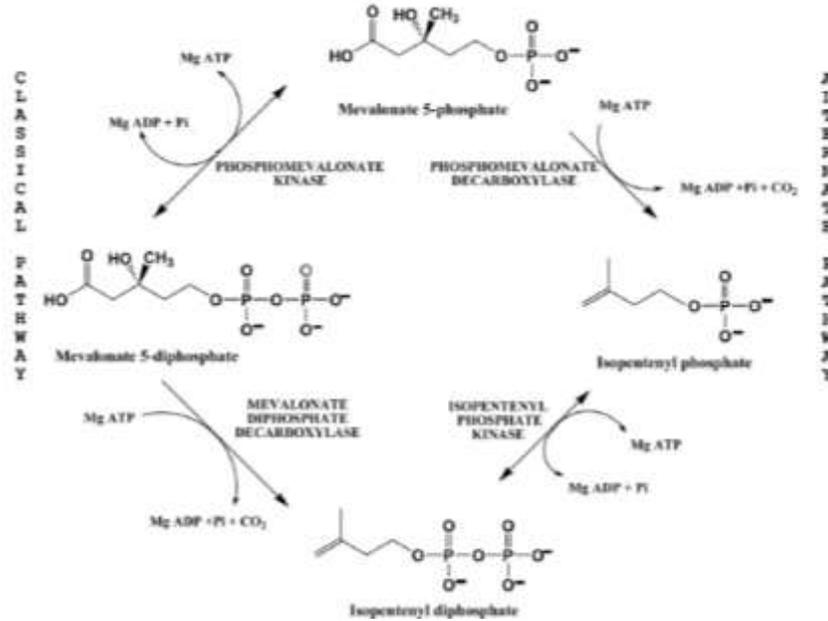


Figure 28 | Voies classiques et alternatives pour la synthèse d'IPP chez les Archaea.

Les enzymes clés : La DXS, la DXR et l'IPP isomérase

Les deux premières enzymes sont importantes puisqu'elles sont potentiellement les enzymes limitantes pour la synthèse de l'IPP.

**La DXS<sup>28</sup> ou DXP synthase** produit du DXP<sup>29</sup> par la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate. Le DXP est non seulement un intermédiaire dans la voie du MEP mais également un intermédiaire des voies de synthèse de la thiamine (vitamine B1) (*Julliard et Douce 1991*) et du pyridoxol (vitamine B6) (*Hill et al. 1989*).

<sup>25</sup> MVAP pour Mevalonate 5-phosphate

<sup>26</sup> IP pour Isopentényl phosphate

<sup>27</sup> IPK pour Isopentényl phosphate kinase

<sup>28</sup> DXS pour 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase

<sup>29</sup> DXP pour 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate

La DXR<sup>30</sup> catalyse la première étape spécifique de la voie conduisant aux terpènes. Celle-ci permet un réarrangement intramoléculaire du DXP pour donner le composé intermédiaire MEP par un processus de réduction aspécifique (Takahashi et al. 1998). Les cyanobactéries, à l'origine des chloroplastes des cellules végétales auraient donc, via l'endosymbiose primaire, apporté aux plantes la synthèse des isoprénoïdes par la voie du MEP. La recherche du gène *Dxr* chez les plantes a été initiée chez *Arabidopsis thaliana* en comparant les séquences végétales qui présentaient des similitudes avec la DXR d'*E. coli* déjà caractérisée (Schwender et al. 1999). Ainsi, la recherche de nouveaux gènes dans les espèces végétales procède souvent par homologie comme nous l'avons d'ailleurs fait lors de cette thèse. Les DXR de plantes ont une séquence d'adressage aux plastes située en position N-terminale (Lange et Croteau 1999). La fusion avec la GFP a permis de démontrer que la DXR était bien importée dans les plastes des feuilles chez *A. thaliana*. Rajoutons encore que la DXR est bien exprimée dans la plupart des organes avec un niveau d'expression néanmoins plus important dans les germinations et les inflorescences (Carretero-Paulet et al. 2002). Ces enzymes très en amont de la synthèse des terpènes sont néanmoins très importantes puisqu'elles régulent la synthèse des précurseurs des terpènes. De nombreux auteurs ont tenté de comprendre quelles enzymes régulaient la voie du MEP. Des exemples de manipulations de ces gènes chez la tomate et la menthe seront donnés dans le paragraphe concernant les biotechnologies puisque leur manipulation constitue une des approches possibles pour augmenter la production de métabolites secondaires.

L'IDI<sup>31</sup> est très importante à la fois pour la voie du MEP et la voie du MVA puisqu'elle catalyse la formation de l'isomère DMAPP à partir de l'IPP. Cette réaction se déroule aussi bien dans le cytosol que dans le plaste. Elle a été caractérisée chez de nombreuses espèces, notamment chez *Clarkia breweri* pour la première fois (Blanc et Pichersky 1995). Puisqu'elle fonctionne dans plusieurs compartiments, il est donc normal de trouver plusieurs cDNAs de cette enzyme pour une même espèce codant des isoformes se répartissant entre les compartiments cellulaires comme le cytosol ou le plaste, le peroxyosome et la mitochondrie (Phillips et al. 2008, Guirimand et al. 2012). Lors de stress environnementaux, ces isoformes sont induites de façon différente, montrant bien que la plante s'adapte à chaque stress subi (Nakamura et al. 2001).

---

<sup>30</sup> DXR pour 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase

<sup>31</sup> IDI pour Isopentényl diphosphate isomérase

### III.4.3.2 La formation des prényl diphosphates

Dans une seconde phase, une fois l'IPP et le DMAPP produits par les voies du MVA et du MEP, ceux-ci sont assemblés par condensation suivant la « règle d'isoprène » découverte par Wallach en 1887, c'est-à-dire de façon tête-bêche. Sous l'action de plusieurs prényltransférases, ils forment ainsi des chaînes de longueurs différentes appelées prényl diphosphates. Ainsi une molécule d'IPP viendra se condenser sur une molécule de DMAPP pour donner le GPP<sup>32</sup>, une autre molécule supplémentaire d'IPP qui se condense sur une molécule de GPP donnera le FPP<sup>33</sup> et enfin une dernière molécule d'IPP se condensera sur le FPP pour donner le GGPP<sup>34</sup> (figure 29) (Dudareva et al. 2004). D'autres prényl transférases entreront en jeu pour la production de polyterpènes dans le réticulum endoplasmique (Bouvier et al. 2005) mais ces molécules n'étant pas volatiles, je ne détaillerai pas ces mécanismes. Ces enzymes ont été caractérisées chez plusieurs plantes aromatiques et médicinales et quelques exemples sont présentés dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3 | Caractérisation des enzymes GPPS, FPPS et GGPPS chez les plantes

	Plante	Références
GPPS	Vigne ( <i>Vitis vinifera</i> )	Feron et al. 1990 ; Soler et al. 1992
	Arabette ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Bouvier et al. 2000
	Menthe ( <i>Mentha x piperita</i> )	Burke et al. 1999
	Sapin ( <i>Abies grandis</i> )	Burke et Croteau 2002
	Sauge ( <i>Clarkia breweri</i> )	Tholl et al. 2004
FPPS	Poivron ( <i>Capsicum annuum</i> )	Hugueney et Camara 1990
	Maïs ( <i>Zea mais</i> )	Li et Larkins 1996
	Houblon ( <i>Humulus lupulus</i> )	Attucci et al. 1995
	Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Gaffe et al. 2000
GGPPS	Poivrons ( <i>Capsicum annuum</i> )	Dogbo et Camara 1987
	Ginkgo ( <i>Ginkgo biloba</i> )	Liao et al. 2004
	If ( <i>Taxus canadensis</i> )	Hefner et al. 1998
	Houblon ( <i>Humulus lupus</i> )	Wang et Dixon 2009

<sup>32</sup> GPP pour Géranyl diphosphate

<sup>33</sup> FPP pour Farnésyl diphosphate

<sup>34</sup> GGPP pour Géranylgéranyl diphosphate

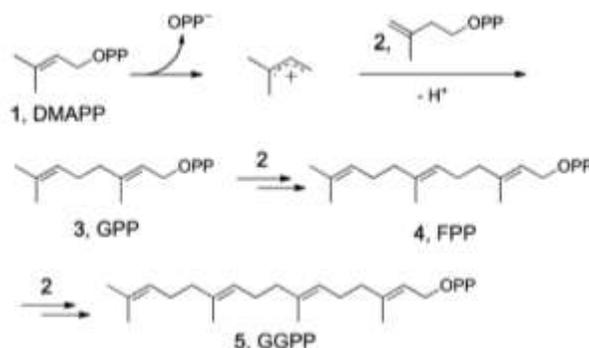
### Les enzymes clés : les prényltransférases

Il existe donc trois types de prényltransférases qui catalysent ces réactions de condensation des précurseurs :

\* La GPPS<sup>35</sup> permet d'obtenir un squelette en C10, le GPP, précurseur des monoterpènes. La GPPS se localise dans le stroma des plastes (Kuntz *et al.* 1992) ou sur les membranes tubuleuses des chloroplastes comme la GGPPS (Turner *et Croteau* 2004).

\* La FPPS<sup>36</sup> permet d'obtenir un squelette en C15, le FPP, précurseur des sesquiterpènes ainsi que des triterpènes en C30 (brassinostéroïdes, phytostérol...) après condensation de deux molécules de FPP. La FPPS se situe dans le cytosol (Feron *et al.* 1990).

\* La GGPPS<sup>37</sup> permet d'obtenir un squelette en C20, le GGPP, précurseur des diterpènes (gibbérélines, tocophérol...) ainsi que des tetraterpènes en C40 (caroténoïdes...) après condensation de deux molécules de GGPP.



**Figure 29 | Mécanisme du carbocation pour la synthèse des GPP, FPP et GGPP (d'après Oldfield et Lin 2012) 1 : DMAPP; 2 : IPP; 3 : GPP; 4 : FPP; 5 :GGPP**

Certaines de ces enzymes sont localisées dans des compartiments non canoniques. Ainsi chez *Lithospermum erythrorhizon*, Il existe une GPPS dans le cytosol qui serait liée à la synthèse d'un pigment rouge dont le précurseur serait le géranol (Sommer *et al.* 1995). A l'inverse, la FPPS a aussi été localisée dans le chloroplaste chez le riz (Sanmiya *et al.* 1999). Certaines des enzymes se retrouvent dans les deux compartiments comme chez *Lippia dulcis* (Dong *et al.* 2013).

<sup>35</sup> GPPS pour Géranyl diphosphate synthase

<sup>36</sup> FPPS pour Farnésyl diphosphate synthase

<sup>37</sup> GGPPS pour Géranylgeranyl diphosphate synthase

La GPPS de *Pelargonium roseum* a été l'une des premières à être purifiée (Suga et Endo 1991). La comparaison des séquences des différentes prényltransférases a mis en évidence l'existence de deux domaines bien conservés et riches en résidus aspartate (DD(X)<sub>2-4</sub>D, X représentant n'importe quel acide aminé (aa)) (Chen et al. 1994). Des expériences de mutagenèse dirigée dans ces domaines montrent que ces aspartates sont essentiels pour catalyser la réaction (Song et Poulter 1994). La mutagenèse des aa autour du premier DD(X)<sub>2-4</sub>D permet de changer la sélectivité et de convertir une GGPPS en une FPPS (Sitthithaworn et al. 2001). Ce motif sera d'ailleurs retrouvé dans les terpène synthases. Les résidus aspartate liaient l'IPP par son groupement diphosphate et le substrat allylique par l'intermédiaire d'un pont magnésium. Certaines prényltransférases sont capables de synthétiser plusieurs produits comme du GPP et du FPP chez une orchidée (Hsiao et al. 2008), du GPP et du GGPP chez le houblon (Wang et Dixon 2009) et enfin du FPP et du GGPP chez le maïs (Cervantes-Cervantes et al. 2006).

Des séquences de GPPS ont été caractérisées chez plusieurs organismes et ont abouti à la séparation des GPPS en deux groupes distincts :

- La forme hétérodi- ou hétérotétramérique chez *Mentha x piperita* (Burke et al. 2004) et chez *Antirrhinum majus* (Tholl et al. 2004).
- La forme homodimérique chez *Arabidopsis thaliana* (Bouvier et al. 2000) et *Abies grandis* (Burke et Croteau 2002).

Cependant, chez *A. thaliana*, une forme hétérodimérique a récemment été découverte et il a été montré que l'enzyme caractérisée initialement comme une GPPS homodimérique agissait en fait sur des substrats à plus longues chaînes (C<sub>20</sub> à C<sub>45</sub>) (Hsieh et al., 2011).

De plus, certaines plantes comme *Salvia miltiorrhiza* possèdent les 2 types d'enzyme (Ma et al. 2012). Enfin, la FPPS peut se trouver sous plusieurs isoformes chez la même espèce, ce qui lui permet d'être localisée dans différents tissus (Attucci et al. 1995, Li et Larkins 1996, Cunillera et al. 1996, Ma et al. 2012).

Jusqu'à récemment, seules les réactions impliquant les isomères (E) des GPP, FPP et GGPP avaient été décrites. Ce n'est plus le cas puisque de nouvelles voies de synthèse ont été mises en évidence. Ainsi chez la tomate, certaines enzymes sont capables de synthétiser du Z,Z-farnésyl diphosphate (Z,Z-FPP) (Sallaud et al. 2009) et du néryl diphosphate, l'isomère (Z) du GPP (Schillmiller et al. 2009). Des terpène

synthèses utilisant ces substrats ont aussi été caractérisées, montrant bien l'existence d'une nouvelle voie métabolique. Il est à noter que la sesquiterpène synthase utilisant le Z,Z-FPP fonctionnerait dans le plaste et non dans le cytosol (figure 30).

### III.4.3.3 La formation des terpènes

La troisième phase de la voie de biosynthèse de terpénoïdes implique la conversion des prényl diphosphates DMAPP, GPP, FPP et GGPP en terpènes acycliques, mono- ou polycycliques. Cette étape est prise en charge par une large famille d'enzymes connues sous le nom de terpène synthases ou TPS<sup>38</sup> (Cane 1999 ; Wise et Croteau 1999). Celles qui catalysent la réaction à partir du GPP pour donner les monoterpènes (C10) s'appellent les MTPS<sup>39</sup>, elles sont nommées STPS<sup>40</sup> quand elles produisent des sesquiterpènes à partir du FPP et enfin des DTPS<sup>41</sup> lorsque le substrat est le GGPP et les produits des diterpènes (figure 30).

La diversité des terpènes est immense puisque l'on compte des centaines de monoterpènes (Dewick 1999), de sesquiterpènes (Fraga 2007) et de diterpènes (Hanson 2000) volatils. Cette très grande diversité de composés terpéniques produits par les plantes présuppose une grande variété d'enzymes de synthèse. Cette richesse s'explique par le grand nombre de TPS différentes mais aussi parce que beaucoup d'entre elles produisent de multiples produits à partir d'un unique substrat (Degenhardt et al. 2009). La connaissance de cette étape clé est donc primordiale et cette thèse ayant comme objectif la caractérisation des terpène synthases impliquées dans les voies de biosynthèse de l'HE chez *Pelargonium*, il me semble très important d'approfondir cette partie.

Etant donné leur importance, les terpène synthases font l'objet de nombreuses recherches et un grand nombre d'enzymes a été caractérisé, aussi bien dans les fleurs que dans les feuilles ou encore dans les racines (annexe 16 et 17).

---

<sup>38</sup> TPS pour Terpène synthases

<sup>39</sup> MTPS pour Monoterpène synthase

<sup>40</sup> STPS pour Sesquiterpène synthases

<sup>41</sup> DTPS pour Diterpène synthases

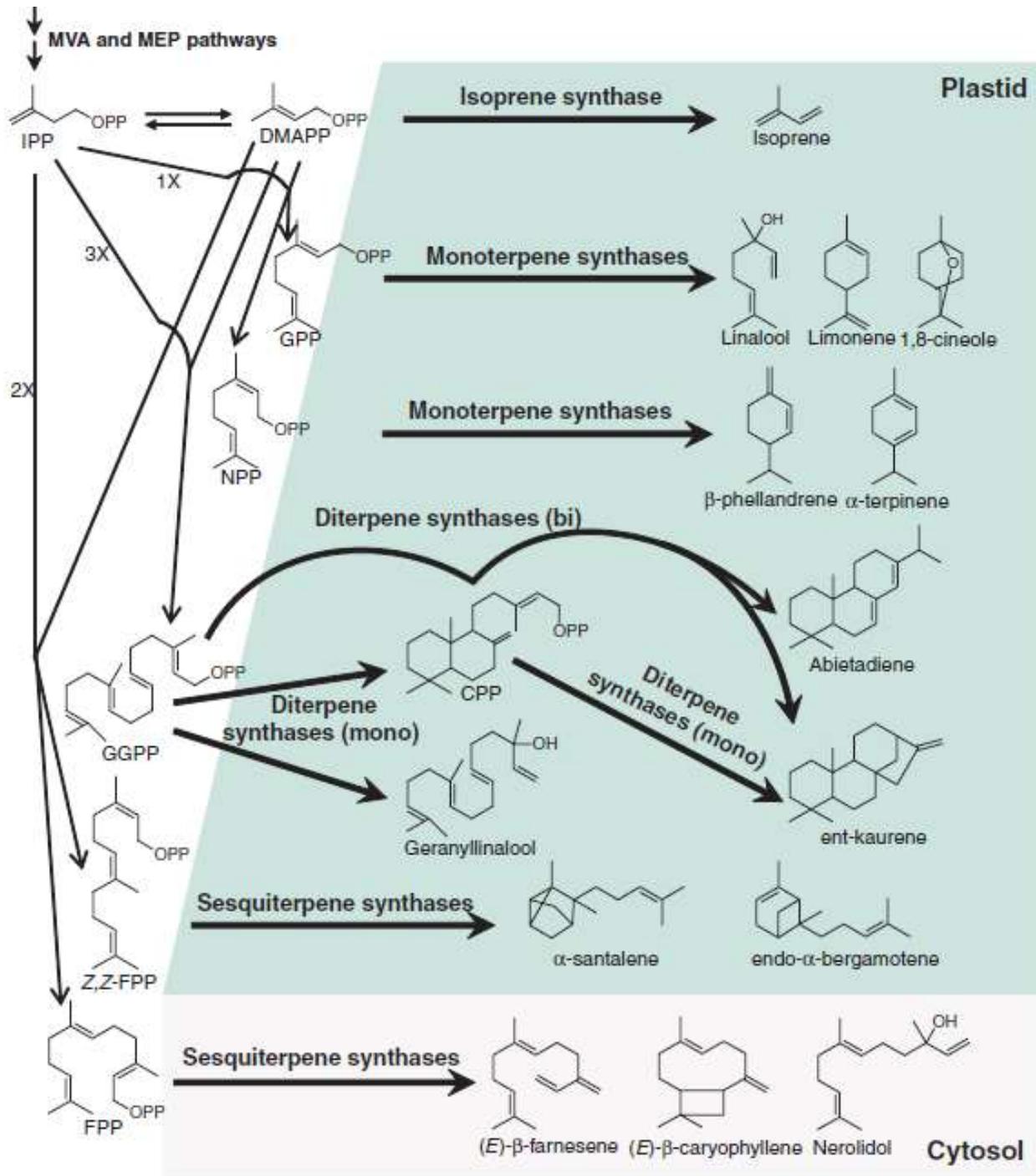
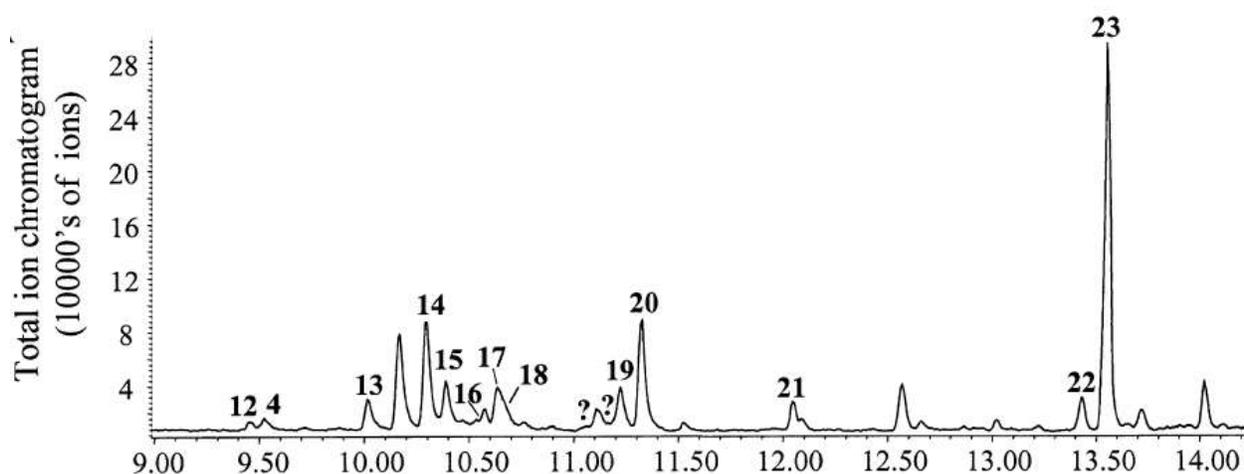


Figure 30 | Schéma de la formation des terpénoïdes catalysée par les différents types de terpène synthases (d'après Chen et al. 2011).

### Les enzymes clés : Les terpène synthases

En plus de la synthèse de leur produit principal, presque la moitié des MTPS et STPS caractérisées produisent une quantité importante d'autres produits (représentant au moins 10% du total des molécules) quand elles sont exprimées *in vitro* (Degenhardt et al. 2009). Par exemple, une seule STPS est responsable chez le patchouli d'une douzaine de sesquiterpènes, représentant la majeure partie de l'HE (Deguerry et al. 2006) (figure 31). Chez *A. thaliana*, une myrcène/ocimène synthase a été caractérisée comme produisant 56% de myrcène, 20% de E- $\beta$ -ocimène et 5% d'autres monoterpènes cycliques (Bohlman et al. 2000, Tholl et al. 2005). Cette multitude de produits est souvent expliquée par le mécanisme de formation des terpènes, avec l'intervention d'un intermédiaire très réactif, le carbocation (figure 32).

Il faut aussi noter que certaines TPS sont bifonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles peuvent accepter du GPP ou du FPP et donner soit un monoterpène, soit un sesquiterpène. Chez la fraise cultivée (*Fragaria* sp), la nérolidol synthase produit du nérolidol à partir du FPP alors qu'elle peut produire du linalol avec du GPP (Aharoni et al. 2004). Chez le muflier, une isoforme est localisée dans le cytosol et produit du nérolidol à partir du FPP alors que la deuxième isoforme, localisée dans le plaste, produit du linalol à partir du GPP (Nagegowda et al. 2008). Il est donc nécessaire de tester l'activité enzymatique des TPS avec les 3 précurseurs possibles, GPP, FPP et GGPP.



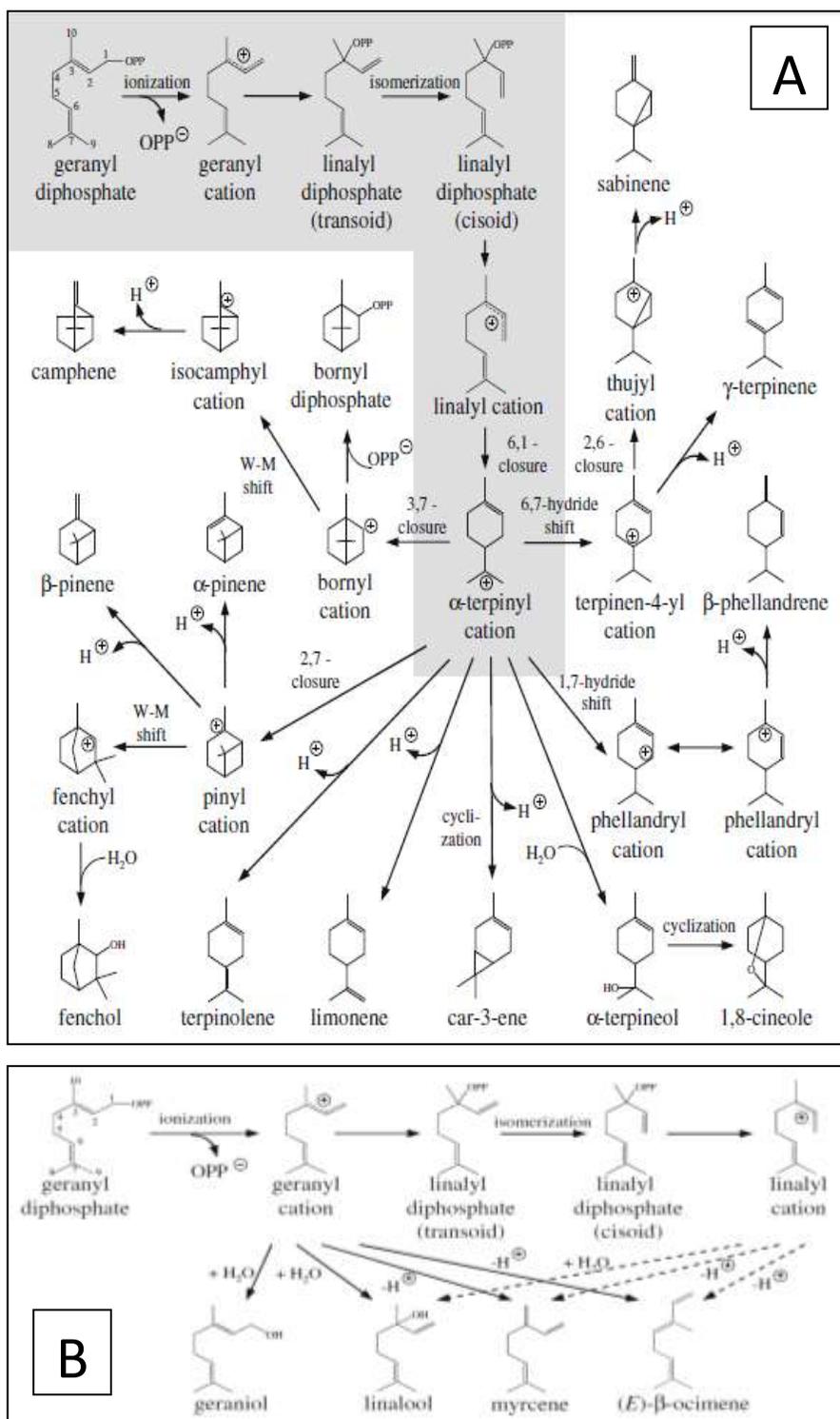
**Figure 31 | Analyse GC-MS des sesquiterpènes générés par l'activité de la patchouli synthase de *Pogostemon cablin* (d'après Deguerry et al. 2006).** Les pics marqués d'un numéro ont été identifiés comme des sesquiterpènes. Les pics marqués d'un point d'interrogation sont des sesquiterpènes non-identifiés. (12)  $\beta$ -patchoulène; (4)  $\beta$ -élémyène; (13) trans- $\beta$ -caryophyllène; (14)  $\alpha$ -guaïène; (15) seychellène; (16)  $\alpha$ -humulène; (17)  $\alpha$ -patchoulène; (18)  $\gamma$ -patchoulène; (19) 4,11 – guaidiène; (20)  $\alpha$ -bulnescène; (21) nérolidol; (22) (-)-pogostol; (23) (-)-patchoulol.

Comme mentionné ci-dessus, les MTPS, DTPS et STPS ne sont pas localisées dans les mêmes compartiments cellulaires. Les MTPS et les DTPS ont toutes un peptide d'adressage aux plastes ou aux mitochondries puisqu'elles doivent être transportées de la surface du RE où elles sont synthétisées jusque dans les chloroplastes, mitochondries, où elles seront fonctionnelles. Les séquences d'ADNc des MTPS seront donc légèrement plus longues (~1800 pbs) que les séquences des STPS (~1600 pbs).

Les TPS ne sont pas toutes exprimées dans tous les organes et la régulation peut même être très fine puisque chez *Arabidopsis thaliana* des expressions différentes existent au sein même de la fleur. En effet, une STPS produisant du E- $\beta$ -caryophyllène, de l' $\alpha$ -humulène, de l' $\alpha$ -copaène et du  $\beta$ -élémane sera exprimée dans les stigmates (Chen et al. 2003) alors qu'une deuxième STPS produisant environ 15 sesquiterpènes sera, elle, exprimée dans les nectaires (Tholl et al. 2005).

### Mécanismes de réaction

Les TPS sont assez similaires dans leurs propriétés physiques et chimiques. En effet, elles nécessitent toutes la présence d'un ion métallique divalent comme cofacteur de la catalyse et toutes opèrent suivant des mécanismes électrophiles inhabituels (Trapp et Croteau 2001). Tous les mécanismes réactionnels des MTPS commencent par l'ionisation du substrat GPP (figure 32). Le carbocation résultant peut être soumis à une cyclisation, un réarrangement ou un changement structural avant que la réaction ne se termine par l'absorption d'une molécule d'eau ou une déprotonation. La formation des monoterpènes cycliques requiert premièrement une isomérisation du cation géranyle pour donner un cation linalyle qui sera capable de se cycliser. La production initiale de l'espèce cyclique, le cation  $\alpha$ -terpinyle, ouvre les portes pour une seconde cyclisation. Dans la figure 32, la voie menant jusqu'au cation  $\alpha$ -terpinyle est soulignée en gris et les réactions conduisant à la formation des principaux produits des monoterpène synthèses caractérisées sont illustrées. La formation des monoterpènes acycliques comme le linalol, le myrcène et le (E)- $\beta$ -ocimène passent soit par le cation géranyle soit par le cation linalyle (Degenhardt et al. 2009).



**Figure 32 | Mécanismes de réaction des monoterpène synthases (d'après Degenhardt et al. 2009).**

A – Mécanismes pour les monoterpènes cycliques. B – Mécanismes pour les monoterpènes acycliques. La voie menant jusqu'au cation α-terpinyle est soulignée en gris et les réactions conduisant à la formation des principaux produits des monoterpène synthases caractérisées sont illustrées.

## Les classes de TPS

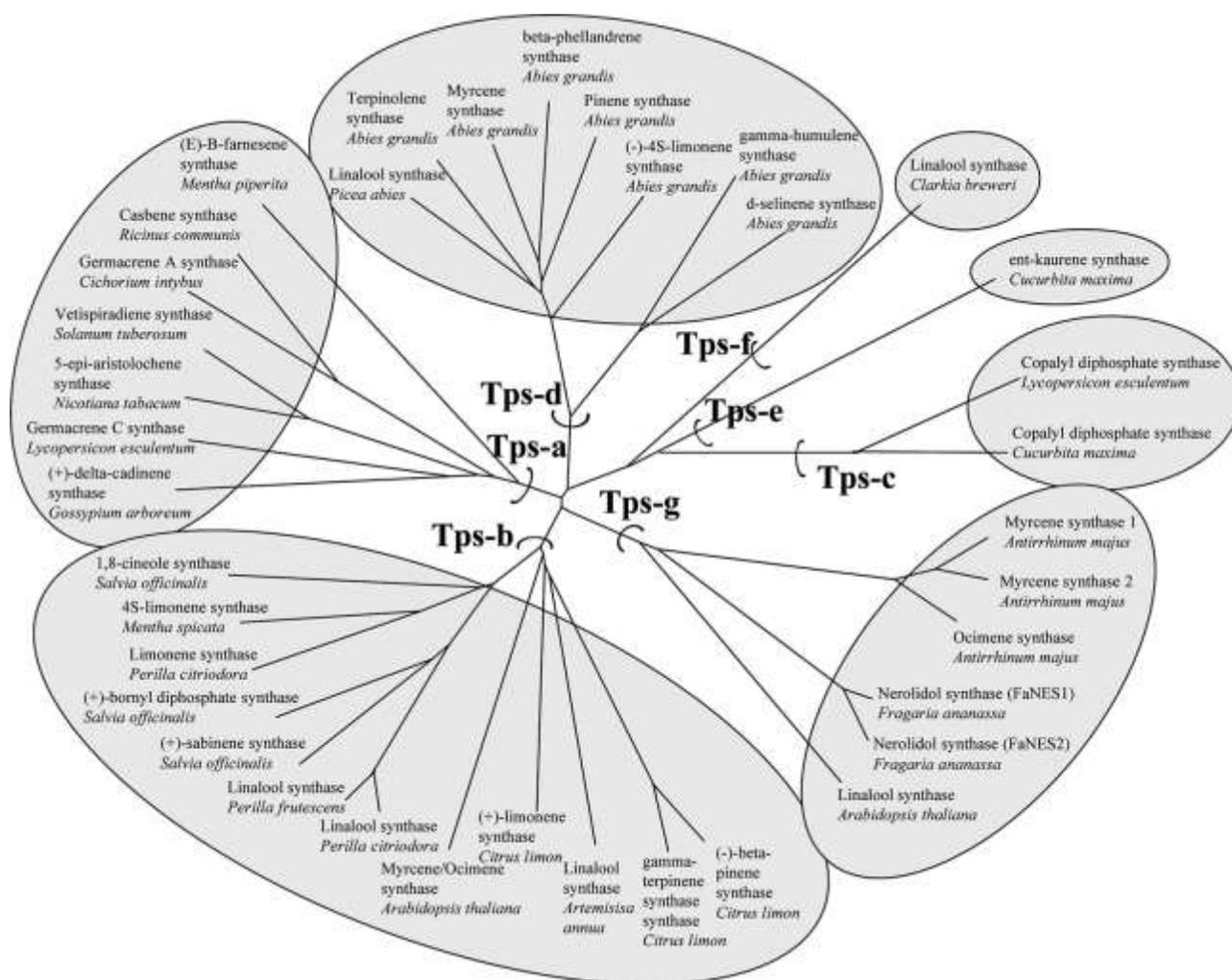
Basée sur la phylogénie et les fonctions des TPS connues à ce jour, la classification des TPS reconnaît sept familles bien distinctes et est résumée dans le **tableau 4** et la **figure 33** ci-dessous. Il a été montré que tous les gènes des TPS proviennent d'un gène prototype de type CS/KS<sup>42</sup> (Chen et al. 2011). La sous-famille des TPS-c est la plus conservée parmi les plantes terrestres, celle des TPS-e/f est conservée au sein des plantes vasculaires, la sous-famille TPS-d est spécifique des gymnospermes alors que les trois sous-familles TPS-b, TPS-g et TPS-a sont spécifiques des angiospermes. Précisons encore que la sous-famille des TPS-a est subdivisée en deux groupes qui séparent les dicotylédones des monocotylédones. La dernière sous-famille apparue dans la classification des TPS est la TPS-h qui est spécifique de *Selaginella moellendorffii*.

**Tableau 4 | Fonction et distribution taxonomique des sous-familles des TPS des plantes (d'après Chen et al. 2011)**

Sous-famille	Groupes	Fonctions	Distribution
TPS-a	TPS-a-1	STPS	Dicotylédones
	TPS-a-2	STPS	Monocotylédones
TPS-b		MTPS, IspS	Angiospermes
TPS-c		CPS/KS, CPS, autres DTPS	Plantes terrestres
TPS-d	TPS-d-1	TPS, STPS	Gymnospermes
	TPS-d-2	STPS	Gymnospermes
	TPS-d-3	DTPS, STPS	Gymnospermes
TPS-e/f		KS, autres DTPS, MTPS, STPS	Plantes vasculaires
TPS-g		MTPS, STPS, DTPS	Angiospermes
TPS-h		DTPS potentielle bifonctionnelle	<i>Selaginella moellendorffii</i>

CPS, copalyl diphosphate synthase ; DTPS, diterpène synthase ; IspS, isoprène synthase ; KS, kaurène synthase ; MTPS, monoterpène synthase ; STPS, sesquiterpène synthase ;

<sup>42</sup> CS/KS pour Copalyl synthase/kaurène synthase

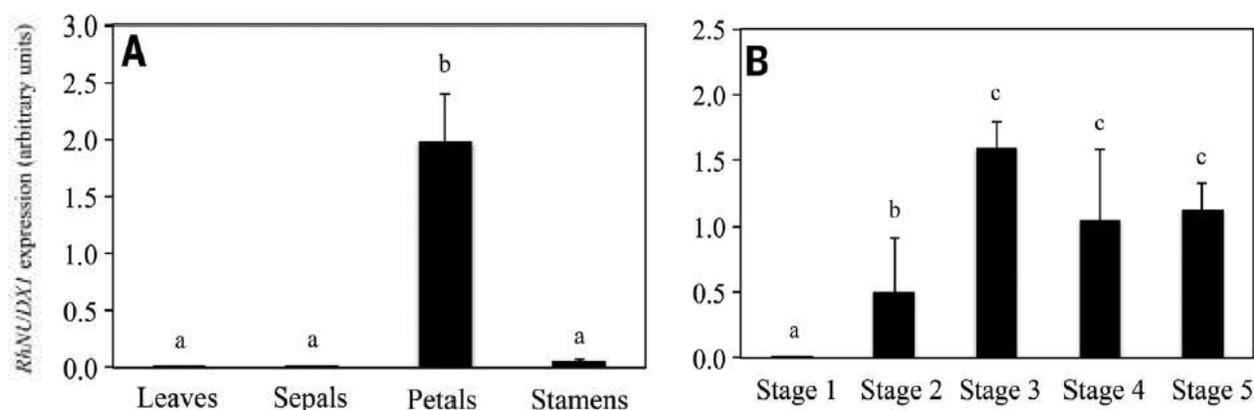


**Figure 33 | Arbre phylogénétique illustrant les relations entre différentes terpène synthases (d'après Dudareva et al. 2006).** Les sous-familles sont divisées en fonction des analyses phylogéniques. Les analyses de séquences ont été réalisées grâce au logiciel CLUSTAL X et la méthode des plus proches voisins qui a été utilisée (Neighbour Joining). A noter que dans la dernière classification (Chen et al. 2011), les sous-familles e et f sont rassemblées et une nouvelle sous-famille h est définie.

### La régulation des enzymes des voies de biosynthèse des terpènes

Comme déjà évoqué au paragraphe III.2.2, l'émission du parfum des plantes dépend de nombreux facteurs internes et externes. Ceci a des conséquences importantes pour la récolte des organes pour la production d'HE. Ainsi, au petit matin dans les champs de jasmin, l'odeur est très puissante, presque entêtante, alors qu'elle s'estompe au cours de la journée. Pour la rose, il est crucial de récolter la fleur au bon stade de développement, ni trop tôt (bouton), ni trop tard (fleur épanouie) sous peine d'avoir un très mauvais rendement lors de la distillation. Chez de nombreuses espèces végétales, l'émission des COV au cours de la journée suit un rythme cyclique. Ce rythme est contrôlé par des facteurs exogènes, comme la lumière et la température (*Jakobsen et Olsen 1994*) ou par des facteurs endogènes (*Loughrin et al. 1991 ; Helsper et al. 1998*) ou par une combinaison des deux (*McTavish et al. 2000*). Ainsi, par exemple, l'émission diurne des COV est contrôlée par un rythme circadien chez *A. majus* (*Dudareva et al. 2000*).

Toutes ces observations sont à mettre en relation avec le fait que les enzymes des voies de biosynthèse ne s'expriment pas de façon uniforme et sont régulées par de nombreux paramètres. Par exemple, les boutons de jasmin sont dépourvus de parfum mais cependant tous les précurseurs sont bien présents puisqu'en les traitant avec un extrait d'enzymes de fleurs épanouies, nous obtenons bien les COV (*Watanabe et al. 1993*). Cet exemple illustre le fait que les dernières réactions d'une voie de biosynthèse sont parfois régulées au cours du développement de l'organe, soit parce que les enzymes ne sont pas présentes, soit parce qu'elles sont activées au cours de l'épanouissement floral. L'émission des odeurs est donc un caractère hautement dynamique géré par des régulations développementales, spatiales et temporelles. Ces phénomènes sont encore peu étudiés et peuvent faire intervenir d'autres facteurs comme la disponibilité en substrat (*Hendel-Rahmanin et al. 2007*). Cependant, l'émission des COV est généralement bien corrélée avec la biosynthèse de ceux-ci (*Pichersky et al. 1994 ; Wang et al. 1997, Dudareva et al. 2000*). En effet, on observe souvent l'accumulation d'ARNm parallèlement à l'émission des composés volatils (*Dudareva et al. 1998 ; Guterman et al. 2002*). Par exemple chez la rose, l'expression de *RhNUDX1*, impliquée dans la biosynthèse des monoterpènes, est régulée au niveau des organes de la fleur et de son stade de développement (**figure 34**, *Magnard et al. 2015*).



**Figure 34 | Analyses de l'expression de *RhNUDX1* chez *Rosa x hybrida* (d'après Magnard et al. 2015).** Les stades de développement floral ont été définis selon Bergougnoux et al. (2007). Les erreurs standards sont indiquées par des barres verticales (n = 6 répliquats). Les moyennes avec des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes (Tukey's HSD test, P < 0,05). A – Expression dans des jeunes feuilles et dans les organes floraux au stade 4 (S4), analysée par qPCR. B – Expression dans les pétales à différents stades de développement (S1 à S5), analysée par qPCR.

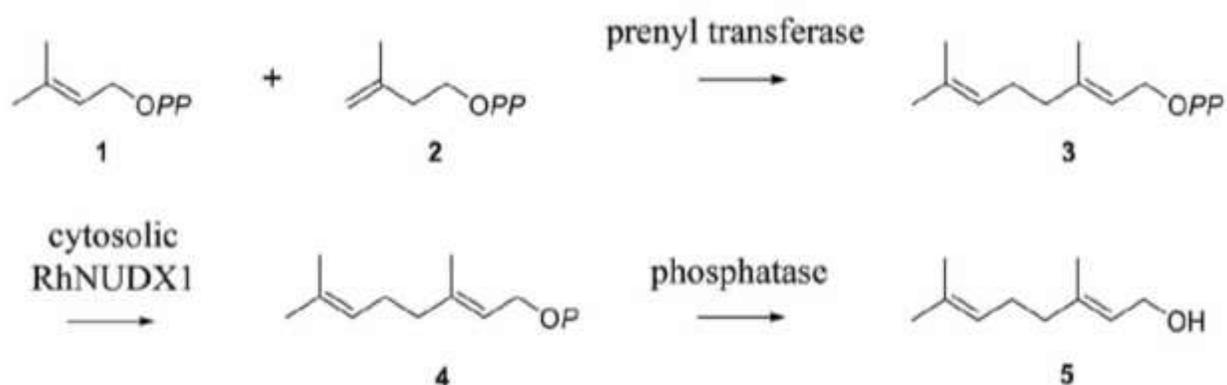
L'expression des gènes des voies de biosynthèse est souvent maximale lorsque la fleur est prête pour la pollinisation (Negre et al. 2003) ou lorsque le fruit est mûr (Lewinsohn et al. 2001 ; Ghosh et al. 2013). Ce contrôle transcriptionnel des gènes est certainement le mécanisme clé dictant les quantités finales des métabolites secondaires dans les cellules et ce contrôle est assuré par les facteurs de transcription ou FT<sup>43</sup>. Ainsi ces protéines régulatrices ont la capacité de se lier spécifiquement à la région promotrice de certains gènes et d'en réguler le niveau d'expression (Broun et al. 2006). En augmentant ou en diminuant la transcription de ces gènes, ils peuvent avoir un profond effet sur les processus biologiques que ces gènes contrôlent (Latchman 2003). Si les voies de biosynthèse commencent à bien être connues, il n'en est pas de même pour les facteurs de transcription liés à ces voies. Le premier gène impliqué dans la régulation des benzénoïdes chez le *Petunia hybrida* a été identifié, il s'agit d'un FT nommé *ODORANT1* (Verdonk et al. 2005). Lorsque ce gène est éteint, cela entraîne une réduction importante de l'émission des benzénoïdes mais aussi une diminution des transcripts impliqués dans la voie de biosynthèse des précurseurs de la voie du shikimate. Le gène est donc bien un élément régulateur de la production de benzénoïdes. Récemment, d'autres facteurs ont été identifiés, comme EOBII (Emission of Benzenoids II)

<sup>43</sup> FT pour Facteurs de transcription

(Spitzer-Rimon et al. 2010). Il a aussi été montré que ces FT sont eux-mêmes régulés par d'autres FT, le tout formant un réseau capable de réguler la biosynthèse des COV très finement (Van Moerkercke et al. 2011 ; Colquhoun et al. 2011 ; Spitzer-Rimon et al. 2012). Malheureusement, très peu de FT concernant la synthèse des composés odorants ont été caractérisés hormis chez le pétunia. La compréhension de ces mécanismes, encore à un stade embryonnaire, aura sûrement un impact important dans les stratégies d'ingénierie métabolique des COV (Broun 2004). Il faut ajouter que d'autres FT ont un rôle important dans l'initiation et la différenciation des trichomes glandulaires, qui sont les sites majeurs d'accumulation des COV pour de nombreuses plantes (Broun et al. 2006).

### Une nouvelle voie...

Pour terminer ce point sur les terpène synthases, je ne peux passer sous silence une découverte originale faite au LBVpam. En effet, chez la rose, une nouvelle voie impliquée dans la synthèse des terpènes vient d'être démontrée. Cette voie ne fait pas intervenir une terpène synthase pour convertir le GPP en géraniol mais une enzyme de la famille des Nudix hydrolases (Magnard et al. 2015) (figure 35).



**Figure 35 | Schéma de biosynthèse hypothétique pour la formation du géraniol libre dans les pétales de rose (d'après Magnard et al. 2015) 1 : DMAPP; 2 : IPP; 3 : GPP; 4 : GP; 5 : Géraniol**

#### III.4.3.4 La formation des terpénoïdes

La richesse des terpénoïdes est non seulement due à la diversité des TPS mais aussi aux enzymes intervenant à la suite et responsables des modifications des terpènes. Ces enzymes appartiennent à différentes classes et font intervenir des réactions diverses comme des oxydations par des cytochromes P450 (Weitzel et Simonsen 2015) ou des déshydrogénases (Frank et al. 1996 ; Bate et al. 1998 ; Bouwmeester et al. 1999 ; Lange et Croteau 1999a), des méthylations de groupes hydroxyles et

carboxyles (Knudsen et al. 1993 ; Wang et al. 1997 ; Lavid et al. 2002 ; Noel et al. 2003), des acétylations (Gang et al. 2002 ; D'auria et al. 2003 ; Shalit et al. 2003), et des glycosylations par des glycosyltransférases (Luan et al., 2005).

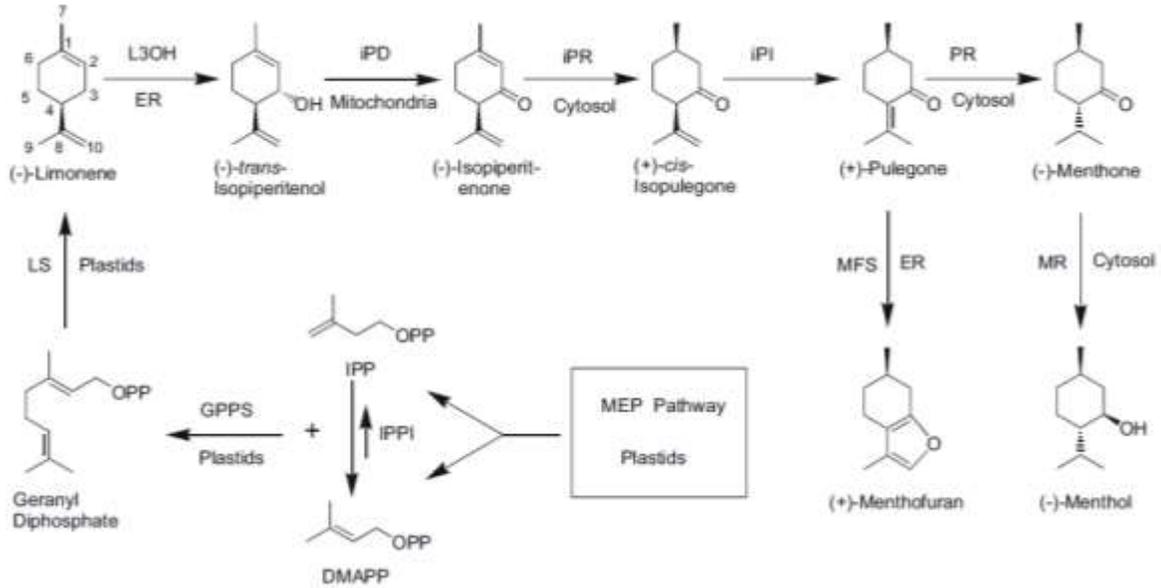
Les réactions de modifications interviennent aussi pour la formation de terpénoïdes avec des squelettes carbonés irréguliers acycliques C<sub>16</sub> et C<sub>11</sub>, appelés homoterpènes et émis par les tissus blessés. Les voies de biosynthèse de ces homoterpènes ne sont pas encore tout à fait élucidées, ils pourraient dériver du géranyllinalol (C<sub>20</sub>) et du (3S)-(E)-nérolidol (C<sub>15</sub>) par une dégradation oxydative catalysée par des enzymes cytochrome P450 (Donath et Boland 1994 ; Degenhardt et Gershenzon 2000).

Les plantes peuvent aussi produire d'autres terpènes volatils irréguliers, dérivés des caroténoïdes (C<sub>40</sub>), ayant un squelette carboné allant de C<sub>8</sub> à C<sub>18</sub> (Knudsen et Gershenzon 2006 ; Auldridge et al. 2006). β-ionone, β-damascénone ou dihydroactinidiolide sont des exemples que l'on trouve notamment dans le parfum de *Rosa x Damascena*, *Osmanthus fragrans*, *Freesia hybrida*... (Dudareva et al. 2006).

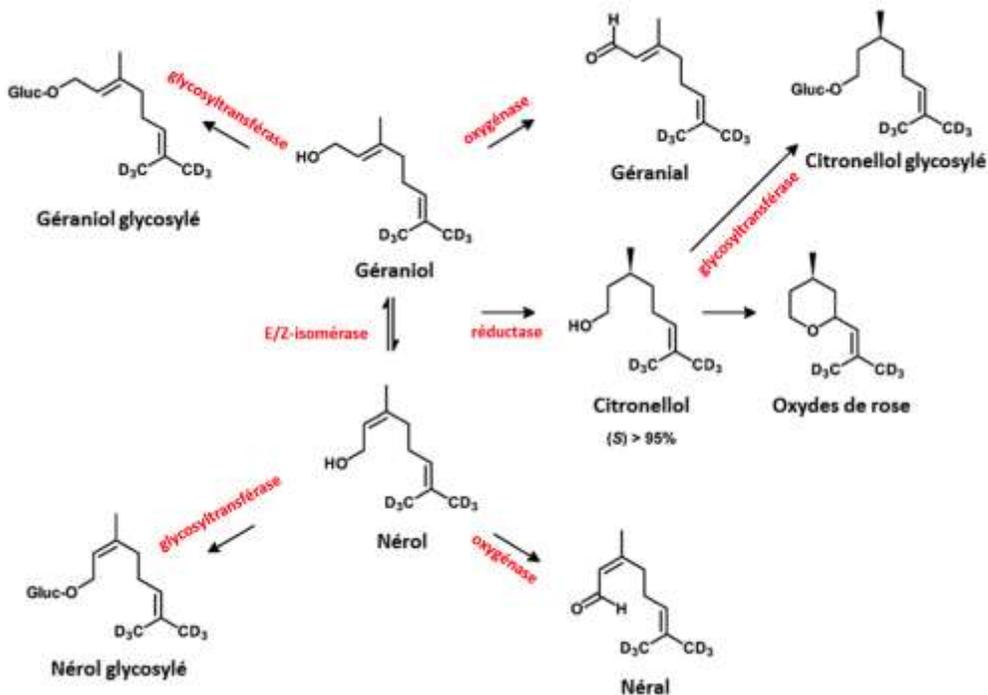
#### Les enzymes clés : Les isomérases, réductases, oxydases...

De nombreuses enzymes interviennent dans les réactions de diversification des terpènes. La **figure 36** présente les différentes étapes enzymatiques successives chez la menthe (*Mentha x piperita*) pour arriver au menthol (Croteau et al. 2005). Ces étapes ont été entièrement élucidées et font intervenir juste après la limonène synthase, une hydrolase, une déshydrogénase, une réductase, une isomérase, une autre réductase et une dernière réductase. Six autres enzymes après la limonène synthase sont donc impliquées dans la biosynthèse du menthol.

Les transformations du géraniol en d'autres composés grâce à diverses enzymes ont aussi été très étudiées chez la vigne notamment (*Vitis vinifera*). Ces étapes sont présentées sur la **figure 37** (Luan et al. 2005). On voit que le géraniol peut être transformé en géraniol sous l'action d'une oxydase comme cela a été montré chez *Zingiber officinale* (Sekiwa-Iijima et al. 2001) et *Perilla citriodora* (Sato-Masumoto et Ito 2014). Le géraniol peut aussi être réduit en citronellol via une oxophytodienoate réductase comme chez *Hevea brasiliensis* (Yuan et al. 2011) ou isomérisé en nérol mais aucune enzyme n'a pu encore être caractérisée. Enfin le géraniol, citronellol et nérol peuvent être glycosylés par une glycosyltransférase comme chez la vigne (Bönisch et al. 2014) ou chez *Actinidia deliciosa* (Yauk et al. 2014). Ces enzymes agissant après les terpène synthases sont très importantes, notamment chez le *Pelargonium* puisque l'on retrouve dans l'HE beaucoup de molécules issues du géraniol.



**Figure 36 | Voie de biosynthèse et localisation subcellulaire de la synthèse du (-)-menthol dans les glandes sécrétrices de la menthe poivrée (d'après Croteau et al. 2005).** Les étapes enzymatiques sont catalysées par les Géranyl diphosphate synthase (GPPS); (-)-limonène synthase (LS); (-)-limonène-3-hydroxylase (L3OH); (-)-*trans*-isopiperitol déhydrogénase (iPD); (-)-isopiperiténone reductase (iPR), (+)-*cis*-isopulégone isomérase (iPI), (+)-pulégone réductase (PR) ; (-)-menthone réductase (MR) et menthofurane synthase (MFS). Le carré MEP Pathway schématise la voie de biosynthèse du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate pour l'approvisionnement en précurseurs en C5, l'isopentényl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). IPPI, isopentényl diphosphate isomérase. OPP, groupement diphosphate. ER, Réticulum endoplasmique.



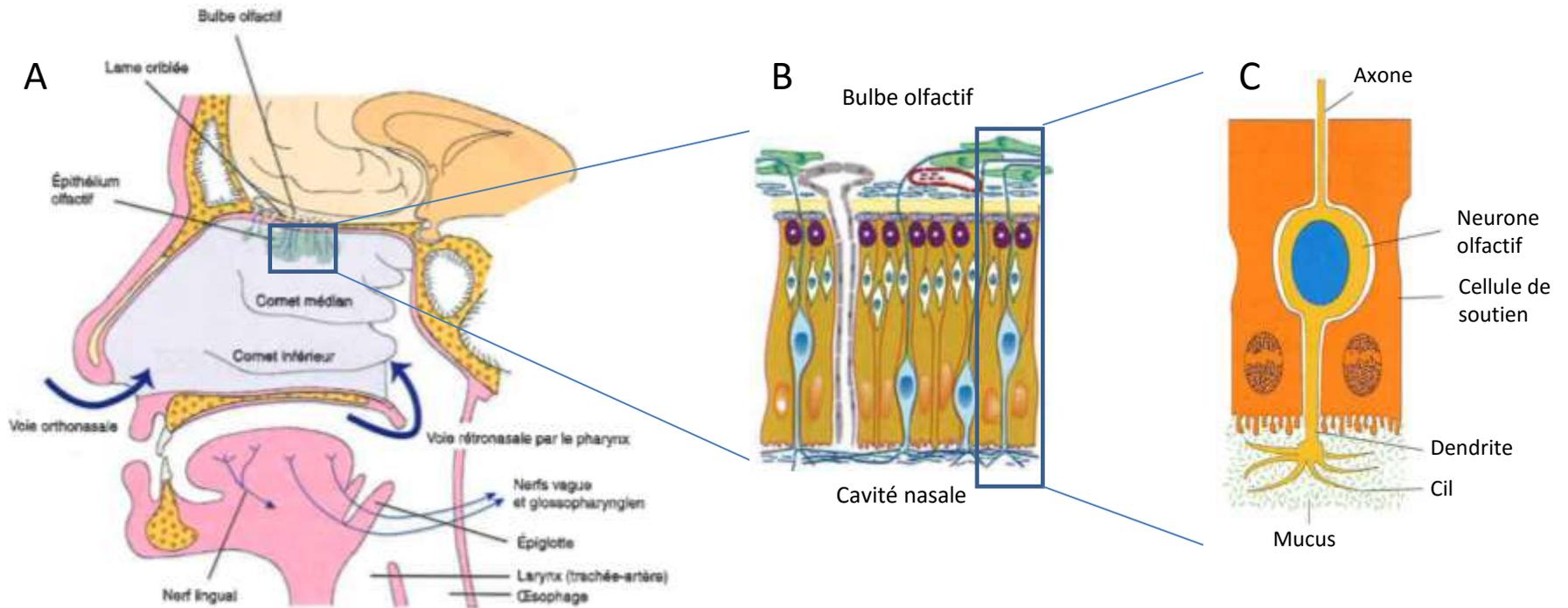
**Figure 37 | Schéma du métabolisme du d<sub>6</sub>-géraniol (d'après Luan et al. 2005).** Le d<sub>6</sub>-géraniol signifie que 6 atomes de deutérium remplacent 6 atomes d'hydrogène afin de pouvoir suivre les composés plus facilement. Gluc-O signifie que la molécule est liée à une molécule de glucose pour être soluble en milieu aqueux. Les classes d'enzymes sont en rouge.

### III.5 La perception des COV

Travaillant au sein d'une entreprise spécialisée dans la parfumerie, la perception des odeurs et donc des COV est le cœur de mon métier, je ne pouvais donc passer sous silence les mécanismes mis en jeu. Que ce soit par le nez humain ou par les antennes des insectes, la perception des COV fait intervenir des mécanismes similaires qui méritent d'être détaillés ici.

Dans le monde animal, la perception des odeurs est très importante et même souvent une question de survie. En effet, les odeurs ne renseignent pas uniquement sur la présence de nourriture mais peuvent aussi signaler la présence d'un prédateur, d'une proie, d'un congénère (statut social et sexuel, état de santé, reconnaissance mère-enfant...) ou d'un danger (gaz...). L'odorat intervient donc à tous les moments de la vie et en fonction des indices olfactifs et de son apprentissage, l'animal adaptera son comportement (alimentaire, social, sexuel, territorial..) au milieu dans lequel il évolue.

Chez l'homme, la perception des odeurs et des saveurs est intimement liée. Ainsi, lorsque nous mastiquons un aliment, nous libérons les produits sapides et odorants qu'il contient (*Salesse et Gervais 2012*). Les produits sapides, souvent solubles dans l'eau et peu odorants, excitent les récepteurs gustatifs au niveau des papilles de la bouche (*Sheperd 2006*) alors que les produits odorants remontent par la voie rétronasale via le pharynx jusque dans la cavité nasale et excitent les neurones olfactifs situés dans l'épithélium olfactif (**figure 38 A et B**) (*Brand 2001*). Lorsqu'une molécule odorante se fixe sur un récepteur olfactif porté par la membrane des cils des dendrites des neurones (leurs grandes surfaces leur permettent d'héberger de nombreux récepteurs), celui-ci envoie un signal qui passe de l'axone du neurone olfactif vers le bulbe olfactif situé à la base du cerveau (**figure 38 C**). Chacun des neurones olfactifs exprime un et un seul récepteur olfactif parmi un répertoire de plusieurs centaines (condition pour que le message soit spécifique de l'odorant). La muqueuse olfactive contient environ cinq millions de neurones olfactifs qui meurent au bout de quelques semaines et sont renouvelés grâce aux cellules souches se trouvant dans l'épithélium olfactif. La muqueuse se trouve donc à l'interface entre le milieu extérieur et le cerveau. Lors d'une agression chimique ou biologique, les cellules de l'épithélium olfactif peuvent dégénérer et ainsi empêcher le passage des particules nocives. L'anosmie peut être temporaire, (anosmie partielle) ou en cas de très forte agression elle peut être permanente (anosmie totale).



**Figure 38 | Le système olfactif chez l'homme** (modifié de Salesse 2015) **(A)** Schéma des deux voies de l'olfaction, la voie orthonasale (par les narines, voie des parfumeurs) et la voie rétronasale (par l'arrière-gorge ou pharynx, la voie des gastronomes) **(B)** Coupe schématique de la muqueuse olfactive : les neurones en bleu envoient leurs axones vers le cerveau et projettent des cils dans la cavité nasale qui baignent dans le mucus. **(C)** Schéma d'un neurone olfactif. Les cils portent les récepteurs olfactifs qui captent les molécules odorantes auxquelles ils réagissent en générant un influx nerveux qui est envoyé vers le bulbe olfactif via l'axone.

Les gènes des récepteurs olfactifs sont très nombreux : 1200 chez les rongeurs, 800 chez le chien, 400 chez l'homme, 280 chez le poulet et une centaine chez les poissons. Le répertoire des récepteurs olfactifs a fortement augmenté lors du passage sur terre des vertébrés, ceci nous indique que les gènes se multiplient en corrélation avec la plus grande richesse olfactive du milieu aérien par rapport au milieu aquatique. Un autre exemple de l'évolution des gènes de récepteurs olfactifs nous est donné avec l'apparition de nouveaux gènes chez l'homme suite à l'invention du feu et à la cuisson des aliments générant de nouvelles molécules olfactives (*Sheperd 2012*). La diminution des gènes de récepteurs olfactifs chez les primates serait due aux changements de modes de vie (arboricole et social) et pour lesquels la vision aurait été favorisée. La bipédie partielle a aussi fait perdre aux primates le contact avec le sol où se concentrent de nombreuses traces odorantes (*Salesse 2015*).

L'homme est capable de sentir entre 10 000 et 400 000 odorants différents, alors que nous ne possédons que 400 gènes de récepteurs olfactifs. On comprend dès lors qu'une molécule doit pouvoir se lier à plusieurs récepteurs différents et qu'un récepteur peut accueillir plusieurs molécules différentes. C'est l'ensemble des influx venant des récepteurs stimulés qui est finalement traité par le cerveau et associé à une odeur spécifique. Le nombre de combinaisons possibles est très important, de l'ordre de plusieurs milliards (**figure 39**) (*Malnick et al. 1999, Buck 2004*). Notre nez est donc un détecteur chimique extrêmement puissant capable de rivaliser avec n'importe quel dispositif analytique.

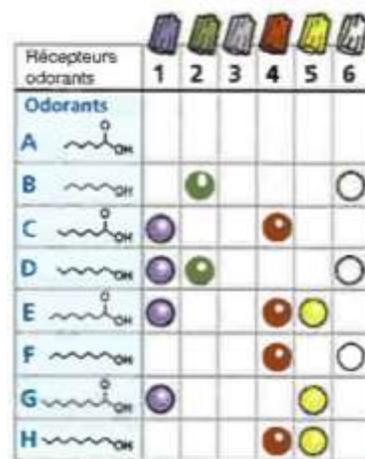
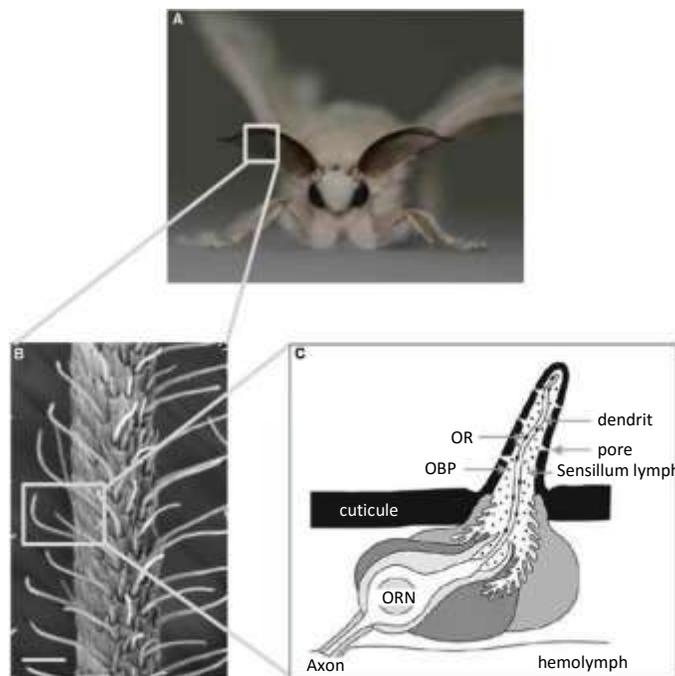


Figure 39 | Schéma de la réponse chez le rat de neurones individuels (1-6) à des odorants (A-H) (modifié d'après [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2004/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2004/))

Pour terminer ce paragraphe sur l'homme, nous pouvons noter que la capacité olfactive dépend de plusieurs facteurs dont le sexe et l'âge. En effet, pour les femmes, les performances olfactives sont meilleures pendant la période d'ovulation et décroissent pendant la période de menstruation (*Mair et al. 1978; Brand et Millot 2001*). Plusieurs études montrent que l'âge réduit de façon significative les performances olfactives chez l'homme (*Cain et Gent 1991; Mirza et al. 1997*). Ce phénomène pourrait être dû à une diminution des récepteurs exprimés dans l'épithélium olfactif comme cela a été montré chez la souris (*Zhang et al. 2004*). Une autre étude a montré qu'au niveau du bulbe olfactif, le nombre de cellules mitrales et le nombre de glomérules diminuaient d'environ 10% tous les 10 ans (*Meisami et al. 1998*).

Chez les insectes comme les papillons par exemple, les signaux chimiques (phéromones) jouent un rôle important à tous les stades de la vie, que ce soit pour l'attraction des congénères, l'agression, la reconnaissance des pairs... (Yew et Chung 2015). Les animaux peuvent ainsi extraire les informations importantes situées dans leur environnement et y répondre par une réponse adéquate. Par exemple, lors de la parade nuptiale, le mâle *Bombyx mori* peut détecter au moyen de ses antennes (figure 40 A) une molécule précise, le bombykol, émise à plusieurs centaines de mètres par la femelle et très diluée dans l'air. La détection de cette phéromone déclenche alors chez le papillon mâle la recherche d'une partenaire, comportement qui est supprimé par l'émission d'une autre molécule (bombykal) (Daimon et al. 2012). Chez d'autres espèces, le cocktail de molécules sexuelles peut même fournir plusieurs informations complexes sur les partenaires (localisation, santé, prédisposition à l'accouplement...), cruciales pour la survie et l'évolution de l'espèce. Les odeurs chez les insectes font aussi partie des mécanismes de défense et sont utilisées contre les prédateurs et les parasites. Ainsi, pour les papillons en général, les molécules diffusent dans l'air ambiant et passent par des pores des sensilles (figure 40 B). Ces molécules sont ensuite captées par de petites protéines solubles ou « Odorant-Binding Proteins » (OBP). Elles forment ainsi un complexe qui est transporté jusqu'aux récepteurs olfactifs (OR) des neurones olfactifs (ORN) (figure 40 C). La transduction du signal provoque alors un stimulus nerveux interprété par le cerveau (Jacquin-Joly et Marlin 2004 ; Tegoni et al. 2004; Sakurai et al. 2014).



**Figure 40 | Principaux organes sensoriels chez le papillon *Bombyx Mori* (d'après Jacquin-Joly et Mrelin 2004). (A)** Papillon mâle avec ses antennes proéminentes optimisées pour la détection des molécules odorantes. **(B)** Microscopie électronique à balayage d'une antenne présentant la morphologie externe d'une sensille olfactive (échelle 25  $\mu$ m). **(C)** Schéma d'une sensille olfactive : ORN, neurone olfactif, Olfactory Receptor Neuron, OBP, Odorant-Binding Protein, OR, Odorant Receptor, récepteur olfactif.

## IV. LES BIOTECHNOLOGIES VÉGÉTALES

Si l'utilisation des biotechnologies à des fins médicales n'est plus aujourd'hui contestée, ce n'est pas le cas concernant la création et la culture de plantes ou de micro-organismes transgéniques. En effet, le citoyen s'interroge sur la justification, au-delà de son intérêt économique, pour les firmes qui s'engagent dans la création et la commercialisation de semences modifiées ou de produits recombinants obtenus grâce aux biotechnologies végétales.

L'agriculture traditionnelle se basait sur 5 leviers pour l'augmentation des rendements : l'irrigation, l'emploi d'engrais et de produits phytosanitaires, le machinisme agricole et la sélection génétique de variétés améliorées. Cependant, les cultures trop irriguées et inadaptées à leur environnement, l'utilisation à outrance des engrais chimiques et des pesticides sont de plus en plus sur la sellette. Parallèlement, l'agriculture fait face à de nouveaux défis comme le réchauffement climatique, la rareté des terres, l'augmentation de la population mondiale, la finitude des ressources disponibles, la disparition et la bonne santé des espèces, la dégradation des sols.

Pour continuer à accroître le rendement et la qualité de nos produits tout en respectant mieux l'environnement, les seuls leviers à notre disposition sont l'amélioration des pratiques agricoles et le progrès génétique des variétés. Ce dernier repose sur un éventail de techniques qui permettent d'augmenter la rapidité et l'efficacité du processus de sélection variétale classique. Les biotechnologies végétales peuvent contribuer à l'amélioration des variétés. Il est cependant important que les entreprises qui s'en saisissent comprennent les implications de ces nouvelles techniques et se sentent responsables de leur bonne utilisation.

Dans ce paragraphe, je me focaliserai sur l'utilisation des biotechnologies pour la production de molécules dans l'industrie des parfums et des arômes alimentaires puisque cela concerne plus particulièrement mon domaine de recherche mais je prendrai aussi quelques exemples de l'industrie pharmaceutique et du secteur agricole car les développements y sont rapides et en lien étroit avec les industries de la parfumerie, de la cosmétique et des arômes alimentaires.

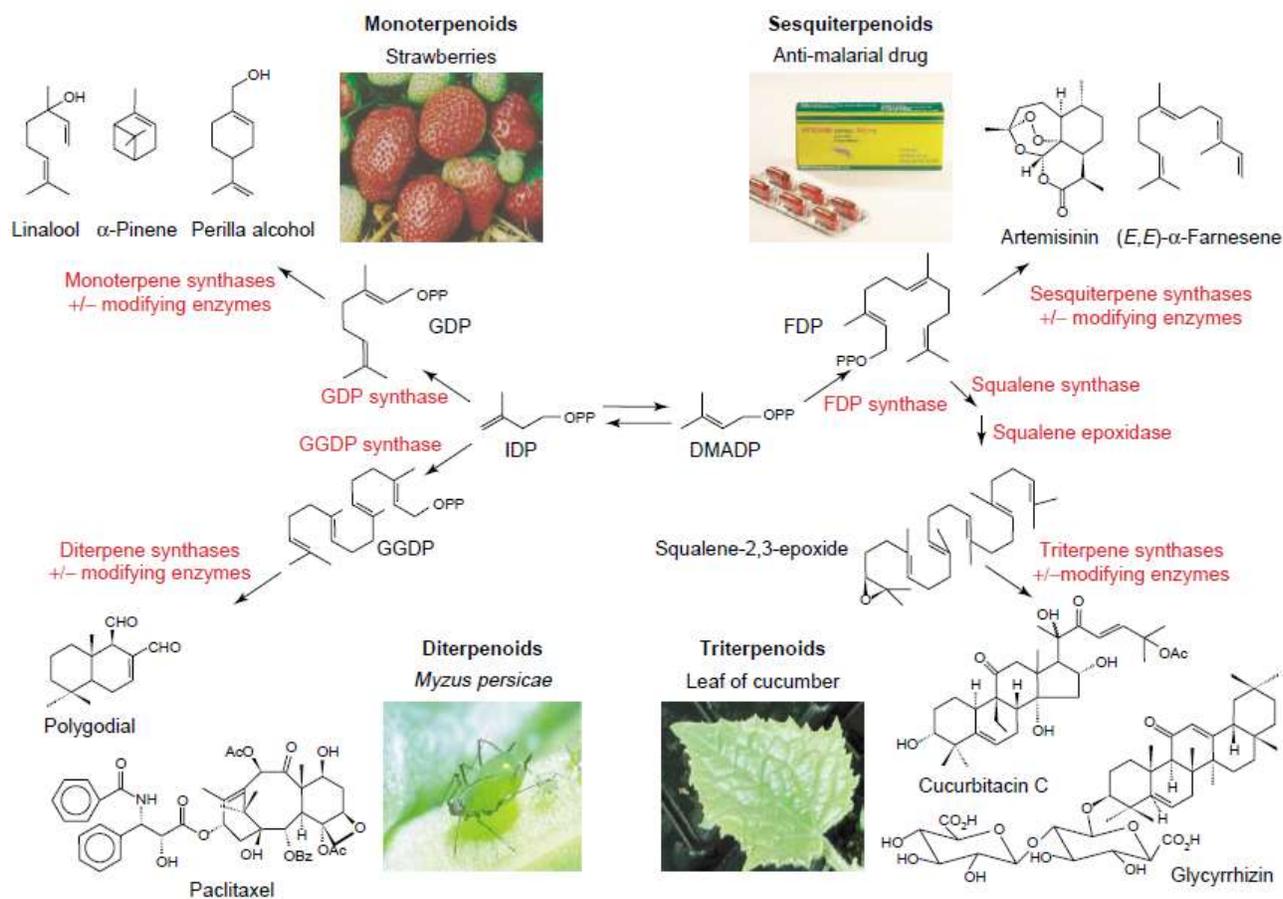
## IV.1 Intérêt des biotechnologies végétales

Longtemps les biotechnologies ont été l'apanage des géants de l'industrie agroalimentaire à cause de leurs coûts prohibitifs. Ces dernières années, grâce à la réduction des coûts et au développement de disciplines comme la biologie moléculaire et la bioinformatique, les avancées dans la compréhension du fonctionnement des êtres vivants ont été énormes. Ces nouvelles connaissances ont permis de construire de nouveaux outils biotechnologiques comme la production de molécules en fermenteurs, la SAM<sup>44</sup>, la sélection génomique ou encore le phénotypage à haut débit. Certaines de ces techniques biotechnologiques ont été intégrées dans les processus industriels. Les découvertes dans le domaine des voies de biosynthèses des métabolismes primaire et secondaire ont notamment beaucoup intéressé les industriels de la pharmacie et de la cosmétique, de l'agroalimentaire et de l'industrie des parfums et arômes alimentaires (*Krings et Berger 1998 ; Berger 2015, Gupta et al. 2015*) (figure 41). En effet, un des points communs de ces industries est la recherche et l'optimisation de la production de composés actifs bien souvent extraits des organismes vivants. Les biotechnologies sont donc un outil attrayant pour la création de nouvelles molécules et une production optimisée et moins coûteuse de produits déjà disponibles.

Les molécules dérivées des plantes sont souvent sujettes à des fluctuations de prix, de quantité et de qualité à cause de facteurs climatiques, politiques ou agronomiques (maladies). Souvent, les extraits naturels peuvent atteindre des prix élevés à cause du faible rendement des plantes, de la limitation des surfaces agricoles, de la forte consommation en main d'œuvre... La chimie organique a pu répondre en partie à ces faiblesses en produisant des molécules d'intérêt à partir des composés de l'industrie du pétrole par plusieurs réactions catalytiques. Néanmoins, à cause de la complexité des structures, les coûts restent très élevés et certaines molécules sont impossibles à réaliser en synthèse (*Bouwmeester 2006*). Avec la démocratisation et la rapidité du développement des biotechnologies, ces technologies sont devenues accessibles pour des entreprises de tailles plus réduites. Les connaissances fondamentales sur les plantes, parfois négligées par des industries positionnées sur des produits ayant un faible poids économique, sont maintenant accessibles pour de nouveaux développements (*Zwenger et Basu 2008 ; Forti et al. 2015*).

---

<sup>44</sup> SAM pour sélection assistée par marqueurs



**Figure 41 | Intérêt des biotechnologies dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, et dans la parfumerie (d'après Aharoni et al. 2005).** Quelques exemples de structures chimiques importantes pour l'industrie sont présentés pour chaque classe de terpènes. Les étapes enzymatiques sont indiquées en rouge. DMAPP : Diméthylallyl diphosphate; GDP : géranyl diphosphate; GGDP, géranylgéranyl diphosphate; FDP : farnésyl diphosphate; IDP : Isopentényl diphosphate

## IV.2 Les biotechnologies et l'industrie de la parfumerie

L'industrie de la parfumerie et des arômes alimentaires utilise principalement les molécules issues des 3 voies de biosynthèse décrites au paragraphe III.4. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, la synthèse chimique a permis une révolution de la parfumerie par la synthèse de composés aux odeurs originales et à des coûts très bas. L'exemple le plus emblématique est l'utilisation d'aldéhydes synthétiques en quantités importantes dans le parfum Chanel n°5 en 1921. La synthèse chimique a donc permis une grande diversité dans les notes parfumées ainsi qu'une baisse des coûts. Il existe actuellement plus de 5000 molécules odorantes synthétiques pour des prix variant de quelques euros à plusieurs milliers d'euros par kilo. Le développement des biotechnologies ouvre des portes dans plusieurs directions pour l'industrie de la parfumerie (figure 42). Ainsi on peut espérer qu'elles seront d'une aide précieuse pour la création de nouvelles variétés végétales présentant un intérêt pour la parfumerie. Dans une toute autre direction, les biotechnologies peuvent aussi servir à la production de molécules naturelles identiques par des micro-organismes ou des plantes génétiquement modifiés. Enfin, elles pourront certainement rendre plus disponibles pour les chimistes organiciens de nouvelles structures moléculaires complexes à modifier chimiquement.

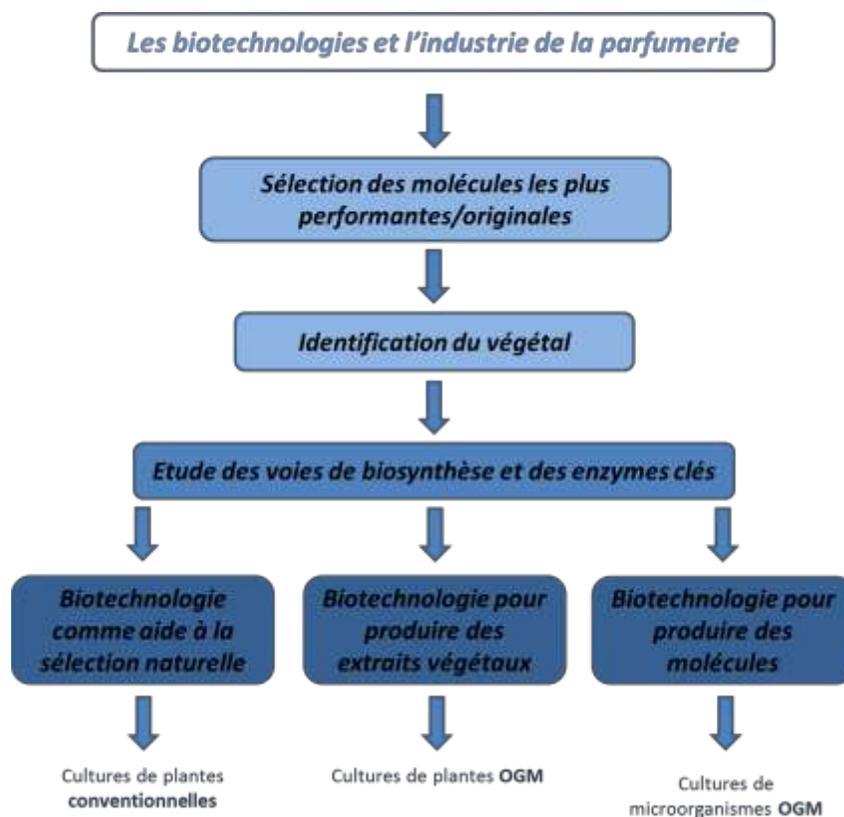


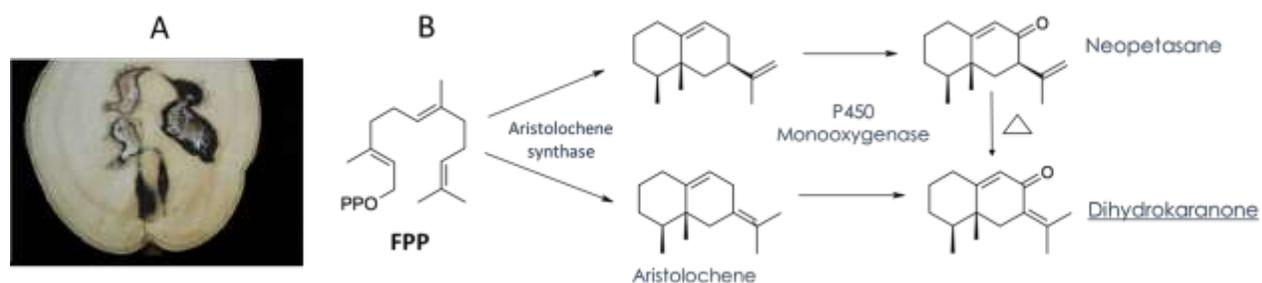
Figure 42 | Représentation schématique de la place des biotechnologies dans l'industrie de la parfumerie.

#### IV.2.1 Sélection des molécules d'intérêt

L'industrie de la parfumerie s'intéresse depuis longtemps aux molécules les plus performantes c.a.d. celles qui diffusent le mieux ou qui ont un seuil de perception très bas, celles jouant un rôle de fixateur et qui entrent en synergie avec d'autres molécules ou encore les squelettes carbonés communs à de nombreuses notes originales. Ces recherches sont plus avancées pour les molécules de synthèse car elles sont obtenues déjà très pures alors que les molécules présentes dans des extraits naturels sont noyées dans une matrice très complexe. Ainsi les intérêts des chimistes pour ces molécules sont multiples et ce sont de bons candidats pour les biotechnologies.

#### Exemples de molécules très performantes et indispensables dans la parfumerie

Certains extraits employés depuis très longtemps par les parfumeurs sont irremplaçables, stratégiques et utilisés en grandes quantités. Les plus importants sont l'HE et l'absolu de rose, l'HE de *Pelargonium*, l'HE de vétiver, l'HE de patchouli, l'absolu de jasmin, l'HE de néroli... Certains extraits, moins utilisés, contiennent néanmoins des molécules de très hautes valeurs parce que très performantes et appréciées des parfumeurs. Les irones de l'absolu d'iris, la dihydrokaranone de l'HE d'agarwood (**figure 43**) (*Ishjhara et al. 1993*), le safranal de l'HE de safran sont des exemples de ces molécules clés. De par leur grande utilisation ou leur place spéciale sur l'orgue des parfumeurs, ces extraits et molécules seront d'un intérêt particulier pour le développement via les biotechnologies (**figure 44**).



**Figure 43 | L'intérêt de la dihydrokaranone en parfumerie. A – Tronc d'agarwood (*Aquilaria crasna*); B – Voie de biosynthèse de la dihydrokaranone à partir du FPP**

Les composés précurseurs de la synthèse

La synthèse chimique de multiples composés odorants débute souvent à partir de quelques structures carbonées spécifiques disponibles en grandes quantités et à bas coût. Ce sont surtout des sous-produits de l'industrie du bois comme l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène et le myrcène (annexe 18). Avoir à disposition ces molécules pures à très bas coût aura donc une influence sur le coût de toutes les molécules produites à partir de ces structures. Cependant si les chimistes disposaient d'autres structures plus complexes (monoterpènes, sesquiterpènes...) et produites à des coûts relativement bas, la palette des molécules fabriquées par l'industrie de la parfumerie pourrait être élargie. Ainsi, les voies de biosynthèses des monoterpènes (ocimène, géraniol, limonène...), des sesquiterpènes (santalène, élémène, patchouliol, cédrol, copaène, kusimol...), des diterpènes (sclaréol) ou triterpènes (irones) (Belcour et al. 1993) sont maintenant étudiées activement par les industriels. C'est d'ailleurs aussi le cas des autres voies de biosynthèse, la voie des phénylpropanoïdes/benzénoïdes et celle des dérivés d'acides gras (figure 44).

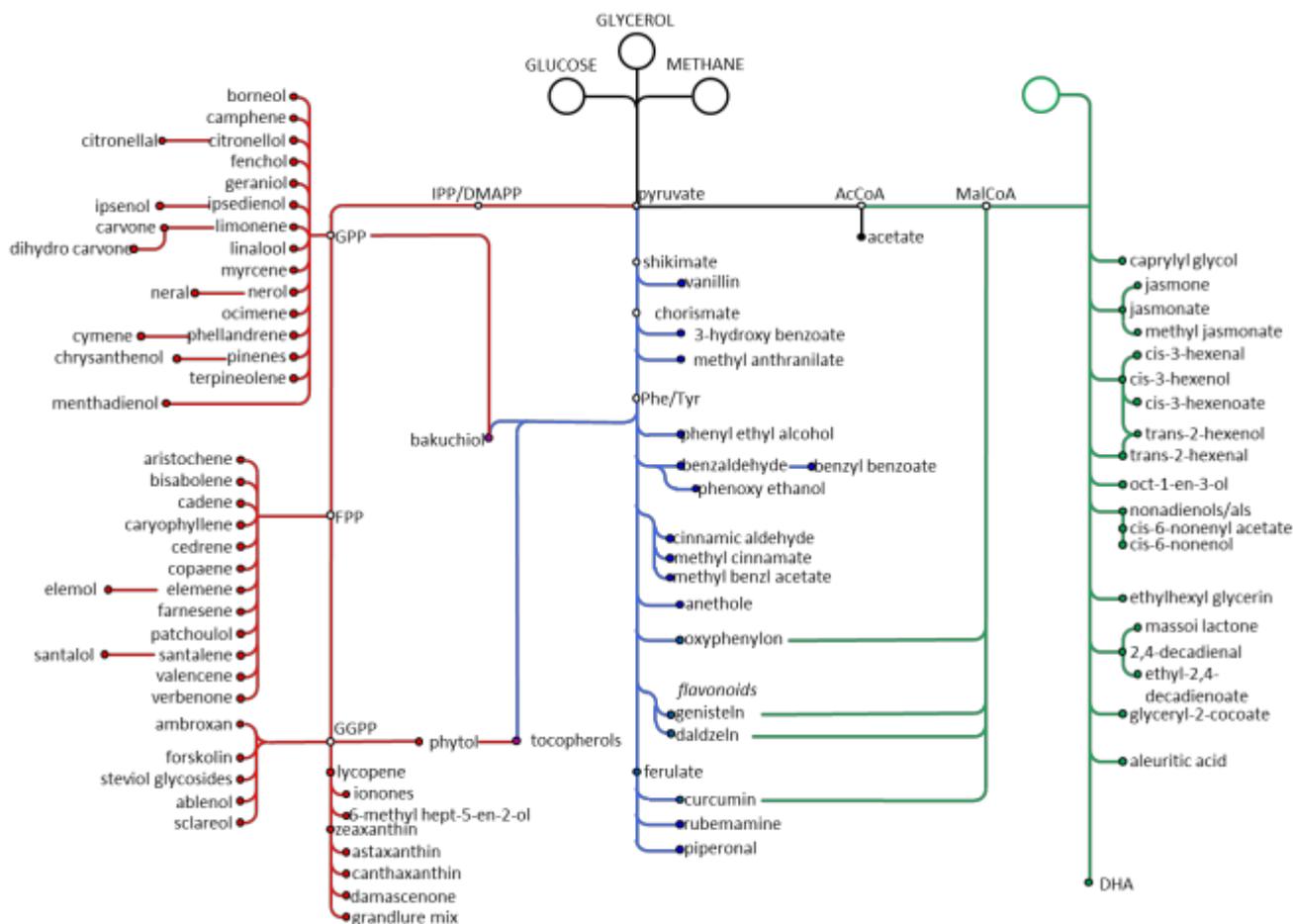


Figure 44 | Molécules odorantes d'intérêt appartenant aux 3 grandes voies métaboliques. En rouge, la voie des terpénoïdes; en bleu, la voie des phénylpropanoïdes et benzénoïdes; en vert, la voie des acides gras et dérivés.

### Problèmes de disponibilité

Certains extraits naturels sont très recherchés par les parfumeurs mais les industriels font face à des problèmes de disponibilité et de protection de ces extraits. C'est particulièrement le cas d'HE extraites de bois (santal, massoia, agarwood) car le renouvellement de ces ressources est très lent (*Nageswara Rao et al. 2007; Kumar et al. 2012*) ou d'animaux (musc, ambre gris...), pour lesquelles se posent des problèmes d'éthique et de réglementation. D'autre part, certaines plantes produisent des molécules très intéressantes mais avec une concentration si faible qu'une extraction classique est irréaliste.

### Problèmes toxicologiques

Il existe dans les extraits naturels des composés carcinogènes et soumis à des restrictions qui en limitent les utilisations. L'industrie a donc mis au point toute une série de procédés physico-chimiques (distillation fractionnée, lavages...) pour se débarrasser des molécules indésirables (Méthyleugénol, safrole (*Jin et al. 2011*), atranol et chloratranol (*Andersen et al. 2015*)...). Une meilleure connaissance des voies de biosynthèse permettrait de sélectionner des individus exprimant plus faiblement le gène impliqué dans une étape enzymatique conduisant à un composé problématique. Ainsi on peut imaginer améliorer la qualité des HE, par exemple en inhibant l'expression de gènes codant pour des enzymes responsables de la synthèse de composés indésirables ou allergisants (*Verpoorte et Memelink 2002; Chaintreau et al. 2003*). Les problèmes toxicologiques ne concernent pas uniquement les molécules naturelles mais aussi beaucoup de molécules de synthèse. Les nitromuscs ou muscs polycycliques en sont un exemple (*Luckenbach et Epel 2005*). La biosynthèse de structures dépourvues de toxicité mais performantes permettrait le développement de nouvelles molécules synthétiques.

### Notes originales

Certains extraits ne se prêtent pas à une extraction conventionnelle (chèvrefeuille, muguet...). Les biotechnologies peuvent aussi permettre de développer des extraits originaux à partir de plantes rares, qui ne pourraient pas être prélevées dans la nature.

### IV.2.2 Identification du végétal

Une fois les molécules d'intérêt ciblées, il faut trouver le végétal qui les produit. Souvent le végétal est déjà connu (le vétiver pour le kusimol et l'isovalencenol pour, le patchouli pour le patchoulol...) puisque c'est en analysant l'extrait qu'ont été découvertes les molécules d'intérêt. Il y a aussi des molécules dont on suspecte la production dans la nature parce que des molécules similaires sont biosynthétisées... Par exemple, l'hédione (méthyl dihydrojasmonate) est une molécule synthétique très utilisée en parfumerie et qui est très proche du méthyl jasmonate synthétisé par le jasmin (*Demole et al. 1962*). Une dernière voie consiste à étudier les voies de biosynthèse de nouvelles plantes potentiellement intéressantes mais pas encore utilisées par l'industrie. Il peut s'agir de plantes impossibles à extraire (muguet, chèvrefeuille...), protégées ou encore de plantes qui viennent d'être découvertes. L'analyse fine notamment à l'aide d'un GC-O<sup>45</sup> pourrait aider à cibler la ou les molécules d'intérêt pour ensuite essayer de retracer la voie de biosynthèse qui leur est associée.

### IV.2.3 Etude des voies de biosynthèse et des enzymes clés

Cette étape est la dernière étape commune avant le choix de différentes stratégies et applications possibles des biotechnologies pour la parfumerie (**Figure 42**). Toutes ces étapes sont nécessaires tant pour se doter d'outils de sélection variétale, que pour transformer génétiquement des micro-organismes ou des plantes. En effet, pour toutes ces applications, il est nécessaire de caractériser les gènes clés des enzymes responsables de la biosynthèse des molécules d'intérêt.

De nombreuses études ont été réalisées sur les plantes clés utilisées en parfumerie comme le patchouli (*Deguerry et al. 2006*), le bois de santal (*Jones et al. 2008, 2011 ; Moniodis et al. 2015 ; Srivastava et al. 2015*), la vanille (*Gallage et al. 2014*), La sauge sclarée (*Caniard et al. 2012 ; Schalk et al. 2012*), le ciste (*Falara et al. 2010 ; Papaefthimiou et al. 2014*) et le vétiver (*Schalk et Deguerry 2012 ; Hartwig et al. 2015*).

Les techniques utilisées pour la caractérisation des enzymes des voies de biosynthèse seront détaillées dans les autres parties du mémoire puisqu'elles constituent le cœur de cette thèse.

---

<sup>45</sup> GC-O pour Chromatographie en phase gazeuse couplée avec une sortie pour l'olfaction

#### IV.2.4 Les biotechnologies comme aide à la sélection variétale

Avant le développement des biotechnologies et notamment de la multiplication *in vitro*, l'une des préoccupations majeures du sélectionneur était la stabilité des cultivars améliorés. En effet, par reproduction sexuée, un individu hybride aux performances agronomiques sélectionnées donne naissance à une descendance aux performances agronomiques hétérogènes. C'est une des raisons pour lesquelles de nombreuses espèces agronomiques sont reproduites par bouturage (rosiers, poiriers, cerisiers...). Avec la CIV<sup>46</sup> et la possibilité de clonage à grande échelle, le travail du sélectionneur peut être de créer un individu élite, de le sélectionner, puis enfin de le copier végétativement et uniformément. On assiste donc à une mutation des stratégies de sélection puisque l'on peut maintenant s'affranchir du suivi de la généalogie des plantes améliorées. L'homogénéité et la valeur moyenne des descendants étaient des paramètres de sélection importants, ce qui n'est plus le cas actuellement (Gallais 2011).

Dans le cas du *Pelargonium*, celui-ci est un hybride aux performances en champ supérieures à celles de ses deux parents. En effet, celui-ci produit des composés à odeur de rose (géraniol, citronellol...) comme l'un de ses parents (caractère qualitatif) avec un rendement en huile essentielle important comme l'autre de ses parents (caractère quantitatif) (voir Blerot et al., 2015, p 18 à 20). Le *Pelargonium* se multipliant très bien par bouturage, nous pouvons espérer que la création d'une nouvelle lignée hybride, sélectionnée par des outils issus des biotechnologies, pourra être rapidement multipliée par CIV et ensuite cultivée à grande échelle en Égypte. Pour créer un individu élite, appelé tête de clone, de nombreuses recherches en génétique des populations et en génétique quantitative ont défini les meilleurs schémas de sélection pour aboutir aux meilleures combinaisons statistiques entre gènes. Cet individu aura été choisi après des interventions biotechnologiques comme par exemple la SAM afin de le repérer précisément parmi les descendants issus des mêmes croisements. Il faudra ensuite s'assurer que l'individu, placé dans les conditions de densité et de compétition du champ ainsi que dans l'environnement de la culture (sol, climat...) conserve sa performance (Dattée et Fellous 2011).

Le progrès des connaissances sur l'expression des gènes, puis les avancées sur la structure moléculaire de l'information génétique ont permis de revoir totalement les méthodes de repérage génétique. Les méthodes les plus anciennes étaient indirectes et identifiaient le gène par son produit à l'aide de

---

<sup>46</sup> CIV pour Culture in vitro

marqueurs biochimiques (analyses des protéines, des molécules produites...). Maintenant, les méthodes plus récentes sont directes et détectent le code génétique lui-même à l'aide de marqueurs moléculaires d'ADN. On peut citer par exemple les marqueurs suivants qui sont les plus utilisés : RFLP<sup>47</sup>, AFLP<sup>48</sup> et microsatellites. Tous les marqueurs n'ont pas les mêmes applications mais grâce à eux, il est maintenant possible d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification ou encore de mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique (*Demarly et Sibi 1996 ; Gallois 2015*).

Ces marqueurs ouvrent ainsi la voie à la SAM notamment. On pourra ainsi par exemple, avoir la sélection d'un OGM après le transfert d'un gène par l'introgression dans une variété d'élite. Mais aussi, si l'on ne cherche pas à sélectionner un OGM mais plutôt à construire un génotype, la sélection d'un hybride par la technique de la cartographie de loci<sup>49</sup> à effet quantitatif ou QTL<sup>50</sup> (Transkley 1993). Cette technique cherche les associations entre des marqueurs génétiques et un trait phénotypique et cela permet de détecter des loci responsables de la variabilité du trait.

---

<sup>47</sup> RFLP pour Restriction Fragment Length Polymorphism

<sup>48</sup> AFLP pour Amplification Fragment Length Polymorphism

<sup>49</sup> Un locus est l'emplacement d'un gène sur un chromosome. Les gènes d'un locus donné agissent sur un caractère précis. Les différentes versions d'un même gène au même locus sont appelées allèles

<sup>50</sup> QTL pour Quantitative Trait Loci

#### IV.2.5 Les biotechnologies pour produire des OGM de plantes

Traditionnellement, l'amélioration des plantes par l'introduction de traits désirés se fait par croisement, sélection ou production de mutants par irradiation. Récemment, le développement des techniques de transformation génétique a permis de cibler les modifications, par l'introduction de nouveaux gènes ou en altérant l'expression des gènes existants, avec comme résultat par exemple des profils métaboliques altérés (Daviet et Schalk 2010). Depuis de nombreuses années, des gènes de résistance aux pesticides ou aux maladies sont introduits dans des plantes alimentaires (colza, maïs, riz, soja...). Avec le développement récent des connaissances sur les voies de biosynthèse des composés odorants, d'autres plantes sont maintenant candidates à l'amélioration par la production d'OGM.

A cause de la séparation des deux voies métaboliques (MEP et MVA) menant notamment aux monoterpènes et aux diterpènes d'une part et aux sesquiterpènes d'autre part, il est beaucoup plus difficile de contrôler la production des terpénoïdes dans les plantes que dans des micro-organismes. Une autre difficulté est la production très localisée et tissu-spécifique de l'essence (feuilles, racines, fleurs, fruits, écorces...). La première des plantes à parfums à avoir été modifiée génétiquement est la menthe poivrée.

##### L'optimisation des voies de biosynthèse par transformation de la plante productrice

Gershenzon et al. (2000) ont montré que chez la menthe (*Mentha x piperita* L.), le taux de biosynthèse est l'étape clé qui détermine l'accumulation des monoterpènes puisqu'il y a peu de métabolites perdus par dégradation et peu par volatilisation. Les efforts pour améliorer la production chez cette espèce doivent donc être concentrés sur les gènes et les enzymes qui régulent la biosynthèse des monoterpènes, biosynthèse qui a été particulièrement bien étudiée (figure 45) (Turner et Croteau 2004). L'étude de la différenciation cellulaire des trichomes qui stockent l'HE est aussi d'un grand intérêt (Turner et al. 2000a). Deux résultats intéressants ont été obtenus : d'une part, la surexpression du gène DXR chez la menthe a permis d'augmenter la production d'HE d'environ 50% sans en changer la composition : d'autre part, l'extinction de la MFS<sup>51</sup> donne des plantes produisant 40% de menthol en plus et une moins grande proportion de menthofurane, composé indésirable puisque toxique (Lang et Croteau 1999b ; Mahmoud et Croteau 2001, 2002 ; Mahmoud et al. 2003).

---

<sup>51</sup> MFS pour (+)-Menthofuran synthase

La transformation d'une plante peut aussi avoir comme objectif la résistance à un virus ou une bactérie. Ainsi, les plants de patchouli en Indonésie sont pour la plupart infectés par des virus tachetés (PaMoV) et/ou par un virus mosaïque (mild mosaic virus) (paMMV) (Nakajima et al. 1994 ; Natsuaki et al. 1994). La culture des méristèmes a produit des plants non infectés donnant de très bons rendements en HE mais qui, une fois cultivés en milieu naturel, ont été très rapidement recontaminés (Sugimura et al. 1995). L'introduction des traits de résistance par des croisements classiques n'est pas possible puisque le cultivar ne produit pas de fleur. Des chercheurs ont donc transformé avec succès génétiquement des cultivars de patchouli afin de produire dans le futur un OGM résistant au deux virus (Sugimura et al. 2005).

Il y a aussi des exemples de transformations génétiques pour augmenter l'expression de certains FT. En effet, la STPS du patchouli est régulée en fonction de l'âge de la plante par un FT. En intervenant sur ce FT, on peut obtenir des plantes ayant une croissance accélérée, ce qui donnera des rendements plus élevés dans le même laps de temps (Yu et al. 2015). Agir sur les FT est une nouvelle voie d'ingénierie métabolique de plus en plus étudiée.

Chez la lavande aspic (*Lavendula latifolia*), il a aussi été tenté de surexprimer la DXS pour produire plus d'HE. Les résultats montrent une augmentation des COV de 102 à 359% dans les feuilles et de 12 à 74% dans les fleurs (Muñoz-Bertomeu et al. 2006). Une surexpression de la limonène synthase a aussi, permis une augmentation de 450% de limonène dans les feuilles (Muñoz-Bertomeu et al. 2008). De même, chez le lavandin, des chercheurs essaient d'éteindre le gène responsable de la production de camphre indésirable olfactivement mais les résultats à ce jour ne sont pas encore connus.

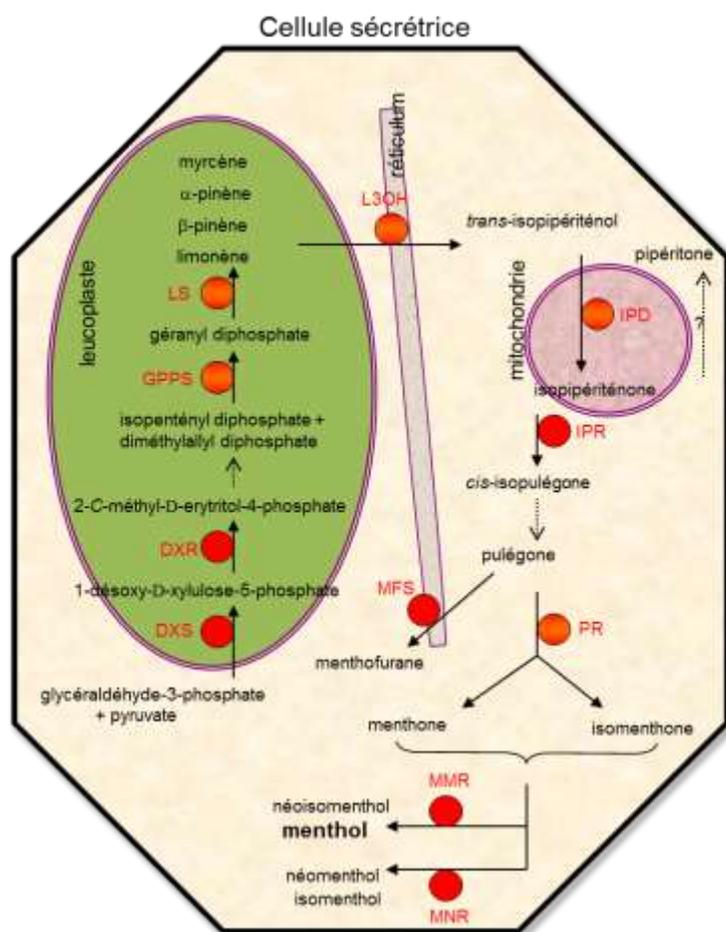
#### L'optimisation des voies de biosynthèse par transformation d'une autre plante productrice

Les gènes d'intérêt peuvent aussi servir à transformer une plante qui ne produit pas de composés odorants. Ainsi, la société Firmenich, après avoir caractérisé la STPS du patchouli, responsable de la production de la majorité des sesquiterpènes de l'HE (Deguerry et al. 2006), a transformé des plants de tabac. Les chercheurs ont inséré la STPS du patchouli ainsi que les autres enzymes situées en amont de la voie de biosynthèse et responsables de la production du FPP, qui est peu produit naturellement par le tabac (Wu et al. 2006). La production des sesquiterpènes de patchouli a bien été bien efficace mais le tabac n'ayant pas de trichomes glandulaires, l'HE s'écoule sur les feuilles sans s'y accumuler (Chappell et al. 2007). La récolte de l'HE à partir de la culture des tabac en champ n'a donc pas été possible. A la suite de cet essai aux résultats mitigés sur le tabac, Firmenich a aussi développé une stratégie pour produire

un extrait de patchouli dans une levure. Des essais de transformation d'une mousse avec une patchouli synthase et une  $\alpha/\delta$ -santalène synthase sont aussi en cours (Zhan et al. 2014).

Dans de nombreux cas d'ingénierie du métabolisme, l'accumulation des terpènes est associée avec une diminution de la croissance et de la chlorose, indiquant un possible effet d'intoxication de la plante et/ou une déviation trop importante du flux de carbone du métabolisme primaire vers la production de ces terpènes (Aharoni et al. 2003, Besumbes et al. 2004 ; Wu et al. 2006). Les plantes qui ont servi à ces expériences ne sont généralement pas des plantes qui accumulent les terpènes (tabac, *Arabidopsis*) et une large quantité est perdue par émission dans l'atmosphère.

D'autres exemples de transformation de plantes avec des gènes de terpène synthases sont donnés dans le **tableau 5**.



**Figure 45 | Schéma d'une cellule sécrétrice de *Mentha x piperita* illustrant la voie de biosynthèse du menthol (d'après Turner et Croteau 2004).** Les étapes enzymatiques sont indiquées en rouge. DXR - 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; DXS - 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; GPPS - géranyl diphosphate synthase; IPD - (-)-trans-isopipériténol déshydrogénase ; IPR - (-)-isopipériténone réductase ; L3OH - (-)-(4S)-limonène-3-hydroxylase ; LS – Limonène synthase ; MFS – (+)-menthofurane synthase ; MMR - (-)-menthone:(-)-menthol réductase ; MNR - menthone:(+)-néomenthol reductase ; PR - (+)-pulégone reductase

Tableau 5 | Exemples d'essais d'ingénierie métabolique sur les monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes et leurs précurseurs et dérivés.

	Espèces	Cible	Localisation	Profil terpénique altéré	Références
<b>Précurseurs</b>	Menthe	DXR	Plaste	Huile essentielle totale ↗↘	Mahmoud et Croteau (2001)
	Tabac	HMGR	Cytosol	Pas de changement	Chappell et al. (1995)
	Arabidopsis	DXS	Plaste	Taxadiène ↗	Bottela-Pavia et al. (2004)
	Arabidopsis	HDR	Plaste	Taxadiène ↗	Bottela-Pavia et al. (2004)
	Arabidopsis	FPPS	Cytosol	Artemisinin ↗	Chen et al. (2000)
<b>Monoterpènes</b>	Menthe	Limonène Synthase	Plaste	Pas de changement	Krasnyanski et al. (1999)
	Menthe	Limonène Synthase	Plaste	Plusieurs produits ↗↘	Diemer et al. (2001)
	Menthe	Limonène Synthase	Plaste	Pas de changement	Mahmoud et al. (2004)
	Petunia	Linalol Synthase	Plaste	Linalol glycosylé ↗	Lücker et al. (2001)
	Tomate	Linalol Synthase	Plaste	Linalol ↗, linalol hydroxyle ↗	Lewinsohn et al. (2001)
	Œillet	Linalol Synthase	Plaste	Linalol ↗, oxydes de linalol ↗	Lavy et al. (2002)
	Arabidopsis	Linalol/nérolidol Synthase	Plaste	Linalol ↗, linalol hydroxylé et glycosylé ↗	Aharoni et al. (2003)
	Pomme de terre	Linallol/nérolidol Synthase	Plaste	Linalol ↗, linalol hydroxylé et glycosylé ↗	Aharoni et al. (2003)
	Tabac	γ-terpinène, β-pinène, limonène Synthases	Plaste	γ-terpinène ↗, limonène ↗, β-pinène ↗ et autres Produits ↗	Lücker et al. (2004)
	Tabac	Limonène Synthase	Cytosol	limonène ↗	Ohara et al. (2003)
	Tabac	Limonène Synthase	Plaste	limonène ↗	Ohara et al. (2003)
	Tabac	Limonène Synthase	ER	Pas de changement	Ohara et al. (2003)
	<b>Sesquiterpènes</b>	Tabac	Trichodiène Synthase	Cytosol	Trichodiène ↗, trichodiène oxygéné ↗
Tabac		Amorpha-4, 11-diène Synthase	Cytosol	Amorpha-4, 11-diène ↗	Wallaart et al. (2001)
Arabidopsis		Linalol/nérolidol Synthase	Plaste	Nérolidol ↗	Aharoni et al. (2003)
Arabidopsis		Germacrène A Synthase	Cytosol	Germacrène A ↗	Aharoni et al. (2003)
Arabidopsis		Linalol/nérolidol Synthase	Mitochondrie	Nérolidol ↗, 4,8-diméthyl-1,3 (E),7-nonatriène ↗	Kappers et al. (2005)
<b>Diterpènes</b>	Arabidopsis	Taxadiène Synthase	Plaste	Taxadiène ↗	Besumbes et al. (2004)
<b>Terpènes modifiés</b>	Menthe	Menthofurane Synthase	ER	Menthofurane ↘, pulégone ↘, menthol ↗	Mahmoud et Croteau (2001)
	Tabac	Cembratrién-ol hydroxylase	ER	Cembratriène-diol ↘, cembratrién-ol ↗	Wang et al. (2001)
	Menthe	Limonène hydroxylase	ER	Limonène ↗, menthofurane ↘, isomenthone ↘, menthol ↘, menthone ↘	Mahmoud et al. (2004)
	Tabac	Limonène hydroxylase	ER	Isopipériténol et dérivés ↗	Lücker et al. (2004)

#### IV.2.6 Les biotechnologies pour produire des OGM de micro-organismes

Nous avons vu que transformer une plante pour la production de COV posait de nombreux problèmes techniques. C'est donc la voie d'une production dans des micro-organismes transformés qui est la plus développée et la plus étudiée actuellement. L'ingénierie des cellules microbiennes pour la biosynthèse des terpénoïdes combine habituellement la surexpression d'un ou plusieurs gènes de plante ainsi qu'une altération du métabolisme de l'hôte (*Kampranis et Makris 2012*). La production de molécules complexes terpéniques dans un hôte microbien, généralement *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* (*Keasling 2010*), offre plusieurs avantages d'échelle, de consommation des ressources naturelles et de développement soutenable, comparée à une extraction classique de ces molécules. Par contre, cela entraîne aussi un certain nombre de risques comme le rejet potentiel des OGM dans l'environnement, la disparition d'une culture et d'un savoir-faire liés à la production d'HE, la disparition de l'entretien des paysages et avec eux de la main d'œuvre liée à cette activité, la simplification des extraits obtenus sans oublier une réaction négative de la part des clients... Il est indéniable que cette révolution aura lieu et sera pertinente pour certains aspects (ressources rares comme des plantes en voie de disparition, problèmes toxicologiques...) mais à cause des nombreux bouleversements que cela peut entraîner, le processus mérite d'être prudemment évalué.

Dans les bactéries et les levures, il existe deux voies de biosynthèses différentes, la voie du MVA chez *S. cerevisiae* et la voie du MEP chez *E. coli*. Cela implique donc des approches différentes pour la production des terpènes dans ces deux micro-organismes. Une première stratégie se propose de fournir à l'organisme hôte la voie de biosynthèse hétérologue alors qu'une deuxième stratégie envisage d'améliorer la voie endogène de biosynthèse de l'hôte. La première a comme avantage principal d'éviter des régulations potentielles par feedback et/ou voie transversale de biosynthèse puisque les métabolites sont étrangers à l'organisme hôte qui n'a donc pas de système de régulation pour ces métabolites. Ces deux approches ont été un succès dans l'augmentation de la production de terpénoïdes (*Mora-Pale et al. 2014*).

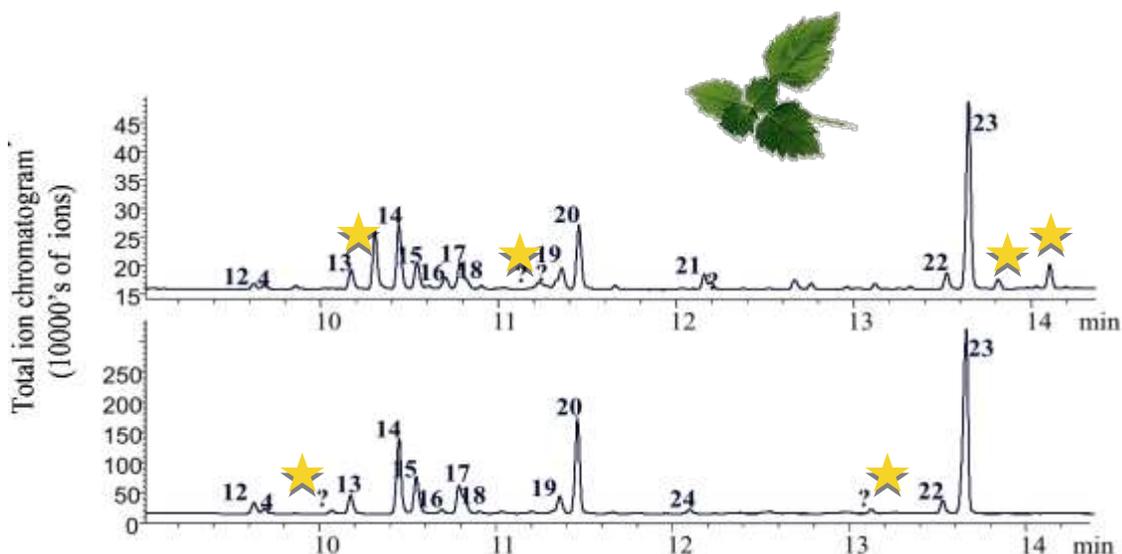
Pour la première stratégie, les sept gènes d'origine bactérienne de la voie du MEP ont été transférés dans *S. cerevisiae* avec succès et se sont révélés fonctionnels (*Maury et al. 2008*). Le transfert de la voie du MVA de la levure dans *E. coli* a aussi été un succès (*Martin et al. 2003*) et a été à l'origine de la production d'amorphadiène en grande concentration (27 g.L<sup>-1</sup>) (*Tsuruta et al. 2009*) (**annexe 19**). La transplantation d'une partie ou de la totalité de la voie du MVA venant d'une bactérie dans *E. coli* a montré aussi une production importante des terpénoïdes ciblés (*Yoon et al. 2009*).

La deuxième stratégie a aussi été beaucoup étudiée. Chez *E. coli*, il a été découvert que plusieurs étapes clés de la voie du MEP étaient limitantes et devaient être surexprimées pour une meilleure productivité (Wang et al. 1999). Cela a aussi permis de mettre en évidence que les mécanismes de régulation de la DXS sont très importants et encore mal connus. La même idée s'applique pour *S. cerevisiae* mais avec plus de difficulté car la levure utilise beaucoup plus les terpénoïdes issus de la voie du MVA notamment les stérols (venant du FPP) pour la constitution de sa membrane. Ainsi pour produire plus de terpènes d'intérêt, il faut aussi réguler cette utilisation, notamment en diminuant l'expression de la squalène synthase. Le résultat est une production d'environ 150 mg.L<sup>-1</sup> de sesquiterpènes d'intérêt comme le patchoulol (Takahashi et al. 2007 ; Asadollahi et al. 2008 ; Zhuang et Chappell 2015).

La transplantation complète de la voie du MVA dans *E. coli* est sans doute la stratégie la plus prometteuse pour générer une plateforme microbienne de synthèse de terpènes (Leonard et al. 2010). Cependant, un défi de taille doit encore être relevé. En effet, nous avons vu lors du paragraphe III.4.3.4 sur la maturation des terpènes que c'est l'action d'enzymes comme les cytochromes P450 qui génère la diversité des terpénoïdes. Utiliser *S. cerevisiae* qui possède des enzymes très similaires à celles des plantes est un avantage (Igneva et al. 2015). Néanmoins, des stratégies alternatives pour utiliser la plus grande productivité d'*E. coli* sont actuellement testées (Picaud et al. 2007). Les voies de recherches sont donc nombreuses et ont déjà abouti à un produit pour la parfumerie : le Clearwood™, commercialisé par l'entreprise Firmenich en 2014 (annexe 20).

#### Clearwood™

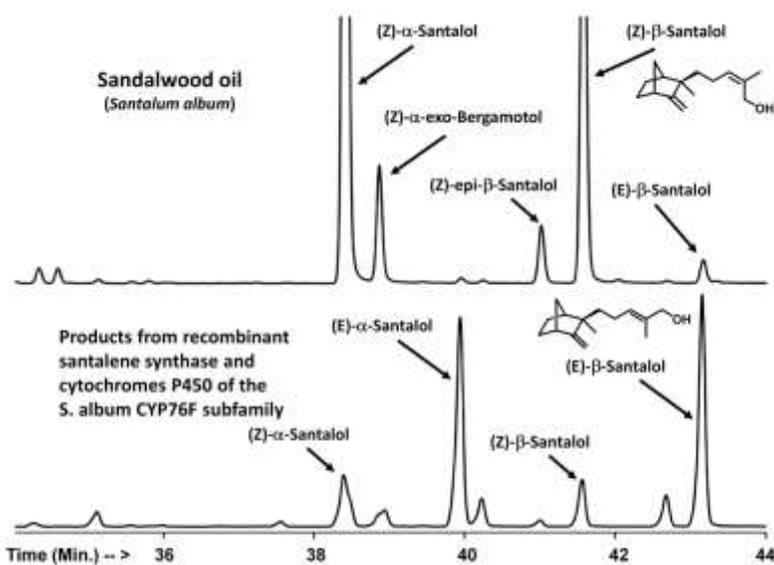
Le Clearwood™ est un produit mimant l'HE de patchouli (figure 46) issu de la biotechnologie. Le patchouli, *Pogostemon cablin*, produit plus de 24 sesquiterpènes (Buré et Sellier 2004). La première caractérisation d'une patchoulol synthase en 1990 (Munck et Croteau 1990) a montré qu'elle était responsable de la production de nombreux terpènes. En 2006, Deguerry et al. (2006) ont caractérisé une nouvelle patchoulol synthase. Après avoir essayé de produire sans succès le patchoulol dans des plantes transgéniques de tabac, ils ont ensuite introduit la séquence de cette patchoulol synthase dans une levure, avec un partenariat avec la compagnie Amyris Biotechnologies Inc. La levure est nourrie par du sucre de canne et produit les sesquiterpènes d'intérêt qui sont piégés dans la phase d'un solvant hydrophobe avant d'en être séparés par évaporation.



**Figure 46 | Comparaison d’une analyse GC-MS des sesquiterpènes de l’HE de patchouli extraite de *Pogostemon cablin* avec le produit Clearwood™** extrait de levures. Les pics marqués d’un numéro sont des sesquiterpènes identifiés. Les pics marqués d’un point d’interrogation sont des sesquiterpènes non-identifiés. (12)  $\beta$ -patchoulène; (4)  $\beta$ -élémane; (13) trans- $\beta$ -caryophyllène; (14)  $\alpha$ -guaïène; (15) seychellène; (16)  $\alpha$ -humulène; (17)  $\alpha$ -patchoulène; (18)  $\gamma$ -patchoulène; (19) 4,11 – guaidiène; (20)  $\alpha$ -bulnescène; (21) nérolidol; (22) (-)-pogostol; (23) (-)-patchoulol. Les étoiles représentent les différences observées entre les 2 extraits.

### Bioproduit de bois de Santal

Les voies de biosynthèses des sesquiterpènes de l’HE du santal ayant été élucidées et les enzymes caractérisées (Jones et al. 2008, 2011, Diaz-Chavez et al. 2013, Moniodis et al. 2015, Srivastava et al. 2015), l’étude de l’optimisation de ces voies métaboliques a commencé (Scalcinati et al. 2012a) et la production d’un bioproduit comprenant les principaux sesquiterpènes de l’HE (figure 47) est envisageable rapidement (Scalcinati et al. 2012b).



**Figure 47 | Comparaison d’une HE de bois de santal avec un bioproduit de bois de santal produit par biotechnologie** (d’après Diaz-Chavez et al. 2013)

Dans la majorité des cas, la technique consiste à intégrer dans le micro-organisme la séquence de TPS d'intérêt et cela, sans changer la voie en amont déjà optimisée pour la biosynthèse des précurseurs des TPS : l'IPP, le DMAPP, le GPP, le FPP ou le GGPP. Ainsi, d'autres molécules très importantes pour la parfumerie sont d'ores et déjà visées par les biotechnologies, comme le vétiver pour lequel un brevet a déjà été déposé (M. Schalk et F. Deguerry 2012 ; Hartwig et al. 2015) et dont le bioproduit est annoncé prochainement ; les composés odorants de rose (Robertet en partenariat avec Gingko Bioworks, une startup du Massachusetts Institute of Technology), le labdane-type diterpène (Igne et al. 2014 ; Papaefthimiou et al. 2014), les composés de l'agarwood (Kumeta et al. 2010) ; et le sclaréol, diterpène lui-même précurseur de l'ambrox et dont la production dans *E. coli* atteint déjà des concentrations honorables (Caniard et al. 2012 ; Schalk et al. 2012 ; Martins et al. 2015) (figure 48 et 49).

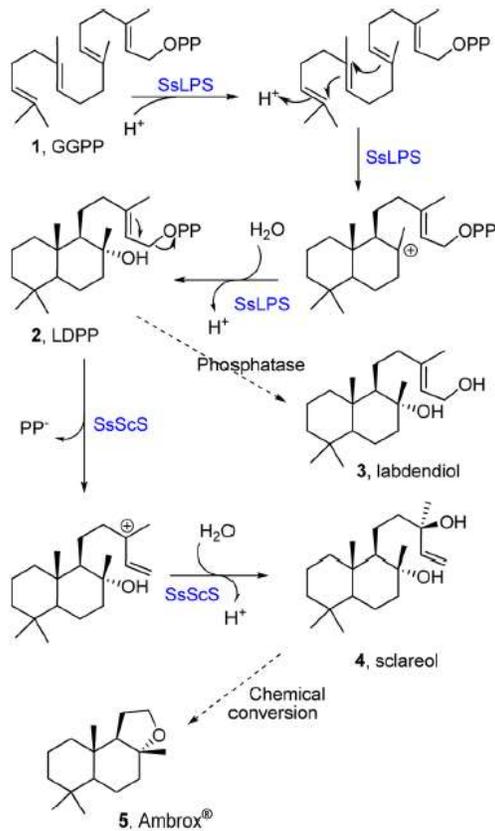


Figure 48 | Etapes successives de la conversion du GGPP (1) en sclaréol (4) par deux diterpène synthases venant de *Salvia sclarea* (SsLPS et SsScS). Il est aussi présenté les structures de l'ambrox (5) dérivé chimiquement du sclaréol et structure du labdènediol (3) obtenu chimiquement après hydrolyse du groupement pyrophosphate du LDPP (2) (d'après Schalk et al. 2012).

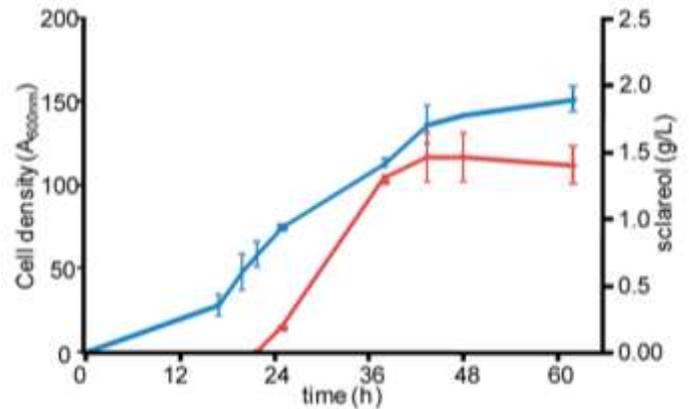


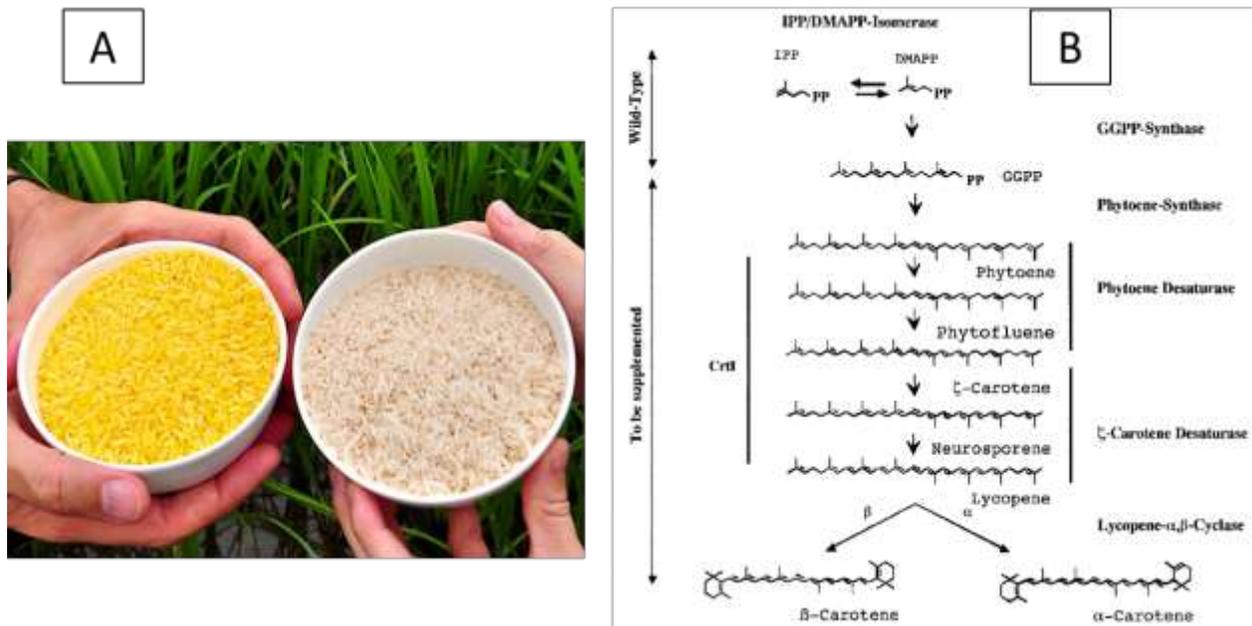
Figure 49 | Production de sclaréol en fermenteur par *E. coli* coexprimant la GGPS, et la sclaréol synthase. L'accumulation du sclaréol (en rouge) et la croissance cellulaire (en bleu) sont montrées. Les données sont des moyennes ± écart types des expériences réalisées en duplicat (d'après Schalk et al. 2012).

### IV.3 Les biotechnologies et l'industrie pharmaceutique

Depuis toujours, l'homme tire de la nature des remèdes qui l'aident à soulager ses maux. Ainsi l'acide ascorbique, la quinine ou encore la pénicilline ont tous en commun de venir d'une source naturelle comme d'ailleurs 60% des médicaments actuels (Cragg et al. 1997). Avec le développement de la chimie organique, tous ces composés ont pu être synthétisés par voie chimique. Certains sont si complexes que la synthèse uniquement chimique est très difficile et très coûteuse (Keasling et Venter 2013). Avec le développement des biotechnologies, l'industrie pharmaceutique s'est mise à étudier les mécanismes mis en œuvre par les organismes pour la biosynthèse de ces molécules. L'industrie pharmaceutique ayant été précurseur dans la production biotechnologique de nouvelles molécules et l'industrie de la parfumerie suivant la même logique, je donnerai quelques exemples emblématiques concernant des molécules d'intérêt pharmaceutique. De plus, un certain nombre de molécules pharmaceutiques sont des terpénoïdes.

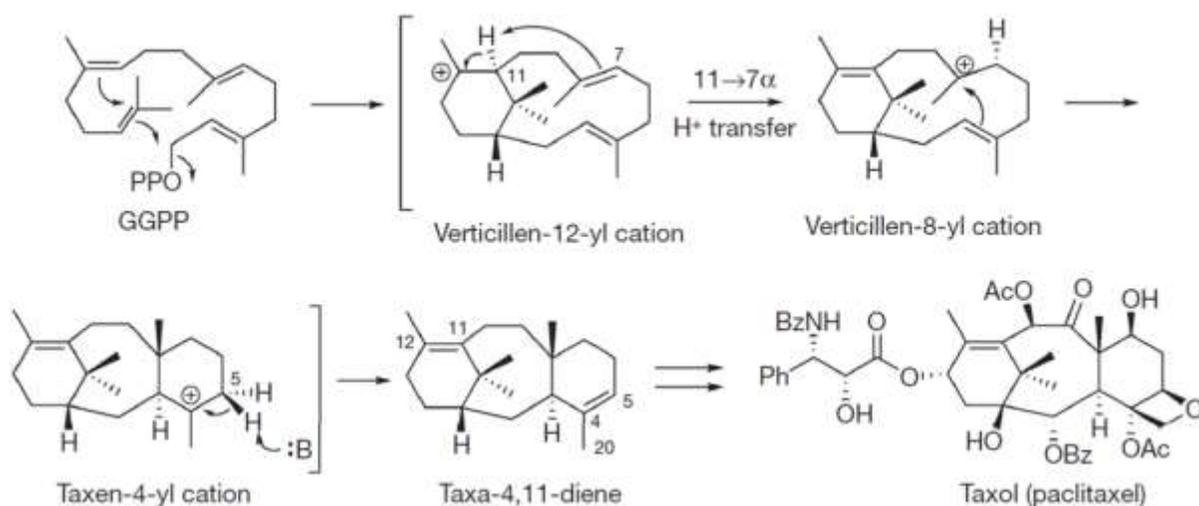
Le premier exemple historique d'utilisation des biotechnologies à des fins thérapeutiques est la synthèse d'insuline. Dans les années 1920, les patients diabétiques étaient traités avec de l'insuline qui était purifiée du pancréas de bovins ou de porcs. Le développement de l'ingénierie génétique a ensuite permis la production de cette insuline via des micro-organismes comme *E. coli* ou des levures. En effet, les gènes encodant l'insuline et l'hormone de croissance furent clonés et exprimés dans *E. Coli* en 1978 et 1979, respectivement et la première production fut développée par Genentech en 1982 (Walch 2005 ; Baeshen et al. 2014).

Le deuxième exemple concerne ce qu'on appelle couramment le riz doré (*Oryza sativa*). Ce riz OGM a été développé après la constatation d'une carence en vitamine A affectant des millions de personnes vivant en Asie du sud-est et dans d'autres pays en voie de développement (UNICEF 2000). En effet, le régime alimentaire des personnes les plus pauvres est principalement constitué de riz, pauvre en vitamine A, ce qui entraîne chez les enfants des retards de croissance et des problèmes oculaires (Beyer et al. 2002). L'idée était d'utiliser les gènes impliqués dans la biosynthèse du  $\beta$ -carotène (un tétraterpénoïde en C40), précurseur de la vitamine A, mais non synthétisé par notre organisme. Les chercheurs ont donc caractérisé ces gènes chez le narcisse (*Narcissus pseudonarcissus*) et les ont transférés dans le génome du riz (Schaub et al. 2005) (figure 50).



**Figure 50 | A Golden Rice. B Voie de biosynthèse du  $\beta$ -carotène** (d'après Beyer et al. 2002). CrtI est une carotène désaturase bactérienne qui peut assurer toutes les réactions de désaturation nécessaires alors qu'il faut deux enzymes chez les plantes pour effectuer ces désaturations. La flèche « To be supplemented » montre la séquence de réactions nécessaires à rajouter au riz sauvage pour arriver à la synthèse complète de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -carotène.

Le troisième exemple est la production de taxadiène, précurseur du taxol (commercialisé sous le nom de Paclitaxel) dont l'activité anticancéreuse est bien établie. Le taxol est un diterpène qui a été pour la première fois isolé à partir de l'écorce de l'if (*Taxus brevifolia*) (Wani et al. 1971). A cause de son faible rendement (0,01-0,1% en poids sec d'écorce) et de son extraction destructive, il est impossible économiquement de le produire en quantité suffisante (Kingston 1991). La voie synthétique, très lourde, n'est pas non plus viable. La seule source est une extraction d'un précurseur à partir des épines de *Taxus baccata* (Hezari et al. 1997). La culture cellulaire d'if a aussi joué un rôle comme source soutenable de taxol (Ketchum et Gibson 1996). De nos jours, c'est plutôt une production par biotechnologie, en faisant produire du 4(5),11(12)-taxadiène (précurseur du taxol) à des levures qui est envisagée (Hezari et al. 1997). La taxadiène synthase a en effet été caractérisée depuis la fin des années 1990 (Hezari et al. 1995) (figure 51).



**Figure 51 | Mécanisme catalytique de la taxadiène synthase** (d'après Köksal et al. 2001). La cyclisation du GGPP pour former le taxadiène, est la première étape dans la synthèse du Taxol (paclitaxel) dans les espèces d'ifs. OPP, diphosphate; Ph, phényl; Ac, acétyl; Bz, benzyl.

L'artémisinine (une sesquiterpène lactone) est la molécule active qui permet de lutter contre la malaria, maladie touchant 300 à 500 millions de personnes. Celle-ci permet de lutter efficacement contre le parasite *Plasmodium falciparum* responsable de la maladie et contre lequel aucun vaccin efficace n'a encore été développé. Longtemps cette molécule a été extraite et purifiée de l'arbuste *Artemisia annua* L. avec de faibles rendements, avec des problèmes de coût et de disponibilité du traitement (Enserink 2005). La synthèse chimique complète est aussi très chère et difficile. Récemment, la voie de biosynthèse du précurseur direct cette molécule (l'acide artémisinique) a été élucidée et les enzymes responsables des étapes clés caractérisées (annexe 21) (Ro et al. 2006). L'entreprise Amyris Biotechnologies Inc. a donc inséré les gènes codant pour ces enzymes dans la levure *S. cerevisiae* et a produit de l'acide artémisinique à un coût bien inférieur à celui obtenu par extraction de la plante (Paddon et Keaslings 2014). La dernière étape pour arriver à l'artémisinine, commercialisée par Sanofi, se fait toujours par synthèse chimique. La chercheuse chinoise Youyou Tu, responsable de l'identification de cette molécule thérapeutique emblématique, a été récompensée par le prix Nobel de médecine en 2015.

Aujourd'hui, il y a plus de 300 produits biopharmaceutiques sur le marché incluant des protéines thérapeutiques et des anticorps et les ventes dépassent 100 milliards de dollars (*Goodman 2009 ; Nielsen 2013*). Les biotechnologies ont donc acquis une place dans nos sociétés et ont grandement fait progresser la médecine. Néanmoins, avec la généralisation et le développement de ces nouvelles technologies, certains problèmes et débats éthiques surgissent. Ainsi, très récemment, deux professeurs de science politique du MIT ainsi qu'un de leur collègue, professeur à l'école de santé publique de l'université d'Alberta au Canada s'interrogeaient dans la revue *Nature* sur les conséquences possibles de la production de morphine par biotechnologie (*Oye et al. 2015*). En effet, les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de cet alcaloïde sont maintenant tous caractérisés et la biosynthèse de morphine a déjà été effectuée (*Thodey et al. 2014 ; Galanie et al. 2015 ; DeLoache et al. 2015 ; Fossati et al. 2015 ; Winzer et al. 2015*). Cette découverte majeure est une bonne nouvelle pour la santé publique et les gouvernements car cela mènera certainement à une production de morphine de très bonne qualité et moins chère pour soulager la souffrance des patients. Cependant, cette technologie pourrait facilement être détournée pour la production de drogue. En effet, mettre en place une filière ne requiert pas de matières premières en grandes quantités (les levures consommant exclusivement du sucre) ni des installations sophistiquées (une installation de type « brasserie » pourrait théoriquement remplir le rôle de bioréacteur)... Les auteurs tirent donc la sonnette d'alarme et attirent notre attention sur le développement rapide et trop peu encadré de ces nouvelles biotechnologies...

#### IV.4 Les biotechnologies et l'industrie agroalimentaire

Le défi de nourrir une population grandissante avec une nourriture de meilleure qualité et d'une manière soutenable en respectant l'environnement est très important. La FAO<sup>52</sup> des nations-unies table sur une augmentation de 70% de demande en nourriture à l'horizon 2050 (FAO 2009). Il est probable que cela demandera des recherches et des développements dans le domaine des biotechnologies. Dans un futur proche, la pression sociétale au niveau de la sécurité alimentaire ainsi que des pratiques agricoles soutenables vont promouvoir la recherche sur le rôle des COV dans l'environnement terrestre et leur utilisation pour la protection des récoltes (Poppy et Sutherland 2004 ; Kappers et al. 2005).

Quand un consommateur mange un maïs génétiquement modifié, il ingère aussi l'ADN et les protéines produites par ce maïs transgénique et donc aussi la partie du génome modifié. Ce n'est pas le cas lorsque l'on fait produire dans une bactérie ou une levure une molécule particulière, que l'on extrait et que l'on commercialise séparément sans garder une trace de l'ADN modifié. La législation est d'ailleurs assez floue puisque pour l'instant, une molécule produite par un organisme génétiquement modifié n'est pas considérée comme un produit OGM. C'est cette nuance qui est exploitée par les industriels. Nous allons donner quelques exemples d'applications directes des biotechnologies dans l'industrie agroalimentaire car ces technologies sont très proches de celles utilisées dans l'industrie des plantes à parfums.

Avec le réchauffement climatique, beaucoup de recherches sont menées sur l'utilisation des biotechnologies pour améliorer la résistance des plantes aux stress abiotiques, comme le stress hydrique. Les biotechnologies pourraient aussi servir à la protection des plantes vis-à-vis de stress biotiques. En effet, le rôle des COV en attirant les ennemis naturels des insectes herbivores suscitent un intérêt croissant dans l'amélioration de la défense naturelle des plantes via l'ingénierie génétique des composés volatils (Dudareva et Pichersky 2008). Ceci pourrait permettre de réduire l'utilisation des pesticides (Degenhardt et al. 2003).

Les premières essais d'augmentation des émissions de sesquiterpènes dans les tissus aériens ou souterrains ont été réalisés sur *A. thaliana* en surexprimant la farnésyl diphosphate synthase dans le but de produire une quantité plus importante de E-β-farnésène qui est un répulsif très efficace (Bhatia et Bhattacharya 2015). D'autres essais ont été aussi réalisés sur le maïs et le riz (Cheng et al. 2007; Degenhardt et al. 2009; Kappers et al. 2005). De telles manipulations d'un cocktail de volatils pourraient

---

<sup>52</sup> FAO pour Food and Agriculture Organization

être applicables dans des stratégies intégrées de gestion des insectes nuisibles comme le système « push-pull » (*Khan et al. 2008 ; Tholl et al. 2011*).

Il a aussi été montré par de nombreuses études qu'une exposition de la plante à des composés volatils induits lors de l'attaque d'herbivores augmente la défense de la plante (*Fantaye et al. 2014*). Ainsi sans transformer génétiquement la plante, on pourrait diffuser certains COV bien sélectionnés qui entraîneraient la production de molécules défensives par les plantes cultivées (*Turlings et Ton 2006*). Une autre approche, utilisée dans la lutte intégrée, est la coculture des plantes d'intérêt avec d'autres plantes émettrices de composés répulsifs. Ainsi la co-culture du maïs avec une herbe africaine (*Melinis minutiflora*) qui émet des COV en grande quantité a déjà montré de bons résultats (*Khan et al. 2000*).

Certaines plantes ne sont que très rarement pollinisées car elles n'émettent que très peu de COV à destination de pollinisateurs très spécifiques. Il pourrait donc être envisagé, grâce aux techniques de génie génétique, d'élargir la palette de composés émis par ces plantes afin d'augmenter le nombre d'espèces pollinisatrices et donc la production de graines (*Dudareva et al. 2006*).

Beaucoup de recherches visent à améliorer les qualités gustatives et à doper en actifs bénéfiques pour la santé (vitamines, caroténoïdes, polyphénols, flavones...) les produits de notre alimentation (*Klein-Marcuschamer et al. 2007*). On peut donc imaginer des gousses de vanille plus parfumées, des tomates plus succulentes (*Gutensohn et al. 2014*), des céréales de très haute qualité... Les possibilités sont infinies.

Des recherches ont déjà donné des résultats, chez la tomate notamment. Ainsi, lors du murissement du fruit de tomate, l'accumulation des caroténoïdes peut être augmentée significativement par une surexpression de la DXS, enzyme clé de la voie de biosynthèse des terpènes (*Rodriguez-Conception et al. 2001*). D'autres chercheurs ont fait produire une grande quantité de  $\beta$ -carotène à des maïs transgéniques (*Yan et al. 2010*). Ces grains de maïs de couleur orange ont servi à nourrir des poulets dont la chair s'est teintée d'orange et qui contiennent du  $\beta$ -carotène antioxydant en grande quantité...

Pour conclure, les plantes ne sont pas les seules en agriculture à utiliser les nouvelles technologies. Pour donner un seul exemple d'importance économique, l'industrie laitière perd chaque année des milliards de dollars à cause de la mastite, une maladie qui affecte le pis des vaches laitières. Des chercheurs expérimentent actuellement des vaches génétiquement modifiées dont le lait contient de la lyotaphine, une substance biochimique qui attaque la bactérie responsable de la maladie (*Wall RJ et al. 2005*).

## V. CONCLUSIONS

Comme souligné tout au long de l'introduction, la compréhension de la biosynthèse des COV et leurs rôles dans leur environnement est un sujet complexe, ayant des applications très larges et faisant interagir de nombreux domaines de recherche. Cela concerne des disciplines très fondamentales telles que l'écologie chimique, la biochimie et physiologie végétale en passant par des disciplines plus appliquées comme la phytopathologie ou encore le génie biologique et biochimique. Le monde des COV est très riche d'enseignements et nombre d'applications peuvent concerner et intéresser directement les entreprises des cosmétiques et de la parfumerie.

La société IFF est depuis plusieurs années très engagée en amont de la composition du parfum puisque via sa filiale IFF-LMR, elle intervient à la source même de la production d'extraits végétaux. Les coûts de production des produits naturels pour la parfumerie sont de plus en plus problématiques à cause des faibles rendements mais aussi parce qu'ils sont liés à une main d'œuvre et une consommation d'énergie souvent importantes. Si l'on peut se réjouir que les travailleurs soient de mieux en mieux rémunérés à travers le monde, il devient maintenant urgent de revoir le modèle ancien de la culture des plantes aromatiques car celui-ci est dépassé. La demande pressante des clients vis-à-vis de leurs fournisseurs d'extrait naturels nous pousse à investir la filière davantage en amont que par le passé.

Si nous voulons augmenter les rendements, l'amélioration par un travail sur les procédés d'extraction déjà bien optimisés, sera marginale. Il est donc important de focaliser une partie de notre effort de recherche sur le végétal lui-même ! Nous l'avons vu dans le paragraphe IV sur les biotechnologies, pour améliorer les rendements de récupération des molécules d'intérêt, les leviers les plus prometteurs sont l'amélioration des pratiques agricoles et le progrès génétique des variétés. Il est donc urgent de travailler sur les leviers qui devraient permettre un réel gain de rendement entraînant une diminution substantielle des coûts et une pérennisation de la filière. C'est dans cette voie que s'est engagée la société IFF-LMR, notamment en développant depuis plusieurs années des partenariats soutenables avec des producteurs locaux.

## VI. Objectifs de la thèse

La thèse porte sur la production d'huile essentielle chez le *Pelargonium* à odeur de rose : *Pelargonium x hybrida* cv 'Rosat'. Les questions principales qui se posent sont les suivantes :

- Quelle est la diversité des COV présents dans le genre *Pelargonium* et quels sont les composés clés de l'HE ?
- Comment ces composés principaux sont-ils synthétisés dans les feuilles ?
- Quels sont les paramètres, endogènes et exogènes qui influencent cette synthèse ?

Lorsque j'ai débuté cette thèse, aucun gène des voies de biosynthèse du parfum n'était connu chez cette plante. Pour répondre aux questions ci-dessus, plusieurs objectifs ont donc été définis :

**L'objectif principal de cette thèse** est la caractérisation des enzymes intervenant dans la biosynthèse des terpènes chez le *Pelargonium*, en tirant parti des connaissances disponibles chez d'autres espèces modèles pour la production de parfum. En particulier, nous nous intéresserons à cloner et à caractériser fonctionnellement des gènes codant les enzymes clés de ces voies de biosynthèse, les terpène synthases. Leur caractérisation fonctionnelle se fera après expression et purification des protéines recombinantes chez *Escherichia coli*.

Nous sélectionnerons un petit nombre de gènes codant pour des terpène synthases que nous aurons isolés afin d'analyser leur expression dans différentes accessions (RT-qPCR). L'objectif est de déterminer si la capacité de production des différents composés volatils est en relation avec l'expression dans les feuilles de certaines terpène synthases.

Enfin, la transformation génétique du *Pelargonium* par *Agrobacterium tumefaciens* étant possible, des expériences de transgène seront aussi effectuées afin de compléter la caractérisation fonctionnelle des gènes isolés.

**Un deuxième objectif porte sur l'inventaire des COV**, en particulier les terpènes, chez différentes espèces et cultivars de *Pelargonium* odorants. Pour cela, nous choisirons plusieurs espèces et cultivars de *Pelargonium* d'intérêt, aux caractéristiques de parfum contrastées (après analyse par GC-MS) et réaliserons une étude analytique et statistique de leur biochimie. La sélection se fera en fonction du

matériel disponible (au minimum les espèces botaniques *P. capitatum*, *P. radens* et *P. graveolens* et les cultivars 'Rosat Bourbon', 'Rosat Égypte' et 'Rosat Chine') mais sera la plus exhaustive possible. En parallèle de ces analyses, un panel de parfumeurs caractérisera olfactivement ces accessions.

**Le troisième objectif** porte sur l'optimisation des pratiques culturelles du *Pelargonium* en Egypte. Ce travail sera réalisé dans la nouvelle unité de distillation construite en Egypte par l'entreprise IFF-LMR, en collaboration avec l'entreprise Hashem Brothers. En particulier, différents paramètres influençant le rendement en HE par unité de surface seront analysés.



## I. MATÉRIEL VÉGÉTAL, SOUCHES ET PLASMIDES

### I.1 Le matériel végétal

#### I.1.1 Pelargonium

Les *Pelargonium* botaniques et les autres hybrides odorants ornementaux viennent pour la plupart du conservatoire national du *Pelargonium*<sup>53</sup> de Bourges, du jardin botanique du parc de la Tête d'Or<sup>54</sup> à Lyon et de la pépinière Heurtebise<sup>55</sup> à Clansayes (**tableau 6**). Les hybrides *P. cv 'Rosat Chine'*, *P. cv 'Rosat Égypte'* et *P. cv 'Rosat Bourbon'* sont cultivés en Chine, en Égypte, sur l'île de la Réunion et proviennent directement de champs cultivés par des partenaires locaux d'IFF-LMR. Ceux-ci sont arrivés sous forme de boutures qui ont repris très facilement en pépinière après bouturage. Les hybrides *P. cv 'Rosat Grasse'* et *P. cv 'Toussaint'* proviennent de notre partenaire Sébastien Rodriguez travaillant en exclusivité pour IFF-LMR à Grasse. Les plants de *Pelargonium* ont tous été cultivés en chambre de culture au LBPvpm à l'université de Saint-Etienne (**figure 52 A et B**) ou en champ à Grasse (**figure 52 C et D**) pour des essais de distillation. Les plantes sont cultivées avec un cycle jour/nuit de 12 h de jour à 25°C et 52 % d'humidité relative sous une luminosité d'5000 Lux, et de 12 h d'obscurité à 17°C et 60% d'humidité relative. L'arrosage était fait pot à pot en laissant au moins une période sèche par semaine. Le *Pelargonium* est aussi cultivé en CIV afin de disposer de matériel stérile pour des expériences de transformation stable avec les terpène synthases caractérisées (**figure 52 G et H**).

Des essais de transplantation et d'acclimatation des hybrides *P. cv 'Rosat Chine'*, *P. cv 'Rosat Bourbon'* et *P. cv 'Toussaint'* ont été réalisés en Égypte chez notre partenaire Hashem Brothers (**figure 52 E et F**).

Le détail des caractéristiques morphologiques, chimiques ainsi que des informations relatives aux pratiques agricoles des cultivars utilisés en parfumerie se trouvent dans l'article *Blerot et al. (2015)*.

#### I.1.2 Nicotiana benthamiana

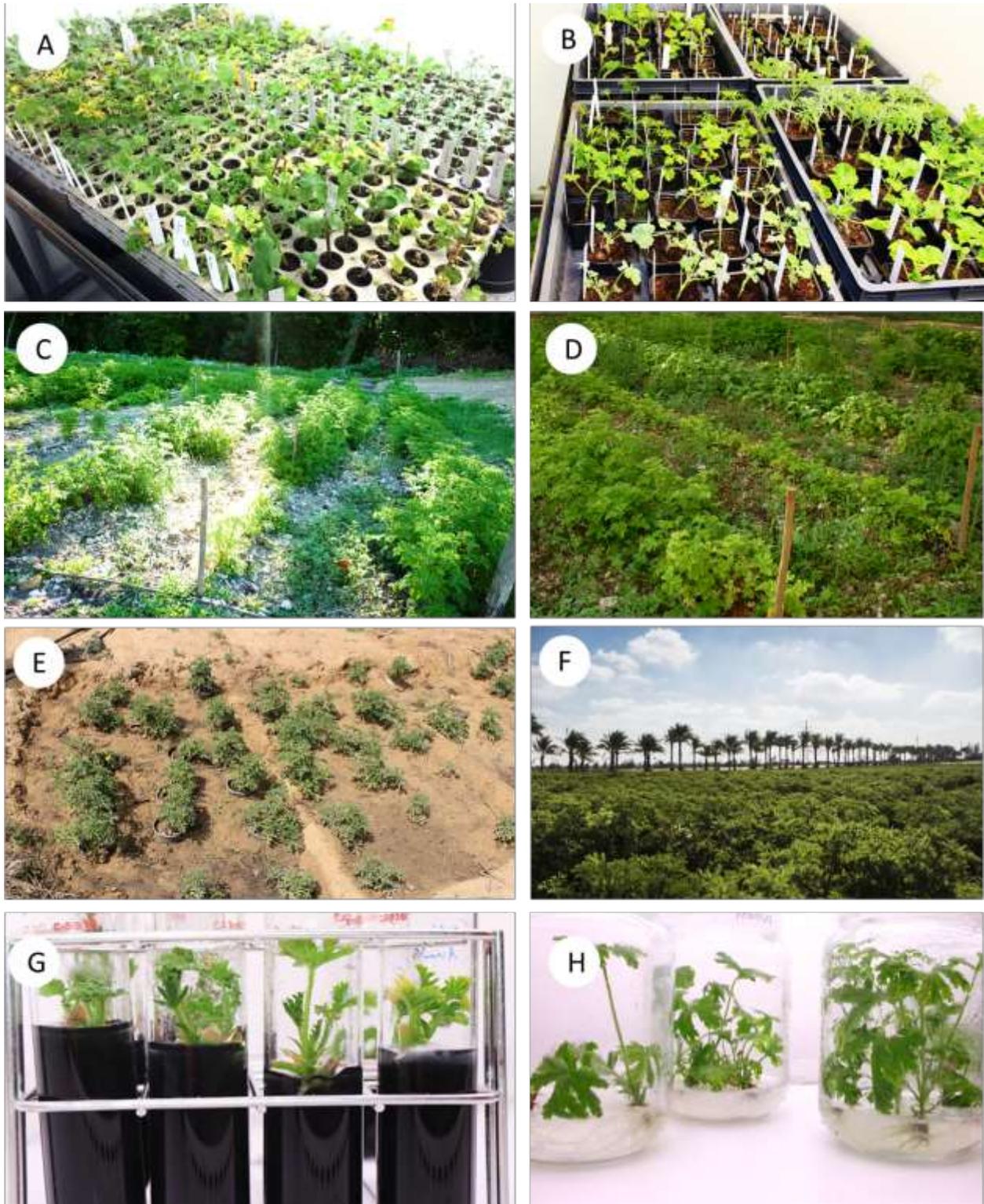
Les expériences de localisation subcellulaire par expression transitoire d'un gène après infiltration d'*Agrobacterium tumefaciens* sont réalisées sur l'espèce de tabac *Nicotiana benthamiana*. C'est aussi ce tabac qui est employé pour étudier l'effet de la surexpression d'un gène sur les composés volatils produits après une transformation stable.

---

<sup>49</sup> Conservatoire national du *Pelargonium* - Domaine Horticole de Bourges, 40 Chemin de Tortiot - 18000 Bourges.

<sup>54</sup> Jardin botanique du parc de la Tête d'Or - Place Général Leclerc - 69006 Lyon

<sup>55</sup> Pépinière Heurtebise - 67 Chemin Morin - 26130 Clansayes



**Figure 52 | Cultures de *Pelargonium* odorants à Saint-Etienne, à Grasse et en Égypte. A et B - Boutures de *Pelargonium* dans les serres de l'université de Saint-Etienne. 68 espèces botaniques, hybrides et cultivars ont été multipliés et cultivés jusqu'en pot de 5 litres pour les extractions d'ARN et d'ADN, les observations microscopiques et les caractérisations chimiques par micro-extractions. C et D - Parcelles de *Pelargonium* cultivées à Grasse à partir des boutures de Saint-Etienne afin de disposer de suffisamment de matériel végétal pour des distillations et extractions représentatives en laboratoire. Les *Pelargonium* cultivés à Grasse ont aussi fait l'objet d'une évaluation olfactive des parfumeurs d'IFF sur la matière verte fraîche, les huiles essentielles et les absolus obtenus au laboratoire. E - Acclimatation en Égypte des boutures de *P. cv.* 'Rosat Chine', *P. cv.* 'Rosat Bourbon' et *P. cv.* 'Toussaint'. F - Champ de *P. cv.* 'Rosat Egypte' en Égypte destiné à la production industrielle d'HE de 'géranium'. G et H - Culture *in vitro* de *Pelargonium* afin de disposer de matériel végétal stérile pour des transformations stables.**

Tableau 6 | Collection de *Pelargonium* odorants des serres du LBPam de l'université de Saint-Étienne

Espèces botaniques section <i>Pelargonium</i>		Odeurs	Hybrides ornementaux à odeurs	Odeurs
<b><i>Pelargonium</i></b>	<i>P. capitatum</i>	Rose, menthe	<i>P. 'Aurore Unique'</i>	Fane de carotte, épices
	<i>P. citronellum</i>	Citron, rose	<i>P. 'Blandfordianum'</i>	Menthe, bois, rose, amande
	<i>P. crispum</i>	Citron, citron vert	<i>P. 'Candy Danser'</i>	Citron, rose
	<i>P. cucullatum</i>	Aromatique, floral	<i>P. 'capitatum Attar of rose'</i>	Rose, épices
	<i>P. denticulatum</i>	Menthe, citronnelle, épices	<i>P. 'Charity'</i>	Citron
	<i>P. glutinosum</i>	Balsamique, butyrate, boisé	<i>P. 'Chocolat Tomentosum'</i>	Menthe poivrée
	<i>P. graveolens</i>	Menthe	<i>P. 'Clorinda'</i>	Bois, muscade, épicé, fruité
	<i>P. hispidum</i>	Floral, menthe	<i>P. 'Clorinda Variegatum'</i>	Bois, muscade, épicé, fruité
	<i>P. papillonaceum</i>	Citron	<i>P. 'Concolor Lace'</i>	Noisette, boisé, épices
	<i>P. quercifolium</i>	Boisé, noix de muscade, eucalyptus	<i>P. 'Crispum Peach Cream'</i>	Pêche, lactones, épices
	<i>P. radens</i>	Menthe	<i>P. 'Crispum variegatum'</i>	Citron, fruité
	<i>P. scabroïdes</i>	Savon de Marseille, crème, floral, fruité	<i>P. 'Crispy'</i>	Rose, citron, agrumes
	<i>P. scabrum</i>	Abricot, citron	<i>P. 'Derwood Lavender'</i>	Lavande
	<i>P. tomentosum</i>	Menthe	<i>P. 'Endsleigh'</i>	Poivre, bois
<i>P. vitifolium</i>	Mélisse, citronnelle, épices	<i>P. 'Filicifolium'</i>	Butyrate, banane, fruité	
Espèces botaniques autres sections		Odeurs	<i>P. 'Fragrans'</i>	Clou de girofle, épices
<b><i>Reniformia</i></b>	<i>P. extipulatum</i>	Bois de cèdre, camphre	<i>P. 'Fragrans Lilian Pottinger'</i>	Clou de girofle, épices
	<i>P. odoratissimum</i>	Clou de girofle, pomme verte, fruité	<i>P. 'Fragrans Old Spice'</i>	Clou de girofle, épices
<b><i>Peristera</i></b>	<i>P. grossularioïdes</i>	Poire, noix de coco	<i>P. 'Fragrans Variegated'</i>	Clou de girofle, boisé
<b><i>Jenkinsonia</i></b>	<i>P. trifidum</i>	Aromatique, boisé, citron, vert	<i>P. 'Fragrans X white'</i>	Clou de girofle, boisé
	<i>P. praemorsum</i>	Patchouli, mousse d'arbre, fruité	<i>P. 'Greytonense'</i>	Fruité
	<i>P. mutans</i>	Poivre, boisé, épices	<i>P. 'Karooense Knuth'</i>	Menthe, boisé
<b><i>Ciconium</i></b>	<i>P. peltatum</i>	Vert	<i>P. 'Lavender'</i>	Aromatique, fruité
<b><i>Subsucculentia</i></b>	<i>P. otanviens</i>	Fruité, boisé	<i>P. 'Lady Plymouth'</i>	Rose, fruité
<b><i>Myrrhidium</i></b>	<i>P. myrrtifolium</i>	Myrrhe, boisé, épices	<i>P. 'Lemon Fancy'</i>	Citronnelle, citron
Hybrides cultivés		Odeurs	<i>P. 'Lemon Juicy'</i>	Agrumes, citron
	<i>P. cv. 'Rosat Grasse'</i>	Rose, menthe	<i>P. 'Lilac lady'</i>	Epices, floral, vert, fruité
	<i>P. cv. 'Rosat Égypte'</i>	Rose, menthe	<i>P. 'Mabel grey'</i>	Citron, rose
	<i>P. cv. 'Rosat Chine'</i>	Rose, menthe	<i>P. 'Pepper'</i>	Poivre, épices, boisé
	<i>P. cv. 'Rosat Bourbon'</i>	Rose, menthe	<i>P. 'Prince of orange'</i>	Agrumes, fleur d'oranger
	<i>P. cv. 'Toussaint'</i>	Citron, rose	<i>P. 'Quercifolium Royal Oak'</i>	Pin, muscade
Hybrides ornementaux à odeurs		Odeurs	<i>P. 'Radula'</i>	Rose, citron
	<i>P. 'Abrotanifolium'</i>	Pin, fleurs blanches, aromatique	<i>P. 'Robert's Lemon Rose'</i>	Rose, menthe
	<i>P. 'Angulosum'</i>	Floral, fruité	<i>P. 'Scarlet Unique'</i>	Fane de carotte, boisé
	<i>P. 'Ardwick cinnamon'</i>	cannelle	<i>P. 'Toronto'</i>	Citron vert, Coca-cola, épices
	<i>P. 'Attar of rose'</i>	Rose, menthe	<i>P. 'tomentosum chocolat'</i>	Menthe, épices
			<i>P. 'Velvet Rose'</i>	Rose, menthe

## I.2 Les souches bactériennes

### I.2.1 *Escherichia coli*

Trois souches d'*E. coli* sont utilisées dans cette thèse et leurs caractéristiques sont données dans le **tableau 7**.

- La souche JM109 d'*E. coli* est utilisée pour le clonage, la multiplication et la conservation des gènes. La souche TOP10 a été préférée à la souche JM109 pour les clonages Gateway™.

- La souche Rosetta (DE3) pLysS a servi à l'expression des terpène synthases pour tester dans un second temps leurs activités.

### I.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

La souche C58pM90 d'*A. tumefaciens* permet de transformer efficacement les cellules végétales. Elle est utilisée pour l'étude de la localisation subcellulaire par expression transitoire d'un gène et pour la transformation stable du tabac. La protéine P19 est une protéine virale qui réprime le mécanisme de silencing qui a lieu dans les cellules des plantes pour prévenir l'expression de l'ADN étranger lors de la transformation transitoire (Voinnet et al. 2003). Les caractéristiques de cette souche sont données dans le **tableau 7**.

**Tableau 7 | Génotypes des différentes souches de bactéries utilisées**

Souche	Génotype	Résistance aux antibiotiques
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)	Kanamycine
TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Streptomycine/ Kanamycine
Rosetta(DE3)pLysS	F- <i>ompT hsdSB</i> (RB- mB-) <i>gal dcm λ</i> (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLysSRARE (CamR)	Chloramphénicol
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
C58pM90	C58 pTiBo542 ; T-region : :aph, Km(R) ; A281 derivative harboring pEHA101, T-DNA replaced with nptII, elimination of T-DNA boundaries unconfirmed, super-virulent.	Gentamycine + Kanamycine

### I.3 Les plasmides

#### I.3.1 Plasmide de séquençage, multiplication et conservation des gènes

Le plasmide pGEMT<sup>®</sup>-easy (Promega) est utilisé pour le séquençage, la multiplication et la conservation des gènes et fragments de gènes isolés tout au long de l'étude (**figure 53 A**). Ce vecteur a été utilisé pour cloner les séquences génomiques amplifiées avec la polymérase Advantage<sup>®</sup> qui ne produit pas d'extrémités franches. La polymérase Advantage<sup>®</sup> est employée pour amplifier de très longs fragments. Le clonage des gènes se fait au niveau d'un site multiple de clonage situé à l'intérieur du gène lacZ, codant pour la β-galactosidase : ceci permet donc une sélection blanc-bleu des clones ayant intégré l'insert.

Le vecteur pCR<sup>®</sup>-Blunt kan/Zero (Invitrogen) a servi à cloner puis à séquencer les allèles de *PhGES*, *PhEDS*, *PhCINS* et *PhMYS* (**Figure 53 B**). Le vecteur pCR<sup>®</sup>-Blunt contient un gène létal pour *E. coli* (gène *ccdB*) qui est fusionné avec la partie C-terminale de LacZα (*Bernard et al. 1994 ; figure 53 B*). Ainsi, la ligation du fragment pCR-Blunt<sup>®</sup> perturbe l'expression du gène fusion lacZα-ccdB et permet la croissance seulement des recombinants positifs à la transformation.

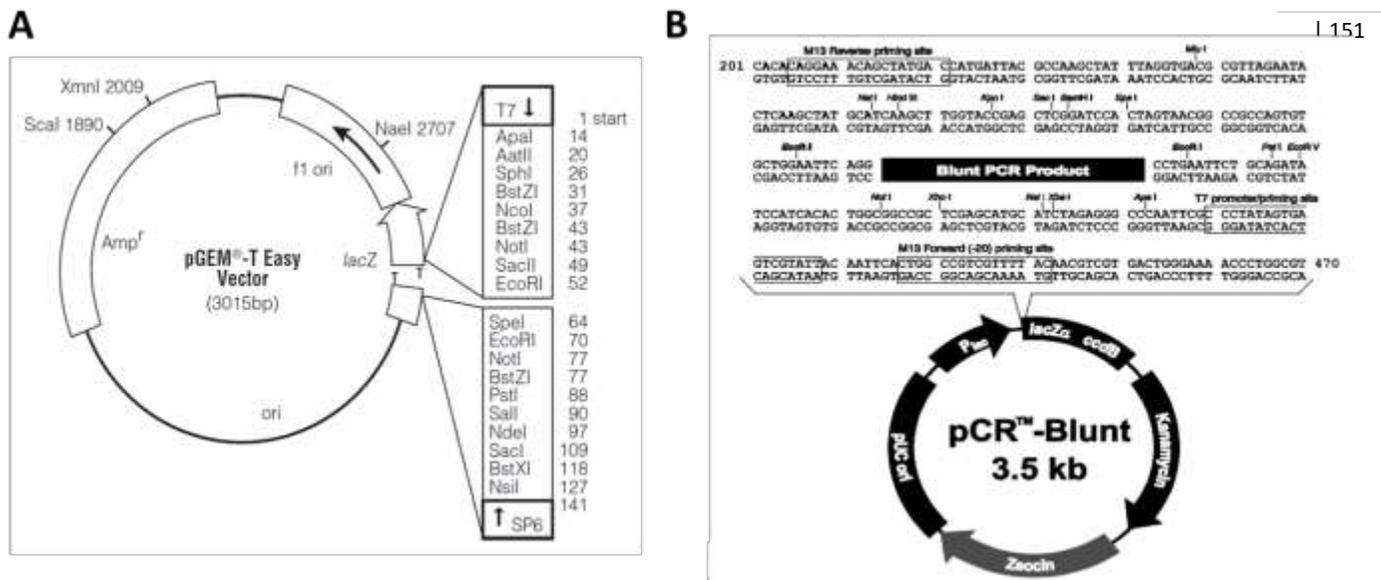


Figure 53 | A - Carte du vecteur de clonage pGEMT<sup>®</sup>-easy et points de référence des séquences (Promega) ; B - Carte du vecteur pCR<sup>®</sup>-Blunt

### 1.3.2 Plasmides d'expression bactérienne

C'est le système Gateway™ (figure 54) qui a été utilisé pour introduire les gènes des TPS dans les vecteurs d'expression bactériens. Il faut donc 2 vecteurs différents : un vecteur d'entrée (pENTR/D-TOPO) et un vecteur d'expression (Busso et al. 2005). Ces 2 vecteurs sont décrits brièvement ci-dessous :

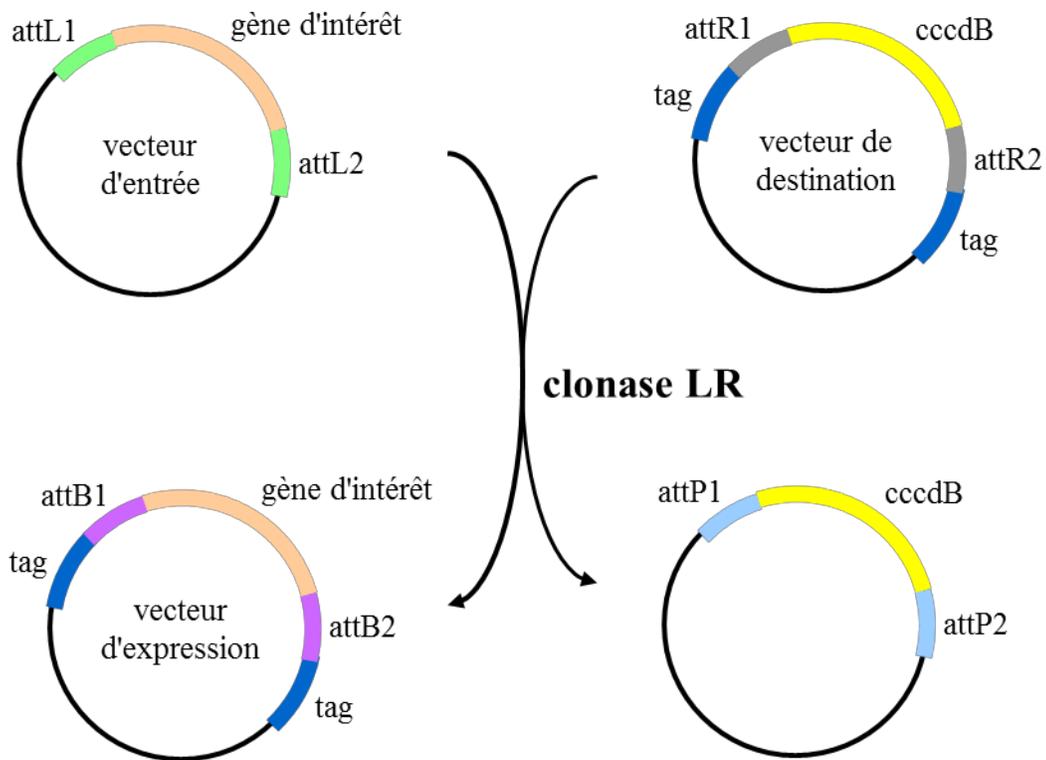


Figure 54 | Schéma du principe du système Gateway™

Le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO

Le plasmide pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) (figure 55) porte la résistance à la kanamycine et est utilisé pour cloner directionnellement le fragment amplifié et flanqué du CACC apporté par l'amorce PCR.

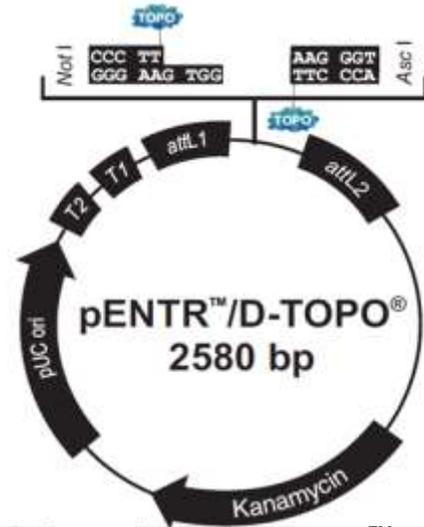


Figure 55 | Carte du vecteur d'entrée pENTR™/D-TOPO®

Les vecteurs d'expression : les vecteurs construits par Busso et al., 2005

Les vecteurs d'expression pHGWA, pHGGWA, pHNGWA, pHXGWA (Busso et al. 2005) possèdent la résistance à l'ampicilline et sont construits à partir du vecteur pET22b (Novagen). Ils ont été modifiés pour permettre l'insertion de la cassette Gateway contenant entre autres les séquences attR pour la recombinaison et l'insertion du gène d'intérêt. Ainsi, ces plasmides permettent d'exprimer les protéines, fusionnées ou non à différentes étiquettes à leur extrémité N-terminale (N-ter). Les quatre vecteurs testés permettent tous de produire une protéine fusionnée à un polypeptide hexahistidine (figure 56). Ces polypeptides de fusion peuvent être éliminés par protéolyse spécifique, en utilisant la thrombine.

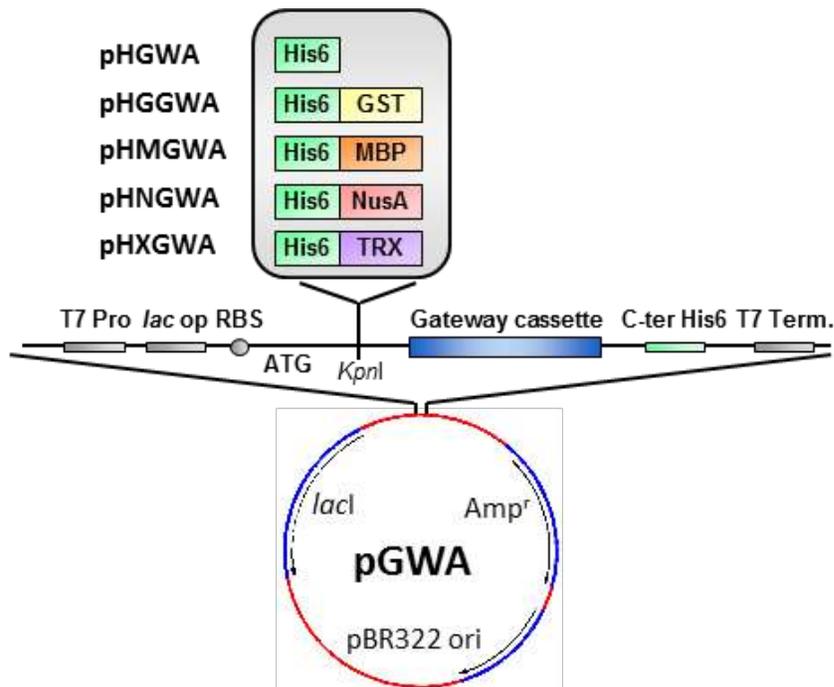


Figure 56 | Vecteurs d'expression construits par Busso et al. (d'après Busso et al. 2005) GST - glutathione S-transferase ; His6 - 6 histidine tag ; MBP - Maltose binding protein ; NusA - N-utilizing substance A ; TRX - thioredoxin.

### I.3.3 Plasmides pour l'expression dans les cellules végétales

#### I.3.3.1 Transformation transitoire

Trois vecteurs sont utilisés pour étudier l'expression transitoire d'un gène dans les cellules végétales :

Le plasmide pK7FWG2 est un vecteur Gateway™ contenant la GFP sans séquence d'adressage sous contrôle d'un promoteur fort (35S::GFP) (figure 57). Elle est donc adressée au cytoplasme des cellules. La souche d'*A. tumefaciens* C58pM90 contient un gène de résistance à la gentamycine et peut donc permettre également l'expression de protéines de fusion à la GFP, en position C-terminale. Il a été utilisé pour l'étude de la localisation subcellulaire par expression transitoire d'un gène après transformation des cellules végétales par infiltration d'*A. tumefaciens*.

Le vecteur pMDC45 et pMDC83 pMDC32

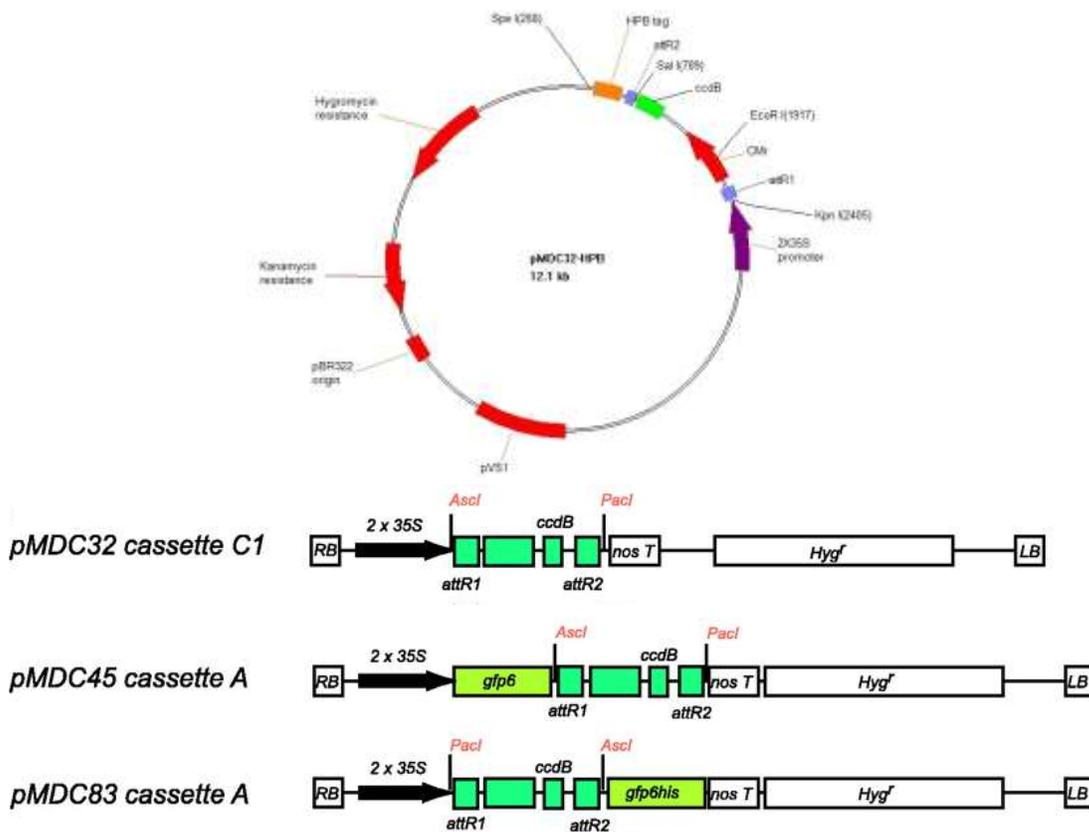


Figure 57 | Cartes des plasmides pMDC32, pMDC45 et pMDC83 utilisés dans l'expression des TPS dans le tabac (*Nicotiana benthamiana*) (d'après Curtis et Grossniklaus 2003 ; Qi et Katagiri 2009)

### I.3.3.2 Transformation stable

Le vecteur Gateway™, pK2GW7, produit par le laboratoire ‘Plant Systems Biology’ de l’université de Gent en Belgique (Karimi *et al.* 2002) (figure 58) permet la surexpression stable d’un gène d’intérêt dans les cellules végétales, sous le contrôle du promoteur simple CaMV35S (Cauliflower mosaic virus (CaMV)). Ce vecteur nécessite d’abord l’introduction du gène d’intérêt dans un vecteur d’entrée, le pENTR/D-TOPO (Invitrogen) (figure 55).

Le vecteur Gateway™ 35S:GFP contenant la GFP sans peptide d’adressage, décrit précédemment, est utilisé comme témoin de transformation afin de s’assurer que les modifications observées sont bien la conséquence de l’introduction du gène d’intérêt.

Le vecteur pK7FWG2 contient un gène de résistance à la gentamycine + GUS<sup>56</sup> (figure 58).

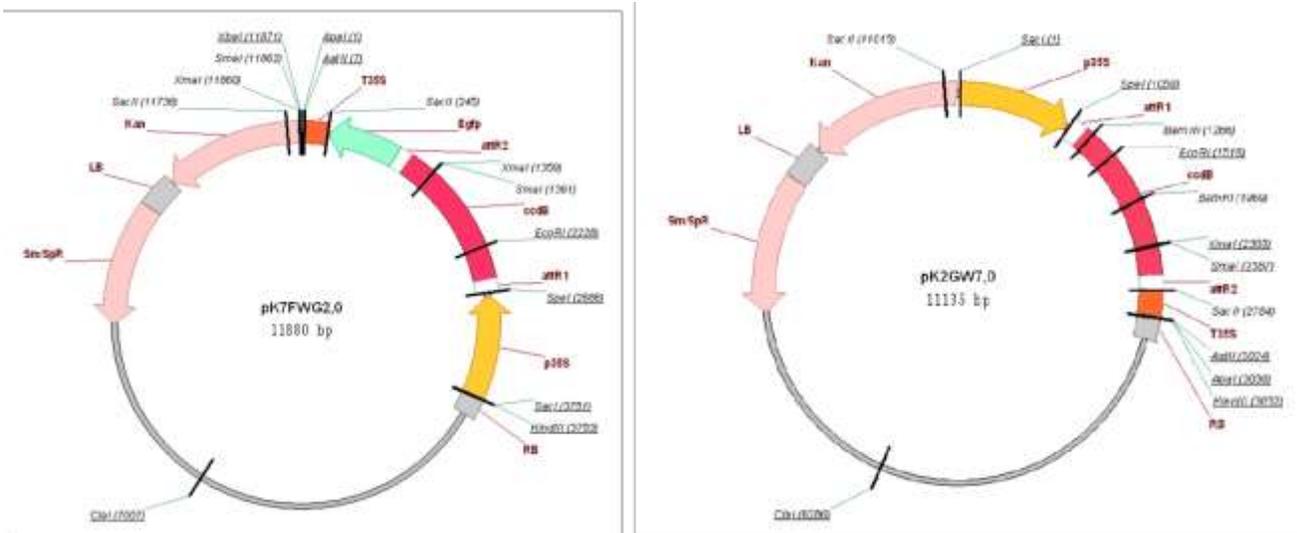


Figure 58 | Carte des vecteurs pK7FWG2 et pK2GW7 utilisés dans les clones

<sup>56</sup> GUS réfère au gène de l’enzyme  $\beta$ -glucuronidase. Le substrat de GUS est le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronic acid qui, lorsqu’il est clivé sous l’action de la  $\beta$ -glucuronidase, produit un précipité bleu insoluble. Le gène GUS est utilisé en tant que gène rapporteur en biologie moléculaire. Il est couplé au promoteur du gène que l’on veut étudier (gène d’intérêt) et s’active en même temps que le gène d’intérêt si celui-ci devient actif. Il y aura donc synthèse de  $\beta$ -glucuronidase et, en présence de son substrat, une coloration bleue qui indiquera l’activité du gène d’intérêt

## II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### II.1 Extraction d'acides nucléiques

#### II.1.1 Extraction d'ARN totaux à partir des jeunes feuilles de *Pelargonium*

Le protocole utilisé est adapté de celui de l'INRA d'Angers (*Chang et al. 1993 ; Cock et al. 1997*). Ce protocole est fastidieux mais pour le *Pelargonium*, il était impossible d'extraire l'ARN à l'aide d'un kit d'extraction du type Macherey Nagel à cause des polyphénols, polysaccharides et des protéines qui perturbent l'extraction.

De jeunes feuilles de *Pelargonium* sont prélevées (1 g) et broyées dans un mortier à l'aide d'azote liquide puis transférées dans un tube Falcon de 50 mL contenant 5 mL de tampon d'extraction (2% (p/v) PVP; 2% (p/v) CTAB; 100mM Tris-HCl pH8; 25mM EDTA pH8; 2M NaCl; Eau Versol qsp 50 mL) et 100 µL de β-mercaptoéthanol. Après broyage, les extraits sont vortexés et incubés pendant 15 min à 65°C puis 1 min à température ambiante. Cinq mL de Chloroforme/alcool isoamylique (24:1) sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 9000 *g* durant 20 min à 4°C. Le surnageant est collecté dans un nouveau tube et le même volume de Chloroforme/alcool isoamylique (24:1) est ajouté puis l'ensemble est vortexé. Après une centrifugation de 10 min à 4°C et 9000 *g*, le surnageant est à nouveau collecté puis 250 µL de chlorure de lithium (2M) par mL de surnageant sont ajoutés dans le but de précipiter l'ARN. Les tubes sont incubés à 4°C pendant 24h. Les tubes sont ensuite centrifugés à 14000 rpm à 4°C pendant 1h, le surnageant est éliminé et 1 mL d'éthanol 70% à -20°C est ajouté. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 5 min et le surnageant éliminé. Cette opération de lavage s'effectue 3 fois puis le culot d'ARN propre est séché. Le culot est ensuite solubilisé dans 25 µL d'eau versol et on ajoute 500 µL de tampon SSTE pour purifier les acides nucléiques (1M NaCl; 0.5% (p/v) SDS; 10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA pH8). L'ensemble est centrifugé à 14000 rpm à 4°C pendant 10 min puis le surnageant (phase aqueuse) est collecté et l'on y ajoute 1 mL d'éthanol 100% + 150 µL d'acétate de sodium 3M à pH 5,7. Le tout est incubé pour la nuit à -20°C. Le lendemain, le tube est centrifugé à 4°C pendant 30 min et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé 3 fois avec de l'éthanol 70% puis avec de l'éthanol 100% et enfin séché à l'air libre. Une fois le culot sec, les ARN seront solubilisés dans de l'eau Versol. Deux fractions aliquotes sont prélevées de façon à estimer d'une part la concentration en ARN totaux par spectrophotométrie ( $DO_{260nm}$ ) et d'autre part la qualité des ARN par migration sur un gel à 1,3 % d'agarose, coloré au bromure d'éthidium.

### II.1.2 Purification d'ADN plasmidique (Mini préparation d'ADN plasmidique)

Le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) est utilisé pour réaliser une purification d'ADN plasmidique. Il permet d'obtenir jusqu'à 15 µg d'ADN plasmidique purifié à partir d'une culture de 2 ml. 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 selon les instructions du fabricant (annexe 22).

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 (NaOH/SDS) sont ajoutés puis mélangés par retournement pour lyser les cellules, 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 du kit NucleoSpin® Plasmid où l'ADN se fixe sur la membrane en silice puis centrifugé 1 min à 11 000 *g*. Le filtrat est éliminé 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 filtrat est jeté et la colonne est ensuite séchée par une centrifugation de 2 min à 11 000 *g*. Enfin, l'ADN plasmidique est élué en ajoutant 50 µL d'eau préalablement chauffée sur la colonne et laissé à incuber 1 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™ 2000c Spectrophotometer (Thermo scientific, France). La qualité du plasmide est également vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (poids/vol de TAE 1X) additionné de BET<sup>57</sup> [10 mg.mL<sup>-1</sup>].

---

<sup>57</sup> BET pour Bromure d'éthidium

## II.2 Obtention d'ADN complémentaire

Une fois les ARN totaux extraits, ils doivent être transformés en ADNc<sup>58</sup> pour une meilleure conservation et afin de quantifier leur expression par PCR<sup>59</sup> et PCR quantitative (qPCR).

### II.2.1 Traitement à la DNase

Malgré les précautions prises lors de l'extraction des ARN, il est possible que les extraits contiennent des traces d'ADN. Il est donc nécessaire de les traiter pour éliminer l'ADN restant. Dans un volume final de 100 µL, 10 µg d'ARN sont additionnés de 10 µL de tampon RQ1 (10X RQ1, Promega), d'1 µL de DNase<sup>60</sup> (RQ1 5U/µL, Promega) et de 1 µL d'inhibiteur de RNase<sup>61</sup> (RNasin 40U/µL, Promega). Le mélange réactionnel est incubé pendant 1h à 37°C. A l'issue de cette étape, 100 µL d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) à pH 8 sont ajoutés, puis une centrifugation à 12800 *g* pendant 10 min à 4°C est réalisée et la phase aqueuse est récupérée. Cette étape, effectuée deux fois, permet l'élimination des protéines. Les ARN sont précipités avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,8) et 2 volumes d'éthanol absolu, pendant 2 heures à -20°C. Après 30 min de centrifugation à 12800 *g* à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 100 µL d'éthanol à 70%, puis centrifugé à nouveau pendant 10 min à 12800 *g* à 4°C. Cette étape de lavage est réalisée deux fois. Les culots d'ARN obtenus sont séchés sous hotte Sorbonne, puis repris dans 10 µL d'eau stérile. Les ARN traités à la DNase sont conservés à -80°C.

### II.2.2 Réaction de réverse-transcription

2 tubes PCR sont chargés avec 5 µg d'ARN traité à la DNase, 1 µL d'oligo dT à 50 µM, 1 µL dNTP à 10mM et de l'eau versol pour atteindre un volume de 13 µL par tube. Les tubes sont ensuite placés dans le thermocycleur et l'ARN est dénaturé à 65°C pendant 5 min. Cette étape permet d'éliminer les structures secondaires des ARN messagers qui pourraient gêner la RT<sup>62</sup>. 7 µL de mélange réactionnel sont alors

---

<sup>58</sup> ADNc pour ADN complémentaire

<sup>59</sup> PCR pour Polymerase Chain Reaction

<sup>60</sup> DNase pour Désoxyribonucléase, une enzyme qui catalyse la dépolymérisation de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

<sup>61</sup> RNase pour Ribonucléase, une enzyme qui catalyse la dépolymérisation de l'acide ribonucléique (ARN)

<sup>62</sup> RT pour Reverse Transcriptase

ajoutés (4 µL de tampon First Strand 5X, 1 µL de DTT 0,1 M ; 1 µL de RNase OUT (Invitrogen) ou RNAsin (Promega) (40 U/µL), 1 µL de SuperScript III RT (200U/µL). Le mélange est ensuite incubé 1 h à 50°C. L'enzyme est inactivée par une incubation de 15 min à 70°C. Une fois refroidis à 15°C, les deux tubes sont rassemblés et les tubes d'ADNc de 50 µL dilués au 1/5<sup>ème</sup>. Les ADNc dilués sont stockés à -20°C.

### II.2.3 Vérification de la qualité des ADNc sur gel d'électrophorèse

Afin de vérifier la qualité des ADNc obtenus, une PCR est réalisée sur les ADNc dilués avec des amorces de l'actine (PhACT1F - CAAGGAGATAACTGCCCTTGCT et PhACT1R - CCACATCTGCTGGAAGGTACTG) obtenus d'un précédent travail par l'université d'Angers (*He et al. 2010 ; Hamama et al. 2012*). Pour cela le mélange réactionnel est préparé (2,5 µL de tampon Dream TAQ Green 10X ; 0,5 µL dNTP (10mM) ; 1 µL amorce Ph ACT1F (10µM) ; 1 µL amorce Ph ACT1R (10µM) ; 0,2 µL Dream TAQ Promega (5U/µL) ; 17,8 µL d'eau versol). Deux µL d'ADNc dilué au 1/5<sup>ème</sup> sont ajoutés, mélangés et centrifugés. Après 35 cycles d'amplification, les produits PCR (échantillon + blanc) sont déposés sur un gel d'agarose 1,2%/TAE coloré au bromure d'éthidium. Une bande à 127 pb doit être observée.

### II.2.4 Vérification de la qualité des ADNc par « fausse » rétro-transcription

L'absence d'ADN contaminant dans les extraits d'ARN peut être vérifiée en réalisant une « fausse » rétro-transcription (RT-). Cette procédure consiste à appliquer le protocole de rétro-transcription sur une partie de l'extrait d'ARN en n'utilisant pas l'enzyme SuperScript III RT (200U/µL). Une fois le protocole terminé, l'échantillon RT- est amplifié par PCR avec un couple d'amorces dont une est définie dans un intron. Après migration sur gel d'électrophorèse et révélation aux UV il ne doit pas y avoir de bande visible. Sinon, l'extrait contient de l'ADN et doit être retiré de l'étude. On peut tester l'échantillon RT- en PCR quantitative (qPCR). Dans ce cas, il ne doit pas y avoir d'amplification ou, au pire, une détection tardive (plus de 35 cycles). L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle utilise une partie de l'extrait d'ARN nécessaire à l'étude et présuppose de disposer de suffisamment d'ARN pour faire une RT et une « fausse » RT.

## II.3 Construction de la banque d'ADNc double brin pour la RACE-PCR<sup>63</sup>

### II.3.1 Purification des ARN messagers

Les ARN messagers des feuilles sont purifiés à partir des ARN totaux suivant les instructions du kit 'Fast Track MAG' (Invitrogen). Le principe repose sur l'utilisation de billes magnétiques sur lesquelles des amorces oligo dT sont fixées. Les ARNm, porteurs d'une queue polyA à leur extrémité 3', se fixent sur ces billes au niveau des amorces oligo dT et peuvent ainsi être séparés des ARN totaux.

Les ARNt sont dilués avec de l'eau versol afin d'obtenir un volume final de 500 µL. Les billes Fast Track sont mises en contact avec un tampon de liaison et les ARNt et le tout est incubé pendant 2-5 min à 65°C. Les billes sont ensuite culotées à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse à température ambiante et pendant 10 min. Les billes sont ensuite culotées à l'aide d'un séparateur magnétique et le surnageant est éliminé. Le tampon de lavage est ajouté immédiatement et les billes remises en suspension pour un lavage efficace. Les billes sont ensuite lavées trois fois et au dernier lavage, après l'élimination du surnageant, les billes sont diluées dans 20-50 µL d'eau Versol. Après une resuspension des billes le mélange est incubé à 37°C puis le séparateur magnétique culote les billes et le surnageant contenant les ARNm est récupéré, dosé et stocké à -80°C. Un gel de contrôle est réalisé afin de vérifier si les ARNm ne sont pas contaminés par des ARN ribosomiques.

| 160

### II.3.2 Obtention de la banque d'ADNc double brin

Pour obtenir la banque d'ADNc double brin nécessaire pour les expériences de RACE-PCR, le kit 'Marathon' (Clontech) est utilisé suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, les ARNm de *Pelargonium* sont purifiés à partir d'ARN totaux extraits des jeunes feuilles. Le premier brin d'ADNc est synthétisé par l'AMV reverse transcriptase en présence d'amorces oligo dT.

Ensuite, l'ARN est dégradé et parallèlement le deuxième brin d'ADNc est obtenu grâce à un mélange d'ADN polymérase I, de RNase H et d'ADN ligase d'*E. coli*. L'enzyme T4 ADN polymérase permet ensuite d'obtenir un ADNc double brin aux extrémités franches. Des adaptateurs de séquence connue sont ligués aux ADNc double brin grâce à la T4 DNA ligase. Ce mélange d'ADNc est ensuite dilué aux 1/50 et 1/250 pour être utilisé dans les réactions de RACE-PCR.

---

<sup>63</sup> RACE pour Rapid amplification of cDNA ends

## II.4 Techniques d'amplification de l'ADN par PCR

### II.4.1 Amplification par oligonucléotides dégénérés

La recherche de gènes impliqués dans la voie de synthèse des monoterpènes est réalisée suivant une stratégie PCR basée sur des homologies de séquences. Ainsi, pour les gènes codant pour les terpène synthases, des séquences de géraniol synthase (la plus importante chez *Pelargonium*) connues chez d'autres espèces sont recherchées dans les bases de données et alignées de façon à définir des oligonucléotides dégénérés dans les zones les plus conservées.

Le mélange d'amplification PCR est composé de 5 µL de tampon de réaction (Tris HCl 100 mM pH 9, KCl 500 mM, Triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 0,5 µL de dNTP 1 mM, 1 µL d'amorce sens 10 µM, 1 µL d'amorce antisens 10 µM, 0,2 µL de Go Taq (Promega) et 2 µL de matrice (ADNc dilué) ; le volume est ajusté à 25 µL avec de l'eau ultra-pure. La réaction PCR est faite dans les conditions suivantes : 95°C, 2 min ; [95°C, 30 sec – 52°C, 30 sec – 72°C, 2 min]<sub>35</sub> ; 72°C, 5 min. Le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium. 13 couples d'amorces ont ainsi été testés avant la réalisation d'une banque d'EST car cette technique était trop lente et fastidieuse. Les séquences des amorces sont précisées à l'**annexe 23**.

### II.4.2 RACE-PCR

L'obtention des extrémités 5' et 3' des gènes se fait par une succession de deux PCR en utilisant comme matrice la banque d'ADNc obtenue avec le kit 'Marathon'. Lors de la première PCR, un oligonucléotide (AP1 fourni avec le kit) reconnaissant l'adaptateur est associé à un oligonucléotide spécifique du gène. La deuxième PCR (NESTED PCR) est réalisée avec des oligonucléotides plus internes dans la séquence de l'adaptateur (oligonucléotide AP2) et dans la séquence du gène.

Le mélange PCR est composé de 5 µL de tampon de réaction cDNA PCR 10X (Tricine- KOH 400 mM pH 8.7 ; KOAc 150 mM ; Mg(OAc)<sub>2</sub> 35 mM ; SAB (sérum albumine bovine) 37,5 µg.mL<sup>-1</sup> ; Tween 20 0,05 % ; Nonidet-P40 0,05 %), 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL d'amorce AP1 ou AP2 10 µM, 1 µL d'amorce gène spécifique (GSP1 ou GSP2), 1 µL de Taq Advantage 2 50X (Clontech) et 1 µL de matrice (banque d'ADNc) diluée au 1/100 ; le volume est ajusté à 50 µL avec de l'eau ultra-pure. La réaction d'amplification est faite dans les conditions suivantes : 94°C - 30 sec ; [94°C 5 sec – 72°C 4 min]<sub>5</sub> ; [94°C 5 sec – 70°C 4 min]<sub>5</sub> ; [94°C 5 sec – 68°C 4 min]<sub>20-25</sub>. Une fraction aliquote des produits PCR est déposée sur gel d'agarose 1,2 % contenant du bromure d'éthidium.

### II.4.3 Marche génomique

La marche génomique a été utilisée car il était difficile d'avoir le début de *PhGES* avec la technique de RACE-PCR. Le protocole du manuel fourni avec le kit (Clontech®) a été suivi et est résumé ci-dessous. Les séquences des amorces sont précisées à l'**annexe 23**.

La première étape consiste à créer la banque. Pour cela, il est d'abord nécessaire de contrôler la qualité de l'ADN génomique par une digestion avec l'enzyme de restriction du kit (DraI à 10U.µL<sup>-1</sup>). La bande obtenue sur le gel d'agarose 0,6% pour l'ADN génomique digéré doit prendre la forme d'un « smear » alors que pour celui non digéré, la bande doit présenter le moins de « smear » possible. Une fois la qualité contrôlée, pour chaque construction de librairie, il y a 5 réactions de digestion (4 pour chaque échantillon et une pour le contrôle<sup>+</sup>) avec à chaque fois 25 µL d'ADNg à 0,1 µg.µL<sup>-1</sup> ; 8µL d'enzyme de restriction (10U.µL<sup>-1</sup>) (DraI, EcoRV, PvuII, PvuII) ; 10 µL de tampon 10X correspondant à l'enzyme et 57 µL d'eau déminéralisée. La digestion se fait d'abord pendant 2 h à 37°C puis l'ensemble est mélangé et ré-incubé sur la nuit à 37°C. Ensuite, vient l'étape de purification de l'ADNg digéré. Tous les composants nécessaires à la purification sont fournis avec le kit NucleoSpin Gel and PCR inclus avec le kit de la marche génomique. Ces étapes ne seront pas décrites mais une fois la purification terminée, 1µL avant et après purification sont chargés sur un gel d'agarose 0,6% afin d'estimer la quantité d'ADN après purification. L'étape suivante consiste à liguer des adaptateurs. Pour chacune des digestions, le mélange suivant est préparé : 4,8 µL d'ADN digéré et purifié ; 1,9 µL Genome Walker Adaptator (25 µM) ; 0,8 µL de tampon de ligation 10X et 0,5 µL de T4 DNA ligase (6U.µL<sup>-1</sup>). Le mélange est ensuite incubé sur la nuit à 16°C et est incubé 5 min à 70°C pour stopper la réaction. Dans chaque tube sont alors ajoutés 32 µL de TE (10/1 pH 7,5).

Ensuite, une première PCR est effectuée avec le mélange suivant pour 8 réactions (4 échantillons ; 2 contrôles<sup>-</sup> et 2 contrôles<sup>+</sup>) : Eau déminéralisée 19,5µL, 2,5 µL de tampon 10X Advantage 2 PCR buffer, 0,5 µL dNTP mix à 10mM, 0,5 µL d'amorce AP1 à 10 µM ; 0,5 µL d'Advantage 2 polymerase 50X puis à cela est rajouté 1 µL de DL1,2,3 ou 4 pour les échantillons, 1µL de contrôle library pour le 1<sup>er</sup> contrôle<sup>+</sup> et 1 µL de Pre-constructed contrôle library pour le 2<sup>ème</sup> contrôle<sup>+</sup>, 0,5 µL de GSP1 (pour les échantillons et le 1<sup>er</sup> contrôle<sup>-</sup>) et 0,5 µL de PCP1 pour les autres contrôles. Le programme PCR est le suivant : 94°C - 30 sec ; [94°C 25 sec – 72°C 3 min]<sub>7</sub> ; [94°C 25 sec – 67°C 3 min]<sub>32</sub> ; 67°C 7 min ; 15°C ∞. Ensuite, 5 µL de produit PCR sont déposés sur gel d'agarose 1,5%. Pour les échantillons, il peut y avoir une ou plusieurs bandes

allant de 0,5 à 5 Kb. Si il y a plus d'une bande et/ou un « smear » dans les pistes des échantillons, une 2<sup>ème</sup> PCR (Nested PCR) est effectuée.

Pour la « Nested PCR », les échantillons PCR1 sont dilués au 1/50<sup>ème</sup> et le même mélange que pour la PCR1 est préparé avec en plus un ajout de 0,5 µL de GSP2 (pour les 4 échantillons et le 1<sup>er</sup> contrôle) et 0,5 µL de PCP2 pour les autres contrôles. Le programme PCR est le suivant : 94°C - 30 sec ; [94°C 25 sec – 72°C 3 min]<sub>5</sub> ; [94°C 25 sec – 67°C 3 min]<sub>20</sub> ; 67°C 7 min ; 15°C ∞. Ensuite 5 µL de produit PCR sont déposés sur gel d'agarose 1,5%. Ensuite il faut procéder au clonage avec la polymérase Advantage 2. Celle-ci donnant déjà des extrémités T/A, il est inutile de faire un A-Tailing avec la ligation dans le pGEMT-easy.

#### II.4.4 PCR Inverse

Le protocole est décrit ci-dessous. Les séquences des amorces utilisées en PCR inverse sont précisées à l'**annexe 23**.

De l'ADNg est dilué à 100 ng.µL<sup>-1</sup> et analysé par un contrôle de sa qualité et un test de digestion. Le test de digestion est fortement recommandé car certaines enzymes sont sensibles aux inhibiteurs (ex : PvuII ou StuI) et d'autres moins (ex : EcoRV ou DraI). Le mélange suivant est préparé : 1,7 µL d'ADNg (100ng.µL<sup>-1</sup>), 1 µL de tampon DraI 10X, 1 µL de DraI (10U.µL<sup>-1</sup>), 6,3 µL d'eau déminéralisée. L'ensemble est incubé 12 à 16h à l'étuve à 37°C puis déposé sur gel d'agarose 1,2%/TAE. La banque de clones peut ensuite être construite. La première étape est de digérer l'ADNg (500 ng) avec 30U d'enzyme de restriction (2 enzymes différentes sont utilisées, DraI et EcoRV). Le mélange suivant est préparé : 5 µL d'ADNg (100ng.µL<sup>-1</sup>), 3 µL de Tampon B ou D 10X, 3 µL de DraI ou EcoRV (10U.µL<sup>-1</sup>) et 19 µL d'eau versol. L'ensemble est incubé 12 à 16h à 37°C. La réaction est stoppée par une incubation de 65°C pendant 15 min. Ensuite, l'ADN digéré est recircularisé par ligation avec le mélange suivant : 0,15 ; 0,75 ; 1,5 µL d'ADNg digéré ; 2,5 µL de tampon de ligation Promega 10X ; 1 µL de T4 DNA ligase Promega à 3U.µL<sup>-1</sup> ; de l'eau versol qsp 25 µL. Le mélange est incubé 16h à 4°C.

Les PCR sont à faire sur toutes les banques de clones digérés et recircularisés. Un test visant à calculer les quantités d'ADN à utiliser pour la 1<sup>ère</sup> PCR est d'abord réalisé. Le mélange suivant est préparé : 4,7 µL d'eau versol ; 2 µL de tampon Phusion® GC 5X ; 0,2 µL de dNTP à 10 mM ; 0,1 µL de Phusion®. A ce mélange est ajouté 1µL ou 2µL de Ligation pour les échantillons ; 0,5 µL des amorces F1 et F2 (10µM)

pour les échantillons et le contrôle<sup>-</sup>; 0,5 µL des amorces CF1 et CR1 (10 µM) et 0,5 µL de plasmide contrôle pour le contrôle<sup>+</sup>. Le programme PCR est le suivant : 98°C – 1 min ; [98°C - 10 sec ; xx<sup>64</sup>°C 30 sec ; 72°C - 90 sec]<sub>30</sub> ; 72°C - 5 min ; 15°C ∞. Les produits PCR1 sont déposés sur un gel d'agarose/TAE 1%.

Une fois ce test réalisé, la première PCR est réalisée avec le mélange suivant : 11,4 µL d'eau versol ; 4 µL de tampon Phusion GC 5X ; 0,4 µL dNTP à 10µM ; 1 µL d'amorce F1 et R1 à 10 µM ; 0,2 µL de Phusion® ; 2 µL de ligation pour chaque échantillon et 2 µL d'eau versol en plus pour le contrôle<sup>-</sup>. Le Programme PCR est le suivant : 98°C – 1 min ; [98°C - 10 sec ; xx°C 30 sec ; 72°C - 90 sec]<sub>30</sub> ; 72°C - 5 min ; 15°C ∞. Les produits PCR seront ensuite déposés sur gel d'agarose/TAE 1% et le reste dilué au 1/25<sup>ème</sup> pour la deuxième PCR.

Pour la deuxième PCR (Nested PCR), le mélange suivant est préparé : 11,4 µL d'eau versol ; 4 µL de tampon Phusion GC 5X ; 0,4 µL dNTP (10 mM) ; 1 µL d'amorce F2 & R2 (10µM) ; 0,2 µL de Phusion® ; 5 µL des PCR 1 dilués au 1/25<sup>ème</sup>. Le programme PCR est le suivant : 98°C – 1 min ; [98°C - 10 sec ; xx°C 30 sec ; 72°C - 90 sec]<sub>30</sub> ; 72°C - 5 min ; 15°C ∞. Les produits PCR2 sont déposés sur un gel d'agarose/TAE 0,8%.

Après cette 2<sup>ème</sup> PCR, on procède à la ligation et au clonage. Dans le cas de la Phusion, les extrémités obtenues sont de type Blunt et le clonage peut donc s'effectuer directement si le clonage se fait dans le Zero-blunt. Si le clonage se fait dans pGEMT-easy, il faudra effectuer un A-Tailing.

#### II.4.5 RT-PCR semi-quantitative

Les réactions de RT-PCR semi-quantitatives nécessitent une normalisation de tous les échantillons. Le gène de l'actine s'exprime à un niveau équivalent quel que soit le tissu ou le stade de développement considéré et était disponible pour le *Pelargonium* (Hamama et al. 2012). Il a donc été choisi pour normaliser tous les échantillons.

Le mélange PCR se compose de 5 µL de tampon de réaction de Dream TAQ® (Promega) (déjà décrit), 0,5 µL de dNTP 10 mM, 1 µL d'amorce sens 10 µM, 1 µL d'amorce antisens 10 µM, 0,2 µL Dream TAQ® (Promega) et 2 µL de matrice d'ADNc ; le volume est ajusté à 25 µL avec de l'eau ultra-pure.

---

<sup>64</sup> xx°C sera fonction des Tm des amorces. Il est conseillé d'utiliser un Tm légèrement supérieur à celui des amorces afin de limiter les fixations aspécifiques. Les Tm des amorces sont donnés dans l'[annexe 23](#).

La réaction PCR est faite dans les conditions suivantes<sup>65</sup> : 95°C - 2 min ; [95°C - 30 sec ; 60°C - 30 sec ; 72°C, 1 min]<sub>20-35</sub> ; 72°C - 5 min. La température de 60°C est donnée en exemple mais doit être adaptée en fonction des amorces. Le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose 1,2 % contenant du bromure d'éthidium et l'intensité de chaque signal est estimée visuellement. Parallèlement, des oligonucléotides sont définis à partir des séquences des gènes isolés afin d'amplifier une fraction du gène. Une PCR est réalisée dans les mêmes conditions sur les échantillons normalisés. Les séquences des amorces sont précisées à l'**annexe 23**.

#### II.4.6 RT-PCR quantitative (qPCR)

Afin de suivre les variations des transcrits des TPS de *Pelargonium*, deux gènes de TPS (*PhGES* et *PhEDS*) ont été étudiés par RT-PCR quantitative. Les niveaux d'expression de *PhGES* et *PhEDS* ont été déterminés dans les feuilles de différentes espèces et cultivars (*P. 'Rosat'* cv. Bourbon; *P. 'Clorinda'*; *P. 'Rosat'* cv. Egypt; *P. 'Rosat'* cv. Grasse; *P. graveolens*; *P. quercifolium*; *P. tomentosum*; *P. 'Toussaint'*). Les ARN totaux des différentes plantes ont été extraits par le protocole expliqué plus haut et traité avec la RQ1 RNase-free (Promega, Madison, USA). Un total de 10 à 20 µg d'ARN a subi une RT (Invitrogen, Carlsbad, USA) à 50°C pour 1 h avec une amorce oligo-dT. Chaque échantillon d'ARN a subi deux réactions RT indépendantes. La réaction de PCR était faite dans un volume final de 25 µl, incluant 400 nM de chacune des amorces sens et antisens, et 5 µl d'ADNc dilué au dixième. Le cycle de qPCR était le suivant : 10 min à 95°C puis 40 cycles de dénaturation de 15 secondes à 95°C et enfin hybridation-extension de 45 secondes à 60°C. Conformément aux recommandations en matière d'analyse en qPCR des contrôles ont été effectués (*Bustin et al. 2009*). Afin de s'assurer de l'absence de contaminations par de l'ADN génomique, des « fausses » RT ont été réalisées avec le protocole décrit plus haut. La qualité du mélange réactionnel était vérifiée par des NTC (non-Template control) réalisés en remplaçant les 5 µl d'ADNc par de l'eau ultra-pure.

La RT-PCR quantitative (qPCR) a été réalisée avec un système de détection en temps réel CFX96TM (Bio-Rad, Hercules, USA) avec des plaques de qPCR 96 puits utilisant le SsoAdvanced™ SYBR green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA). Toutes les réactions ont été effectuées dans un volume de 20 µL avec 2 µL de RT-ADNc comme modèle et 500 nM de chaque amorce selon le protocole du fournisseur. Les amorces

---

<sup>65</sup> Attention, les T<sub>m</sub> et les durées d'élongation sont propre à chaque couple d'amorce. Il s'agit ici d'un exemple pour illustrer un programme PCR type.

(tableau 8) ont été désignées en utilisant le logiciel Primer3 (Rozen et Skalesky 2000). Chaque échantillon d'ADNc a été amplifié deux ou trois fois dans deux séries indépendantes de qPCR avec chaque combinaison d'amorces. Comme les échantillons d'ARN ont été répliqués deux fois par RT-PCR, il y a finalement quatre réplicats techniques par espèce ou cultivar de *Pelargonium*. Le profil thermique suivant a été utilisé pour les réactions PCR (95°C – 30 sec ; [95°C – 5 sec, Tm – 30 sec]<sub>40</sub>) Après les 40 cycles, l'analyse de la courbe de fusion est réalisée (65°-95°, une lecture de fluorescence chaque 0,5°C) dans le but de vérifier la spécificité de l'amplification et donc que le signal mesuré dans chaque puits correspond bien à un seul produit PCR.

**Tableau 8 | Amorces utilisées pour la qPCR**

Gènes	(5' Forward 3')	(3' Reverse 5')	Amplicon length (bp)/ efficiency	R <sup>2</sup>	E
<i>PhGES</i>	AATGATTAGGGAGTTGTGGGTGG	GATGATCTTCAACACCAGAGAA	159		
<i>PhEDS</i>	TGACCATGACCTCTACACTTGTG	AGCTTAGCATGCCTCTAACATCA	149		
<i>PhACTIN</i>	CAAGAGCTGGAGACTTCAAAGAC	CGAAACCACATACAACCTCCATCA	175	0,999	106,1%
<i>PhEF1a</i>	ACTACTGCACTGTTATTGATGCC	GCTGGTATCTCTAAGGATGGTCA	142	0,997	102,6%
<i>PhGAPDH</i>	TTGTTGATCTTGTGTCCAGGTC	GACTTTAGATGCTCCGATGTGTC	151		
<i>PhTCTP</i>	CGAGAACAAGAGGAATTCAAGA	GGTTGAAGGAGGTTAAGTGCTAA	196	1,000	91,9%
<i>PhTUB</i>	TCCATTTTCATGCTTTCCTCGTAC	TTTACATCTTTAGGCACCACGTC	193	0,999	92,9%

Les valeurs de l'expression normalisée ( 2-DDCq method, Livak et Schmittgen 2001) de *PhGES* et *PhEDS* sont calculées par le CFX96TM manager en utilisant *PhACTIN*, *PhTUBULIN* et *PhGAPDH* comme gènes de référence (tableau 8). La stabilité de l'expression de ces gènes de références est évaluée par le logiciel Best-Keeper (Pfaffl et al. 2004), geNorm v. 3.5 (Vandesompele et al. 2002) et NormFinder (Andersen et al. 2004). Le logiciel REST 2009 (Pfaffl et al. 2002) a été utilisé pour comparer le niveau d'expression d'un gène dans un 'échantillon' groupe utilisant un 'contrôle' groupe comme référence en implémentant un test aléatoire de relocation par paire fixée (10 000 itérations). Les différences d'expression entre les ADNc 'échantillons' et 'contrôle' sont considérées comme significatives pour des p-values < 0,05.

## II.5 Techniques de clonage

### II.5.1 Purification sur gel des fragments PCR

Les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 1,2 % puis purifiés suivant les instructions du kit de purification sur gel 'Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System' (Promega). Brièvement, le fragment d'ADN est excisé du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel, placé dans un tube Eppendorf et pesé. Pour chaque 100 mg de gel, 100 µL de solution de liaison à la membrane (fourni avec le kit) sont ajoutés. Le tube est incubé à 50°-60°C jusqu'à dissolution complète du gel. Ensuite, le mélange est transféré sur une colonne, incubé à température ambiante 1 min et centrifugé 1 min à 16000 g. La colonne est lavée avec 700 µL de solution de lavage de membrane (fournie avec le kit) et centrifugée 1 min à 16000 g et l'opération est répétée avec 500 µL de solution de lavage et une centrifugation de 5 min. Le fragment d'ADN est élué par 50 µL d'eau 'Nuclease-Free', après incubation à température ambiante puis centrifugation 1 min à 16000 g. L'ADN est conservé à 4°C.

### II.5.2 Clonage de fragments dans les vecteurs pGemT-easy et pCR-Blunt

Les clonages des fragments d'ADN dans le vecteur pGemT-easy vector I (Ref Promega : A1360) avec l'enzyme Advantage® ou le vecteur pCR®-Blunt avec l'enzyme Phusion® sont utilisés pour séquencer, multiplier et conserver tous les fragments d'ADN. La ligation dans ces vecteurs peut se faire une nuit à 4°C ou 1 h à température ambiante. Le mélange de ligation est composé de 5 µL de tampon de ligation 2X ; 1 µL de vecteur pGemT-easy (50 ng) ou 1 µL de vecteur pCR®-Blunt (25 ng) ; 1 µL de T4-DNA ligase à 3 U.µL-1 et de 1-5 µL de produit PCR (insert) ; de l'eau versol sera utilisée pour compléter le volume à 10 µL.

En cas d'utilisation d'une polymérase qui donne des extrémités franches, il faudra rajouter des groupes adénosine (A) aux extrémités du fragment amplifié si l'on veut sous-cloner un fragment amplifié avec ce type de polymérase (pGemT-easy et non pour pCR-Blunt). A 7 µL de produit PCR purifié, sont ajoutés 1 µL de GoTAQ (5U/µL) (Promega), 1 µL de dATP 10 mM et 1 µL de tampon de réaction de l'enzyme GoTAQ 5X. L'ensemble est placé 20 min à 72°C. La même réaction peut être réalisée directement sur les 20 µL de réaction PCR. Dans tous les cas, une purification des produits PCR est nécessaire afin d'éliminer les dATP non incorporés. L'introduction des plasmides dans les souches TOP 10 et JM109 est réalisée grâce à un choc thermique (42°C pendant 60 sec suivi d'un passage dans un bain de glace ; *Sambrook et al. 1989*).

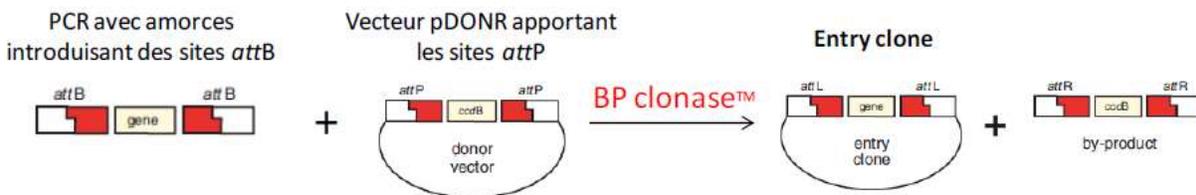
### II.5.3 Sous-clonage par recombinaison avec le système GATEWAY™

Le clonage utilisant la technologie Gateway™ (Invitrogen) est une méthode basée sur les propriétés de recombinaison site-spécifique du bactériophage  $\lambda$  (Cassuto *et al.* 1971, Bushman *et al.* 1985, Landy 1989).

L'introduction d'un gène dans un vecteur d'expression Gateway™ (pHGGWA, pMDC32...) nécessite l'obtention d'un vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO contenant le gène d'intérêt qui sera inséré par simple recombinaison homologue. La réaction se fait grâce à la topoisomérase I. Son rôle biologique est de couper et de religuer l'ADN pendant la réplication. Elle reconnaît spécifiquement la séquence pentamérique 5'-(C/T)CCTT-3' et forme une liaison covalente avec le phosphate de la thymidine en 3'. Elle coupe un des deux brins d'ADN, assurant le déroulement de l'hélice d'ADN, puis associe les extrémités du brin coupé. Pour exploiter l'activité de ligation de la topoisomérase I, le vecteur pENTR-D/TOPO est linéarisé et la topoisomérase est fixée de façon covalente sur les extrémités 3' des deux brins d'ADN. Elle permet aux vecteurs de se refermer en intégrant une séquence d'ADN avec des extrémités compatibles. Le gène est donc amplifié par PCR avec des amorces permettant d'ajouter des sites attL1 et attL2 de recombinaison au gène d'intérêt, mais aussi du côté 5' quatre bases supplémentaires (CACC) qui vont assurer le clonage directionnel du gène dans le vecteur pENTR-D/TOPO.

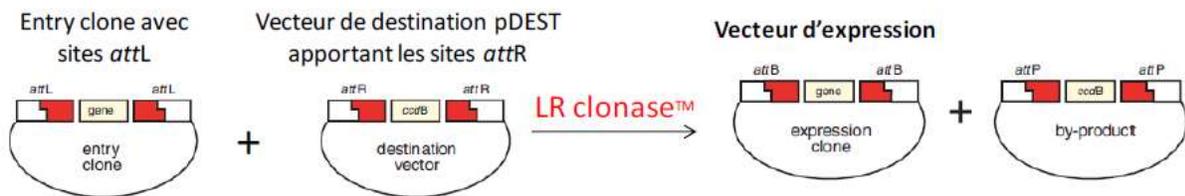
| 168

La réaction BP est la première étape du clonage : Le réactif BP clonase™ contient l'intégrase du phage  $\lambda$  et le facteur d'intégration IHF d'*E. coli*, permettant la recombinaison entre les sites attB de l'insert et les sites attP du vecteur donneur (figure 59). Le clonage se fait dans les conditions décrites par le protocole fourni avec le vecteur (Invitrogen). Des cellules TOP10 d'*E. coli* sont ensuite transformées avec ce vecteur par choc thermique suivant le protocole fourni par le fournisseur (Invitrogen), puis sélectionnées sur un milieu LB (Sigma) contenant de la kanamycine à 50 mg.L<sup>-1</sup>. L'ADN plasmidique est extrait par lyse alcaline, puis vérifié par restriction et séquençage.



**Figure 59 | Etape BP du clonage utilisant la technologie Gateway™** (d'après Invitrogen). La réaction BP permet la création du clone d'entrée, plasmide qui sert ensuite à la réaction LR pour former le vecteur d'expression.

La réaction LR est la deuxième étape du clonage. En effet, lorsque le vecteur d'entrée est vérifié, l'insert est introduit dans le vecteur Gateway™ grâce à une réaction de recombinaison mettant en jeu la LR-clonase (Invitrogen). Le réactif LR clonase™ contient l'intégrase et l'excisionase Xis du phage λ, ainsi que le facteur d'intégration IHF d'*E. coli*. La recombinaison se fait entre des sites de recombinaison semblables à ceux des phages λ, plus précisément entre les sites attL (1 et 2) et attR (1 et 2) du vecteur d'entrée et du vecteur de destination, respectivement (figure 60). La réaction se fait dans les conditions décrites par le protocole d'utilisation de la LR-clonase (Invitrogen).



**Figure 60 | Etape LR du clonage utilisant la technologie Gateway™** (d'après de Invitrogen). La réaction LP permet la création du vecteur d'expression.

## II.6 Expression de protéines recombinantes

Afin de caractériser fonctionnellement les TPS dont la séquence est complète, une analyse par comparaison avec les banques de données disponibles ne suffit pas (BLAST) et il est nécessaire de réaliser un test d'activité *in vitro* des protéines et si possible un test d'activité *in planta*. Pour cela, il faut premièrement réaliser les constructions qui permettront l'expression de ces protéines grâce au système Gateway®. Ensuite il faut répliquer un grand nombre de fois ces constructions en transformant *E. coli* (TOP10). Ces construits seront alors transférés soit dans une autre souche d'*E. coli* (Rosetta DE3) pour l'expression *in vitro*. La protéine d'intérêt est alors produite de façon à pouvoir être séparée facilement des autres protéines bactériennes natives et son activité testée *in vitro*. Le construit peut aussi être transféré dans une souche d'*A. tumefaciens* (P19A) pour un test d'activité *in planta*. Ces étapes sont décrites ci-après.

### II.6.1 Conception des différentes constructions des TPS

Les gènes des 4 TPS caractérisées sont d'abord insérés dans le vecteur donneur pCR®-Blunt suivant le protocole déjà détaillé plus haut (II-5-b). Le construit est alors multiplié dans *E. coli* (TOP10 ou JM109) puis mis en contact avec le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO et le gène est transféré dans celui-ci suivant le protocole décrit plus haut (II-5-c). Le vecteur d'entrée est ensuite multiplié dans *E. coli* (TOP10 ou JM109) et isolé pour être finalement inséré dans un vecteur d'expression, un des vecteurs construits par Busso et al. (2005) par exemple, par le système Gateway® décrit au paragraphe II-5-d.

### II.6.2 Expression dans *Escherichia coli*

#### II.6.2.1 Transformation des bactéries thermo-compétentes

Une fraction aliquote de bactéries thermo-compétentes (50 µl) (JM109, TOP10 ou Rosetta) est décongelée lentement dans la glace et est mélangée à l'ADN plasmidique (50 ng). Le mélange est laissé incuber 30 min sur la glace. Un choc thermique est alors réalisé à 42°C pendant 1 min. Le mélange est ensuite placé sur la glace pendant 2 min avant d'y rajouter 250 µl de milieu LB. La réaction de transformation est placée à 37°C sous agitation constante pendant 1 h. Différents volumes du mélange de transformation (entre 20 et 150 µl au maximum) sont étalés sur milieu LB agar supplémenté de l'antibiotique adéquat puis incubé toute la nuit à 37°C.

### II.6.2.2 La technique de production des enzymes dans les bactéries

Le système d'expression utilisé (Busso et al. 2005) est basé sur l'ARN polymérase du bactériophage T7, inductible à l'IPTG<sup>66</sup>. L'IPTG est un analogue du lactose fréquemment utilisé comme inducteur de l'opéron lactose. L'IPTG n'étant pas métabolisé par *E. coli*, sa concentration reste constante et le taux d'expression des gènes lac p et lac o ne varie pas.

Ce système est très puissant pour exprimer les protéines recombinantes dans *E. coli* (figure 61). Le gène cible est cloné dans un plasmide sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel du bactériophage T7. La transcription du gène cible est réalisée uniquement par l'ARN polymérase de T7, dont le gène est inséré dans le génome de la bactérie hôte par l'intermédiaire d'un dérivé lysogène du bactériophage  $\lambda$ , le bactériophage DE3. Le gène codant l'ARN polymérase T7 est sous la dépendance du promoteur lacUV5 inductible à l'IPTG. De plus, le gène cible et le gène codant l'ARN polymérase T7 présente un site Lac opérateur pour un contrôle optimal de la transcription.

En absence d'inducteur, le répresseur produit par le gène lacI reconnaît spécifiquement le site opérateur Lac et s'y fixe. L'encombrement de ce complexe est tel que l'ARN polymérase est incapable de se fixer au site promoteur Lac, la transcription/traduction de l'ensemble des gènes étant par conséquent réprimée. La présence d'inducteur (IPTG) induit un changement conformationnel du répresseur LacI. Ainsi modifié, le répresseur LacI est incapable de se fixer sur le site opérateur Lac, permettant la transcription, puis la traduction, de l'ARN polymérase T7. L'ARN polymérase T7 se fixe alors sur le promoteur T7 présent sur le vecteur et le gène cible est exprimé.

### II.6.2.3 Production des bactéries thermo-compétentes

Des cellules d'*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells (Novagen) (Chloram<sup>R</sup>) sont transformées avec les vecteurs pHGWA, pHGGWA, pHNGWA et pHXGWA (Busso et al. 2005 ; amp<sup>R</sup>) contenant le gène d'intérêt par choc thermique. Les cellules sont sélectionnées sur un milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 mg.L<sup>-1</sup>. L'ADN plasmidique est récupéré par lyse alcaline. Ensuite, une colonie isolée est mise en pré-culture dans du LB avec du chloramphénicol (34 mg.L<sup>-1</sup>) et de l'ampicilline (100 mg.L<sup>-1</sup>). Une pré-culture de Rosetta vide (sans construit) est aussi réalisée avec uniquement du Chloramphénicol (34 mg.L<sup>-1</sup>). Ces tubes sont mis en culture 1 nuit à 37°C sous 200 rpm.

---

<sup>66</sup> IPTG pour IsoPropyl  $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside

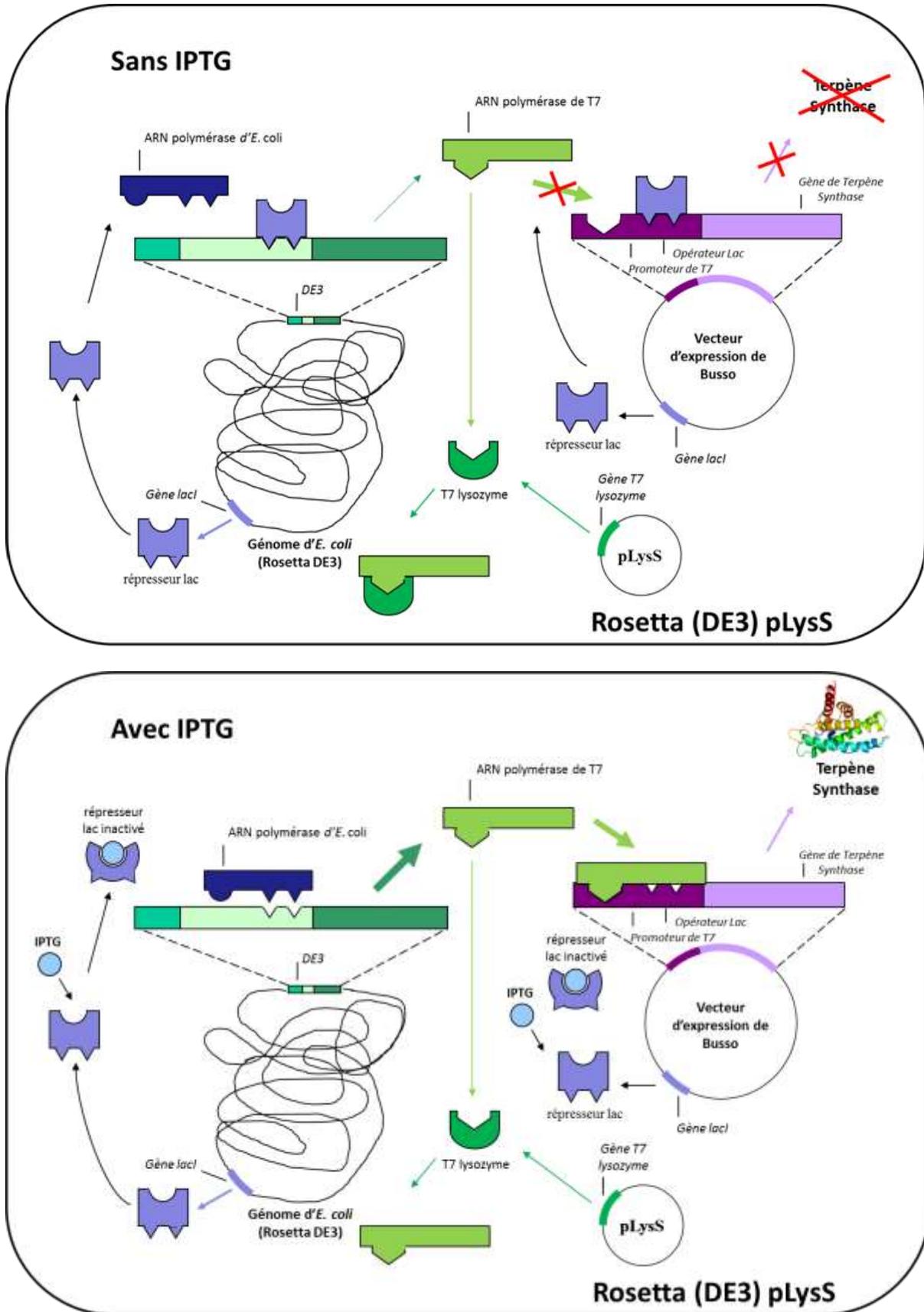


Figure 61 | Système d'expression utilisé dans *E. coli* (Rosetta DE3 pLysS). Induction avec IPTG et sans induction

La pré-culture est alors transférée dans 200 mL de milieu TB<sup>67</sup> modifié auquel sont ajoutés 500 µL de bétaine 1M ; 200 µL d'ampicilline [100 mg.L<sup>-1</sup>] ; 200 µL de chloramphénicol [34 mg.L<sup>-1</sup>]. La culture est alors mise sous incubation à 37°C sous 200 rpm jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600nm</sub><sup>68</sup> comprise entre 0,5 et 0,8. La culture est alors incubée 1H à 20°C puis l'induction se fait en rajoutant 0,2 mM d'IPTG. En parallèle, les cultures avec les Rosetta vides sont aussi induites de la même manière et sont maintenues dans les mêmes conditions. Les cultures sont ensuite placées dans l'agitateur réfrigéré à 16°C sous une agitation de 50 rpm pendant la nuit. Le lendemain, la culture est transvasée dans un tube Falcon 50 mL et centrifugé à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le même tube est à nouveau rempli de culture et centrifugée jusqu'à épuisement des 200 mL de culture. Le tube contenant le culot bactérien est finalement pesé et stocké à -80°C pour la purification des protéines.

### II.6.3 Expression in Planta via *A. tumefaciens*

#### II.6.3.1 Transformation des bactéries thermo-compétentes

Les vecteurs (pMDC32, pMDC45 et pMDC83) comprenant le gène d'intérêt (*GES* ou *EDS*) sont obtenus par clonage (voir II.5) et sont introduits par choc thermique dans des cellules C58pMP90 pour une transformation stable du tabac ou du *Pelargonium*. Le vecteur pK7FWG2 (35S:GFP) comprenant les gènes d'intérêt (*PhGES* ou *PhEDS*) est obtenu par clonage et est introduit dans C58 d'*A. tumefaciens* pour une transformation transitoire du tabac.

La transformation de la souche C58 est réalisée suivant le protocole suivant. 100 µL d'agrobactéries compétentes sont ajoutés dans 100 µL de milieu LB contenant 5 µg d'ADN plasmidique. L'ensemble est placé pendant 5 min dans l'azote liquide, puis pendant 25 min à 37°C à l'étuve. Le choc thermique et l'incubation à 37°C sont répétés encore deux fois. Ensuite 15 mL de milieu LB sont ajoutés aux bactéries et l'ensemble est placé 4h30 à 27 à 28°C sans agitation. La culture bactérienne est ensuite centrifugée pendant 20 min à 4000 g à température ambiante, le surnageant est éliminé et le culot est repris par 300 µL de milieu LB. Deux fractions aliquotes de 50 µL et 200 µL sont étalées sur un milieu LB contenant de la rifampicine [50 mg.L<sup>-1</sup>], de la gentamycine [20 mg.L<sup>-1</sup>] (vecteur pM90) et de la kanamycine [50 mg.L<sup>-1</sup>] (pour les vecteurs pMDC32, pMDC45, pMDC 83). Les cultures sont incubées 2 à 4 jours à température ambiante. Une vérification facultative peut être réalisée par un criblage par PCR de quelques-unes des colonies obtenues

---

<sup>67</sup> TB pour terrific broth

<sup>68</sup> DO<sub>600nm</sub> pour Densité Optique pour une λ de 600 nm

## II.7 Purification de protéines recombinantes

### II.7.1 Lyse cellulaire et centrifugation

Les culots bactériens sont resuspendus dans 10 mL de tampon de lyse (**annexe 24**) puis vortexés. Dans chaque tube on ajoute 5 mg de lysozyme et 10  $\mu$ L d'antiprotéase et le tout est incubé sur glace pendant 30 min en agitant doucement de temps en temps. La lyse s'effectue principalement par sonication, à l'aide d'un sonicateur de type Sonopuls HD 2200 (Bandelin) équipé d'une sonde de 13 mm de diamètre, durant 9 cycles par des impulsions d'ultra-sons toutes les 10 sec à 95% d'amplitude à 4°C, dans la glace. Chaque échantillon est soniqué 10 fois selon ce protocole en attendant 3-4 min entre chaque sonication. Une fraction aliquote correspondant à l'extrait brut est prélevée et déposée sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes.

L'extrait brut, issu de la sonication, est ensuite clarifié par centrifugation pendant 20 min à 10000 *g* à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction soluble est maintenu à 4°C et immédiatement utilisé. 100  $\mu$ L de surnageant et de culot resuspendu dans un volume équivalent de tampon de reprise sont conservés pour être déposés sur gel d'acrylamide.

### II.7.2 Chromatographie d'affinité sur résine de chélation de cations métalliques

La résine utilisée pour cette chromatographie d'affinité est la résine Talon® (Clontech).

Le principe de cette chromatographie est basé sur l'emploi de cations métalliques divalents  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  (*Porath et al. 1975, Hochuli et al. 1988*) chélatés par des groupements de type imido-acétates, greffés sur une matrice de type sépharose CL-6B (GE Healthcare) pour séparer des protéines portant des étiquettes poly-histidines. Ces cations immobilisés vont former des liaisons par chélation avec les histidines de la protéine produite (**figure 62**) et permettre de séparer efficacement la protéine de fusion du reste des protéines bactériennes endogènes. Après lavage de la résine, la protéine d'intérêt peut être séparée du support en utilisant la thrombine qui va couper la protéine d'intérêt. On pourra alors la récupérer pure sans le fragment histidine. Celle-ci sera récupérée en utilisant l'imidazole comme agent d'élution et non en jouant sur le pH (pour protoner l'histidine) car cela aurait pour effet de dénaturer la protéine. Cette méthode de purification donne en général de très bons résultats chez les procaryotes. La résine Talon® est chargée avec des cations  $\text{Co}^{2+}$  et l'avantage de cette résine réside dans la nature du cation fixé et dans le type de groupement chélatant. Le cobalt interagit moins fortement avec les

protéines à poly-histidines, la fixation est moins forte, mais plus spécifique. Il y a donc moins de fixation aspécifique et certains contaminants sont mieux séparés.

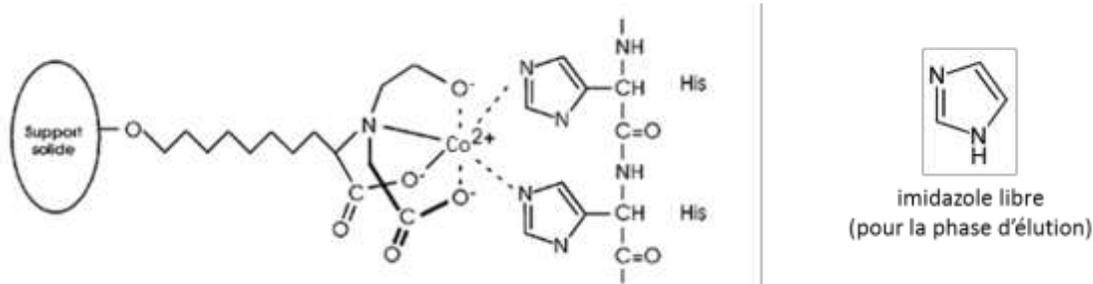


Figure 62 | Schéma du principe de purification d'affinité sur colonne de nickel

L'élimination, par protéolyse grâce à la thrombine, de l'étiquette poly-histidine des protéines surproduites et purifiées est réalisée en utilisant de la thrombine bovine plasmatique. (Calbiochem® – Millipore).

100-200  $\mu\text{L}$  de résine resuspendue et préalablement lavée sont déposés dans un tube Falcon de 15 mL. Le surnageant obtenu après centrifugation (environ 8 mL) est directement mis en contact avec la résine et le tube est ensuite mis sur l'agitateur rotatif placé au frigo ( $4^{\circ}\text{C}$ ) sous 20 rpm pendant 1h30. Le tube sera alors centrifugé 4 min à 100 g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 8 mL de tampon de reprise ([annexe 24](#)) et soniqué pendant 3 cycles puis chauffé à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min. Le tube sera alors centrifugé 5 min à 13000 rpm et 50  $\mu\text{L}$  de surnageant seront conservés. La résine est lavée 5 fois avec 10 mL de tampon de lavage ([annexe 24](#)) pour éliminer un maximum de protéines endogènes ainsi que les protéines aspécifiques fixées sur la résine. 50  $\mu\text{L}$  du dernier lavage seront aussi conservés pour le gel d'acrylamide.

La thrombine (10  $\mu\text{L}$ ) est ajoutée à 200  $\mu\text{L}$  de tampon de Landman ([annexe 24](#)). Les TPS requièrent la présence de cations divalents ( $[\text{Mg}^{2+}] = 10 \text{ mM}$  ;  $[\text{Mn}^{2+}] = 2 \text{ mM}$ ) et un pH de 7,5 pour les monoterpène synthases et 8,0 pour les sequiterpène synthases pour fonctionner. L'ensemble est incubé pendant la nuit au frigo à  $4^{\circ}\text{C}$ . La résine et la solution sont transférées ensuite sur une colonne à filtre et centrifugées 15 sec avec une centrifugeuse de pailleasse. Environ 200  $\mu\text{L}$  de filtrat contenant la TPS pure sont récupérés, 10  $\mu\text{L}$  seront gardés pour le gel et 10  $\mu\text{L}$  pour de dosage de Bradford. Le reste servira pour le test d'activité.

Les protéines sont dosées avec la méthode décrite dans le 'BioRad protein assay' (BioRad), adaptée de la méthode de Bradford (1976). Le dosage se fait par une mesure spectrophotométrique à une  $\text{DO}_{595\text{nm}}$ .

Une gamme de concentration de BSA<sup>69</sup> permet d'obtenir une courbe étalon à partir de laquelle la concentration en protéines de l'échantillon est déterminée.

## II.8 Tests d'activité des terpène synthases

Les tests d'activité sont réalisés dans un volume final de 500 µL contenant 15 à 50 µg de protéine recombinante (60 µL pour les quatre TPS), du tampon de Landmann jusqu'au volume de 500 µL (**annexe 24**), 1 µL de DTT à 0,5 M (1 mM), 5 µL de solution de BSA [100 mg.mL<sup>-1</sup>] et 10 µL de substrat [50 µM]. Pour l'activité des terpènes synthases, à la fois le GPP et le FPP seront utilisés. Une épiphase de 400 µL d'hexane servira à piéger les monoterpènes et les sesquiterpènes produits lors de la réaction enzymatique. Le mélange est alors incubé pendant 2 heures au bain-marie à 30°C.

À l'issue de l'incubation, le flacon est agité délicatement et la phase hexanique est récupérée et concentrée puis transvasée dans un nouveau flacon équipé d'un réducteur pour être injecté en GC-MS. Des témoins négatifs ont aussi été réalisés en utilisant le produit purifié d'une souche Rosetta (DE3) pLysS sans vecteur d'expression.

## II.9 Analyse des protéines par SDS-PAGE

Les expériences de SDS-PAGE<sup>70</sup> sont réalisées avec le système 'Mini PROTEAN II electrophoresis cell' de BioRad. Les compositions des gels, des tampons et des solutions de coloration et de décoloration sont données en **annexe 25**.

Les protéines sont dénaturées par un chauffage à 100°C pendant 5 min. Le chauffage à 100°C en présence de DTT dénature les protéines et le SDS du tampon de Laemli se fixe sur les protéines dénaturées. Le SDS étant chargé négativement, les protéines migrent vers le pôle positif de l'électrophorèse. Les échantillons de protéines sont déposés avec un volume de tampon de Laemli ainsi que du bleu de charge contenant notamment du glycérol qui alourdit l'échantillon afin que celui-ci se dépose bien au fond du puits. La migration se fait sous une tension de 60 volts lorsque les échantillons se trouvent dans le gel de concentration (~30 min) puis pendant environ 2 heures sous une tension de 80 à 100 volts dans le gel de migration jusqu'à ce que les marqueurs de taille soient bien séparés et que le front de migration sorte du gel.

---

<sup>69</sup> BSA pour bovine serum albumin

<sup>70</sup> SDS-PAGE pour Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Après migration, le gel est immergé dans une solution de coloration sur la nuit sous agitation douce. Le gel est ensuite décoloré par des bains successifs de solution de décoloration sous agitation faible. Cette étape est renouvelée jusqu'à ce que la décoloration soit suffisante. Enfin le gel est transféré dans de l'eau sous agitation douce.

## II.10 Obtention de plantes transgéniques

### II.10.1 Transformation transitoire de feuilles de tabac

Une pré-culture de bactérie contenant le construit à tester est diluée dans 5 mL de LB avec les antibiotiques appropriés. Deux autres pré-cultures d'agrobactéries C58 de la construction P19 sont réalisées dans 5 mL de LB avec les antibiotiques gentamycine (20 mg.L<sup>-1</sup>) et kanamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>). Les pré-cultures sont mises à 28°C pendant une nuit sous agitation (200 ppm).

Le lendemain, une mesure à DO<sub>600nm</sub> est réalisée et les bactéries sont diluées dans le LB supplémenté en antibiotiques pour atteindre une DO<sub>600nm</sub> = 0,3. A partir de ces pré-cultures, des cultures de volume de 30 mL (en fonction des plantes à inoculer) sont préparées avec du LB additionné des antibiotiques et incubées à 28°C et agitées à 220 rpm jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> = 0,5. La culture est ensuite centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans le milieu d'induction (5 mL MES 1M ; 400 µL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M; 2 mL acétylsyringone 10mM ; 0,5 g glucose ; le pH est ajusté à 5,6 avec du NaOH et le volume est porté à 100 mL avec de l'eau distillée). La culture est à nouveau centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min à température ambiante et 23 µL de milieu d'induction sont ajoutés pour porter le volume total à 30 mL. Sur les deux cultures de P19A, une est mélangée avec un volume égal de la suspension du construit à tester et laissée à l'obscurité pendant deux heures. L'autre culture est gardée intacte à l'obscurité et servira de contrôle.

Les feuilles de tabac sont inoculées sur leur partie abaxiale en grattant délicatement la surface de la feuille à l'aide d'un cône de pipette. L'injection est réalisée avec une seringue de 1 mL sans l'aiguille (figure 63). Les feuilles sont ensuite séchées entre deux feuilles de papier absorbant et la partie inoculée est marquée délicatement avec un feutre noir. Les analyses des plantes au microscope confocal et l'extraction des feuilles pour une analyse GC-MS sont réalisées 5 à 6 jours plus tard.



**Figure 63 | Agro-infiltration d'une feuille de *Nicotiana benthamiana*.** La seringue est remplie d'une solution d'*Agrobacterium tumefaciens* transformés qui sont injectés par pression dans la partie abaxiale de la feuille.

## II.10.2 Transformation stable de plants de *Pelargonium* et de tabac

Nous prendrons l'exemple du *Pelargonium* mais la technique et le protocole sont très similaires pour la transformation du tabac.

### Obtention des explants

Des plantules de *Pelargonium* sont cultivées en pots stériles en CIV sur un milieu de culture (**annexe 26**). La transformation se fait à partir de plants âgés d'environ cinq semaines. La transformation du *Pelargonium* avec une souche d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur d'expression des gènes *GUS*<sup>71</sup>, *GES*, *EDS* est réalisée sur une centaine de disques foliaires prélevés sur des jeunes feuilles. Comme témoin de transformation, une centaine de disques foliaires sont transformés avec une souche d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur pKFWG2 dans lequel la GFP est exprimée de façon constitutive.

### Préparation des bactéries

A partir d'une colonie transformée avec le vecteur d'intérêt et isolée ou à partir d'un stock glycérol, Une culture de 5 mL de LB estensemencée avec les antibiotiques adéquats (rifampicine [50 mg.L<sup>-1</sup>]; gentamycine [20 mg.L<sup>-1</sup>]; streptomycine [50 mg.L<sup>-1</sup>] dans ce cas) et incubés sous agitation (220 rpm) la nuit à 26-27° C. Le lendemain, 1 mL de préculture est porté à 25 mL avec du LB (+ antibiotiques) et de nouveau mis à croître pour la nuit. Le lendemain la DO<sub>660nm</sub> est prise jusqu'à atteindre une valeur de 0,5 ou la culture est diluée si besoin. La culture bactérienne est ensuite centrifugée 5-10 min à 500 g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec du milieu liquide SRM<sup>72</sup> sans hormone (**annexe 27**).

### Transformation des explants

Les disques foliaires (pré-cultivés 2 jours à l'obscurité) sont mis en contact 20 min sous une faible agitation à 27°C dans des bocaux stériles avec 20 mL de suspension bactérienne DO<sub>660nm</sub>= 0,5. Les disques foliaires sont alors mis à sécher rapidement sur papier filtre stérile, puis placés dans des boîtes de pétri contenant le milieu SRM + acétyrsyngone (AS<sub>100µM</sub>) face supérieure vers le haut. Les boîtes sont alors mises à l'obscurité pendant 2 jours. On procède de la même manière avec les témoins (milieu SRM + acétyrsyngone mais sans culture bactérienne).

---

<sup>71</sup> GUS pour β-glucuronidase

<sup>72</sup> SRM pour

Après les 2 jours d'obscurité, les explants sont cultivés sur un milieu SRM avec les antibiotiques augmentin (500 mg.L<sup>-1</sup>) et kanamycine (100 mg.L<sup>-1</sup>) ainsi que les hormones ANA (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) et BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>). Les boîtes de pétri sont parafilmées et mises à l'obscurité pendant trois semaines, puis une semaine à la lumière diffuse et enfin de façon permanente à la lumière. Les explants, puis les cals, sont repiqués toutes les trois semaines sur le même milieu jusqu'à la formation de bourgeons puis de plantules.

#### Entretien des transformants

Lorsque les bourgeons apparaissent et sont suffisamment grands, ils sont repiqués sur le milieu EM (milieu d'élongation, [annexe 27](#)) toutes les six semaines jusqu'à pouvoir isoler les plantules. Celles-ci seront alors cultivées en phytotron.

### III. TECHNIQUES DE BIO-INFORMATIQUE

#### III.1 Préparation d'une banque d'ADNc normalisée et pyroséquençage 454

Un total de 75 µg d'ARN totaux a été envoyé à Eurofins MWG GmbH pour la fabrication d'une banque normalisée et son séquençage. Brièvement, la qualité des ARN a été vérifiée par électrophorèse capillaire à l'aide du système MultiNA de Shimadzu. Après un traitement à la DNase, les ARN polyadénylés ont été isolés et les ADNc ont été synthétisés. Le premier brin d'ADNc a été obtenu à l'aide d'une amorce composée de 6 nucléotides aléatoires. Ensuite, les adaptateurs 454 A (CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG) et B (CTGAGACTGCCAAGGCACACAGGGGATAGG) ont été ligués aux terminaisons 3' et 5' de l'ADNc avant amplification. La normalisation a été effectuée par un cycle de dénaturation et de réassociation de l'ADNc. Les ADNc double brin réassociés ont été séparés des ADNc simple brin en passant le mélange sur une colonne d'hydroxylapatite. Après cette étape de chromatographie, les ADNc simple brin ont été amplifiés par PCR. Les ADNc dont les tailles sont comprises entre 500 et 1200 paires de bases ont été sélectionnés à l'aide d'une séparation sur gel d'agarose et ont été analysés par électrophorèse capillaire. Ensuite une PCR en émulsion et un séquençage GS FLX (454/Roche) ont été réalisés.

#### III.2 Analyse des séquences obtenues

Les lectures ont été nettoyées par le prestataire. Nous avons vérifié leur qualité à l'aide du logiciel FastQ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (`fastqc_report.html`). Les lectures ont été assemblées avec le logiciel CAP3 (Huang and Madan 1999) avec un seuil minimum d'identité de séquence de 90% sur un minimum de recouvrement de 40 bases. Les séquences ont été annotées en comparant les séquences assemblées aux séquences protéiques d'Arabidopsis (The Arabidopsis Information Resource (TAIR, V10: <http://www.arabidopsis.org/>), à l'aide du programme Blastx. Les séquences ont ensuite été classées de façon fonctionnelle à l'aide du catalogue FunCat de l'IBSB (Institute of Bioinformatics and Systems Biology) (<http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis/resourcesservices/services/funcat-the-functional-catalogue/index.html>) comme décrit par *Legrand et al.* (2010). Plusieurs programmes codés en langage Perl ont été construits pour l'assemblage, l'annotation et la classification fonctionnelle des séquences.

## IV. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

### IV.1 Microscopie électronique à balayage environnemental

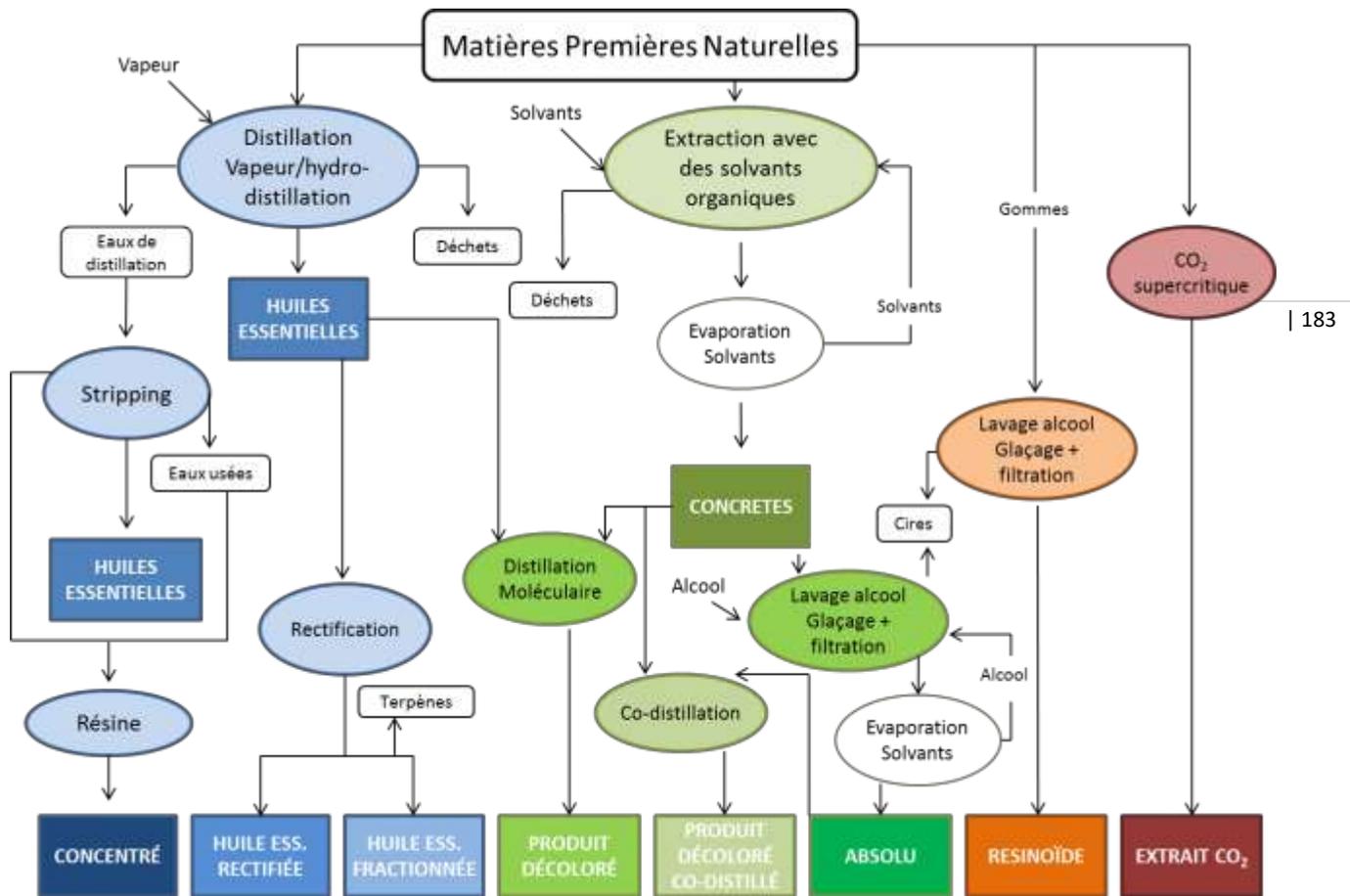
Pour la microscopie électronique environnementale à balayage, des morceaux de feuilles sont découpés et directement collés sur un support. Ce support est ensuite placé dans la chambre à pression contrôlée d'un microscope Hitachi S-3000N. Les échantillons sont maintenus à une température comprise entre +4°C et -20°C grâce à l'effet Pelletier. Une pression de 110 Pa et une tension de 15 kV sont appliquées pour les observations.

### IV.2 Microscopie confocale

Pour les études de localisation subcellulaire, les zones des échantillons, transformées de façon transitoire, sont prélevées à l'aide d'un scalpel et placées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope à balayage confocale droit Zeiss Axioplan 2 équipé du système confocale LSM 510 (plate-forme PLATIM, INSERM-ENS Lyon). La GFP est excitée par une longueur d'onde de 488 nm émise par un laser Argon/krypton. Un filtre d'émission BP 505-550 nm est utilisé. Les observations se font soit à l'aide d'un objectif Plan-Neofluar 10 x0,3 Ph1, soit à l'aide d'un objectif à immersion à eau de type C-Apochromat 40x/1,2 W. Les images et empilements obtenus sont enregistrés, analysés et annotés grâce au logiciel LSM5 Image Browser (Zeiss).

## V. TECHNIQUES D'ANALYSES DU PARFUM

L'extraction peut s'effectuer par des entraînements à la vapeur d'eau, des extractions solvants, qui représentent les extractions les plus connues avec aujourd'hui de nouveaux solvants d'extraction à notre disposition. Les techniques d'extraction les plus anciennes sont toujours utilisées dans l'industrie de la parfumerie. Ces techniques sont bien connues, peu onéreuses et nécessitent peu d'appareillage par rapport à l'extraction plus récente telle que l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique ou encore l'extraction par micro-onde avec vide séquentiel. La **figure 64** représente différents procédés d'extraction et de purification utilisés chez IFF-LMR.



**Figure 64 | Schéma simplifié des principaux procédés physico-chimiques d'extraction et de purification ainsi que leurs extraits associés, destinés à la parfumerie et aux arômes alimentaires.** Les cercles de couleurs représentent les opérations unitaires utilisées pour traiter un produit. Les boîtes rectangulaires de couleurs correspondent aux produits finis ou semi-finis prêts pour une commercialisation.

## V.1 Extraction par solvant

### V.1.1 Extraction à partir de végétal frais

L'extraction par solvant existe depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Vers 1870, Louis-Maximin Roure envisage de concentrer des lavages alcooliques afin d'obtenir des « essences concrètes de pommade » entièrement solubles dans l'alcool. Ce n'est qu'en 1879, que les recherches de Naudin et de Schneider permettent d'utiliser l'éther de pétrole pour l'extraction des produits floraux.

Ces techniques d'extractions mettent en jeu un solvant, autre que l'eau, pour extraire les composés volatils d'une matière première. Il existe évidemment une multitude de solvants (dichlorométhane, hexane, cyclohexane, ...) qui se différencient par leur polarité et leur pouvoir d'extraction. Des composés plus ou moins polaires pourront ainsi être extraits selon leurs affinités avec le solvant utilisé ce qui donnera un produit final spécifique. Cette technique est aussi appelée extraction totale car les solvants utilisés sont beaucoup moins sélectifs que la vapeur d'eau. La technique de l'extraction par solvant est très utilisée en parfumerie, elle permet d'aboutir à un produit appelé concrète. Une concrète par définition est une substance solide ou semi solide résultant de l'extraction par un solvant organique apolaire d'une matière végétale fraîche.

| 184

L'obtention d'une concrète est basée sur la solubilité des composés de la matière végétale. Généralement, la plupart des produits odorants passent en solution. Etant donné que plusieurs solvants peuvent être utilisés, il peut alors y avoir plusieurs concrètes différentes pour une même matière première. Par exemple, une extraction particulière est également très utilisée en parfumerie. C'est l'extraction d'une matière première par l'alcool, ici l'éthanol, permettant d'aboutir à un résinoïde. La méthode d'obtention d'un résinoïde est comparable à celui d'une concrète, Il y a d'ailleurs souvent confusion entre ces deux termes. Le résinoïde alcool s'effectue en général sur une matière végétale sèche (gommes...) tandis que la concrète s'effectue sur une matière première fraîche. Si on devait faire une extraction à l'alcool sur un végétal frais, l'eau contenue dans ce dernier abaisserait le titre de l'alcool d'extraction. Le produit obtenu s'appelle un résinoïde parce que généralement les produits visés par ce type d'extraction sont plutôt des résines, des gommes, des baumes. Les avantages et désavantages de cette extraction sont indiqués dans le **tableau 9**.

L'absolu par définition est le résultat du traitement que l'on fait subir à une concrète de façon à la rendre soluble à 10 % dans l'alcool. Ce traitement consiste en plusieurs lavages à l'alcool de la concrète puis en

un glaçage à -20 °C afin de faire précipiter tous les agents gras, les cires non solubles et un filtrage sur célite pour éliminer ces derniers. Le produit purifié obtenu lors de l'évaporation de l'alcool constitue l'absolu tandis les produits insolubles recueillis à la filtration sont appelés les cires.

**Tableau 9 | Avantages et inconvénients de l'extraction par solvant**

Avantages	Inconvénients
Température d'extraction basse	Solvant résiduel
Diversité des extractions	Risque de dégradation
Quantités de solvant minimum	Perte de composés volatils
Procédé continu	Rendement généralement faible

#### **V.1.1.1 Les extractions aux laboratoires**

Trois types d'extractions ont été réalisés dans le cadre de cette thèse :

- Des extractions sur des quantités importantes de végétal sont réalisées au laboratoire LMR-IFF sur des *Pelargonium* cultivés à Grasse afin de disposer de suffisamment de matière pour pouvoir transformer la concrète en absolu et faire une évaluation par les parfumeurs.
- Des micro-extractions, réalisées en Egypte pour le suivi du rendement et de la composition de l'essence de la plantation et de l'épuisement du végétal après distillation.
- Des micro-extractions, réalisées au LBVpam pour une analyse chimique des composés d'un grand nombre de *Pelargonium* cultivés dans les serres du LBVpam. Cette extraction a aussi été utilisée pour extraire des feuilles de *Nicotiana benthamiana* transformé de façon transitoire ou stable.

#### **V.1.1.2 Réalisation d'absolu au laboratoire de IFF-LMR**

L'extraction par solvant se fait à l'aide d'un appareil soxhlet qui est composé d'une chambre d'extraction où se trouve confinée la matière première dans une cartouche de cellulose. Cette chambre possède deux bras en verre. Le premier, d'un diamètre plus important est le chemin de distillation et connecte les vapeurs de solvant produites dans le ballon et le refroidisseur, situé à la verticale de la chambre d'extraction. Le deuxième bras connecte, au moyen d'un siphon, le bas de la chambre d'extraction au ballon rempli du solvant d'extraction (figure 65).

La cartouche de cellulose est placée dans le centre de la chambre d'extraction et est remplie jusqu'à la hauteur du siphon par la MP<sup>73</sup> à extraire finement coupée (feuilles, tiges...) ou cryobroyée préalablement (bois, gousses, baies...). Le ballon est rempli par un volume deux à trois fois supérieur à la contenance de la chambre d'extraction. Un barreau magnétique d'agitation est aussi ajouté dans le ballon afin d'éviter de brûler le produit extrait.

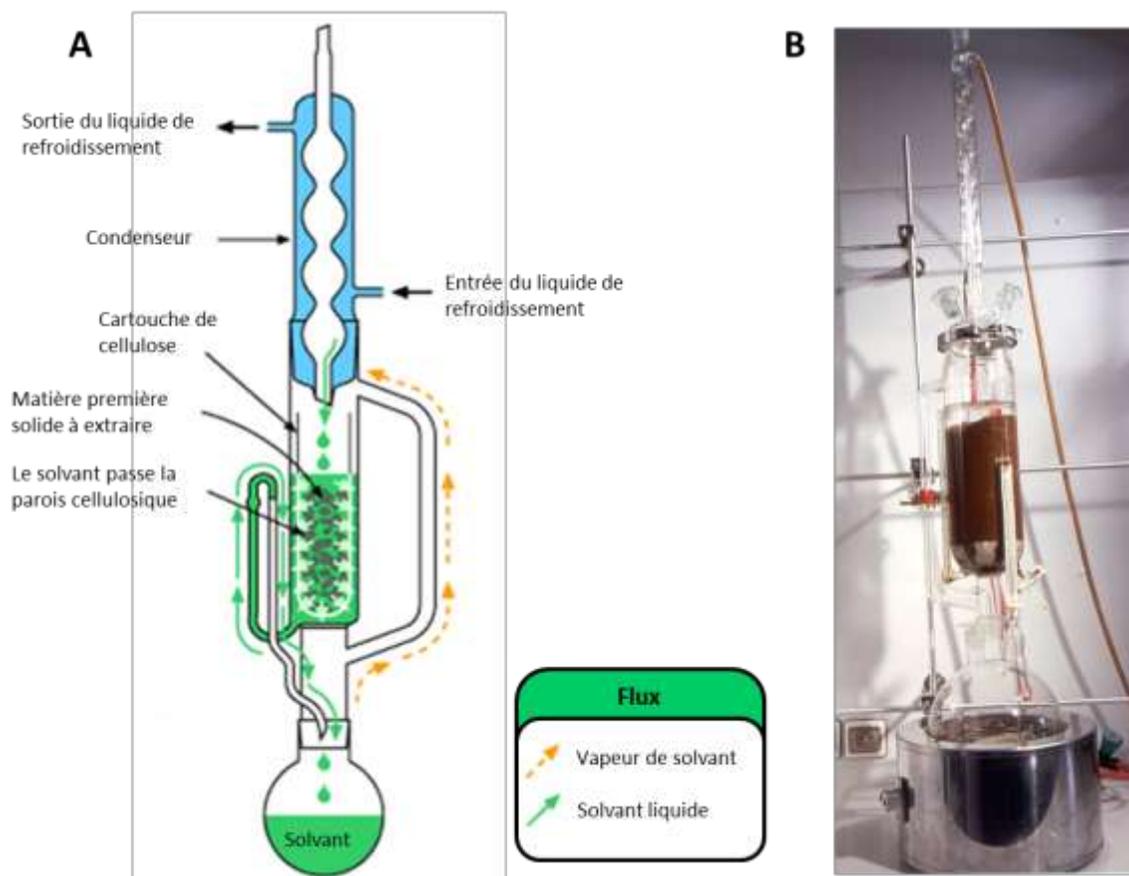
Le chauffe-ballon est ensuite mis en marche en prenant bien soin de contrôler précisément la température du thermostat. La consigne de température sera fonction bien évidemment de la température d'ébullition du solvant mis en œuvre. Une température trop haute induira un débit de vapeur important et donc un risque que le refroidisseur ne soit plus capable de refroidir efficacement les vapeurs de solvant avec un risque de fuite à l'extérieur du montage. La mise en place d'une garde de sécurité est d'ailleurs conseillée. Les vapeurs du solvant vont passer par le bras de distillation pour se condenser au-dessus de la chambre d'extraction jusqu'à le remplir jusqu'au niveau du siphon. La chambre d'extraction se videra alors par siphonage et un nouveau cycle redémarrera. 6 cycles d'extractions sont suffisants pour une bonne extraction.

Après l'extraction, l'évaporation du solvant dans un rotavapeur se fera sous vide peu poussé au début afin de ne pas perdre de molécules volatiles mais sera terminé avec un vide plus poussé. L'extrait qui en résulte est la concrète.

Afin de se débarrasser des cires et autres composés insolubles à 10% dans l'alcool, la concrète sera chauffée doucement puis mise en contact avec un volume dix fois supérieur en alcool 96°. Ce mélange sera ensuite glacée à -20°C puis filtré sur célite. Le filtrat sera ensuite de nouveau lavé deux fois afin de ne pas perdre les molécules odorantes restées piégées sur le filtre. La totalité de l'alcool sera alors évaporé doucement sous vide à l'aide d'un rotavapeur. L'évaporation sera ensuite finie sous haut vide afin de s'assurer l'évaporation totale de l'alcool. Le produit obtenu est l'absolu directement utilisable par les parfumeurs ou pouvant subir d'autres opérations comme une distillation moléculaire pour le décolorer notamment.

---

<sup>73</sup> MP pour Matière première



**Figure 65 | A** – Schéma d'un appareil soxhlet pour l'extraction à l'aide d'un solvant organique d'une matière première solide à destination de la parfumerie. **B** – Montage d'un soxhlet de laboratoire lors d'une extraction de feuilles de *Pelargonium odorant* (IFF-LMR)

### V.1.1.3 Réalisation de micro-extractions au LBVpam

Un micro-extrait est obtenu à partir d'un gramme de jeunes feuilles qui seront mises en contact avec 2 mL d'hexane auquel il aura été rajouté du camphre comme standard interne à une concentration de 300 mg.L<sup>-1</sup>. Le camphre sert ainsi à l'homogénéisation des analyses même si avec de si faibles quantités, le rendement est approximatif. L'extraction est réalisée sur la nuit à 4°C dans des flacons en verre à bouchon à vis étanches. L'extrait est ensuite récupéré dans des flacons adaptés au passeur du GC<sup>74</sup>. Le rendement de certains *Pelargonium* étant très faible, une concentration sous air pulsé de l'extrait peut être nécessaire. Ces extractions sont utilisées pour une comparaison chimique des différentes espèces et cultivars de *Pelargonium* ainsi que pour les suivis des composés lors de l'étude des cultivars 'rosat Chine', 'rosat Bourbon', 'rosat Égypte' et 'rosat Grasse' soumis à des conditions différentes de températures et de substrats.

<sup>74</sup> GC pour Chromatographie en phase gazeuse

#### **V.1.1.4 Réalisation de micro-extractions au champ en Égypte**

Un micro-extrait en champ pour le suivi du rendement et de la qualité de l'essence est obtenu à partir d'environ quarante feuilles représentatives du plant (petites et grandes). Ces feuilles sont prélevées à différents endroits sur la plante (au sommet, à la base, exposées au soleil et au vent ou non-exposées...). Les feuilles sont ensuite extraites avec 50 mL d'hexane auquel il a été ajouté du camphre comme standard interne à une concentration de 300 mg.L<sup>-1</sup>. Les 50 mL d'hexane sont ensuite évaporés au rotavapeur pour concentrer l'extrait jusqu'à l'obtention de 5 mL de solution. Ce concentré sera séché si nécessaire sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et injecté en GC-FID pour une quantification. Des extractions sur le matériel végétal épuisé après la distillation sont réalisées avec le même protocole afin de vérifier l'épuisement de la matière végétale après distillation et la bonne efficacité de celle-ci.

## V.2 Distillation par vapeur d'eau

### V.2.1 Le principe de l'hydrodistillation et de la distillation à la vapeur d'eau

Les techniques d'hydrodistillation et de distillation vapeur sont très utilisées pour extraire les composés organiques volatils notamment dans les matières premières naturelles pour la parfumerie. La distillation d'un liquide consiste à le vaporiser par la chaleur, à recueillir sa vapeur, et à la liquéfier par refroidissement. La matière première végétale est placée dans un ballon rempli d'eau ou dans une colonne de distillation au-dessus d'un générateur de vapeur. L'eau qui est ensuite chauffée va passer de son état liquide à son état vapeur et va traverser les cellules végétales de la matière première. L'eau dans son état vapeur va entraîner les composés volatils libérés par la plante par des liaisons de type Van-Deer-Waals. Ces vapeurs seront condensées ce qui permet de récupérer par simple décantation une phase organique constituée de composés volatils appelée HE.

Ces techniques présentent de nombreux avantages : elles sont simples à réaliser de façon expérimentale, et ne présentent aucun risque de toxicité. De plus, seuls les composés les plus volatils sont entraînés, les HE obtenues sont généralement de haute qualité organoleptique (**tableau 10**).

---

| 189

Cependant, ces techniques possèdent également des inconvénients. Le temps d'extraction est généralement assez long. La forte chauffe peut engendrer des dégradations pour les composés thermosensibles. Certaines molécules peuvent être facilement hydrolysées, cyclisées, décarboxylées, transposées avec l'acidité que produisent les matières végétales fraîches, ce qui peut causer une perte de qualité de l'HE (particulièrement dans le cas de l'hydrodistillation). D'autre part, les produits volatils extraits sont organiques donc généralement apolaires, ce qui veut dire qu'ils ne sont pas solubles dans l'eau. Malheureusement ce n'est pas vrai pour tous les composés, plus particulièrement les composés oxygénés. Par exemple, l'HE de rose possède une odeur différente de celle d'un absolu rose. En effet, l'alcool phényléthylique qui représente quantitativement une grande partie des COV de la fleur est miscible dans l'eau. Donc dans l'HE de rose, on ne retrouvera que très peu d'alcool phényléthylique. A l'inverse, dans un absolu de rose, extrait au solvant, l'alcool phényléthylique sera un composé majoritaire de l'extrait.

**Tableau 10 | Avantages et inconvénients de la distillation vapeur**

Avantages	Inconvénients
Produit de haute qualité organoleptique	Température de distillation élevée (100°C)
Simplicité de la technique et de sa mise en œuvre	Temps d'extraction long
Pas de risque de toxicité, produit naturel	Risque de dégradation des composés thermosensibles
Pas de solvant résiduel	Risque d'hydrolyse
	Perte de composés volatils
	Risque de perte des composés miscibles dans l'eau
	Rendement généralement faible

### V.2.2 Obtention d'une HE de *Pelargonium* au laboratoire de IFF-LMR

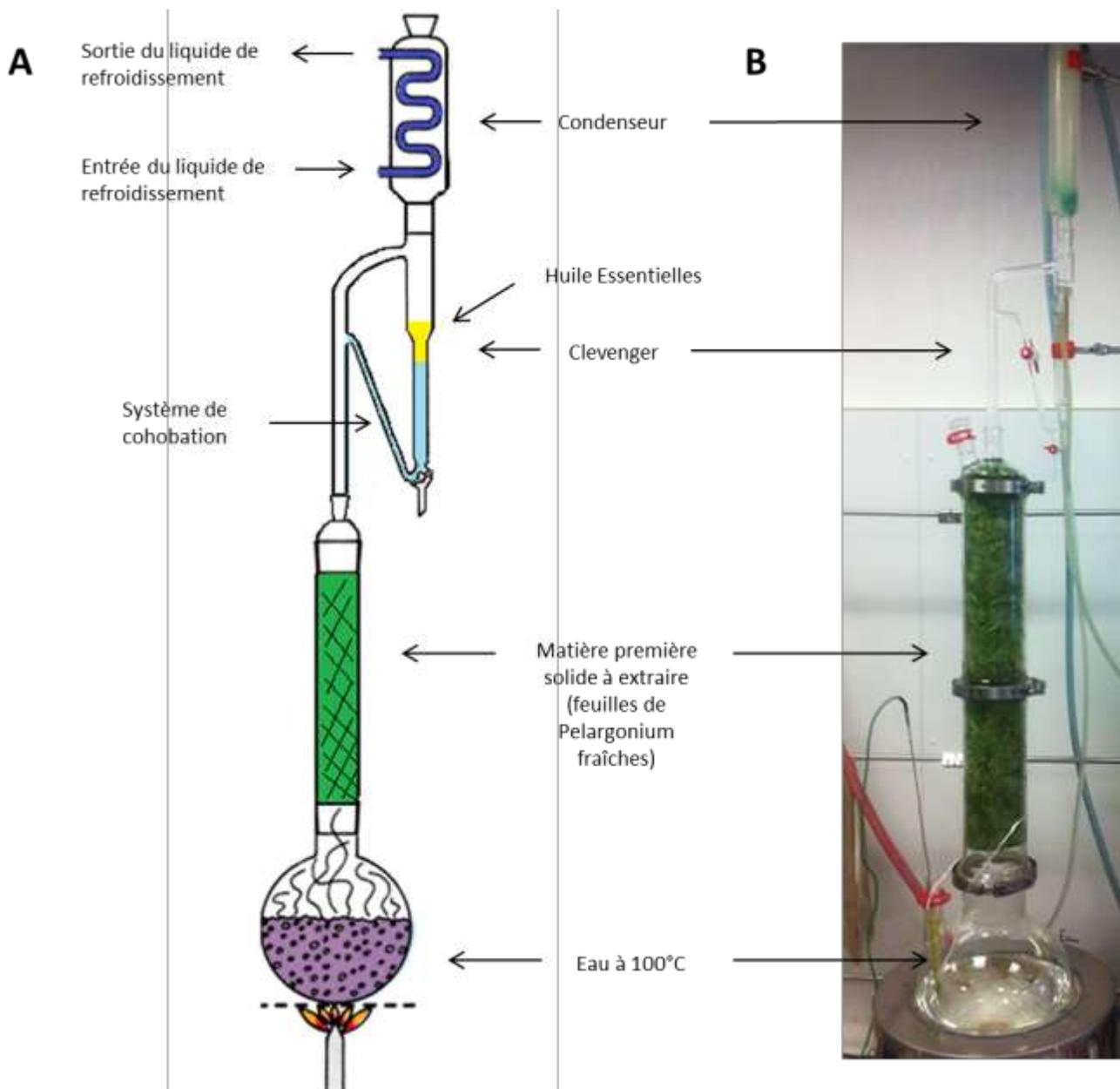
Pour la distillation de feuilles de *Pelargonium*, la distillation vapeur sera utilisée, comme cela se fait traditionnellement de façon industrielle. Un appareillage de type Clevenger est installé sur un montage d'hydrodistillation (figure 66). Le Clevenger est un petit décanteur permettant de séparer l'HE fraîchement distillée de la phase aqueuse. De plus cet appareil de laboratoire est doté d'un retour (cohobation) permettant à l'eau de retourner dans le milieu réactionnel, tout comme l'hydrodistillateur en version industrielle. Industriellement, la distillation se réalise dans les mêmes proportions entre la matière première et l'eau qu'au laboratoire.

| 190

Environ 1 à 2 kg de feuilles de *Pelargonium* sont chargés dans la colonne de distillation. L'eau se trouvant dans le ballon de 10 L est mise à chauffer jusqu'à l'évaporation et en s'évaporant, traverse la matière végétale. Cette eau à 100°C fait ainsi exploser les trichomes glandulaires où se trouve stockée l'HE du *Pelargonium*. Une fois chargée en composés volatils cette eau sera condensée et retombera dans le Clevenger. L'HE décantera alors à cause de la différence de densité et de l'hydrophobicité des composés volatils. Les composés hydrosolubles ne seront quant à eux pas récupérés dans l'HE. L'eau excédentaire remplira le tube de cohobation et retournera ensuite dans la colonne de distillation. Si les rendements en HE sont faibles pour le végétal travaillé, il est possible de piéger l'HE dans une phase hexanique (cyclohexane ou hexane). Cependant cette phase hexanique piègera aussi des composés hydrosolubles. Les deux extraits seront donc différents. La distillation est arrêtée après 2-3 heures car on considère que le matériel végétal est alors épuisé. L'HE est alors récoltée puis séchée sur sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) avant d'être injectée en GC-MS<sup>75</sup> ou GC-FID<sup>76</sup>.

<sup>75</sup> GC-MS pour Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse

<sup>76</sup> GC-FID pour Chromatographie en phase gazeuse - Détecteur à ionisation de flamme



**Figure 66 | A** – Schéma d'un appareil de distillation vapeur de laboratoire pour la fabrication d'HE. **B** – Montage d'un appareillage de distillation vapeur de laboratoire lors d'une fabrication d'HE de *Pelargonium* odorant (IFF-LMR)

### V.2.3 Obtention d'une HE de *Pelargonium* en conditions industrielles en Égypte

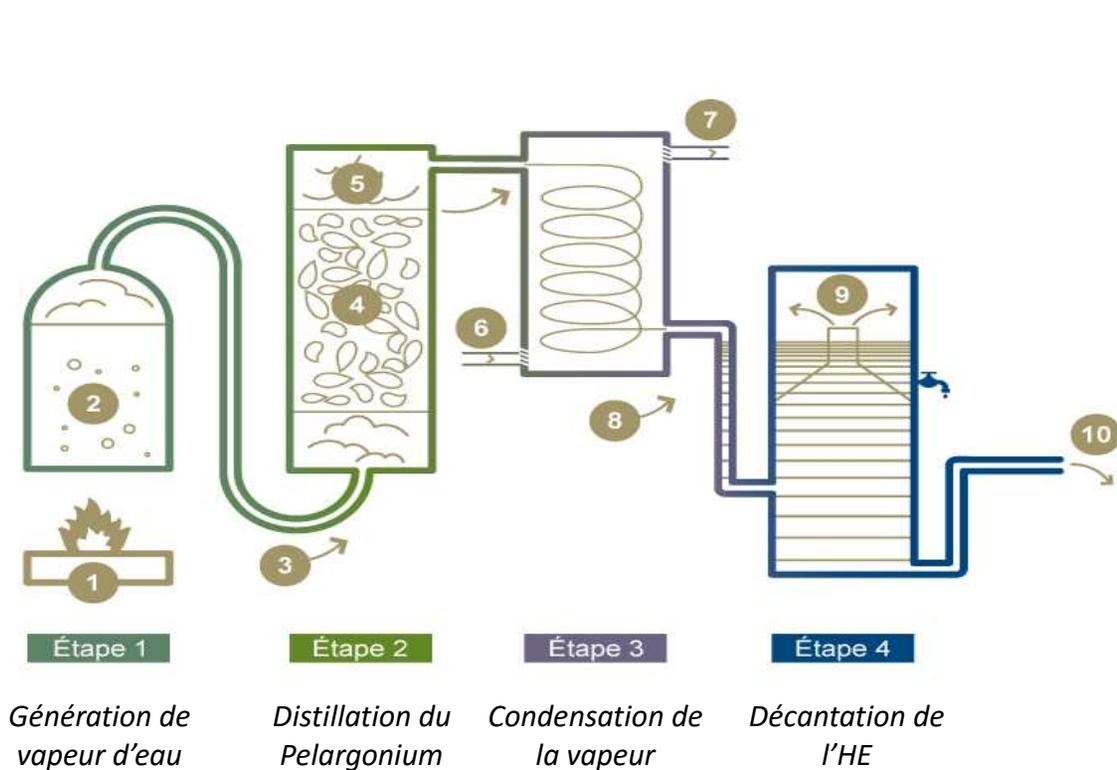
Une fois le matériel végétal récolté, celui-ci est transporté et chargé dans les alambics de distillation. La distillerie se trouve juste à côté des champs. Les gains de rendement et de productivité obtenus par une amélioration des procédés d'extraction dans le cas d'une distillation vapeur simple d'un matériel rapide à distiller sont souvent moins importants qu'avec un travail sur le végétal lui-même. Cependant, ces améliorations sont rapides et demandent peu d'investissement en matériel et en recherche.

La distillation du *Pelargonium* se déroule comme schématisée sur la **figure 67** et présentée en **annexe 28**. Les alambics de 3000 L sont chargés avec environ 1000 Kg de végétal qui sont distillés pendant 60 à 90 min avec un débit de 2 L d'eau.min<sup>-1</sup> (120-180 L pour 1000 Kg de plante). L'alambic est alimenté par une vapeur directe sous 2 bars de pression (1800 L.min<sup>-1</sup> de vapeur à 120°C). La vapeur se détend ensuite et traverse la masse végétale à un débit de 3400 L.min<sup>-1</sup>. Le temps de séjour de la vapeur dans l'alambic est d'environ 20-25 sec. 1000 Kg de végétal permettent de produire 1,1 Kg d'HE (rendement<sub>moy.</sub> = 0,11%).

### V.2.4 Obtention d'une HE *Pelargonium* par stripping en Égypte

Dans certains cas, des expériences de stripping ont été effectuées après la distillation. Le principe du stripping est de redistiller l'eau de décantation chargée en composés organiques avec une quantité très inférieure de vapeur afin qu'une fois condensée, cette eau soit sursaturée. Le volume d'eau contenant ces composés passe de 10 à 1 si l'on travaille avec un ratio de 10%. Le ratio vapeur d'eau/eau à stripper dépend de la charge et de la composition de l'effluent en COV ainsi que du design de la colonne. Une colonne très efficace développera une surface d'échange très importante entre les deux fluides mis en contact, abaissant ainsi le ratio vers les 2-3%.

L'eau à stripper est préchauffée à environ 95°C. Cette eau est ensuite dispersée en tête de colonne (**figure 68**) tandis que la vapeur est produite sous la colonne et s'élève à contre-courant dans celle-ci. La colonne de stripping est composée de plusieurs étages séparés par des plateaux troués. Sur ces plateaux sont disposés un garnissage inerte (ici de petits cylindres d'acier inoxydable) dont l'intérêt est de développer la surface d'échange la plus importante. Lors de son contact avec l'eau qui descend la colonne par gravité, la vapeur d'eau qui monte à contre-courant se charge en composés organiques jusqu'au sommet de la colonne. La vapeur passe alors dans la deuxième partie de l'appareillage où elle sera condensée et décantée. L'huile obtenue est considérée comme une HE car elle provient exclusivement d'une distillation. L'eau de décantation, à nouveau à saturation, sera renvoyée dans le réservoir d'eau à saturation pour être à nouveau strippée.



- 1 Production de chaleur par fuel lourd
- 2 Génération de la vapeur d'eau saturée à 8 bars (170°C)
- 3 Transfert de la vapeur d'eau vers l'alambic de distillation et détente jusqu'à 2 bars (120°C) avec un débit de 1800 L.min<sup>-1</sup>
- 4 La vapeur d'eau traverse la masse végétale en faisant exploser les trichomes et se charge d'HE avec un débit de 3400 L.min<sup>-1</sup>.
- 5 La vapeur d'eau, maintenant à P<sub>atm</sub>, s'échappe par le dessus de l'alambic de distillation.
- 6 L'eau de refroidissement est pompée dans le sol pour condenser la vapeur d'eau.
- 7 L'eau de refroidissement, réchauffée, est envoyée dans un refroidisseur pour être réutilisée.
- 8 L'eau condensée et chargée d'HE est transférée dans le décanteur avec un débit de 2 L.min<sup>-1</sup>. L'HE, plus légère que l'eau, décante dans une phase hydrophobe au-dessus de l'eau pour être récupérée.
- 9
- 10 L'eau épuisée est jetée.

Figure 67 | Schéma représentant les principales étapes de la distillation du *Pelargonium* en Égypte

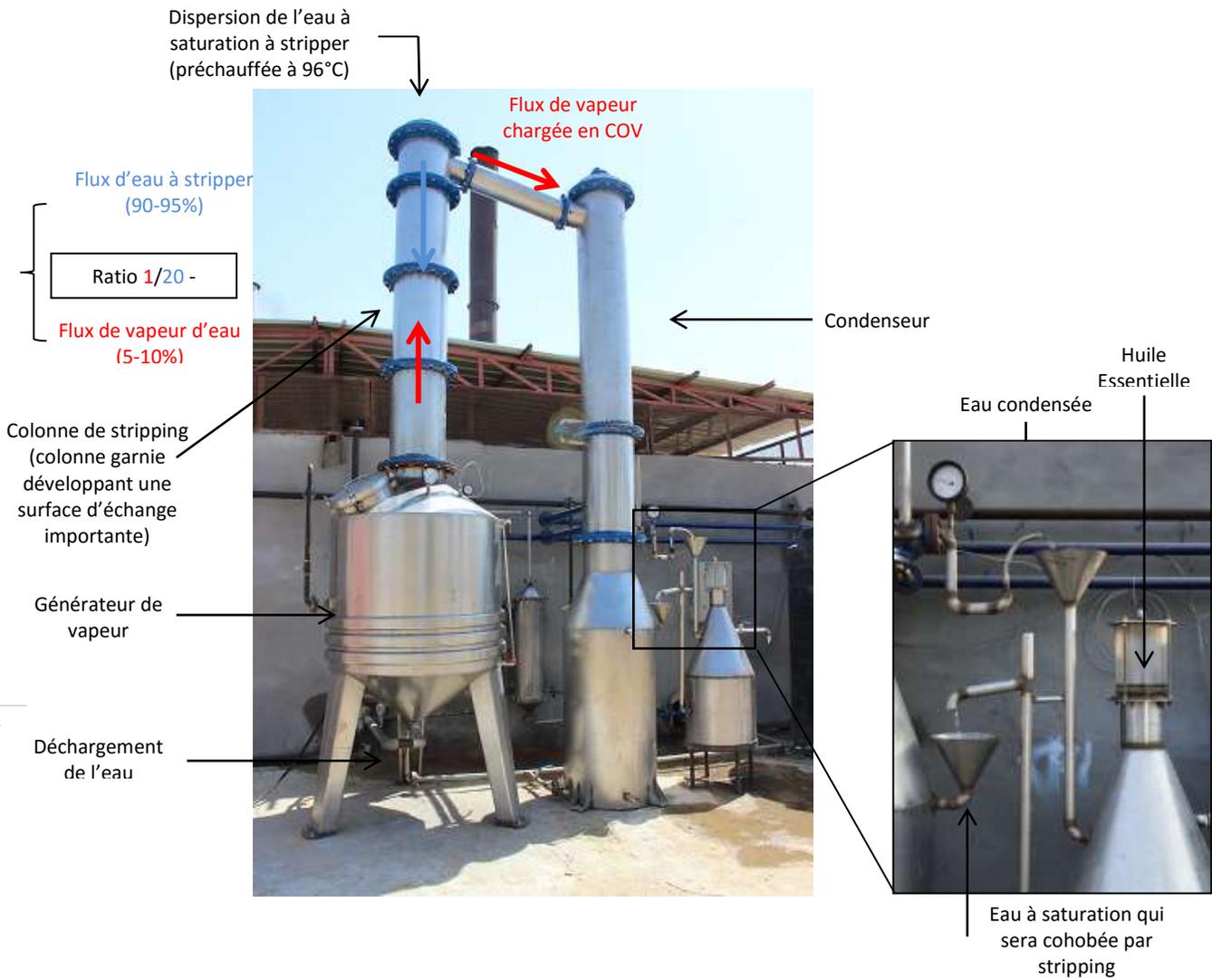


Figure 68 | Unité de Stripping utilisée pour extraire l'eau à saturation en COV venant de la distillation du *Pelargonium*

### V.2.5 Extraction sur des eaux de distillation

Afin de quantifier les composés présents dans l'eau de distillation, on extrait cette phase aqueuse avec le solvant organique, dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Cette eau est épuisée au moyen d'extractions liquide-liquide successives et les composés sont ainsi récupérés dans la phase organique. Cette extraction sera très utile aussi pour mettre au point les différents paramètres de stripping.

100 mL d'eau à analyser sont prélevés dans un flacon auquel est ajouté 1 mL d'éthanol contenant le standard interne (méthyle undécanoate) à une concentration de  $5000 \text{ mg.L}^{-1}$ . Il est important d'ajouter le standard interne avant de commencer l'extraction. Ces 100 mL d'eau sont alors extraits dans une ampoule à décanter avec 30 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (figure 69). L'ampoule est agitée fortement pour avoir un bon contact entre les deux phases et est ensuite reposée pour une bonne séparation des phases. La phase organique, se situant sous la phase aqueuse, est soutirée et passée à travers un filtre papier rempli de sulfate de sodium pour être séchée. Cette opération d'extraction liquide-liquide sera répétée trois fois avec le même volume de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pour épuiser complètement la phase aqueuse. La solution obtenue est alors concentrée à l'aide d'un rotavapeur.

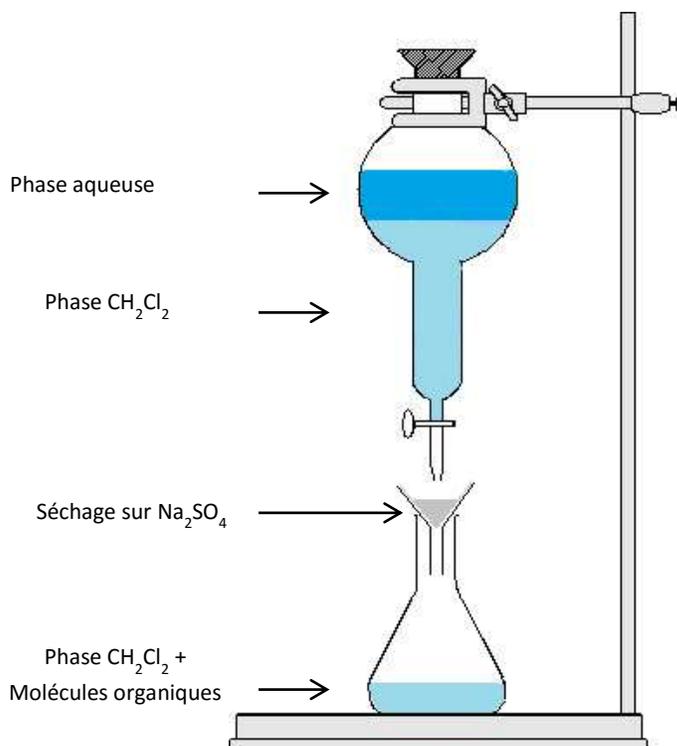


Figure 69 | Extraction liquide-liquide des eaux de distillation avec un solvant organique ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

### V.3 Analyse des composés volatils par GC-FID et GC-MS

Certaines analyses ont été réalisées au laboratoire de Grasse et d'autres au LBVpam de l'université de Saint-Etienne. Les deux laboratoires n'ayant pas le même type d'équipement, celui-ci sera précisé à chaque fois que nécessaire.

#### V.3.1 GC-FID

##### Equipement IFF-LMR

La chromatographie gazeuse a été réalisée au moyen d'un appareil Agilent® 6890N équipé avec un détecteur FID. La colonne est une colonne Varian® CP 7739 CP sil 5CB 25mx0.32mmx0.4µm, le flux à l'intérieur de la colonne est de 1,9 mL.min<sup>-1</sup> (He). Le ratio de split est de 50:1 et le programme de température du four est 60°C-10mn/2°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 300°C/10mn. Le volume d'injection est de 1µl. La fréquence de signal est de 50hz.

#### V.3.2 GC-MS

##### Equipement IFF-LMR

##### GCMS 5973

Les analyses GC-MS ont été réalisées sur une colonne capillaire apolaire Agilent® HP-1-MS (100% diméthylpolysiloxane, 60 m × 0.25 mm d.i.<sup>77</sup> × épaisseur de film de 0.25 µm) montée sur un appareil Agilent® HP 6890 – MS HP 5973. Le gaz vecteur est de l'He à flux constant de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La température de l'injecteur est de 250°C, le ratio de split de 1:110. Le programme de température est le suivant: 60°C - 10 min/ 2°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 300°C/ 300°C - 20 min. La température de la source d'ions est de 230°C, la température du Quadrupole de 150°C, la température de la ligne de transfert de 310°C, l'énergie d'ionisation de 70eV et les spectres de masse des électrons ionisés sont acquis pour une masse allant de 40 à 450 uma<sup>78</sup>.

---

<sup>77</sup> d.i. pour diamètre intérieur

<sup>78</sup> uma pour unité de masse atomique

#### GCMS 5977

Les analyses GC-MS ont été réalisées sur une colonne capillaire apolaire Restek® Rxi (100% diméthylpolysiloxane, 60 m × 0.25 mm d.i. × épaisseur de film 0.50 µm) montée sur un appareil Agilent® HP 6890 – MS HP 5977. Le gaz vecteur est de l'He à pression constante de 44 psi. La température de l'injecteur est de 250°C, le ratio split de 1:25. Le programme de température est le suivant: 50°C - 2 min/ 2°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 200°C/ 5°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 300°C. La température de la source d'ions est de 230°C, la température du Quadrupole de 150°C; la température de la ligne de transfert de 310°C; l'énergie d'ionisation de 70eV et les spectres de masse des électrons ionisés sont acquis pour une masse allant de 45 à 450 uma. Un split est installé à la fin de la colonne et ce split divise l'effluent de la colonne vers deux détecteurs, l'un FID et l'autre MS.

#### Equipement LBVpam

#### GCMS 5973

Toutes les analyses CG-MS au LBVpam ont été réalisées sur un appareil Agilent® GC 6850 couplé avec un détecteur Agilent® 5973 ion trap mass. L'appareil est équipé avec une colonne capillaire apolaire Agilent® DB-5 (5% phényl - 95% diméthylpolysiloxane 30 m × 0.25 mm d.i. × épaisseur de film 0.50 µm). Le gaz vecteur est de l'He à flux constant de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La température de l'injecteur est de 250°C en mode splitless (2 µL de volume d'injection). Le programme de température est le suivant : 60°C - 40 min/ 4°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 240°C/ 240°C - 5 min. La température de la source d'ions est de 250°C, l'énergie d'ionisation de 70eV avec une mesure de 2.45 scans.s<sup>-1</sup> entre 35 et 350 uma.

### **V.4 Identification des composés**

#### IFF-LMR

Les constituants ont été identifiés par une corrélation croisée des indices de retentions (IR) calculés à partir d'une série de n-alcanes ou n-esters et en comparant leurs spectres de masse avec une base de données commerciale ou la base de données interne à IFF. Les molécules les plus importantes dans l'HE de Pelargonium sont présentées aux **annexes 29, 30 et 31**.

#### LBVpam

L'identification des molécules a été réalisée en utilisant les bases de donnée Wiley, NIST 05 et le livre de référence Adams (Adams 2007).

## V.5 Traitements statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec R (version 2.15). L'analyse en composantes principales a été faite grâce au package *ade4*. Les analyses discriminantes ont été menées avec la fonction *plsda* du package *mixOmics* (Cao *et al.* 2011). Les composés discriminants ont été déterminés grâce à leurs coefficients VIP qui caractérisent l'importance de la variable dans le modèle et qui sont supérieurs à 1 pour les composés les plus discriminants. Le dendrogramme a été réalisé avec la fonction *hclust* du package *stats*. Chacune de ces analyses a été menée avec des matrices quantitatives de composés rapportées au standard interne (pourcentages de l'aire du pic).

## VI. PROTOCOLES DES ESSAIS DE CULTURE DU *PELARGONIUM*

### VI.1 Traitements des 17 parcelles R&D en Egypte en 2013

Le champ expérimental a été séparé en 37 parcelles différentes (**figure 70**) pour lesquelles différents traitements ont été appliqués.

Traitement 1 : Fertilisation en N:P:K (18:7:30). (100, 200 (contrôle), 400 et 600 kg.Ha<sup>-1</sup>). Malheureusement nous n'avons pu tester l'apport en CaO, MgO, Na comme cela avait été envisagé au début faute de temps et de disponibilité des produits.. Les fertilisants sont apportés à la plantation par fertirrigation, selon le programme décrit en **annexe 32** (*Rajeswara Rao 2002 ; Prasad et al. 2006 ; Blerot et al. 2015*).

Traitement 2 : Utilisation d'agents d'enracinement (IBA<sup>79</sup> (0,1 et 0,2%) + Captane 10% dans du talc (remplacé plus tard par le Pilartop<sup>®</sup>) et Vitamine C (2 et 5 g.L<sup>-1</sup>)) pour faciliter l'enracinement (*Michellon 1975 ; Weiss 1997 ; Demarne 2002*).

Traitement 3 : Utilisation de la phytohormone 28-homobrassinolide (1 et 3 mg.L<sup>-1</sup>), qui est un brassinostéroïde qui augmenterait de façon significative la croissance. Cette hormone est diluée dans de l'eau puis les *Pelargonium* sont aspergés 3 fois (mars, avril et mai) pendant leur croissance juste avant la nuit avec un pulvérisateur à dos. La 24-epibrassinolide était aussi prévue dans le programme initial mais a été impossible à trouver à des prix abordables et a donc été abandonnée (*Swamy et Rao 2009, 2010 ; Houimli et al. 2010*).

Traitement 4 : Les micronutriments comme le Zinc (100 et 200 mg.L<sup>-1</sup>) ont déjà été testés avec succès pour leurs effets stimulants de la croissance végétale du *Pelargonium*. Le Zinc est dilué en concentration voulue dans l'eau puis dispersé avec un pulvérisateur à dos sur les feuilles de *Pelargonium* juste avant la nuit. Trois pulvérisations ont eu lieu en mars, avril et mai. Le Zinc est connu notamment pour être impliqué dans la biosynthèse du tryptophane qui est un précurseur de l'IAA<sup>80</sup>, un régulateur de croissance (*Chand et al. 2007 ; Prasad et al. 2008 ; Ayad et al. 2010*).

---

<sup>79</sup>IBA pour Indole-3-butyric acid, hormone de la famille des auxines

<sup>80</sup> IAA pour Indole-3-acetic acid, hormone de la famille des auxines

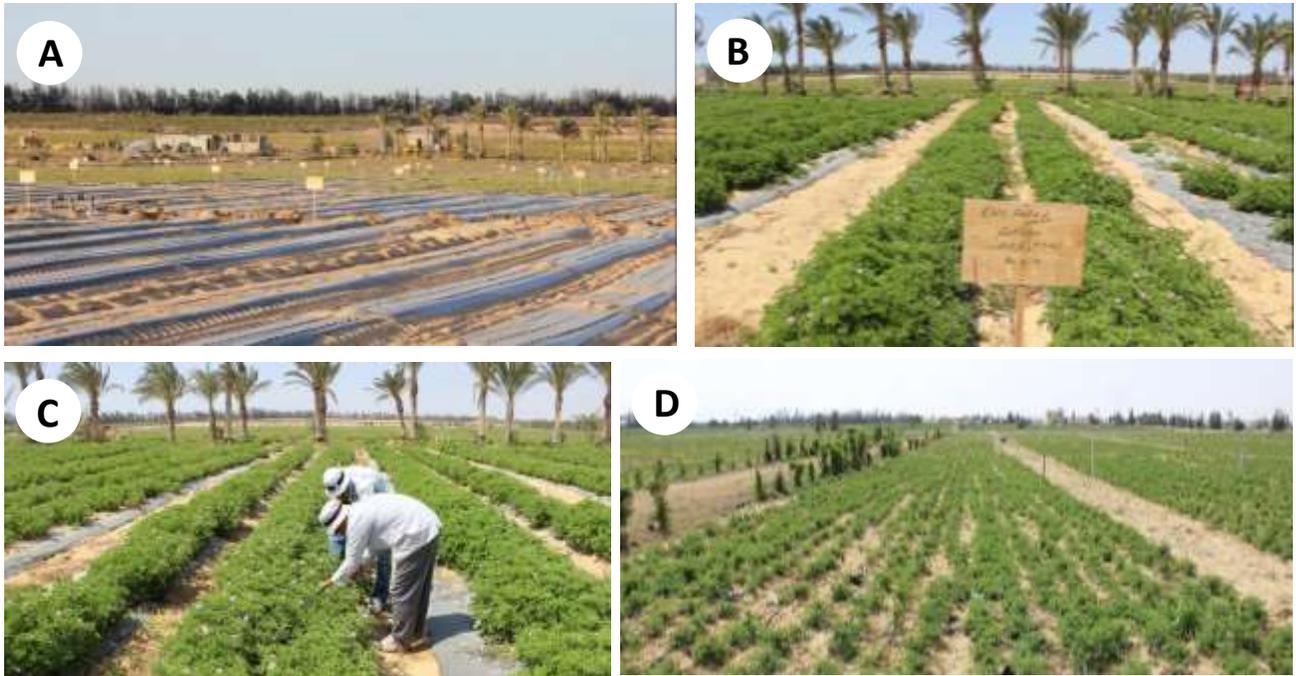
Traitement 5 : Utilisation de la putrescine (10, 20 et 40 mg.L<sup>-1</sup>) qui est une polyamine impliquée dans la croissance cellulaire notamment la division cellulaire. Celle-ci a aussi été appliquée par pulvérisation en mars, avril et mai (Ayad *et al.* 2010).

## VI.2 Traitements des 10 parcelles R&D en Egypte en 2014

Des combinaisons des traitements les plus intéressants de 2013 ont été utilisées pour l'année 2014. En tout, 10 traitements différents ont été testés (**tableau 11**) avec 2 réplicats sur une surface de 2500 m<sup>2</sup> (5 fois plus importante qu'en 2013). L'application de ces traitements s'est faite selon le même protocole qu'en 2013 pour la fertirrigation (**annexe 32**). Les parcelles de contrôle ont été simplement nourries avec 600 Kg.Ha<sup>-1</sup> de N:P:K (18:7:30) et c'est la même quantité de fertilisant qui a été utilisée pour les parcelles expérimentales. La distillation du matériel végétal pour chaque traitement a dû se faire en plusieurs fois car la masse végétale produite était importante mais entre le début et la fin des distillations des parcelles expérimentales, il ne s'est pas écoulé plus de 10 jours.

**Tableau 11 | Traitements des différentes parcelles expérimentales en 2014**

Parcelles	N:P:K (18:7:30) Kg.Ha <sup>-1</sup>	Vitamine C g.L <sup>-1</sup>	28- Homobrassinolide mg.L <sup>-1</sup>	Putrescine mg.L <sup>-1</sup>	Zinc mg.L <sup>-1</sup>
Control (3)	600				
1A et 1B	600	5	0,5		
2A et 2B	600	5	1		
3A et 3B	600	5	2,5		
4A & 4B	600	5	5		
5A & 5B	600			40	
6A & 6B	600	5		40	
7A & 7B	600	5		80	
8A & 8B	600	5			200
9A & 9B	600	5			400
10A & 10B	600	5	2,5	40	200



<b>E</b>											
AXE 1	AXE 4	AXE 2	AXE 5	Control 1	AXE 2	AXE 3	AXE 5	Control 2	AXE 1	AXE 2	
Fertilizers	Metals	Rooting Agents	Plant Regulators		Rooting Agents	Plant Hormones	Plant Regulators		Fertilizers	Rooting Agents	
Field 1 A	Field 10 A	Field 4 A	Field 12 A		Field 5 A	Field 8 A	Field 13 A		Field 2 A	Field 6 A	
N:P:K (18:7:30) 100 Kg.Ha <sup>-1</sup>	Zinc 100 mg.L <sup>-1</sup>	IBA 0,1% Captane 10% in Talc	Putrescine 10 mg.L <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 200 Kg.Ha <sup>-1</sup>	IBA 0,2% Captane 10% in Talc	28-Homo- brassinolide 1 mg.L <sup>-1</sup>	Putrescine 20 mg.L <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 200 Kg.Ha <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 400 Kg.Ha <sup>-1</sup>	Vitamin C 1 g.L <sup>-1</sup>	
AXE 5	AXE 1	Control 3	AXE 4	AXE 2	AXE 5	Control 4	AXE 1	AXE 4	AXE 2	AXE 3	
Plant Regulators	Fertilizers		Metals	Rooting Agents	Plant Regulators		Fertilizers	Metals	Rooting Agents	Plant Hormones	
Field 14 A	Field 3 A		Field 11 A	Field 7 A	Field 12 B		Field 1 B	Field 10 B	Field 4 B	Field 9 A	
Putrescine 40 mg.L <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 600 Kg.Ha <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 200 Kg.Ha <sup>-1</sup>	Zinc 200 mg.L <sup>-1</sup>	Vitamin C 2 g.L <sup>-1</sup>	Putrescine 10 mg.L <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 200 Kg.Ha <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 100 Kg.Ha <sup>-1</sup>	Zinc 100 mg.L <sup>-1</sup>	IBA 0,1% Captane 10% in Talc	28-Homo- brassinolide 3 mg.L <sup>-1</sup>	
AXE 2	AXE 3	AXE 5	AXE 1	Control 5	AXE 2	AXE 4	AXE 3	Control 6	AXE 5	AXE 1	AXE 2
Rooting Agents	Plant Hormones	Plant Regulators	Fertilizers		Rooting Agents	Metals	Plant Hormones		Plant Regulators	Fertilizers	Rooting Agents
Field 5 B	Field 8 B	Field 13 B	Field 2 B		Field 6 B	Field 11 B	Field 9 B		Field 14 B	Field 3 B	Field 7 B
IBA 0,2% Captane 10% in Talc	28-Homo- brassinolide 1 mg.L <sup>-1</sup>	Putrescine 20 mg.L <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 400 Kg.Ha <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 200 Kg/Ha	Vitamin C 1 g.L <sup>-1</sup>	Zinc 200 mg.L <sup>-1</sup>	28-Homo- brassinolide 3 mg.L <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 200 Kg/Ha	Putrescine 40 mg.L <sup>-1</sup>	N:P:K (18:7:30) 600 Kg.Ha <sup>-1</sup>	Vitamin C 2 g.L <sup>-1</sup>

7,0 m

75 m

**Figure 70 | Expérimentation sur la culture du *Pelargonium* en Egypte. A –** Délimitation des parcelles expérimentales pour une première expérimentation directionnelle (2013). **B et C –** Suivi des parcelles expérimentales et distillation de chaque parcelle séparément. **D –** La deuxième année, seuls 10 traitements ont été approfondis sur une surface 3 fois plus importante pour vérifier les résultats de 2013. **E –** Conception de l'expérimentation sur les différentes conditions de cultures dans le champ expérimental divisé en 34 parcelles destinées à recevoir 14 traitements différents avec 2 réplicats. Six parcelles servent de contrôle.

### VI.3 Comparaison des rendements en HE de jeunes feuilles et de feuilles plus âgées

Afin de quantifier la quantité d'HE présente dans les jeunes feuilles et dans les feuilles âgées dans les parcelles de contrôle en Egypte, nous avons extrait ces feuilles à l'hexane et quantifié les composés majoritaires de ces feuilles par GC-FID à l'aide du camphre comme standard interne.

Pour cela 20 feuilles de longueur comprise entre 40 et 60 mm (figure 71) ont été pesées puis plongées dans 60 mL d'hexane camphré et gardé sur la nuit à 4°C. L'hexane a ensuite été évaporé au rotavapeur jusqu'à un volume de 5 mL puis injecté en GC-FID.

Pour les plus jeunes feuilles de longueur comprise entre 10 et 25 mm (figure 71), il a fallu en prélever 60 par échantillon afin d'avoir un poids suffisant. L'extraction s'est faite exactement de la même manière que pour les feuilles plus âgées.

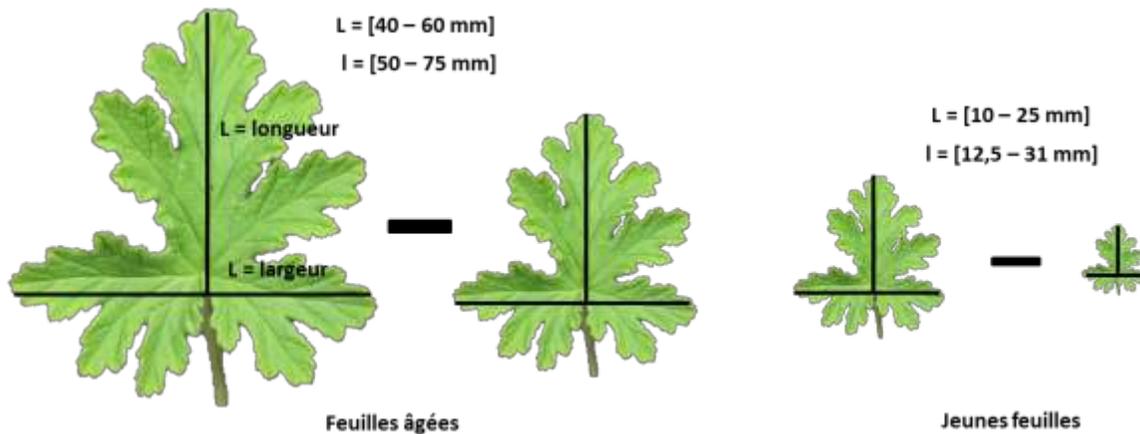


Figure 71 | Représentation des feuilles utilisées pour la quantification de l'HE par g de matière fraîche.

### VI.4 Préfanage du *Pelargonium* cv. 'rosat' à Grasse

Une expérience de préfanage a été réalisée à Grasse avec les deux cultivars *P.* cv. 'rosat Chine' et 'rosat Égypte' cultivés depuis 2 ans dans un champ expérimental. Afin de limiter l'influence d'une température et d'un soleil excessif comme cela avait pu être le cas en Égypte, le préfanage s'est effectué en intérieur sous une température de 25°C et sans lumière solaire directe. Après avoir ôté les pétioles, 3 échantillons de feuilles ont été pesés (poids entre 70 et 110 g) au temps T0 et suivis jusqu'au jour 4. Ces feuilles ont été extraites aux temps t= 0, 2 et 4 jours avec environ 130 g d'hexane contenant 0,015 g de standard interne (camphre) pendant 3h30 à 4°C. Ces extraits ont ensuite été évaporés doucement sous un faible vide jusqu'à obtenir environ 5 mL d'extrait final. Celui-ci a ensuite été injecté en GC-FID et les composés ont été quantifiés.

## VI.5 Culture des *Pelargonium* cv. 'rosat' en conditions contrôlées au LBVpam

Le but de cette expérience est de confirmer ou d'infirmer les résultats de la transplantation des cultivars 'rosat Chine' et 'rosat Bourbon' en Égypte et de mettre en évidence un effet des conditions environnementales sur la production d'HE. Les 4 *Pelargonium* cv. 'rosat' ont donc été cultivés sous deux conditions de température et d'hygrométrie différentes. Un compartiment de phytotron a été chauffé à des températures mimant les conditions égyptiennes (35,5° en moyenne pendant la journée) et l'autre compartiment avec des températures plus basses, mimant des conditions plus tempérées (25,8°C en moyenne pendant la journée) (**tableau 12**). Pour mettre en évidence un effet substrat, nous avons fait venir de la plantation égyptienne plusieurs kilos de sable. Le **tableau 13** résume les conditions de cultures pour les quatre cultivars. Les températures et l'hygrométrie ont été mesurées avec un appareil Kistock KT100 de Kimo®. Deux exemples de mesure sur deux semaines sont donnés en **annexe 33**.

**Tableau 12 | Conditions de cultures (Température et humidité relative) relevées durant l'expérience**

Conditions chaudes (compartiment 1)			
T° Jour moy. (°C)	35,5 ± 0,7	Humidité Relative (%) Jour	24,1 ± 3,2
T° Nuit min (°C)	18,1 ± 0,3	Humidité Relative (%) Nuit	38,2 ± 4,2
Conditions tempérées (compartiment 2)			
T° Jour moy. (°C)	25,8 ± 0,2	Humidité Relative (%) Jour	52,1 ± 4,0
T° Nuit min (°C)	17,3 ± 0,9	Humidité Relative (%) Nuit	60,0 ± 5,1

| 203

**Tableau 13 | Expérience pour mettre en évidence l'influence du substrat et/ou de la température sur la qualité de l'HE des différents *Pelargonium***

Conditions chaudes (compartiment 1)			
<i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i> (4) Sable	<i>P. cv. 'rosat Chine'</i> (4) Sable	<i>P. cv. 'rosat Égypte'</i> (4) Sable	<i>P. cv. 'rosat Grasse'</i> (4) Sable
<i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i> (4) Terreau	<i>P. cv. 'rosat Chine'</i> (4) Terreau	<i>P. cv. 'rosat Égypte'</i> (4) Terreau	<i>P. cv. 'rosat Grasse'</i> (4) Terreau
Conditions tempérées (compartiment 2)			
<i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i> (4) Sable	<i>P. cv. 'rosat Chine'</i> (4) Sable	<i>P. cv. 'rosat Égypte'</i> (4) Sable	<i>P. cv. 'rosat Grasse'</i> (4) Sable
<i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i> (4) Terreau	<i>P. cv. 'rosat Chine'</i> (4) Terreau	<i>P. cv. 'rosat Égypte'</i> (4) Terreau	<i>P. cv. 'rosat Grasse'</i> (4) Terreau



## I. CHOIX DES TERPÈNE SYNTHASES À ÉTUDIER

L'HE de *Pelargonium* est composée majoritairement de monoterpènes et de sesquiterpènes (Blerot et al. 2015) Afin d'orienter la recherche de terpène synthases d'intérêt, une analyse détaillée des COV des principales HE du marché a été réalisée par GC-MS. Il s'agit des HE de *Pelargonium x hybridum* cv. 'rosat Bourbon' (HE Bourbon), 'rosat Chine' (HE Chine) et 'rosat Égypte' (HE Égypte). L'analyse de l'HE de *P.* cv. 'rosat Grasse' (HE Grasse) cultivé en champ à Grasse et distillé en laboratoire a été analysée en GC-FID.

### I.1 Analyses des VOC des huiles essentielles commerciales

Les résultats sont présentés dans le **tableau 14**.

- Les composés majoritaires des 4 HE sont le géraniol, le citronellol, le citronellyl formate, le linalol et l'isomenthone.

- Les ratios entre citronellol et géraniol (G/C) sont très variables d'une HE à l'autre, de 0,20 (HE Chine) à 1,12 (HE Grasse). Les 2 autres huiles ont des ratios intermédiaires (0,77 pour l'HE Bourbon et 0,53 pour l'HE Égypte).

- Deux composés présents en faibles quantités, le 6,9-guaiadiène et le 10- $\gamma$ -épi eudesmol sont fréquemment utilisés par les parfumeurs pour caractériser l'origine des HE. L'industrie utilise peu le ratio Géraniol/Citronellol qui est moins fiable et peut être facilement adultéré (le géraniol et le citronellol synthétiques sont peu chers et disponibles sur le marché). De plus, ce ratio peut fortement varier avec les conditions de culture et les pratiques agricoles (résultats non publiés IFF-LMR). Le 6,9-guaiadiène n'est pas présent dans l'HE Égypte et très minoritaire dans l'HE Grasse (0,12%) mais présent en grande concentration dans l'HE Chine (7,68%) et Bourbon (5,95%). Le 10- $\gamma$ -épi eudesmol se trouve en grande quantité dans l'HE Égypte (6,75%) et Grasse (4,33%) alors qu'il n'est pas détecté pas dans l'HE Bourbon et en très faible quantité dans l'HE Chine (0,11%).

Pour nous guider dans le choix des TPS à caractériser, nous avons aussi analysé l'HE des parents des cultivars commerciaux *P.* cv. 'Rosat'. Il s'agit des espèces *P. capitatum*, *P. radens* et *P. graveolens* (**annexe 34**). *P. radens* montre une très grande production de menthone et d'isomenthone. La limonène synthase est donc aussi une terpène synthase importante. Il est à noter que notre analyse du *P. graveolens* ressemble plutôt à une analyse d'un *P.* cv. 'rosat'. Cette analyse nous indique donc qu'il y a une erreur d'identification de ce cultivar.

Tableau 14 | Analyses GC-MS<sup>81</sup> ou GC-FID<sup>82</sup> des HE commerciales de *Pelargonium* cv. 'rosat'

	AREA% (GC-MS) (GC-FID)				Terpene synthases putatives
	HE Bourbon	HE Chine	HE Égypte	HE Grasse	
<i>cis</i> -3-hexénol	0,03	0,04	nd	0,59	
α-pinène	0,75	0,28	0,35	0,42	
oxyde de bois de rose	0,26	0,06	0,08	0,06	
β-pinène	0,02	0,01	nd	0,01	
myrcène	0,29	0,06	0,05	0,17	
α-phellandrène	0,12	0,04	0,04	0,09	
α-terpinène	0,12	nd	nd	nd	
<i>para</i> -cymène	0,10	0,05	0,05	0,03	
β-phellandrène	0,11	0,05	nq	0,08	
limonène	0,25	0,09	0,14	0,12	Limonène Synthase
<i>cis</i> -β-ocimène	0,25	0,07	0,05	0,17	
<i>trans</i> -β-ocimène	0,26	0,04	0,07	0,16	
linalol oxyde I	0,37	0,10	0,17	0,12	Linalol Synthase
linalol oxyde II	0,21	0,04	0,10	0,08	Linalol Synthase
terpinolène	0,09	0,02	0,03	nd	
<b>linalol</b>	<b>9,24</b>	<b>2,30</b>	<b>4,73</b>	<b>8,72</b>	Linalol Synthase
<i>cis</i> -oxyde de rose	0,72	1,21	0,81	0,27	Géranol Synthase
<i>trans</i> -oxyde de rose	0,27	0,48	0,32	0,10	Géranol Synthase
<b>menthone</b>	<b>0,54</b>	<b>1,79</b>	<b>0,80</b>	<b>0,21</b>	Limonène Synthase
<b>isomenthone</b>	<b>8,02</b>	<b>3,88</b>	<b>4,95</b>	<b>5,33</b>	Limonène Synthase
menthol	0,17	0,10	0,11	0,13	Limonène Synthase
α-terpinéol	1,17	0,21	0,36	0,67	
<b>citronellol</b>	<b>18,22</b>	<b>34,66</b>	<b>28,37</b>	<b>26,19</b>	Géranol Synthase
pipéritone	0,11	0,13	0,06	nd	Limonène Synthase
<b>géraniol</b>	<b>14,11</b>	<b>6,77</b>	<b>15,06</b>	<b>29,43</b>	Géranol Synthase
géraniol	0,87	0,46	0,90	1,58	Géranol Synthase
<b>citronellyl formate</b>	<b>9,40</b>	<b>12,15</b>	<b>7,32</b>	<b>5,47</b>	Géranol Synthase
néryl formate	0,27	0,12	0,10	nd	Géranol Synthase
<b>géranyl formate</b>	<b>6,10</b>	<b>2,07</b>	<b>3,39</b>	<b>3,61</b>	Géranol Synthase
phénéthyl propionate	0,12	0,03	0,03	0,05	
citronellyl acétate	0,26	0,44	0,25	0,11	Géranol Synthase
néryl acetate	0,02	0,01	nd	nd	Géranol Synthase
alpha cubébène	0,07	0,11	0,17	0,05	
géranyl acetate	0,51	0,16	0,47	0,36	Géranol Synthase
β-phénéthyl isobutyrate	0,15	0,06	0,07	0,05	
α-copaène	0,33	0,43	0,57	0,21	
β-bourbonène	0,95	1,12	1,16	0,35	
β-caryophyllène	1,09	1,30	1,30	0,67	
citronellyl propionate	0,42	0,82	0,30	0,08	Géranol Synthase
α- <i>trans</i> -bergamotène	0,22	0,01	0,01	nd	
1(5), 1, 1-guaiadiène	0,47	0,53	0,01	nd	Guaiadiene Synthase
<b>6,9-guaiadiène</b>	<b>5,95</b>	<b>7,68</b>	<b>0,37</b>	<b>0,12</b>	Guaiadiene Synthase
aromadendrène	0,50	0,66	0,52	nd	

nd = non déterminé ; nq = non quantifié

<sup>80</sup> *Pelargonium* cv. 'rosat Bourbon'; *P.* cv. 'rosat Chine' et *P.* cv. 'rosat Égypte' sont des HE commerciales de qualité IFF-LMR et qui ont été analysées par GC-MS chez IFF-LMR.

<sup>82</sup> *P.* cv. 'rosat Grasse' a été cultivé et distillé à Grasse puis l'HE a été analysée par GC-FID chez IFF-LMR.

- Résultats I : Caractérisation des terpène synthases -

AREA% (GC-MS) (GC-FID)					
	HE Bourbon	HE Chine	HE Égypte	HE Grasse	Terpenes synthases putative
géranyl propionate	1,49	0,61	0,80	0,48	Géranol Synthase
alloaromadendrène	0,12	0,38	0,24	0,18	
germacrène d	<b>0,97</b>	<b>1,14</b>	<b>1,56</b>	<b>1,84</b>	
β-selinène	0,15	0,37	0,16	*	
viridiflorène	0,16	1,20	0,73	0,88	
géranyl isobutyrate	0,43	0,44	0,32	*	Géranol Synthase
gamma cadinène	0,15	0,25	0,31	0,10	
calamène	0,16	0,72	0,52	*	
citronellyl butyrate	0,49	0,72	0,41	0,14	Géranol Synthase
δ-cadinène	0,51	0,92	1,03	0,34	
géranyl butyrate	<b>1,49</b>	<b>0,83</b>	<b>1,47</b>	<b>0,30</b>	Géranol Synthase
phénéthyl tiglate	0,69	0,72	1,01	0,63	
furopélargone	0,63	0,62	nq	*	
β-caryophyllène oxyde	0,14	0,17	0,14	0,05	
géranyl valérate	0,10	0,26	0,18	*	
citronellyl caproate	0,05	0,13	0,08	*	Géranol Synthase
<b>10-γ-épi eudesmol</b>	<b>ND</b>	<b>0,11</b>	<b>6,75</b>	<b>4,33</b>	Eudesmol Synthase
γ-eudesmol	ND	ND	0,14	0,26	Eudesmol Synthase
citronellyl tiglate	0,27	1,00	0,35	*	Géranol Synthase
géranyl tiglate	1,65	1,65	1,50	0,89	Géranol Synthase
géranyl caproate	0,08	0,05	0,12	*	Géranol Synthase
<b>TOTAL</b>	<b>93,53</b>	<b>93,53</b>	<b>91,57</b>	<b>96,28</b>	

nd = non déterminé ; nq = non quantifié

Les TPS les plus importantes à caractériser seront donc :

- la **GES**<sup>83</sup> qui est responsable de la production du géranol mais aussi *in-fine* de tous ses dérivés (**tableau 14 et annexe 29**). Cela représente donc une partie très importante de l'HE pour tous les cultivars : Bourbon (57,36 %) ; Chine (64,83 %) ; Égypte (62,42 %) et Grasse (69,07 %).

- la **EDS**<sup>84</sup> et la **GUAS**<sup>85</sup> sont impliquées dans la synthèse du 10-γ-épi eudesmol et du 6,9-guaiadiène or, ces molécules signent la qualité de l'HE et sont des traceurs importants pour l'origine de l'HE dont les prix peuvent aller du simple pour l'HE Egypte au quadruple pour l'HE Bourbon.

- la **LIMS**<sup>86</sup> qui produit du limonène. Celui-ci, après plusieurs transformations, sera métabolisé en menthone et isomenthone qui sont des molécules très importantes chez les parents *P. radens* et *P. graveolens*.

- la **LINS**<sup>87</sup> pourra être intéressante à cause de l'importance du linalol dans l'HE mais n'est pas prioritaire.

<sup>83</sup> GES pour géranol synthase

<sup>84</sup> EDS pour 10-γ-épi eudesmol synthase

<sup>85</sup> GUAS pour 6,9-guaiadiène synthase

<sup>86</sup> LIMS pour limonène synthase

<sup>87</sup> LINS pour linalol synthase

## II. OBTENTION D'UN TRANSCRIPTOME DE FEUILLES DE *PELARGONIUM* CV. 'ROSAT GRASSE'

Le choix de séquencer le transcriptome des feuilles de *P. cv. 'rosat Grasse'* vient de plusieurs observations. Il produit à la fois du 10- $\gamma$ -épi eudesmol et du 6,9-guaiadiène. D'après la littérature (Demarne 1989), ce serait l'hybride originel qui aurait ensuite été transplanté dans les autres régions productrices. Nous l'avions aussi à disposition en quantité importante au début des travaux.

### II.1 Analyse de la banque de transcriptome

La banque d'ADNc normalisée et soumise à un pyroséquençage 454 a permis d'obtenir un total de 698 176 lectures d'une longueur moyenne de 449 pb, et représentant 313 Mb. 517 536 lectures ont été assemblées dans 45 143 contigs et 180 640 lectures n'ont pu être assemblées (singletons). Notre transcriptome est donc composé de 225 783 séquences uniques, qui représentent 111 Mb. Sur ces séquences, 195 121 présentant une longueur d'au moins 100 pb ont été conservées pour la suite de l'analyse. Le nombre maximum de lectures par contigs est de 1228 et 33% des contigs sont représentés par au moins 10 lectures. Une analyse de la distribution des séquences uniques en fonction de leurs longueurs révèle que 50% de ces séquences sont de longueurs comprises entre 394 et 628 pb et que 10% ont une longueur supérieure à 918 pb.

L'annotation des séquences uniques par comparaison avec les séquences protéiques d'*A. thaliana*, montre que 58005 d'entre elles (29,7%) présentent une forte homologie avec des séquences d'*Arabidopsis* ( $E$ -value  $\leq 1E^{-30}$ ) et 55540 (28,5%) montrent une homologie plus faible ( $E^{-30}$  to  $E^{-5}$ ). Les 81576 séquences uniques restantes (41,8%) ne présentent pas, ou pas significativement, d'homologie. Ce résultat peut être dû à la longueur moyenne de 434 pb pour ces séquences uniques, ce qui représente environ 220 pb de moins que la longueur moyenne des séquences annotées. 23% des séquences annotées (26226) présentent au moins 50% de recouvrement avec leur meilleure correspondance.

Les résultats d'annotation sont ensuite confrontés aux données de FunCat (Ruepp et al. 2004) afin d'assigner une classe de fonction biologique aux séquences. Parmi les 113 545 séquences uniques annotées, 70987 ont présenté des homologies avec des protéines de fonction biologique connue et 42558 avec des protéines de fonction biologique inconnue (tableau 15). Les classes de fonction les plus fréquemment assignées sont les classes 'métabolisme' (21,4%) et 'devenir des protéines' (13,2%) (figure

72). Les numéros des classes correspondent à l'ancienne notation du catalogue fonctionnel de MIPS dans lequel certaines classes ont été éliminées et retravaillées sans changer les numéros des classes restantes.

Tableau 15 | Classification fonctionnelle des séquences 454 uniques de *P. cv. 'rosat Grasse'*

Fonction	classe	Séquences uniques du <i>P. cv. 'rosat Grasse'</i>		Séquences codantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	
		nombre	Pourcentage	nombre	Pourcentage
Métabolisme	1	27883	21,4%	4932	19,0%
Energie	2	3368	2,6%	453	1,7%
Stockage des protéines	4	155	0,1%	65	0,3%
Cycle cellulaire et Processus ADN	10	6347	4,9%	1518	5,9%
Transcription	11	10525	8,1%	2664	10,3%
Synthèse des protéines	12	3749	2,9%	1332	5,1%
Devenir des protéines (arrangement, modification, destination)	14	17250	13,2%	3104	12,0%
Régulation du métabolisme et de la fonction des protéines	18	3669	2,8%	608	2,3%
Transport cellulaire, transport facilité et routes de transport	20	12962	9,9%	2419	9,3%
Communication cellulaire/mécanismes du signal de transduction	30	6309	4,8%	1283	4,9%
Sauvetage, défense et virulence cellulaire	32	7692	5,9%	1425	5,5%
Interaction avec l'environnement	34	9330	7,2%	1651	6,4%
Interaction systémique avec l'environnement	36	4088	3,1%	757	2,9%
Éléments transposables, protéines virales et plasmidiques	38	290	0,2%	96	0,4%
Destin cellulaire	40	2555	2,0%	450	1,7%
Développement (Systémique)	41	4504	3,5%	1047	4,0%
Biogénèse des compartiments cellulaires	42	6218	4,8%	1554	6,0%
Différentiation du type cellulaire	43	1306	1,0%	218	0,8%
Différentiation des tissus	45	584	0,4%	98	0,4%
Différentiation des organes	47	1495	1,1%	260	1,0%
Protéines non classifiées	99	42558		13183	

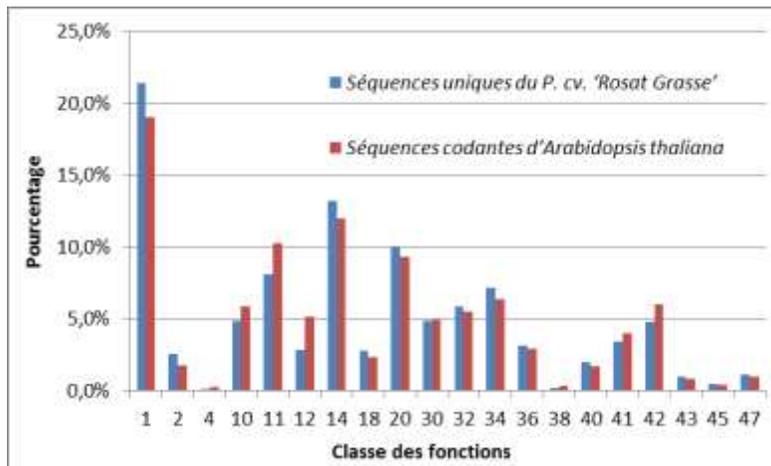


Figure 72 | Classification fonctionnelle des séquences 454 uniques de *P. cv. 'rosat Grasse'*

L'annotation pour les enzymes relatives au métabolisme des terpènes a été réalisée par un BlastX contre les protéines d'*Arabidopsis thaliana*, la liste des enzymes étant connue chez *Arabidopsis thaliana*. Les 'pathways de KEGG 'ont été utilisées pour faire la liste des protéines d'A. thaliana impliquées dans le métabolisme des terpènes ([http://www.genome.jp/kegg-bin/get\\_htext?query=00900&htext=br08901.keq&option=-a](http://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?query=00900&htext=br08901.keq&option=-a)) (Tableau 16).

Tableau 16 | Classification spécifique des séquences 454 reliées au métabolisme des terpènes

Nombre sur Terpènes (étiquettes de lignes)	somme
3-hydroxy-3-méthylglutaryl Co-A reductase	42
CDPME kinase	15
CDPME synthase	5
cMEPP synthase	2
DXP réductoisomérase	18
DXP synthase	22
FPPS	14
GGPPS	9
GPPS	19
HMBP synthase	22
IPP synthase	8
IPP/DMAPP isomérase	11
IPP/DMAPP synthase	17
Mévalonate kinase	6
Phosphomévalonate kinase	6
Terpène Synthase	232
TOTAL	448

| 210

## II.2 Recherche de séquences correspondant à des TPS

L'annotation des terpène synthases a été réalisée avec le logiciel Blast 2Go (Götz *et al.* 2008) et du travail de Bolhmann *et al.* (1998). 232 séquences correspondant potentiellement à des TPS ont été identifiées dans le transcriptome. Le grand nombre de séquences obtenues peut provenir du fait que le *Pelargonium* que nous avons séquencé est heptaploïde (*P.* cv. 'rosat Grasse'). Il peut aussi traduire un assemblage imparfait. Parmi celles-ci, 2 séquences correspondaient à des séquences complètes. Ces séquences ont été comparées avec des séquences de TPS déjà caractérisées chez d'autres plantes à l'aide du logiciel Geneious®. La première de ces séquences, qui présentait des homologues avec les isoprène synthases et les ocimène synthases n'a pas pu être caractérisée fonctionnellement.

La deuxième séquence correspondait à une géraniol synthase que nous avons nommée PhGES et caractérisée fonctionnellement. La GES a déjà été caractérisée chez plusieurs plantes et ces séquences connues ont été utilisées pour les comparaisons de séquences (**annexe 35**).

Pour les trois autres séquences obtenues dans la banque de transcriptome (*PhCINS*, *PhMYS*, *PhEDS*) que nous avons caractérisées fonctionnellement, il a fallu compléter les séquences 5' et 3' au moyen de la technique de RACE.

Il existe dans les bases de données une séquence annotée comme une guaiadiène synthase. Cependant, cette séquence est en fait une germacrène A synthase (*Kim et al. 2005*). Il existe aussi dans les banques de données une guaiène synthase qui a été caractérisée chez l'agarwood (*Aquilaria sinensis*) (*Kumeta et Ito 2010*, *Xu et al. 2013*). Cette guaiène synthase produit en majorité du  $\delta$ -guaiène (74,2%), du  $\beta$ -élémente (16,3%) et de l' $\alpha$ -guaiène (9,5%). Ces molécules sont relativement proches du 6,9-guaiadiène. Cependant aucune séquence dans notre transcriptome n'étant proche de cette séquence, nous n'avons pas pu caractériser de guaiadiène synthase chez le *Pelargonium*.

En revanche, il existe bien une eudesmol synthase qui a été caractérisée fonctionnellement chez *Zingiber zerumbet* (*Yu et al. 2008*). Cette eudesmol synthase produit en majorité du  $\beta$ -eudesmol (62,6%), du 10- $\gamma$ -épi eudesmol (16,8%), de l' $\alpha$ -eudesmol (10,0%) et de l'aristolène (5,6%). Nous avons donc recherché dans les séquences du *Pelargonium* la séquence la plus proche, que nous avons nommée PhEDS et caractérisée fonctionnellement.

Nous avons également caractérisé fonctionnellement 2 autres TPS car elles présentaient des homologies avec les limonène synthases. Il s'agit de PhMYS et PhCINS.

### III. CLONAGE ET ANALYSES DES SÉQUENCES DE QUATRE TERPÈNE SYNTHASES

Une fois les extrémités 3' et 5' des gènes isolées grâce aux réactions de RACE-PCR, des oligonucléotides spécifiques ont été définis à partir des séquences théoriques complètes de façon à amplifier les ADNc des gènes dans leur totalité.

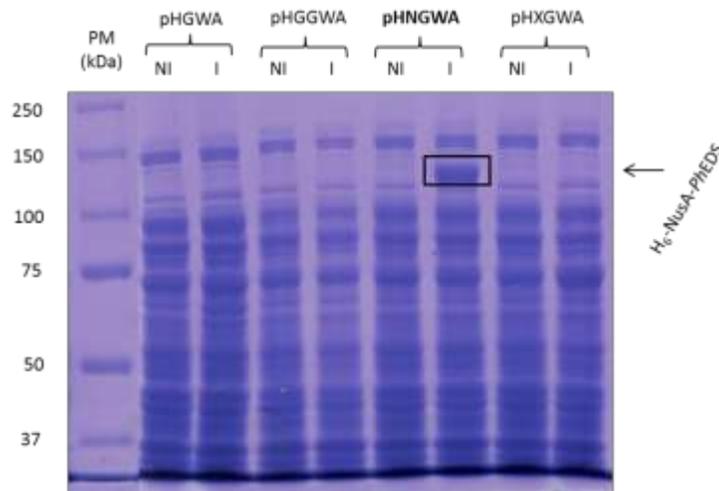
#### III.1 Caractérisation fonctionnelle de quatre terpène synthases

Quatre terpène synthases ont donc été caractérisées fonctionnellement. Trois sont des monoterpène synthases, la géraniol synthase (PhGES<sup>88</sup>) ; la 1,8-cinéole synthase (PhCINS<sup>89</sup>) et la  $\beta$ -myrcène synthase (PhMYS<sup>90</sup>). La quatrième est une sesquiterpène synthase, la 10- $\gamma$ -épi eudesmol synthase (PhEDS<sup>91</sup>). Les activités de ces quatre TPS ont été testées *in vitro* selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes. La phase organique contenant les produits de l'activité enzymatique des TPS a été analysée par GC-MS.

| 212

##### III.1.1 Expression et purification des terpène synthases

La production des TPS a été effectuée dans *E. coli* en utilisant à chaque fois quatre vecteurs d'expression (Busso *et al.* 2005) afin de voir lequel serait le plus adapté (figure 73).



**Figure 73 | Gel SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie des tests d'expression de la protéine recombinante PhEDS.** Gel SDS-PAGE 8 %, 40  $\mu$ L de protéines bactériennes totales ont été déposés dans chaque puits avant (NI) et après une induction (I) par 0,2 mM d'IPTG; PM - marqueur de poids moléculaire en kDa.

<sup>88</sup> PhGES pour *P. cv. 'rosat Grasse'* géraniol synthase

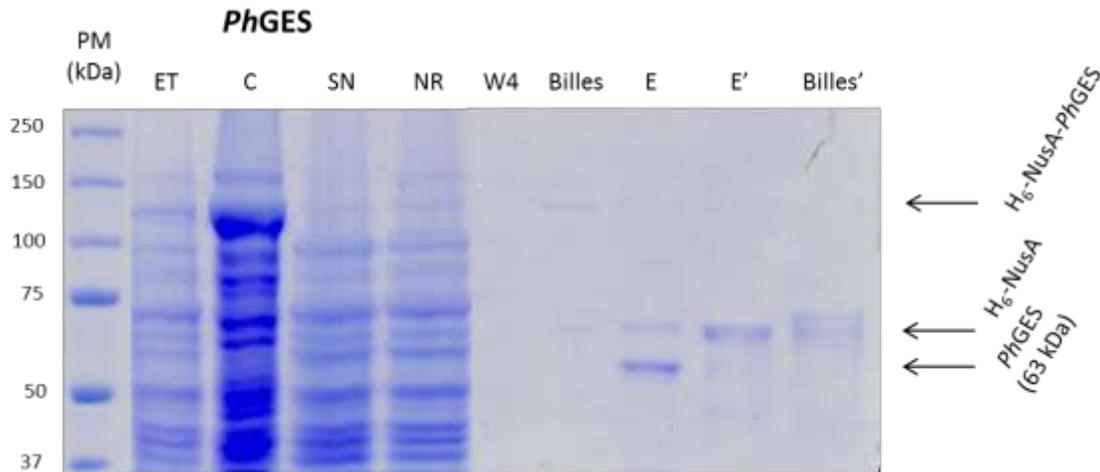
<sup>89</sup> PhCINS pour *P. cv. 'rosat Grasse'* 1,8-cinéole synthase

<sup>90</sup> PhMYS pour *P. cv. 'rosat Grasse'*  $\beta$ -myrcène synthase

<sup>91</sup> PhEDS pour *P. cv. 'rosat Grasse'* 10- $\gamma$ -épi eudesmol synthase

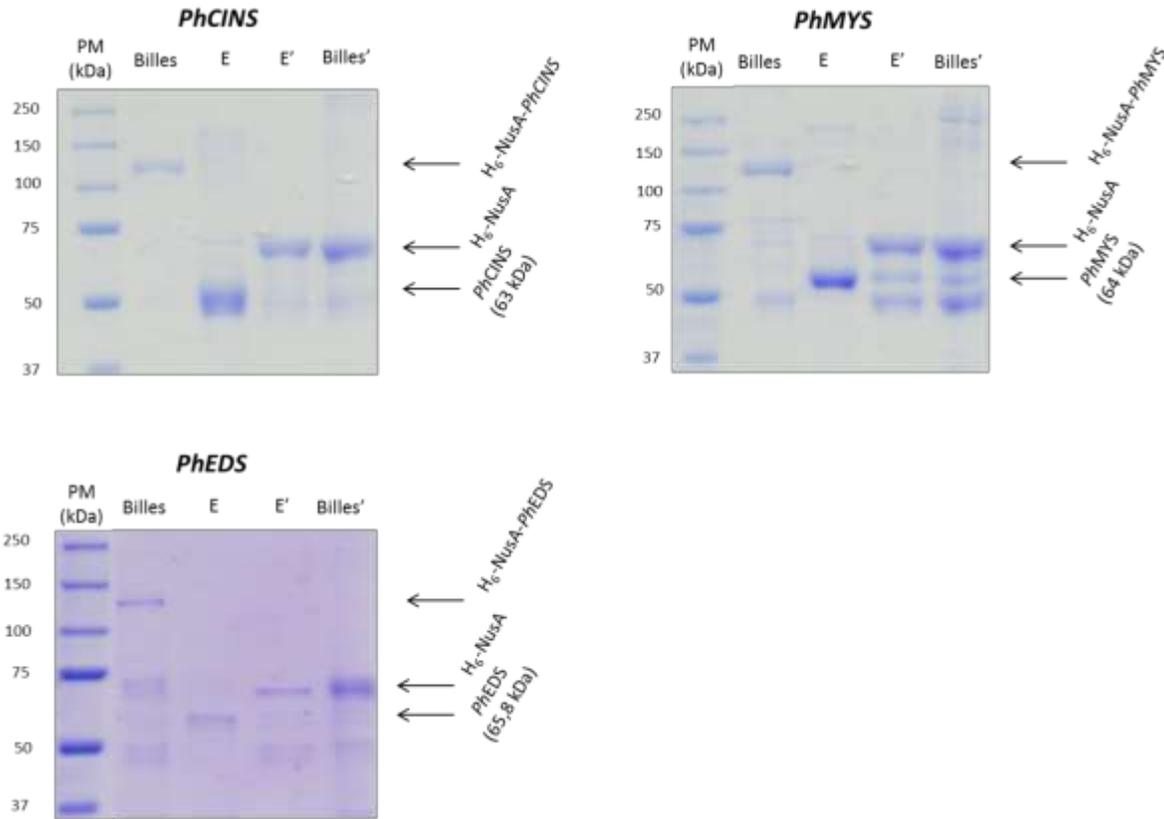
Le vecteur pHNGWA s'est montré le plus efficace, quelle que soit la TPS. La **figure 74** montre l'exemple de la production de la PhEDS.

La culture des bactéries recombinantes surexprimant les TPS et la purification des protéines ont ensuite été réalisées sur un plus grand volume pour permettre les tests d'activité. Les enzymes ont été extraites en conditions natives pour le test d'activité *in vitro* mais toutes les étapes de purification ont été vérifiées sur gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes (**figure 74**).



**Figure 74 | Gel SDS-PAGE après coloration au bleu de coomassie des tests d'expression de la protéine recombinante PhGES.** Purification sur résine Ni-Talon en conditions dénaturantes de la protéine recombinante PhGES possédant une étiquette poly-histidine en position C-terminale. PM - marqueur de poids moléculaire en kDa ; ET – Expression totale (12,5 µL après la lyse de *E. coli* et avant la centrifugation) ; C – culot (12,5 µL de culot dans du tampon de reprise) ; SN – Surnageant de l'incubation avant agitation (12,5 µL) ; NR – Protéines non retenues après agitation (12,5µL) ; W4 – surnageant du dernier lavage (40 µL) ; Billes – billes de résine après lavage (4 µL) ; E = élution après clivage à la thrombine (10 µL) ; E' = élution de la résine après lavage à l'imidazole (25 µL) ; billes' – billes de résines après lavage à l'imidazole (25 µL).

Les bandes de taille inférieure à H<sub>6</sub>-NusA (très visibles pour PhMYS, **figure 75**) peuvent s'expliquer par le fait que la traduction peut être partielle, donnant des protéines plus courtes mais néanmoins détectées, qui sont des formes tronquées. Néanmoins c'est peu probable car nous aurions alors aussi une bande plus courte sur la piste E. Il s'agit donc probablement d'une dégradation. Pour les autres TPS, les gels SDS-PAGE de la **figure 75** sont simplifiés et seules les étapes terminales sont montrées.



**Figure 75 | Gel SDS-PAGE coloration au bleu de coomassie des tests d'expression des protéines recombinantes *PhCINS*, *PhMYS* et *PhEDS*.** Purification sur résine Ni-Talon en conditions dénaturantes des protéines recombinantes PhCINS, PhMYS et PhEDS possédant une étiquette poly-histidine en position C-terminale. PM - marqueur de poids moléculaire ; Bille – billes de résine après lavage (4  $\mu$ L) ; E = élution après clivage à al thrombine (10  $\mu$ L) ; E' = élution de la résine après lavage à l'imidazole (25  $\mu$ L) ; billes' – billes de résine après lavage à l'imidazole (25  $\mu$ L).

Les figures montrent que la production et la purification ont été bien réalisées pour les 3 protéines. Pour PhEDS, la bande est néanmoins moins intense mais assez pure.

### III.1.2 Test d'activité des terpène synthases

Les tests d'activités *in vitro* des terpène synthases ont été réalisés avec du GPP et du FPP comme précurseurs, que ce soit pour une MTPS ou une STPS, afin de vérifier si l'enzyme était capable d'agir sur plusieurs substrats comme cela a parfois été montré.

### III.1.2.1 Caractérisation fonctionnelle de la géraniol synthase

#### III.1.2.1.1 Analyse de la séquence de la PhGES

PhGES a une longueur de 1886 pb<sup>10</sup>, sans le peptide signal et code pour une ORF<sup>92</sup> de 1671 pb, commençant avec un codon d'initiation ATG<sup>93</sup> en position 16 et un codon stop TAA en position 1687 (**annexe 35**). La protéine a une masse moléculaire prédite de 63,4 kDa et comporte 557 aa<sup>94</sup>. Pour une MTPS, elle est très courte puisqu'elles ont en général une séquence d'une longueur de 600 à 650 aa (*Degenhardt et al. 2009*). En effet, PhGES est plus petite que les autres protéines quand elle est alignée avec la protéine de *Cinnamomum tenuipilum* (CtGES, 605 aa), celle de *Citrus jambhiri* (CjGES, 613 aa) et celle d'*Ocimum basilicum* (ObGES, 568 aa) (**Figure 76**).

Même si elle est fonctionnelle, sa taille peut faire supposer qu'elle n'est pas complète et qu'il manquerait peut-être le peptide signal. En effet, dans un peptide signal, il y a souvent de nombreux résidus S (serine) et T (Thréonine) mais pas de séquence consensus (*Bohlman et al. 1997*). Or dans le cas de PhGES, le nombre de ces acides aminés est faible (4 S et 1 T pour les 25 premiers aa) mais pas très différent de celui de ObGES qui est aussi petite (3 S et 4 T pour les 25 premiers aa). De plus, le logiciel de prédiction d'adressage (Target P) (*Emanuelsson et al. 2000*) prédit aussi de façon assez faible la présence d'une séquence d'adressage aux chloroplastes comme c'est normalement le cas pour une géraniol synthase (*Dong et al. 2013*).

Afin de confirmer ou non la présence d'un peptide signal, plusieurs techniques ont été essayées comme la RACE puis la marche génomique mais sans succès. Une expérience de PCR inverse, mettant en évidence plusieurs codons stop en amont de la séquence codante putative, a finalement permis de conclure que PhGES était bien une géraniol synthase atypique de petite longueur.

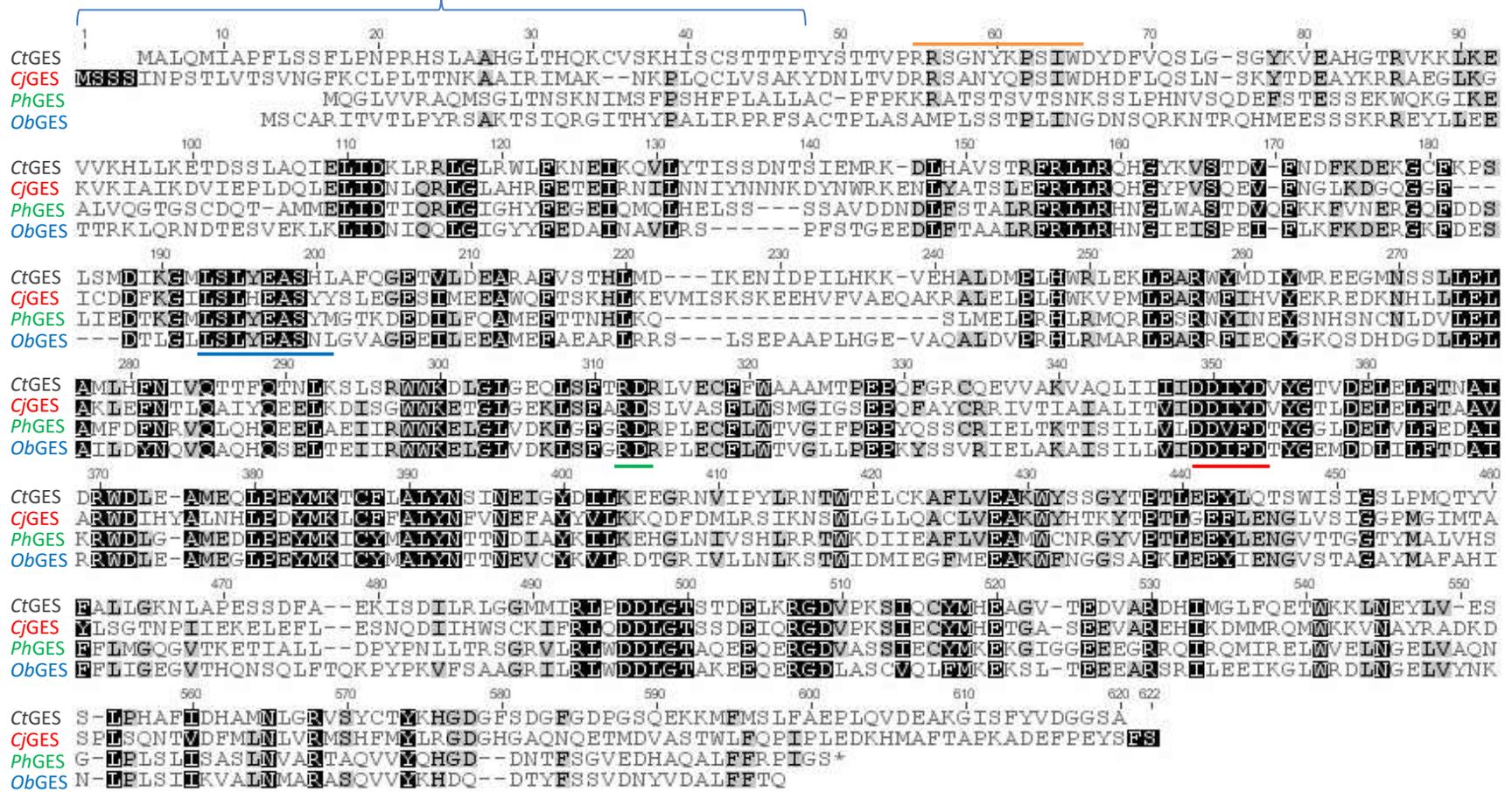
---

<sup>92</sup> OPF pour Open Reading Frame

<sup>93</sup> ATG est le codon d'initiation ou codon de démarrage, c'est un triplet de nucléotides (ATG pour Adénosine, Thymines, Guanine) qui dirige l'initiation de la traduction protéique, il signale le début du message génétique sur un ARNm.

<sup>94</sup> pb pour paire de base ; aa pour acide aminé

Domaine riche en sérine (S) et thréonine (T) (peptide d'adressage)



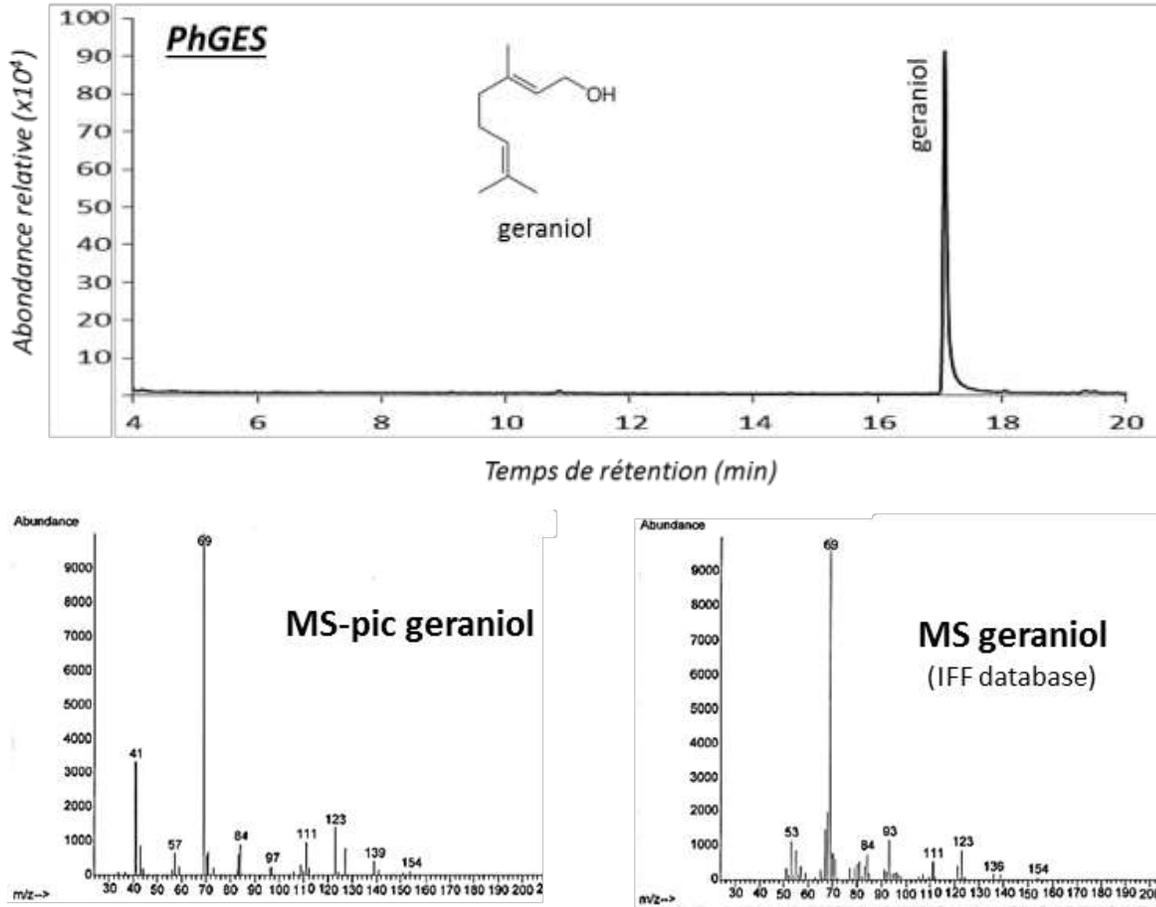
| 216

- Séquence RRx<sub>g</sub>W
- Séquence LSLYEASYL
- Séquence RxR
- Séquence DDxxD

Figure 76 | Comparaison de différentes séquences protéiques de géraniol synthases caractérisées. Les séquences sont de *Cinnamomum tenuipile* (CtGES) (Yang et al. 2005), *Citrus jambhiri* (CjGES), (Shishido et al. 2012), *Pelargonium x hybridum* cv. 'rosat grasse' (PhGES) et *Ocimum basilicum* (ObGES) (Iijima et al. 2004a). Les motifs caractéristiques des TPS sont soulignés.

### III.1.2.1.2 Test d'activité de la protéine PhGES

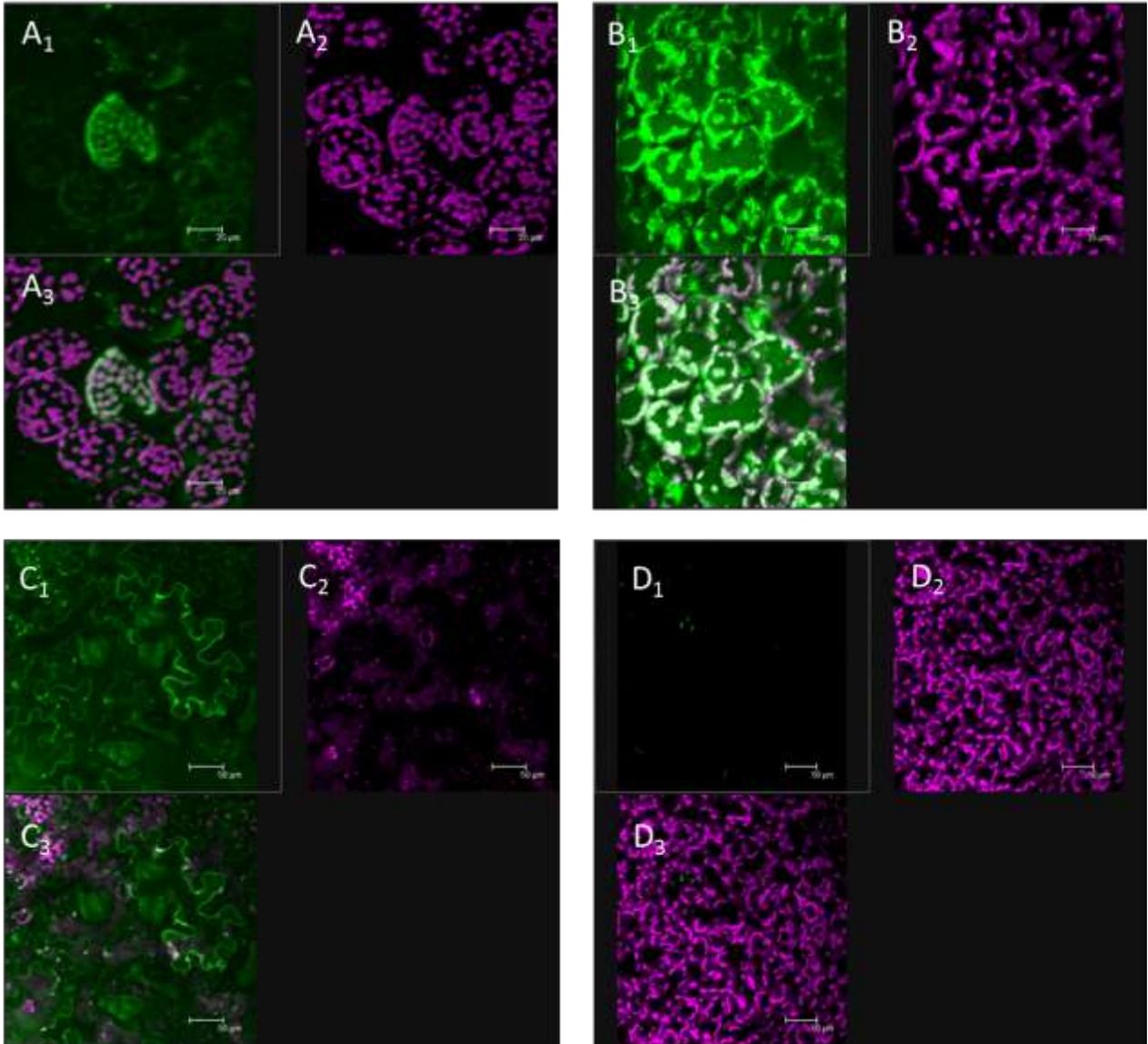
La PhGES purifiée et incubée avec du GPP produit un composé unique dont le temps de rétention et le spectre sont identiques à ceux du standard analytique pour le géraniol (figure 77). L'incubation avec du FPP ne donne aucun produit.



**Figure 77 | Test d'activité *in vitro* de PhGES recombinante utilisant le GPP comme substrat.** Le produit a été analysé par GC-MS puis le spectre de masse obtenu a été comparé avec le spectre de masse du géraniol des bases de données.

### III.1.2.1.3 Localisation de la PhGES

Afin de vérifier que le peptide signal était bien présent, PhGES a été fusionnée avec la GFP (construit PhGES-GFP) et une transformation transitoire du tabac a été réalisée (voir matériels et méthodes). Les feuilles de tabac ont ensuite été observées en microscopie confocale au centre de physique-optique de Saint-Etienne (figure 78).



**Figure 78 | Observations en microscopie confocale de feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*) transformées de manière transitoire avec *Agrobacterium tumefaciens* transformée avec le construit *PhGES-GFP*. A et B – Parenchyme de la feuille avec A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub> GFP seule; A<sub>2</sub> et B<sub>2</sub> chlorophylle seule et A<sub>3</sub> et B<sub>3</sub> superposition des deux canaux. C – Epiderme de la feuille avec C<sub>1</sub> GFP seule; C<sub>2</sub> chlorophylle seule et C<sub>3</sub> superposition des deux canaux. D – Témoins négatif. La coloration verte montre la localisation de la GFP et donc de *PhGES* et la coloration mauve celle de la chlorophylle. Les barres d'échelle sont de 25 µm (A et B) et 50 µm (C et D).**

La superposition des canaux correspondant à la chlorophylle et à la GFP montre une localisation plastidiale de *PhGES*, comme toutes les monoterpène synthases. Dans **figure 78 A**, seule une cellule a été transformée mais le résultat de localisation chloroplastique de *PhGES* est néanmoins clair. Ce résultat a été confirmé à plusieurs reprises sur d'autres tabacs transgéniques.

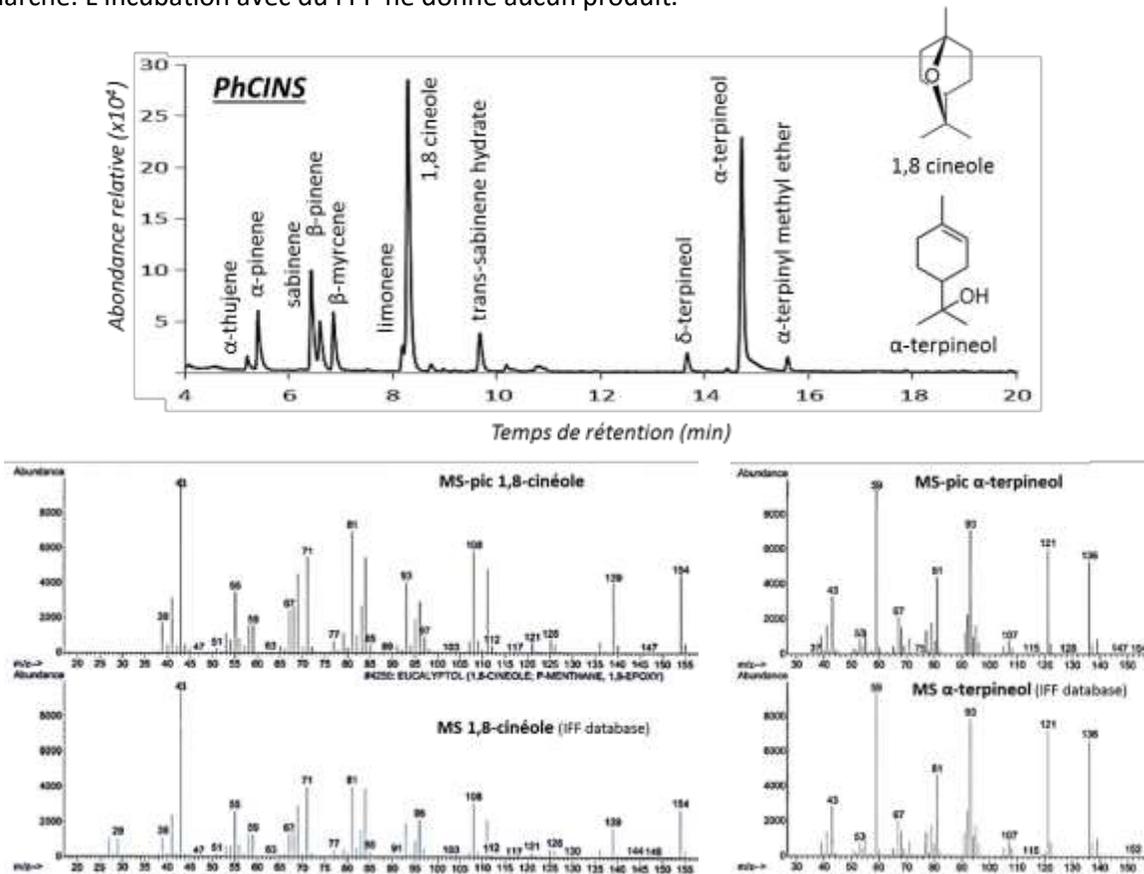
### III.1.2.2 Caractérisation fonctionnelle de la 1,8-cinéole synthase

#### III.1.2.2.1 Analyse de la séquence de PhCINS

PhCINS a une longueur de 1786 pb avec une ORF de 1779 pb (protéine de 593 aa et une masse moléculaire prédite de 68,6 kDa) commençant avec un codon d'initiation ATG en position 7 et un codon stop TAG en position 1786 (annexe 36). L'analyse de la séquence de PhCINS par le logiciel Target P confirme la présence d'une séquence d'adressage aux chloroplastes.

#### III.1.2.2.2 Test d'activité de la protéine PhCINS

La protéine PhCINS purifiée, incubée avec du GPP, catalyse la production du 1,8-cinéole (33,5%) et de l' $\alpha$ -terpinéol (31,2%) comme produits majeurs et de l' $\alpha$ -pinène (5,0%), du sabinène (9,9%), du  $\beta$ -pinène (4,8%), du  $\beta$ -myrcène (5,4%) et du *trans*-sabinène hydrate (4,2%) comme produits mineurs. Quelques autres composés sont présents en très faible quantité comme l' $\alpha$ -thujène, le limonène, le  $\delta$ -terpinéol et l' $\alpha$ -terpinyl méthyl éther (figure 79). Les spectres de masse du 1,8 cinéole et de l' $\alpha$ -terpinéol produits de l'activité enzymatique ont été comparés avec les spectres des bases de données et des standards du marché. L'incubation avec du FPP ne donne aucun produit.



**Figure 79 | Test d'activité in-vitro de la protéine PhCINS recombinante utilisant le GPP comme substrat.** Les produits ont été analysés par GC-MS puis les spectres de masse obtenus ont été comparés avec les spectres de masse des composés correspondants dans les bases de données.

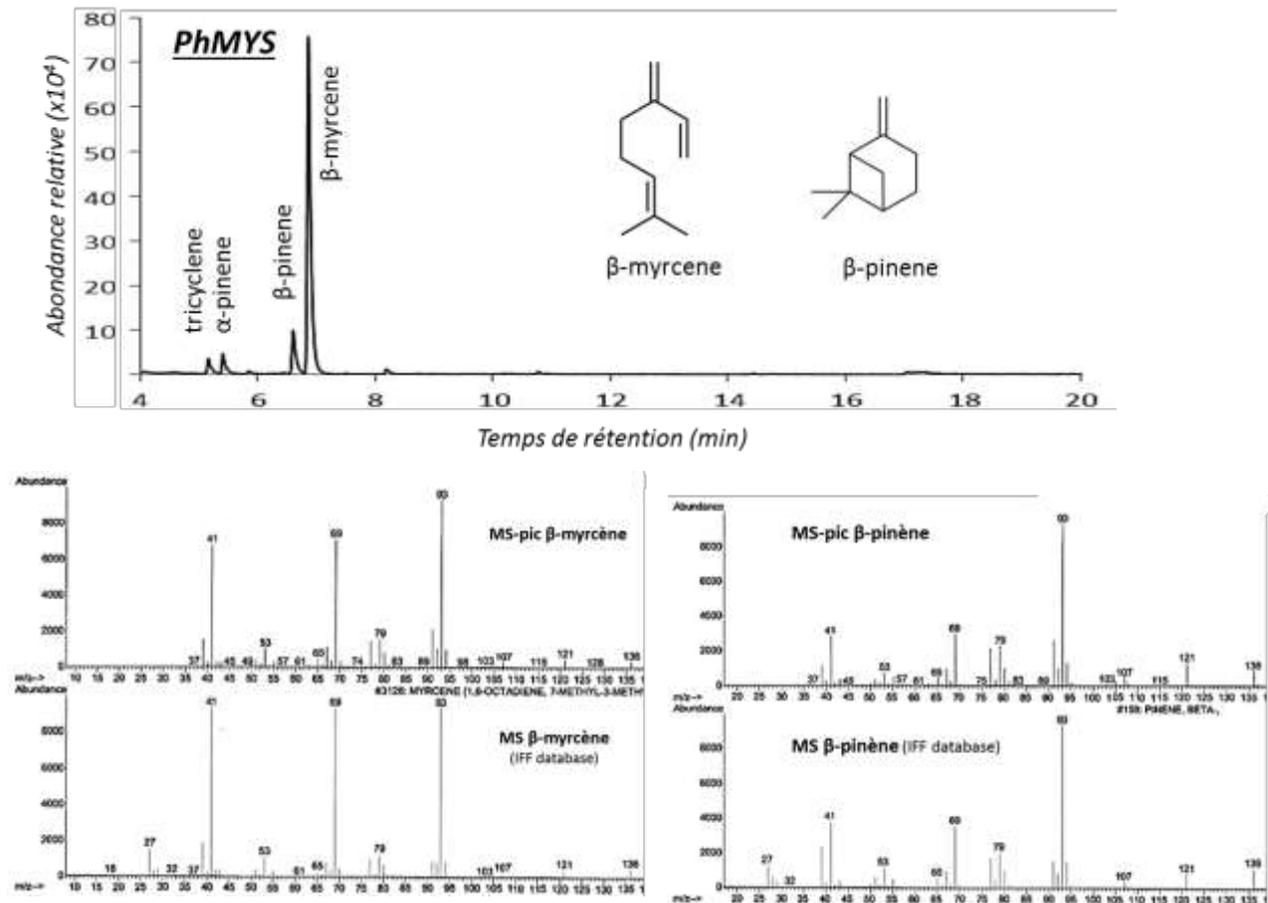
### III.1.2.3 Caractérisation fonctionnelle de la myrcène synthase

#### III.1.2.3.1 Analyse de la séquence de PhMYS

PhMYS a une longueur de 2010 pb avec une ORF de 1821 pb (protéine de 607 aa et une masse moléculaire prédite à 70,2 kDa) commençant avec un codon d'initiation ATG en position 31 et un codon stop TAG en position 1855 (**annexe 37**). L'étude de la séquence par le logiciel Target P confirme la présence d'une séquence d'adressage aux chloroplastes.

#### III.1.2.3.2 Test d'activité de la protéine PhMYS

La protéine PhMYS purifiée, incubée avec du GPP, catalyse la production de  $\beta$ -myrcène (81,0%) et de quelques produits mineurs comme le tricyclène (3,0%), l' $\alpha$ -pinène (3,9%) et le  $\beta$ -pinène (9,8%) (**figure 80**). Les spectres de masse du  $\beta$ -myrcène et du  $\beta$ -pinène produits de l'activité enzymatique ont été comparés avec les spectres des bases de données et des standards du marché. L'incubation avec du FPP ne donne aucun produit.



**Figure 80 | Test d'activité *in vitro* de la protéine PhMYS recombinante utilisant le GPP comme substrat.** Les produits ont été analysés par GC-MS puis les spectres de masse obtenus ont été comparés avec les spectres de masse des composés correspondant dans les bases de données.

#### III.1.2.4 Caractérisation fonctionnelle de la 10- $\gamma$ -épi eudesmol synthase

##### III.1.2.4.1 Analyse de la séquence de PhEDS

PhEDS a une longueur de 1933 pb avec une ORF de 1704 pb (protéine de 568 aa et une masse moléculaire prédite à 65,6 kDa) commençant avec un codon d'initiation ATG en position 12 et un codon stop TAA en position 1716 (**annexe 38**).

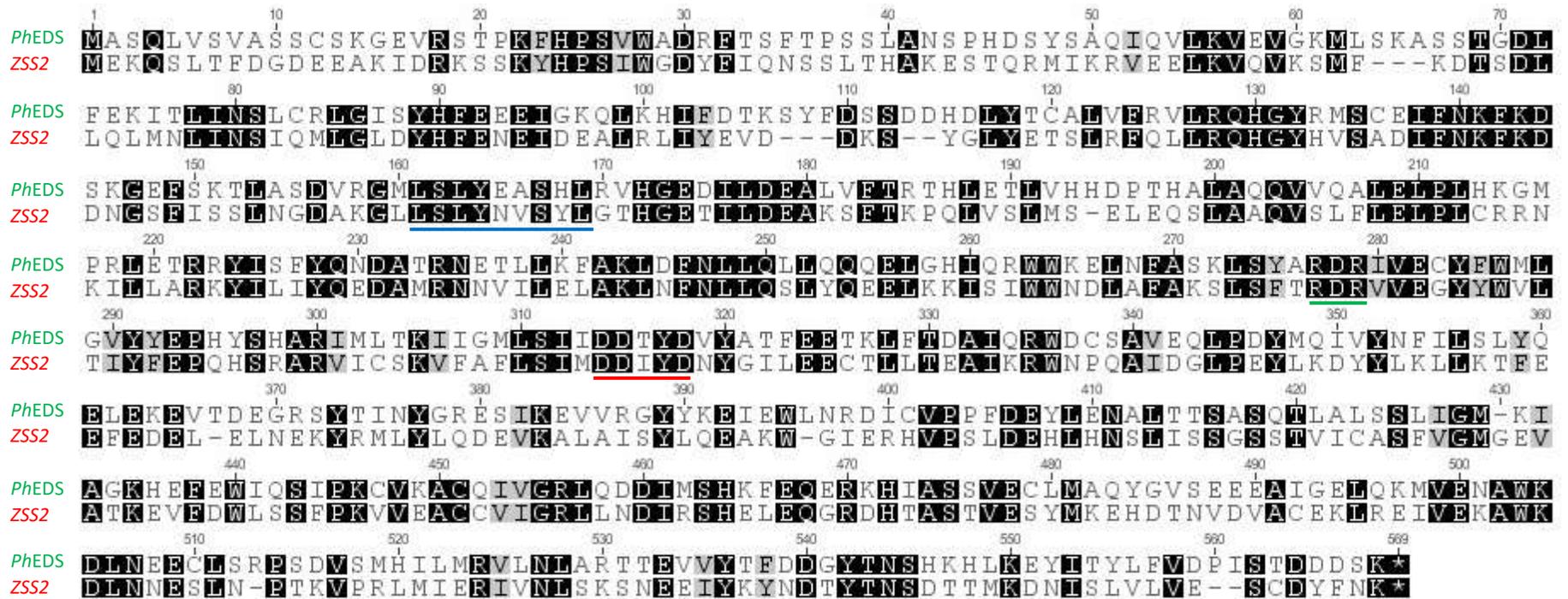
La protéine PhEDS étant une sesquiterpène synthase, elle ne devrait pas être adressée aux chloroplastes. En effet, l'étude de la séquence par le logiciel Target P confirme la localisation cytosolique probable de la protéine.

La séquence protéique de la 10- $\gamma$ -épi eudesmol synthase du *Pelargonium* (PhEDS) a été comparé avec la  $\beta$ -eudesmol synthase de *Zingiber zerumbet* (ZSS2) (Yu et al. 2008a) (**figure 81**).

##### III.1.2.4.2 Test d'activité de la protéine PhEDS

La protéine PhEDS purifiée, incubée avec du FPP, catalyse la production de 10- $\gamma$ -épi eudesmol (62,6%) et de  $\beta$ -élémol (31,1%) comme produits majeurs et de l' $\alpha$ -eudesmol comme produit mineur (**figure 82**). Le spectre de masse du 10- $\gamma$ -épi eudesmol produit par l'activité enzymatique a été comparé avec le spectre de masse du 10- $\gamma$ -épi eudesmol venant de l'HE du *P. cv. 'rosat Égypte'* car les standards n'existent pas sur le marché. Le spectre du  $\beta$ -élémol a été comparé avec le spectre de l'HE *P. quercifolium* qui est la seule espèce botanique de *Pelargonium* en produisant (**annexe 32**). Les spectres de masse ont aussi été comparés avec les spectres des bases de données. L'incubation avec du GPP ne donne aucun produit.

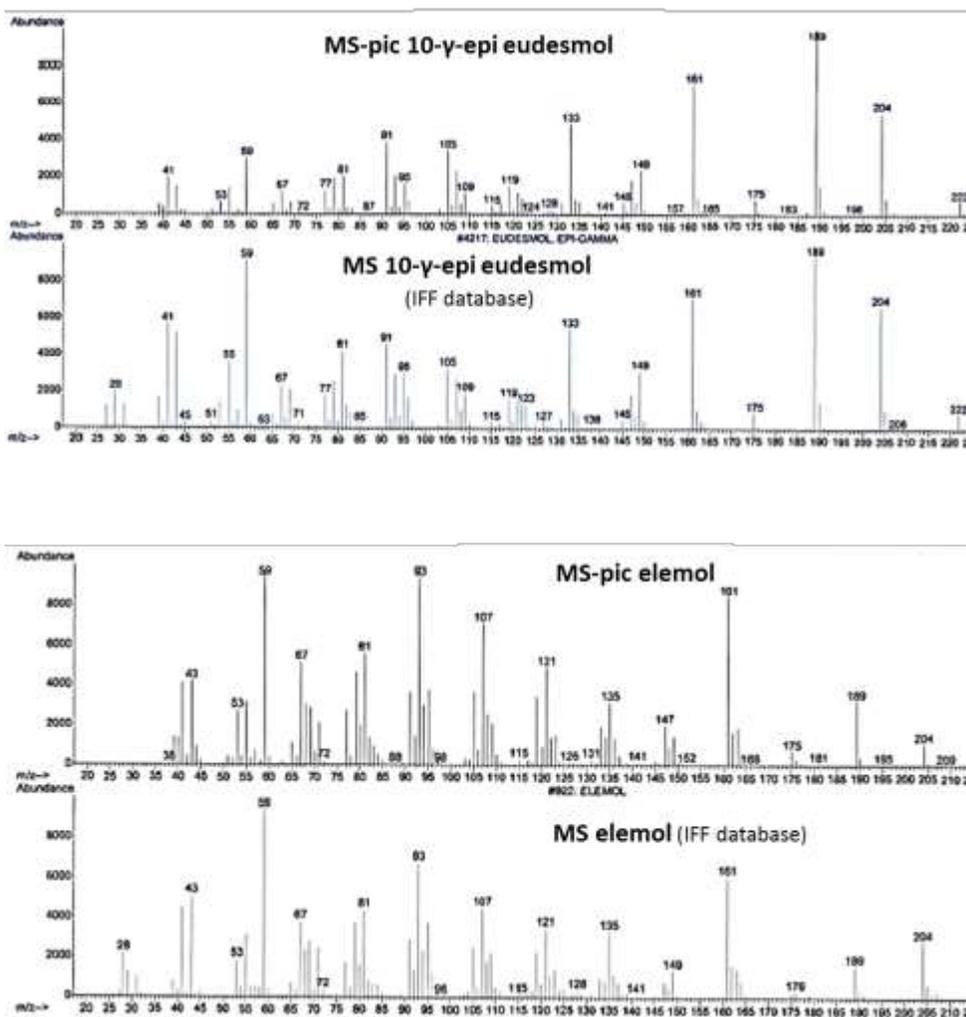
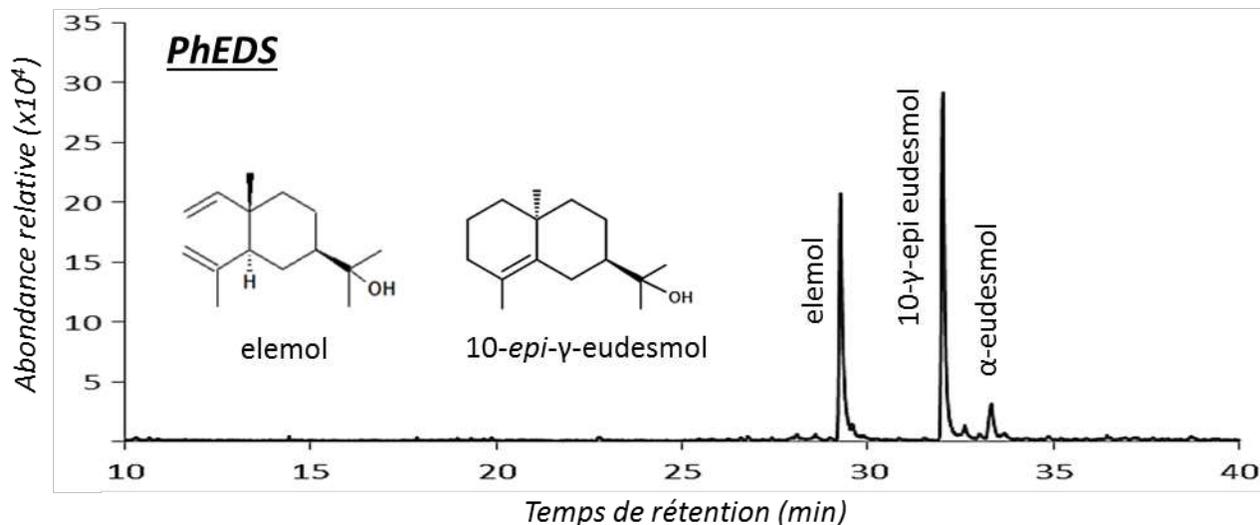
- Résultats I : Caractérisation des terpène synthases -



| 222

- Séquence théorique LSLYEASYL
- Séquence RxR
- Séquence DDxxD

Figure 81 | Comparaison des séquences protéiques de la 10-γ-épi eudesmol synthase de *Pelargonium* (PhEDS) et de la β-eudesmol synthase de *Zingiber zerumbet* (ZSS2) (Yu et al. 2008a). Les motifs caractéristiques des TPS sont soulignés.



**Figure 82 | Test d'activité *in vitro* de la protéine PhEDS recombinante utilisant le FPP comme substrat. Les produits ont été analysés par GC-MS puis les spectres de masse obtenus ont été comparés avec les spectres de masse des composés correspondants dans les bases de données.**

### III.2 Comparaison des séquences des TPS

Les séquences caractéristiques des TPS PhGES, PhCINS, PhMYS et PhEDS sont résumées dans le **tableau 17** ci-dessous. Pour chaque séquence spécifique, il est précisé si celle-ci est présente ou non, si elle contient une mutation et la place où commence la séquence.

**Tableau 17 | Analyse des séquences caractéristiques des TPS**

	PhGES (557 aa)	PhCINS (593 aa)	PhMYS (607 aa)	PhEDS (568 aa)
<b>RR<sub>x</sub>W</b>	Non	Oui 63 <sup>ème</sup> aa	Oui 67 <sup>ème</sup> aa	Oui R <sub>S</sub> x <sub>8</sub> W 18 <sup>ème</sup> aa
<b>LSLYEASYL</b>	Oui LSLYEASY <b>M</b> 173 <sup>ème</sup> aa	Oui LSLYE <b>V</b> SYL 198 <sup>ème</sup> aa	Oui 200 <sup>ème</sup> aa	Oui LSLYEAS <b>H</b> L 161 <sup>ème</sup> aa
<b>RxR</b>	Oui 37 aa avant DDxxD	Oui 37 aa avant DDxxD	Oui 37 aa avant DDxxD	Oui 37 aa avant DDxxD
<b>DDxxD</b>	Oui 311 <sup>ème</sup> aa	Oui 346 <sup>ème</sup> aa	Oui 354 <sup>ème</sup> aa	Oui 314 <sup>ème</sup> aa

Les monoterpène synthases ont une longueur le plus souvent comprise entre 600 et 650 aa. PhGES (557 aa) est plus courte, PhCINS a une longueur très proche (593 aa) et PhMYS a une longueur comprise dans cet intervalle (607 aa). Les STPS, généralement plus courtes car n'ayant pas de séquence d'adressage aux plastides, ont une longueur le plus souvent comprise entre 550 et 580 aa, ce qui est le cas de PhEDS.

Le site **RR<sub>x</sub>W** à environ 60 résidus de l'extrémité N-terminale est présent chez beaucoup de MTPS et pourrait jouer un rôle dans la cyclisation (*Williams et al. 1998, Degenhardt et al. 2009*). Ce site n'est néanmoins pas toujours présent quand il y a formation de composés acycliques. Il n'est pas présent chez PhGES qui produit du géraniol acyclique. Le 1,8-cinéole et l' $\alpha$ -terpinéol sont des composés cycliques et la présence de cette séquence est donc normale chez PhCINS. Par contre, le  $\beta$ -myrcène est un composé acyclique mais pas le  $\beta$ -pinène qui est le deuxième composé produit par PhMYS, il n'est donc pas étonnant non plus de retrouver cette séquence chez *PhMYS*.

La séquence **LSLYEASYL** est une séquence souvent bien conservée chez les TPS et c'est le cas pour les quatre TPS de *Pelargonium*. Néanmoins le rôle précis de cette séquence est inconnu (*Degenhardt et al. 2009*).

La séquence **RxR** est aussi très conservée et est présente chez les TPS de *Pelargonium*. Il est à noter que cette séquence se situe dans les 4 protéines exactement à 37 aa en amont de la séquence DDxxD. *Degenhardt et al. (2009)* la situe à environ 35aa en amont de DDXXD. Cette séquence jouerait un rôle dans la complexation de la fonction diphosphate après l'ionisation du substrat prévenant ainsi une attaque nucléophile des carbocations intermédiaires (*Starks et al. 1997*).

Le motif structural le plus conservé est la région riche en Aspartate, **DDxxD** qui est retrouvé chez toutes les TPS et isoprène synthases caractérisées, y compris dans les 4 protéines de *Pelargonium*. Cette région est impliquée dans la liaison avec les ions des métaux divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) qui interagissent avec le diphosphate et l'hydratation du substrat (*Lesburg et al. 1997*, *Starks et al. 1997*). Ce motif, situé à l'entrée du site catalytique, semble crucial pour le positionnement du substrat.

Les séquences protéiques des TPS de *Pelargonium* et des séquences de TPS présentes dans les bases de données ont été alignées avec le logiciel ClustalW. Un arbre a été construit avec le logiciel Geneious (arbre Neighbour Joining non enraciné). Le dendrogramme est présenté sur la **figure 83**.

PhGES se trouve dans le clade TPS-g alors que PhCINS et PhMYS sont classées dans le clade TPS-b.

*PhGES* est très proche d'un petit groupe de géraniol synthases.

PhCINS et *PhMYS* sont très proches l'une de l'autre, ce qui explique peut-être qu'elles ont en commun une série de produits ( $\beta$ -myrcène,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène). Nos premières comparaisons sur des séquences partielles avaient pointé des homologues avec des limonène synthases, qui sont incluses dans des clades voisins dans l'arbre.

PhEDS se trouve bien dans le sous-clade des sesquiterpène synthases, Tpsa. Il est remarquable que la séquence la plus proche soit la guaiadiène synthase d'*Ixeris dentata* qui est en fait une germacrène A synthase. L'eudesmol synthase de *Zingiber zerumbet* n'est pas loin non plus ce qui semble normal.

Ces observations confirment qu'il est très difficile de connaître l'activité réelle d'une TPS avant d'avoir réalisé des tests d'activité.

- Résultats I : Caractérisation des terpène synthases -

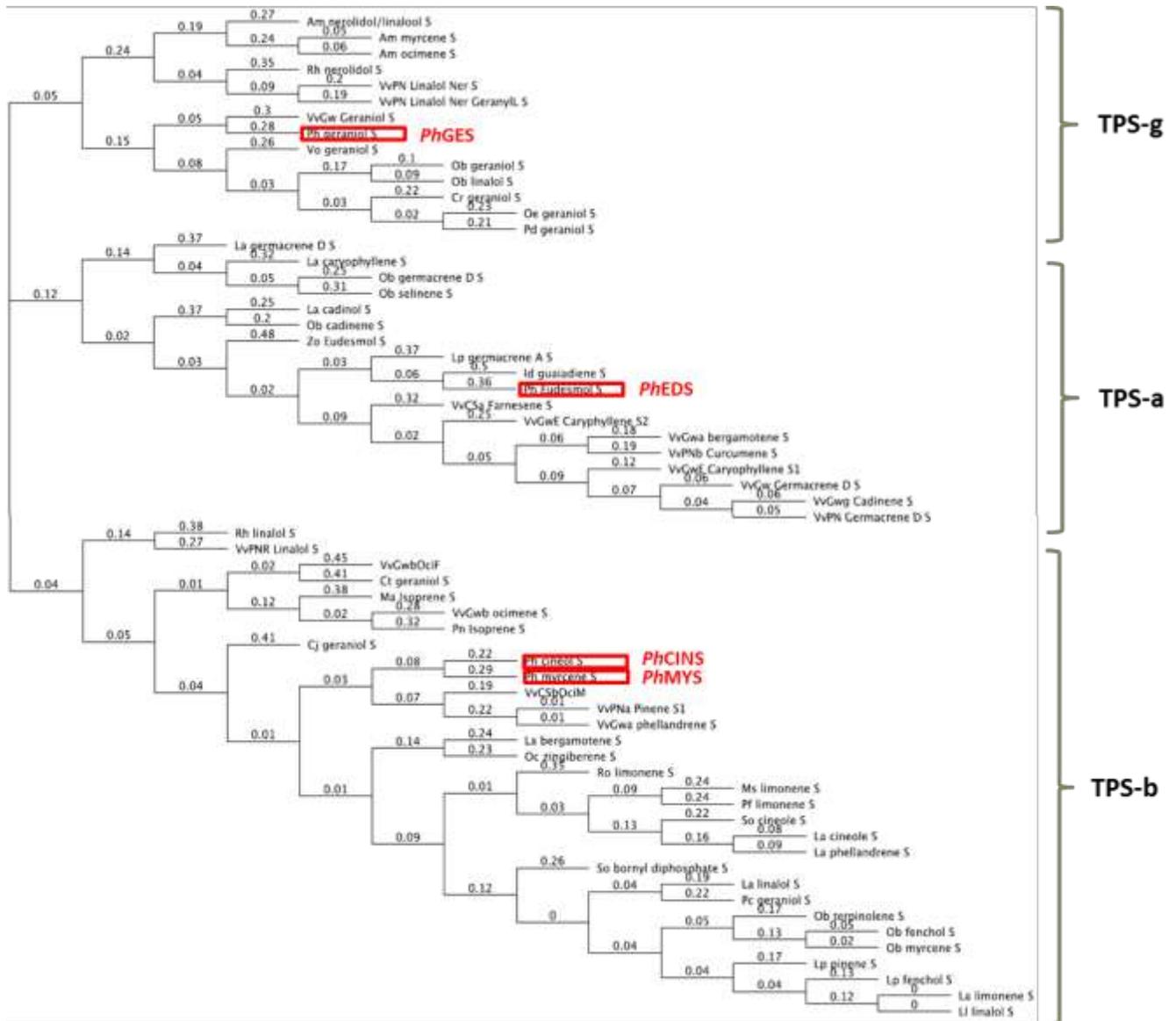
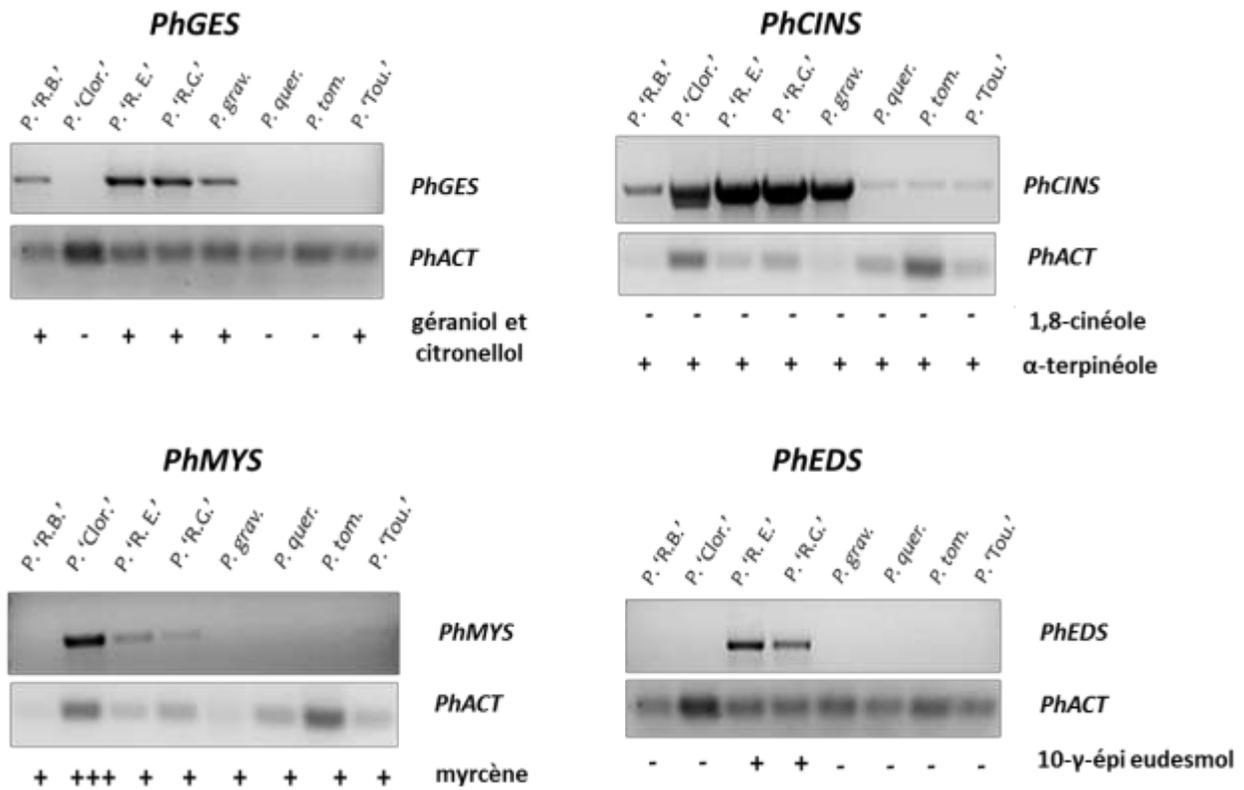


Figure 83 | Arbre des voisins non-enraciné montrant les relations entre les terpène synthases de *Pelargonium hybridum* cv. 'rosat Grasse' (en rouge) et les autres terpène synthases prochant. L'arbre a été construit en utilisant le logiciel Geneious®.

### III.3 Profils d'expression des quatre TPS de *Pelargonium*

#### III.3.1 Profils d'expression analysés par RT-PCR semi-quantitative

Des expériences de RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées sur les feuilles de plusieurs espèces et variétés de *Pelargonium*, dans le but de mettre en relation l'expression de ces TPS avec la présence des composés odorants. Les quatre profils de RT-PCR (figure 84) ont été réalisés dans les mêmes conditions et avec les mêmes espèces ou cultivars de *Pelargonium*. Chaque profil est discuté séparément ci-dessous. Les + et – dans les analyses font référence à la présence ou non des composés dans les HE. Toutes les analyses se trouvent en annexe 34.



**Figure 84 | Profils d'expression par RT-PCR semi-quantitative pour les quatre TPS.** *P.* cv. 'Rosat Bourbon' (*P. 'R.B.'*); *P.* cv. 'Clorinda' (*P. 'Clor.'*); *P.* cv. 'rosat Égypte' (*P. 'R.E.'*); *P.* cv. 'rosat Grasse' (*P. 'R.G.'*); *P. graveolens* (*P. graveolens*); *P. quercifolium* (*P. quercifolium*); *P. tomentosum* (*P. tomentosum*); *P.* cv. 'Toussaint' (*P. 'Tou.'*). Le gène *PhACT* (actine) a été utilisé comme gène de référence.

### III.3.1.1 Profil d'expression de *PhGES*

Le profil est cohérent avec les analyses chimiques des compositions des HE sauf dans le cas du cultivar *P. cv. 'Toussaint'*. En effet, même si l'HE de celui-ci ne contient que très peu de géraniol, elle contient par contre beaucoup de citronellol. Or le citronellol étant très probablement dérivé du géraniol, il est probable que le cultivar 'Toussaint' synthétise du géraniol grâce à l'expression de *PhGES* et que ce géraniol est transformé en citronellol par une enzyme encore inconnue. La *PhGES* étant une enzyme clé, il a été décidé de rechercher la cause de l'absence d'expression de *PhGES* dans ce cultivar. *PhGES* pourrait être exprimée très faiblement (bande non visible après 25 cycles) ou bien le citronellol serait produit par une autre voie que celle via le géraniol, ce qui est en contradiction avec les données de la littérature. Une autre explication possible est que la séquence de *PhGES* chez 'Toussaint' est trop éloignée et qu'une des 2 amorces désignées à partir de la séquence de *PhGES* de *P. cv. 'rosat Grasse'* ne s'hybride pas.

Nous avons donc testé 4 nouveaux couples d'amorces pour amplifier le gène *phGES*. Seul le couple 3 fonctionne sur l'ADNc de *P. cv. 'Toussaint'* (figure 85). Cette variété exprime donc bien *PhGES*, en conformité avec la présence en grande quantité de citronellol dans l'HE. Il semble donc que *P. cv. 'Toussaint'* soit plus loin sur l'arbre phylogénétique que les parents des hybrides comme *P. graveolens* pour lesquels les amorces s'hybrident correctement.

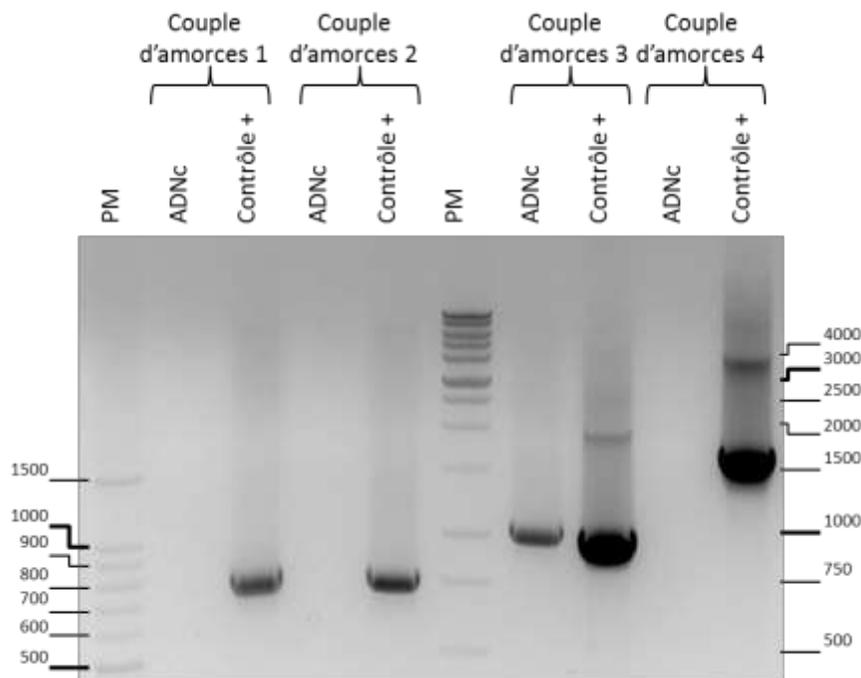


Figure 85 | Profil d'expression par RT-PCR semi-quantitative de *PhGES* avec quatre couples d'amorces sur l'ADNc de feuilles de *P. cv. 'Toussaint'*. Le contrôle positif correspond à l'ADNc de *Pelargonium cv. 'rosat Grasse'*.

### III.3.1.2 Profil d'expression de *PhCINS*

Les 2 produits principaux de *PhCINS* sont le 1,8-cinéole et l' $\alpha$ -terpinéol. Aucune des variétés dont nous avons analysé l'HE ne produit de 1,8-cinéole alors que l'expression de *PhCINS* est importante. Il est possible que les amorces ne soient pas assez spécifiques et se soient hybridées sur une autre TPS. Par contre, l' $\alpha$ -terpinéol est bien présent dans l'HE de toutes les variétés et c'est peut-être ce composé ou un autre produit plus minoritaire qui sont produits majoritairement par *PhCINS* dans la plante.

### III.3.1.3 Profil d'expression de *PhMYS*

*PhMYS* produit principalement du  $\beta$ -myrcène *in vitro*. Une analyse de l'HE des *Pelargonium* testés en RT-PCR montre que tous produisent du  $\beta$ -myrcène en petites quantités sauf *P. cv. 'Clorinda'* qui en produit une quantité importante, ce qui explique la bande plus intense chez ce cultivar. Néanmoins, on n'observe pas une bande chez tous les cultivars. Cela est peut-être dû, comme pour *PhGES*, à des amorces qui ne s'hybrident pas ou mal.

### III.3.1.4 Profil d'expression de *PhEDS*

Le profil d'expression de *PhEDS* est très bien corrélé avec l'analyse des HE des *Pelargonium cv. 'rosat Bourbon'*, *P. cv. 'rosat Grasse'* et *P. cv. 'rosat Egypt'* sont très proches puisqu'il s'agit d'hybrides à l'odeur de rose issus d'un croisement avec des parents identiques. Ils ont aussi une HE très similaire excepté que *P. cv. 'rosat Bourbon'* produit du 6,9-guaiadiène mais pas de 10- $\gamma$ -épi eudesmol, ce qui est exactement le contraire pour les deux autres cultivars rosats. Il est donc vraisemblable que *P. cv. 'rosat Bourbon'* n'exprime pas *PhEDS* à un niveau détectable et que cette absence d'expression explique l'absence de 10- $\gamma$ -épi eudesmol.

## III.3.2 Profils d'expression quantitative de *PhGES* et *PhEDS*

Il a été décidé de tester quantitativement l'expression de *PhGES* et de *PhEDS* parce que ce sont les deux TPS les plus intéressantes, produisant du géraniol et du 10- $\gamma$ -épi eudesmol. Ces deux TPS ont donc été testées sur trois cultivars 'rosat' ainsi que sur les 3 parents (*P. capitatum*, *P. radens* et *P. graveolens*). Le cultivar 'Toussaint' a aussi été analysé car il produit beaucoup d'HE très riche en citronellol, ainsi que l'espèce botanique *P. tomentosum* qui ne produit ni géraniol ni citronellol. Les amorces ont été choisies pour minimiser les problèmes d'hybridation potentiels des différents *Pelargonium* testés. En effet, quand cela était possible, nous avons au préalable cloné et séquencé toutes les TPS concernées pour les

variétés choisies pour la qPCR. Les amorces pour *PhGES* et *PhEDS* (**annexe 23**) ont donc été désignées sur 6 et 7 espèces/cultivars de *Pelargonium*. Les séquences de *P. tomentosum* (*PhGES* et *PhEDS*) et *P. radens* (*PhEDS*) n'ont pas pu être obtenues.

Les expressions attendues de *PhGES* et *PhEDS* pour les *Pelargonium* étudiés sont résumées dans le **tableau 18**.

**Tableau 18 | Expressions attendues de *PhGES* et *PhEDS* pour plusieurs variétés de *Pelargonium*, en fonction de la composition des HE**

	Expression attendue de <i>PhGES</i>	Expression attendue de <i>PhEDS</i>
<i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i>	+++	
<i>P. cv. 'rosat Égypte'</i>	+++	++
<i>P. cv. 'rosat Grasse'</i>	+++	++
<i>P. capitatum</i>	+	+
<i>P. graveolens</i>	++	
<i>P. radens</i>		
<i>P. tomentosum</i>		
<i>P. cv. 'Toussaint'</i>	+++	

Les résultats pour *PhGES* (**figure 86**) sont globalement cohérents avec la composition en HE (**annexe 34**) des *Pelargonium*. Les trois *P. cv. 'rosat'* ainsi que *P. graveolens* ont comme prévu une activité importante, en accord avec leur production importante de géraniol et de ses dérivés. Le faible niveau d'expression pour *P. capitatum* de type 2 (chénotype II, voir **annexe 34**) est aussi corrélé avec sa faible production de géraniol. Le *P. cv. 'Toussaint'* a une *PhGES* moyennement exprimée alors qu'il produit beaucoup de citronellol. Comme attendu, on ne retrouve aucune activité pour *P. radens* et *P. tomentosum*.

Les résultats pour *PhEDS* (**figure 87**) sont très cohérents avec les analyses chimiques puisqu'il y a beaucoup de 10- $\gamma$ -épi eudesmol dans les *P. cv. 'rosat Grasse'* et '*rosat Égypte*' et un peu de ce composé dans *P. capitatum* de type II.

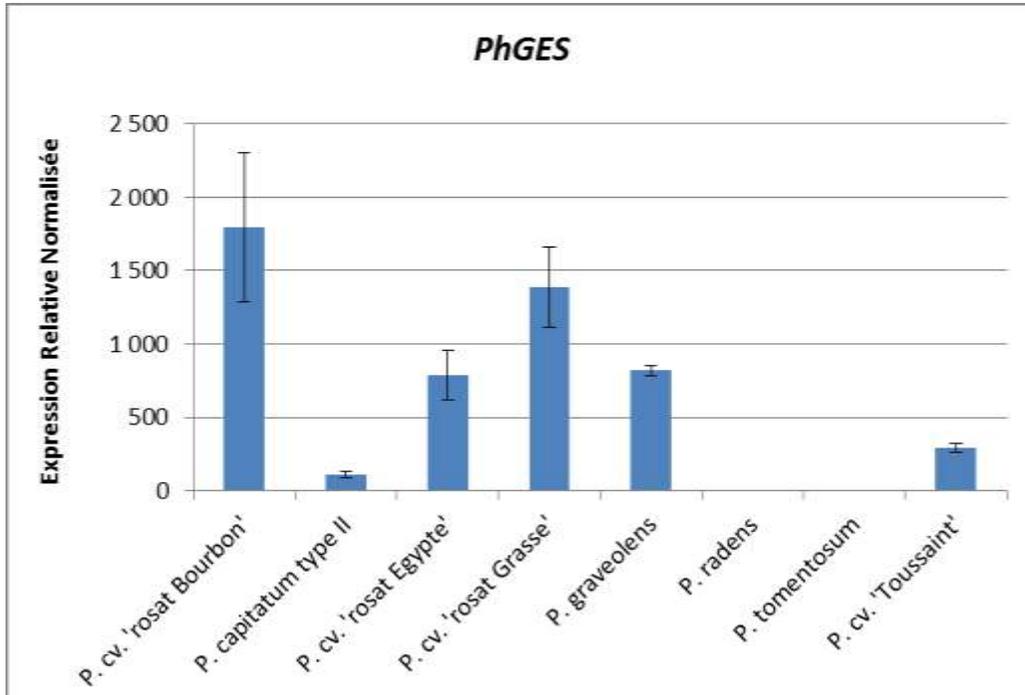


Figure 86 | Expression relative normalisée de *PhGES* dans des jeunes feuilles de différents *Pelargonium* cultivés dans les mêmes conditions contrôlées. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. 2 réplicats sur 2 RT-PCR indépendantes ont été réalisés.

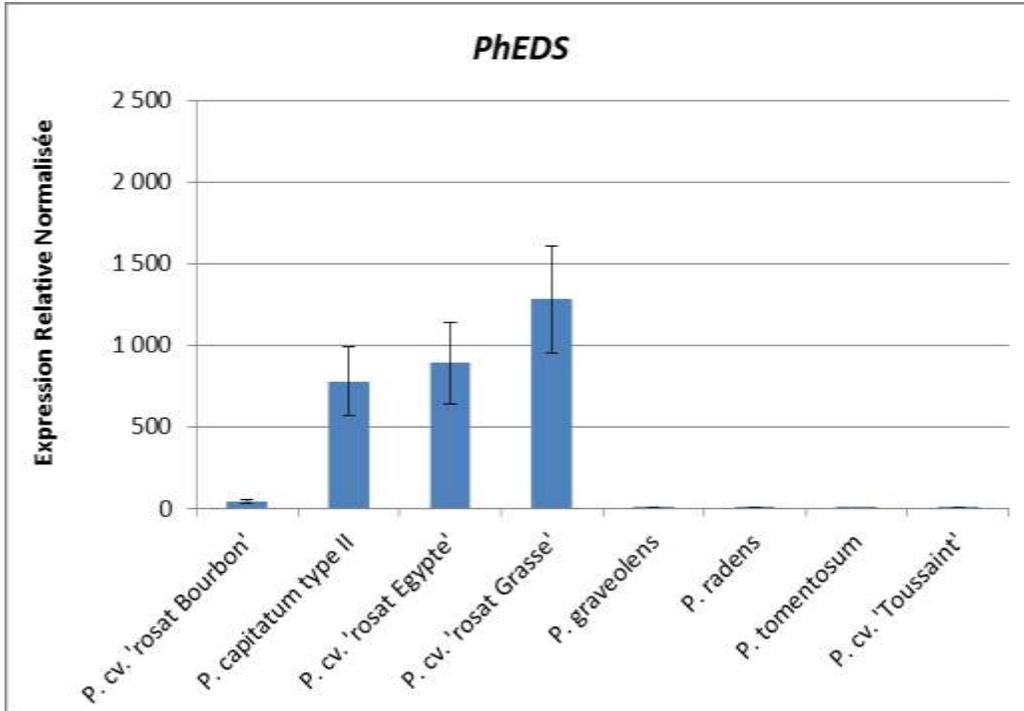
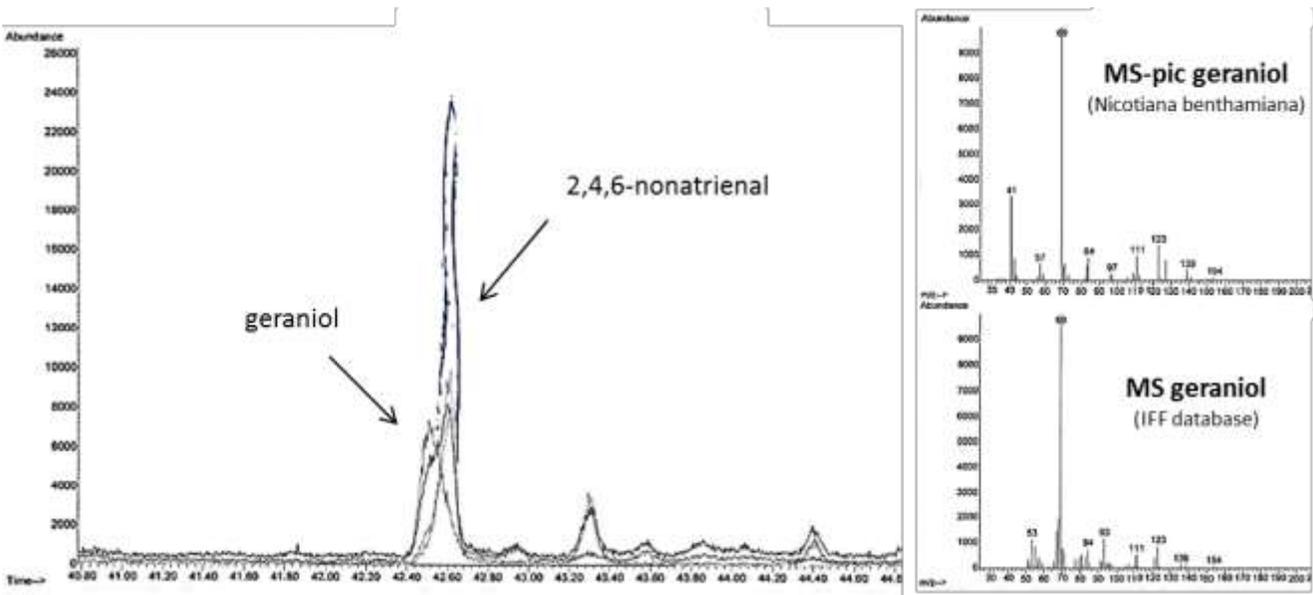


Figure 87 | Expression relative normalisée de *PhEDS* dans les jeunes feuilles de différents *Pelargonium* cultivés dans les mêmes conditions contrôlées. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standards. 2 réplicats sur 2 RT-PCR indépendantes ont été réalisés.

## IV. EXPRESSION DES TPS *IN PLANTA*

### IV.1 Expression transitoire de *PhGES* et de *PhEDS* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*

Les feuilles de *Nicotiana benthamiana* ne produisant que très peu de terpènes, il est probable que la quantité de GPP disponible est faible. Des transformations transitoires de feuilles de tabac avec le construit *35S::PhGES* (voir matériel et méthodes) ont été réalisées et l'analyse des composés volatils a été effectuée 5 jours après la transformation. Elle montre dans les tabacs transformés une production de géraniol faible mais significative (**figure 88**). Ceci prouve que *PhGES* est fonctionnelle dans la plante et produit bien du géraniol. La construction *35S::PhEDS*, utilisée de la même manière, n'a donné aucun résultat.



**Figure 88 | GC-MS de feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*) transformé transitoirement avec la construction *35S::PhGES*. Il y a co-élution du géraniol avec le 2,4,6 nonatriénel et ce n'est qu'en faisant une extraction des ions sortant à ce temps de rétention que l'on a pu déterminer avec certitude la présence du géraniol.**

#### IV.2 Expression stable de *PhGES* et de *PhEDS in planta* dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* et de *Pelargonium*

Les premiers essais de transformation stable du tabac avec les constructions 35S::*PhGES* et 35S::*PhEDS* n'ont donné aucun transformant. Notre protocole de transformation a donc été réévalué et les expériences refaites. Nous observons actuellement des bourgeons potentiellement transformés et leur sélection est en cours.

Nous avons mis au point au laboratoire la transformation stable des feuilles de *Pelargonium* avec *Agrobacterium tumefaciens* (chapitre II - Matériels et méthodes). L'application de ce protocole de transformation a permis d'obtenir une efficacité de 11% de transformants par explant avec une construction 35S::*GUS* le *P. cv. 'rosat Grasse'* (figure 89). D'autres essais ont aussi été menés avec succès sur *P. cv. 'rosat Bourbon'*.

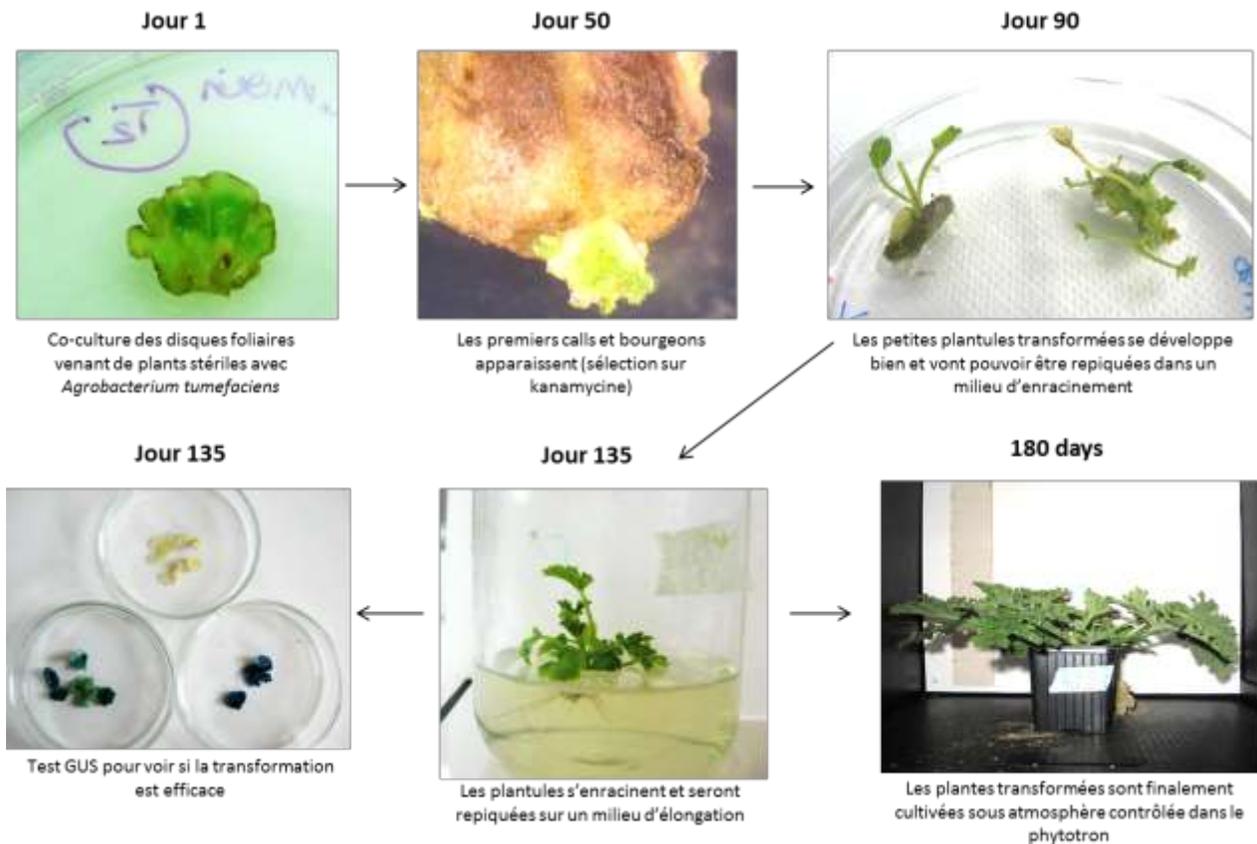


Figure 89 | Expérience de transformations stable de feuilles de *Pelargonium x hybridum cv. 'rosat Grasse'* avec le construit 35S::*GUS*.

## V. CONCLUSIONS

Les profils d'expression semi-quantitative des quatre TPS sont globalement bien en accord avec les résultats attendus si l'on se réfère à l'HE des accessions testées. Néanmoins, pour PhCINS, les bandes obtenues semblaient montrer une forte expression de cette enzyme dans l'ensemble des *Pelargonium*. Or si l'on analyse la composition chimique de l'HE, ces *Pelargonium* produisent peu de 1,8 cinéole. On peut imaginer que l'on a choisi des amorces non suffisamment spécifiques et qu'elles se sont hybridées sur d'autres gènes. Une PCR avec des températures d'hybridation plus élevées nous aurait peut-être permis d'être plus discriminants. On peut par contre probablement exclure que ces composés soient métabolisés en d'autres molécules car ce sont des composés très stables. Il est aussi possible que la TPS se comporte différemment *in planta* que *in vivo*. L'activité *in planta* de la PhCINS pourrait alors changer les ratios entre ces molécules et favoriser la production de molécules présentes chez ces *Pelargonium* comme l' $\alpha$ -terpinéol, le limonène, l' $\alpha$ -pinène ou encore le  $\beta$ -pinène.

La qPCR montre une expression de la GES plus importante chez *P. cv. 'rosat Bourbon'* et '*rosat Grasse'* mais cela ne veut pas pour autant dire que ce sont ces cultivars qui sont les plus productifs. En effet, la quantité de géraniol produit dépend aussi de la quantité de substrat (GPP) à disposition et il y aurait lieu aussi de regarder l'expression des enzymes situées en amont dans la voie de biosynthèse.

Grâce à la transformation transitoire du tabac, nous avons pu prouver l'activité *in planta* de PhGES. Malheureusement, la même transformation avec l'EDS n'a rien donné. Cela peut s'expliquer par le fait que le tabac produise très peu de GPP et peut-être encore moins de FPP. Un des paramètres qui limite ces expériences est le taux de cellules transformées, qui est très variable d'une expérience à l'autre. Ce paramètre et la faible disponibilité en substrat ne nous aura sans doute pas permis de confirmer l'activité *in planta* de l'EDS.

Les résultats de la transformation du *Pelargonium* avec le gène rapporteur GUS sont intéressants car ils montrent une bonne efficacité de transformation de cette plante. Nous allons donc pouvoir transformer *P. tomentosum*, ne produisant pas du tout de géraniol et ses dérivés, avec la GES. Cela confirmera nos résultats en transformation transitoire. Une deuxième transformation de *P. cv. 'rosat Bourbon'* sera aussi intéressante à mener avec l'EDS puisque ce *Pelargonium* ne produit pas du tout ce composé.

## I. ANALYSES OLFACTIVES ET CHIMIQUES DES *PELARGONIUM*

Les *Pelargonium* odorants présentent de nombreuses odeurs très diverses (menthe, citron, abricot, pomme verte, pêche, rose, fleur d'oranger, savon de Marseille, patchouli, pin, eucalyptus, muscade, clou de girofle, cannelle, poivre, fane de carotte, coca-cola, butyrate, balsamique...) (**tableau 6 – chapitre matériel et méthode**). Cette diversité olfactive est certainement représentative d'une biosynthèse de COV très riche. Les HE de *Pelargonium* botaniques faisant partie de la sous-section *Pelargonium* ont déjà fait l'objet de recherches par le passé et ont parfois été caractérisées chimiquement (*Blerot et al. 2015*). Cependant, c'est la première fois qu'un si grand nombre de variétés sont cultivées et caractérisées du point de vue des composés volatils de manière exhaustive. Ayant constitué au LBVpam puis à IFF-LMR une riche collection de variétés et cultivars, j'ai voulu connaître leur composition et la relation avec leur diversité olfactive. Afin de voir leur rendu en HE et en absolu, des essais ont aussi été menés sur une quinzaine de variétés sélectionnées par les parfumeurs mais il n'en sera pas fait état ici.

### I.1 Caractérisation olfactive de 64 accessions de *Pelargonium*

Soixante-quatre accessions (cultivars et espèces) de *Pelargonium* ont été évaluées sur du matériel frais cultivé en champ à Grasse par les parfumeurs de l'entreprise IFF (**annexe 39**) (**tableau 6 – chapitre matériel et méthodes**). Après une première évaluation des parfumeurs pour laquelle la description était totalement libre et la plus large possible, il s'est avéré que certains descripteurs olfactifs revenaient fréquemment parmi les parfumeurs. Il leur a donc été demandé, dans un second temps, de décrire pour chaque accession l'odeur la plus puissante, donnant la direction majoritaire de la fragrance du *Pelargonium* ainsi qu'une odeur secondaire. Les 9 descriptifs les plus souvent cités sont rose, citron, menthe, butyrate, floral, aromatique, fruité, boisé, épices (**tableau 19**).

Tableau 19 | caractérisation olfactive des 64 accessions de *Pelargonium* odorants

Accession de <i>Pelargonium</i>	Odeur principale	Odeur secondaire	Accession de <i>Pelargonium</i>	Odeur principale	Odeur secondaire
1. <i>P. capitatum</i>	Rose	Menthe	33. <i>P. 'Attar of rose'</i>	Rose	Menthe
2. <i>P. radens</i>	Menthe	Menthe	34. <i>P. 'Aurore unique'</i>	Aromatique	Epices
3. <i>P. graveolens</i>	Rose	Menthe	35. <i>P. 'Filicifolium'</i>	Butyrate	Fruité
4. <i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i>	Rose	Menthe	36. <i>P. glutinosum</i>	Butyrate	Boisé
5. <i>P. cv. 'rosat Chine'</i>	Rose	Menthe	37. <i>P. 'Royal oak'</i>	Boisé	Epices
6. <i>P. cv. 'rosat Egypte'</i>	Rose	Menthe	38. <i>P. quercifolium</i>	Boisé	Epices
7. <i>P. cv. 'rosat Grasse'</i>	Rose	Menthe	39. <i>P. 'Radula'</i>	Rose	Citron
8. <i>P. 'Toussaint'</i>	Citron	Rose	40. <i>P. 'Karooense K.'</i>	Menthe	Boisé
9. <i>P. 'Candy dancer'</i>	Citron	Rose	41. <i>P. 'Velvet rose'</i>	Rose	Menthe
10. <i>P. tomentosum</i>	Menthe	Menthe	42. <i>P. 'Crispy'</i>	Rose	Citron
11. <i>P. 'Pepper'</i>	Epices	Boisé	43. <i>P. 'Abrotanifolium'</i>	Boisé	Aromatique
12. <i>P. 'Prince of orange'</i>	Citron	Rose	44. <i>P. 'Angulosum'</i>	Floral	Fruité
13. <i>P. 'Clorinda'</i>	Boisé	Fruité	45. <i>P. 'Capitatum Attar of Rose'</i>	Rose	Epices
14. <i>P. 'Fragrance'</i>	Epices	Aromatique	46. <i>P. 'Tomentosum chocolate'</i>	Menthe	Epices
15. <i>P. citronellum</i>	Citron	Rose	47. <i>P. 'Clorinda variegatum'</i>	Boisé	Fruité
16. <i>P. denticulatum</i>	Menthe	Epices	48. <i>P. 'Crispum variegatum'</i>	Citron	Citron
17. <i>P. ostanviens</i>	Fruité	Boisé	49. <i>P. cucullatum</i>	Aromatique	Floral
18. <i>P. crispum</i>	Citron	fruité	50. <i>P. extipulatum</i>	Boisé	Epices
19. <i>P. vitifolium</i>	Citron	Epices	51. <i>P. 'Fragrance Lilliane Pottinger'</i>	Epices	Epices
20. <i>P. torento</i>	Fruité	Epices	52. <i>P. 'Fragrance old Spice'</i>	Epices	Epices
21. <i>P. 'Scarlet unique'</i>	Boisé	Epices	53. <i>P. 'Fragrance variegated'</i>	Epices	Boisé
22. <i>P. odoratissimum</i>	Epices	Fruité	54. <i>P. 'Fragrance white'</i>	Epices	Boisé
23. <i>P. 'Blandfordianum'</i>	Menthe	Boisé	55. <i>P. hispidum</i>	Floral	Menthe
24. <i>P. 'Charity'</i>	Citron	Epices	56. <i>P. 'Lemon fancy'</i>	Citron	Citron
25. <i>P. 'Crispum peache'</i>	Fruité	Epices	57. <i>P. 'mutans variegated'</i>	Boisé	Epices
26. <i>P. 'Cocolor lace'</i>	Boisé	Epices	58. <i>P. papillonaceum</i>	Citron	Citron
27. <i>P. 'Lavender'</i>	Aromatique	Fruité	59. <i>P. myrrtifolium</i>	Boisé	Epices
28. <i>P. 'Mabel grey'</i>	Citron	Rose	60. <i>P. praemorsum</i>	Boisé	Fruité
29. <i>P. 'Lady Plymouth'</i>	Rose	Fruité	61. <i>P. 'Robert lemon rose'</i>	Rose	Menthe
30. <i>P. 'Lemon juicy'</i>	Citron	Citron	62. <i>P. scabroïdes</i>	Floral	Fruité
31. <i>P. trifidum</i>	Aromatique	Boisé	63. <i>P. 'Lady lilac'</i>	Epices	Fruité
32. <i>P. 'Lilac'</i>	Epices	Floral	64. <i>P. grossularioides</i>	Fruité	Fruité

| 236

Si on regarde uniquement l'odeur principale, les *Pelargonium* se répartissent comme suit : 13 'Rose', 12 'Citron', 11 'Boisé', 9 'Epices', 6 'Menthe', 4 'Fruité', 4 'Aromatique', 3 'Floral' et 2 'Butyrate'. On peut noter que l'odeur de rose est souvent associée à une odeur de menthe en odeur secondaire alors qu'elle est souvent choisie elle-même comme odeur secondaire pour les *P.* à odeur principale de citron. Les *P.* 'rosat' sont bien classés dans le groupe 'Rose' ainsi que le *P. capitatum*. Le parent *P. radens* est lui, bien identifié comme menthe. Ce n'est pas le cas pour *P. graveolens*, ce qui nous confirme une nouvelle fois que cette accession n'est pas un véritable *P. graveolens* mais est plutôt un hybride 'rosat'. L'odeur de citron, qui est dominante dans plusieurs accessions, n'est jamais choisie comme odeur secondaire sauf si l'odeur principale est elle-même 'citron'. Les odeurs 'boisé' et 'épices' sont souvent associées, ce sont en effet des notes assez proches.

## I.2 Caractérisation chimique de 64 accessions de *Pelargonium*

Les feuilles des 64 accessions de *Pelargonium* ont ensuite été extraites à l'hexane à partir de plantes cultivées en serre au LBVpam et les extraits analysés en GC-MS. Le but était d'avoir des analyses suffisamment détaillées pour chaque *Pelargonium* et de pouvoir corrélérer ces analyses chimiques des *Pelargonium* entre eux mais aussi d'y associer les descripteurs olfactifs. La matrice des 64 analyses obtenues, a révélé la présence de 191 composés en quantités très variables, mais toutefois suffisantes pour être détectées (annexe 40). Les extraits ont été réalisés sur 1 g de jeune feuille de *Pelargonium* avec 3 prélèvements par plante. Très peu de différences ont été observées et la moyenne des 3 réplicats a été présentée dans la matrice finale. Il n'a pas été possible de faire des extractions à partir d'individus différents car nous ne possédions pas toujours 3 exemplaires de la même variété, certaines étant assez rares. Nous n'avons donc pas pu évaluer la variabilité intra-espèce mais comme les plants sont multipliés par bouturage, on peut penser qu'elle est faible. Cette variabilité intra-espèce a par contre été évaluée lors d'autres expériences sur les *P. 'rosat'* et s'est avérée effectivement faible (voir Chapitre V - II.5.2)

Une quantification à l'aide du camphre comme standard interne nous a permis de calculer les concentrations totales en COV produits par les *Pelargonium* qui varient de 400 ppm ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{PS}$ ) à plus de 150 000 ppm pour le plus productif. Nous nous attendions à des différences marquées entre les variétés car lors de notre étude en MEB<sup>95</sup>, dont une partie des résultats a été exploitée dans la revue présentée en introduction, nous avons observé une grande diversité non seulement au niveau du type de trichomes glandulaires, mais aussi au niveau de la densité des trichomes glandulaires entre les variétés.

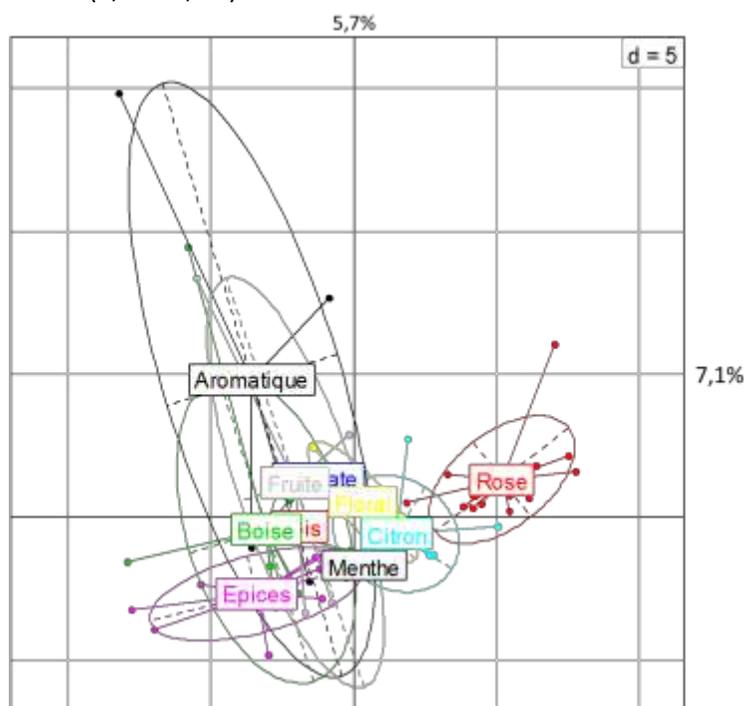
---

<sup>95</sup> MEB pour Microscopie électronique environnementale à balayage

## II. ANALYSE DES RÉSULTATS BRUTS

### II.1 Analyse en composantes principales sur l'ensemble des accessions

Une première analyse en composantes principales ou ACP<sup>96</sup> a été réalisée sur l'ensemble des accessions et l'ensemble des composés. Les résultats (figure 90) montrent que seuls quelques groupes ressortent clairement, un groupe 'Rose' et un groupe 'Citron'. Les groupes 'Epices' et 'Boisé' qui comprennent un grand nombre d'accessions aux composés multiples sont mal séparés. Les groupes 'Menthe', 'Floral' et 'Butyrate' sont assez bien regroupés aussi mais mal séparés les uns des autres. Les groupes 'Aromatique' et 'Fruité' apparaissent, eux, très dispersés malgré le faible nombre de variétés les composant (4 chacun). Ceci est dû probablement à la signification peu précise de notes aromatiques et fruitées qui regroupent un nombre trop important de molécules différentes. Précisons encore que les valeurs des axes sont faibles (7,1 et 5,7%).



**Figure 90 | ACP des 64 accessions de *Pelargonium* (1 individu par accession).** La matrice quantitative utilisée regroupe les 191 composés dont l'aire a été rapportée au standard. L'axe des abscisses représente 7.1% de la variabilité et l'axe des ordonnées 5.7%.

Suite à ce premier résultat, nous avons refait une ACP avec un périmètre réduit. Nous avons pris en compte les molécules présentes dans les extraits à des concentrations supérieures à 1% mais cela n'a pas donné de meilleurs résultats (annexe 41). Nous avons ensuite éliminé les *Pelargonium* dont le

<sup>96</sup> ACP pour Analyse en composantes principales

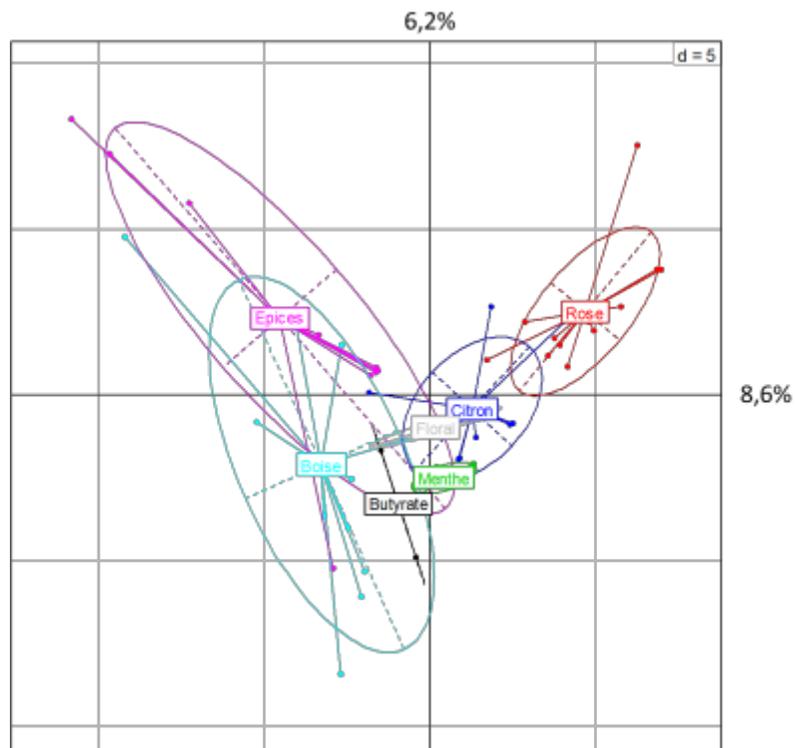
descripteur majeur était 'aromatique' ou 'fruité' qui sont des descriptifs trop vagues pour être discriminants.

## II.2 Analyse sur un sous-jeu de données

Pour ces analyses, tous les composés (191) ont été conservés mais les 4 accessions étant décrites comme 'fruité' (*P. otanviens*, *P. 'Toronto'*, *P. 'Crispum peach'*, *P. grossularioides*), ainsi que les 4 'aromatiques' (*P. trifidum*, *P. 'Aurore unique'*, *P. cucullatum*, *P. 'Lavender'*) ont été enlevées. A noter que *P. otanviens*, *P. grossularioides* et *P. trifidum* sont 3 *Pelargonium* botaniques ne se trouvant pas dans la section *Pelargonium*.

### II.2.1 Analyse en composantes principales

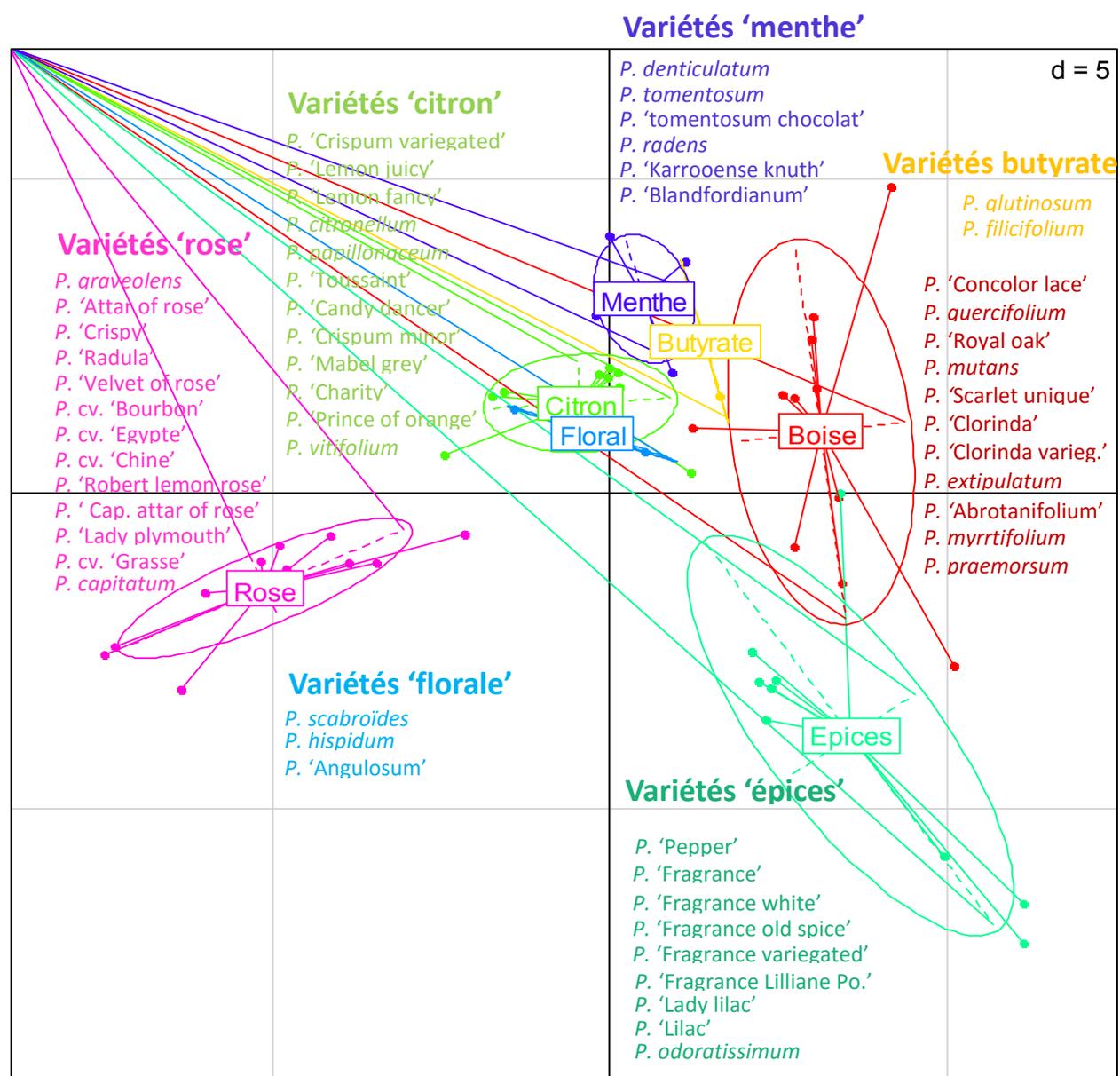
La **figure 91** montre un résultat plus clair, avec des groupes olfactifs mieux séparés. Les résultats des variables explicatives sont présentés en **annexe 42**. Les groupes 'Rose' et 'Citron' sont plus proches de l'axe principal (8,6%) que le groupe 'Epices' et 'Boisé' qui ne sont discriminés que par l'axe secondaire (6,2%). Ces résultats demandent encore à être affinés au regard du faible pourcentage des axes.



**Figure 91 | ACP de 56 accessions de *Pelargonium* (1 individu par accession).** La matrice quantitative utilisée regroupe les 191 composés dont l'aire a été rapportée au standard. L'axe des abscisses représente 8.6% de la variabilité et l'axe des ordonnées 6.2%.

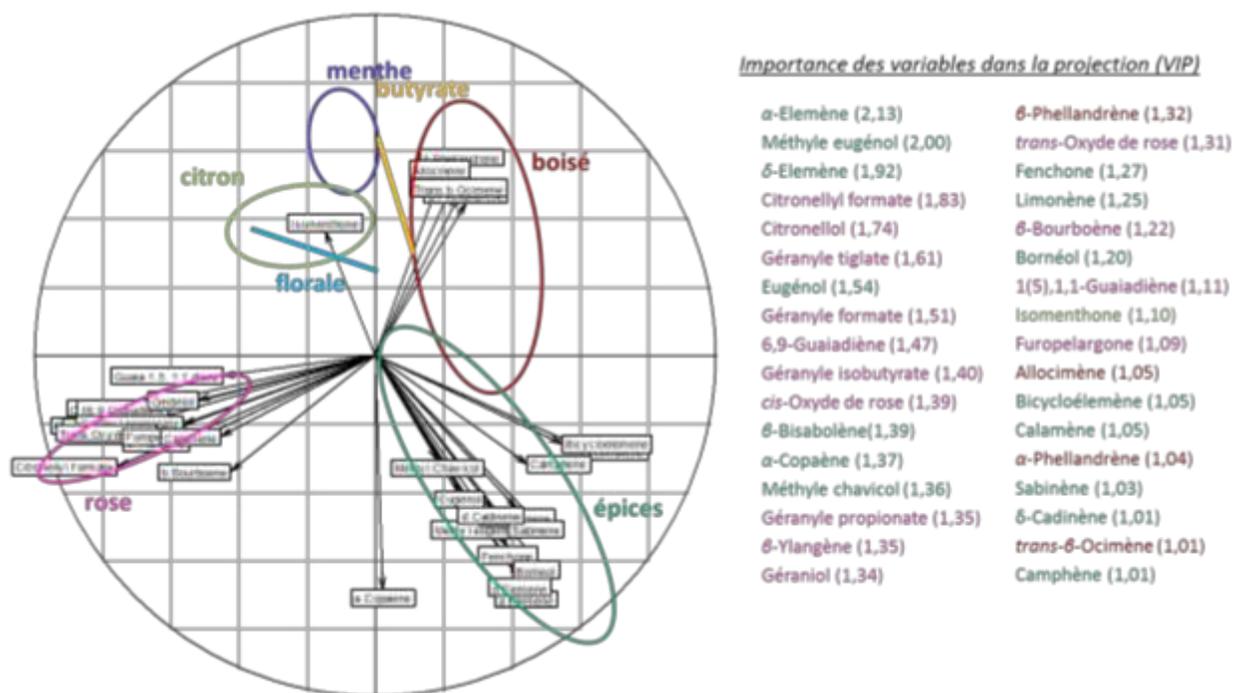
## II.2.2 Analyse discriminante

Nous avons ensuite réalisé une analyse discriminante (PLS-DA<sup>97</sup>) (figure 92) afin d'expliquer quelles variables pouvaient être discriminantes entre ces groupes olfactifs. Au vu de la séparation très nette de ces groupes, à l'exception du groupe citron-floral, on en déduit qu'il y a bien des variables discriminantes entre ces groupes. Ces variables sont présentées dans la figure 93 et discutées ci-dessous.



**Figure 92 | Analyse discriminante sur 56 accessions de *Pelargonium* appartenant aux groupes olfactif 'menthe', 'citron', 'rose', 'floral', 'épice', 'boisé', 'butyrate' et sur l'ensemble des composés identifiés (191). Analyses réalisée avec le package R mixPmics. La proportion de variation expliquée par l'axe des abscisses est de 36% et de 17% pour l'axe des ordonnées.**

<sup>97</sup> PLS-DA pour Partial Least Squares Discriminante Analysis



**Figure 93 | Cercle des corrélations des composés les plus discriminants (coefficient VIP supérieur à 1) pour les groupes olfactifs 'menthe', 'citron', 'rose', 'floral', 'épice', 'butyrate', 'boisé' et sur l'ensemble des 191 composés.**

On observe que 34 variables (sur 191 composés) sont discriminantes pour ces 7 groupes olfactifs. Parmi celles-ci, on retrouve 14 molécules qui sont discriminantes pour le groupe 'Rose' (en rose dans les colonnes de droite de la figure 93). Ces molécules ont d'ailleurs pour la plupart une réelle odeur de rose (Citronellyl formate, citronellol, cis-oxyde de rose, géranol, trans-oxyde de rose,...). Il est intéressant de noter que le 6,9-guaiadiène est discriminant pour l'odeur de rose alors que le 10- $\gamma$ -épi eudesmol ne l'est pas. Dans le tableau 20 ci-dessous et qui est extrait de la matrice en annexe 40, on observe que ces composés sont très répandus dans le genre *Pelargonium*. Cependant 13 *P.* sur 21 synthétisant du 6,9-guaiadiène sont classés dans le groupe 'Rose' alors que seulement 3 *P.* sur les 10 *P.* produisant du 10- $\gamma$ -épi eudesmol, sont des *P.* 'Rose'. Cette différence explique pourquoi le 6,9-guaiadiène est discriminant pour l'odeur de rose et pas le 10- $\gamma$ -épi eudesmol.

Quinze composés sont aussi discriminants pour le groupe 'Épices', dont certains sont effectivement connus pour avoir une note épicée comme le clou de girofle (méthyleugénoïl, eugénoïl), le poivre (sabinène,  $\alpha$ -élémène,  $\delta$ -élémène) ou une note camphrée (bornéol, camphène). On retrouve bien chez les *Pelargonium* du groupe 'Épices' ces composés discriminants en grande concentration comme le méthyle eugénoïl, composé par ailleurs carcinogène, présent chez tous les *P.* 'fragrance' (5 variétés) de

19 à 77% ainsi que chez *P. odoratissimum* (88%), *P. lilac* (73%) et *P. 'Lady lilac* (64%). Les  $\alpha$ -élémente,  $\delta$ -élémente et le bicycloélémente sont très peu présents et en très faibles concentrations chez les *Pelargonium* ne faisant pas partie du groupe 'Epices' alors qu'il sont systématiquement présents et souvent en concentration dépassant les 0,5% chez toutes les accessions 'Epices'.

Tableau 20 | Pourcentages de 6,9-guaiadiène et de 10- $\gamma$ -épi eudesmol dans les extraits de *Pelargonium*

<i>Pelargonium</i>	6,9-guaiadiène	10- $\gamma$ -épi eudesmol	<i>Pelargonium</i>	6,9-guaiadiène	10- $\gamma$ -épi eudesmol
1. <i>P. capitatum</i>	18,53	-	33. <i>P. 'Attar of rose'</i>	6,38	-
3. <i>P. graveolens</i>	13,20	-	35. <i>P. 'Filicifolium'</i>	2,07	-
4. <i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i>	7,04	-	36. <i>P. glutinosum</i>	-	2,73
5. <i>P. cv. 'rosat Chine'</i>	7,21	-	39. <i>P. 'Radula'</i>	8,19	-
6. <i>P. cv. 'rosat Egypte'</i>	0,24	6,39	40. <i>P. 'Karrooense K.'</i>	6,28	2,09
7. <i>P. cv. 'rosat Grasse'</i>	0,52	6,24	41. <i>P. 'Velvet rose'</i>	6,78	-
13. <i>P. 'Clorinda'</i>	3,25	-	42. <i>P. 'Crispy'</i>	6,11	4,06
19. <i>P. vitifolium</i>	-	13,18	45. <i>P. 'Capitatum A of R'</i>	10,22	-
23. <i>P. 'Blandfordianum'</i>	-	2,29	49. <i>P. cucullatum</i>	6,48	-
24. <i>P. 'Charity'</i>	-	6,16	55. <i>P. hispidum</i>	16,23	1,88
25. <i>P. 'Crispum peach'</i>	11,89	-	61. <i>P. 'Robert lem. rose'</i>	9,56	-
26. <i>P. 'Cocolor lace'</i>	2,93	-	62. <i>P. scabroïdes</i>	1,18	0,55
29. <i>P. 'Lady Plymouth'</i>	4,71	-			

Le groupe 'Boisé' est caractérisé par 4 composés discriminants : l' $\alpha$ -phellandrène, l'allocimène, le  $\beta$ -phellandrène et le *trans*- $\beta$ -ocimène. L' $\alpha$ -phellandrène et le  $\beta$ -phellandrène sont deux isomères souvent décrits comme ayant une note boisée-poivrée et sont présents en grande quantité dans les variétés à très forte odeur de bois-muscade-poivre (tableau 21).

Tableau 21 | Pourcentages de l' $\alpha$ -phellandrène, du  $\beta$ -phellandrène et du para-cymène pour des *Pelargonium* à odeur boisé et autres

<i>Pelargonium</i>	$\alpha$ -phellandrène	$\beta$ -phellandrène	Ratio $\alpha$ -phell./ $\beta$ -phell.	para-cymène
11. <i>P. 'Pepper'</i>	4,63	1,50	3,1	10,21
57. <i>P. mutans</i>	3,31	0,99	3,3	9,93
13. <i>P. 'Clorinda'</i>	14,88	3,48	4,3	1,70
47. <i>P. 'Clorinda varieg.'</i>	17,24	3,37	5,1	1,61
37. <i>P. 'Royal oak'</i>	13,1	3,53	3,7	13,10
38. <i>P. quercifolium</i>	8,75	1,6	5,5	8,75
46. <i>P. 'Tomentosum chocolate'</i>	17,39	4,27	4,1	-
10. <i>P. tomentosum</i>	2,54	1,85	1,4	1,84

On observe dans le tableau 21 que le ratio  $\alpha$ -phellandrène/ $\beta$ -phellandrène est toujours très en faveur de l' $\alpha$ -phellandrène (3 à 5 fois supérieur).

Il est intéressant de noter que *P. tomentosum* (menthe verte) et *P. 'tomentosum chocolat'* (menthe poivrée) n'ont pas du tout la même concentration en  $\alpha$ -phellandrène et en  $\beta$ -phellandrène (respectivement 2,54%-1,85% et 17,39-4,27%). Cette différence donne probablement le côté poivré au *P. 'tomentosum chocolat'*. Le *P. 'Tomentosum chocolat'*, produisant beaucoup de phellandrène, n'a cependant pas été classé dans le groupe '**Boisé**' probablement parce que les molécules de menthone et d'isomenthone fortement présentes (29,02 et 21,36%) ont une odeur très puissante couvrant l'odeur des phellandrènes.

### II.2.3 Classification hiérarchique agglomérative

Nous avons ensuite effectué une classification hiérarchique agglomérative effectuée avec les distances euclidiennes et avec une méthode de liaison complète sur la matrice de 56 *Pelargonium* avec tous les composés. Le résultat sous forme de dendrogramme est présenté à la **figure 94**. On observe que le groupe '**Epices**' est divisé en deux, d'un côté les *Pelargonium* ayant une concentration très forte en méthyleugénol (~80% - 5 accessions) et de l'autre les *Pelargonium* ayant une concentration moins forte (~20% - 3 accessions) et pour lesquels d'autres composés sont en plus forte concentration.

On y observe aussi que 4 sur 5 *P. 'Menthe'* sont regroupés. Ils sont aussi proches de *P. 'Toussaint'* et *P. 'Candy dancer'*, que l'on soupçonne d'être en fait le même cultivar sous 2 noms différents, qui produisent aussi beaucoup de menthone et d'isomenthone. Le dernier *P. 'menthe'* est éloigné probablement à cause de sa forte concentration en  $\alpha$ -phellandrène.

Le groupe '**Rose**' est scindé en deux, ce qui est surprenant surtout pour des cultivars très proches comme les 4 cultivars 'rosat'. Les *P. cv. 'rosat Grasse'* et '*rosat Bourbon*' sont très proches sur le dendrogramme or le premier produit du 10- $\gamma$ -épi eudesmol et le deuxième du 6,9-guaiadiène. Ce ne sont donc pas les composés discriminants. Ces deux *P. 'rosat'* sont aussi proches des variétés *P. 'Crispy'* et *P. 'Velvet rose'* ainsi que de *P. 'Prince of Orange'* (citron). D'après les analyses, ces *P.* sont tous très riches en géraniol (25-42%) et plus pauvres en citronellol (10-20%), comparativement aux autres *Pelargonium* du groupe '**Rose**' qui sont plus riches en citronellol (~30%) et plus pauvres en géraniol (<10-20%) (**tableau 22**). C'est à cause de ce critère qu'ils sont éloignés dans le dendrogramme.

Les deux accessions '**Butyrate**' (*P. glutinosum* et *P. 'Filicifolium'*) sont séparées alors qu'ils ont beaucoup d'esters de butyrate en commun (Butyl butyrate, Hexyl butyrate, Trans-2-Hexényl butyrate, Heptyl butyrate) dont la somme représente respectivement 20,29 et 25,57 %. Cependant, *P. glutinosum*

possède en sus un certain nombre d'autres molécules en grandes proportions, comme l'alloaromadendrène (7,15%), le bicyclogermacrène (8,79%) et le nérolidol (9,71%), ce qui le rapproche de certains *P.* 'Boisé'. Ces molécules sont beaucoup moins présentes chez *P.* 'Filicifolium' qui produit d'autres composés spécifiques comme le viridiflorène (8,48%), le spathulénol (4,22%).

Le groupe 'Boisé' est relativement homogène même s'il regroupe les 'Butyrate' à cause de leur production commune de nombreux sesquiterpènes.

Enfin, les trois *Pelargonium* 'Floral' sont dispersés dans la figure. Apparemment, même si leur odeur est qualifiée de proche par les parfumeurs, celle-ci semble provenir de molécules très différentes qui ne permettent pas de les rassembler au niveau biochimique.

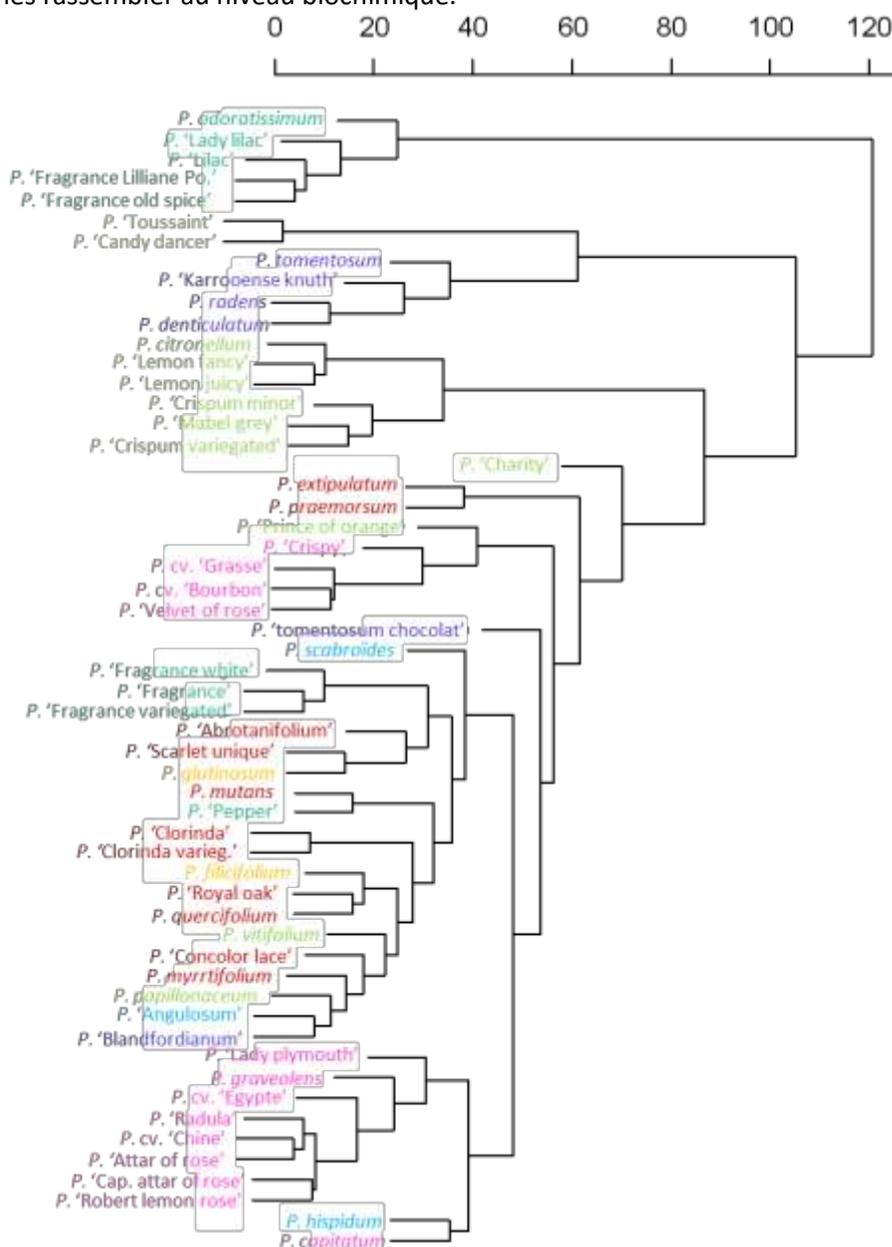
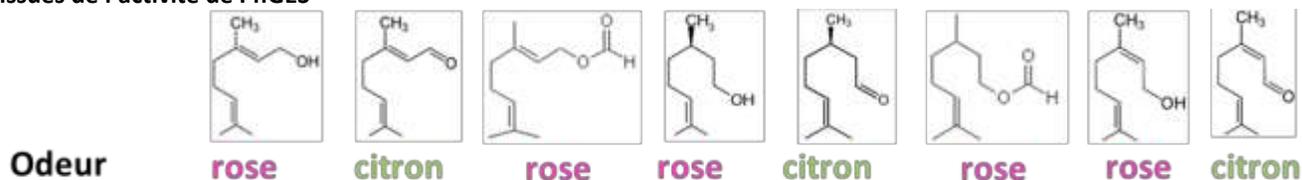


Figure 94 | Dendrogramme issu d'une classification hiérarchique effectuée avec une distance euclidienne et avec une méthode de liaison complète. Pour ce dendrogramme, les compositions chimiques de 56 accessions de *Pelargonium* représentant 191 composés ont été utilisées. Les variétés classées 'fruité' et 'aromatique' ont été

- Résultats II : Diversité des COV dans le genre *Pelargonium* -

**Tableau 22 | Composition chimique (en % du total des composés) des *Pelargonium* à odeur de rose et de citron, avec un focus sur les molécules potentiellement issues de l'activité de PhGES**



Σ<sub>GES</sub> = Somme de tous les composés potentiellement issus de l'activité de PhGES

Pelargonium	Géranol	Géranial	Géranyle formate	Citronellol	Citronellal	Citronellyl formate	Nérool	Néral	ΣGES
<i>P. capitatum</i>	-	-	0,26	5,73	0,11	23,97	-	-	31,18
<i>P. graveolens</i>	0,64	-	-	34,74	1,35	-	-	-	37,20
<i>P. cv. 'rosat Bourbon'</i>	24,30	2,87	8,07	16,76	0,31	7,99	-	0,44	66,91
<i>P. cv. 'rosat Chine'</i>	8,05	1,52	1,50	34,48	0,93	14,13	-	-	66,74
<i>P. cv. 'rosat Egypte'</i>	13,34	1,39	4,66	29,03	0,62	9,97	0,39	0,64	66,61
<i>P. cv. 'rosat Grasse'</i>	25,61	1,84	4,83	21,90	0,26	6,69	-	-	64,37
<i>P. 'Toussaint'</i>	0,23	2,48	-	39,19	8,00	-	-	-	50,96
<i>P. 'Candy dancer'</i>	0,45	2,48	-	38,48	7,60	-	-	-	51,52
<i>P. 'Prince of orange'</i>	22,95	0,45	0,13	-	-	-	0,54	0,13	50,12
<i>P. citronellum</i>	0,83	63,30	-	-	-	-	1,53	15,91	81,62
<i>P. crispum</i>	16,46	34,18	1,65	-	-	-	3,19	17,78	77,65
<i>P. 'Mabel grey'</i>	6,89	49,5	-	-	-	-	2,00	15,45	73,91
<i>P. 'Lady plymouth'</i>	1,6	0,29	0,88	23,71	0,76	10,28	-	-	48,68
<i>P. 'Lemon juicy'</i>	3,72	61,57	-	0,22	-	-	-	23,66	89,91
<i>P. 'Attar of rose'</i>	8,68	1,37	2,16	33,22	0,78	12,33	-	-	66,69
<i>P. 'Radula'</i>	10,58	2,01	2,43	31,38	0,78	11,49	-	0,44	65,31
<i>P. 'Velvet rose'</i>	20,34	2,63	3,49	25,05	0,36	11,13	-	0,67	66,99
<i>P. 'Crispy'</i>	42,27	1,55	0,05	10,11	0,21	-	-	0,24	60,96
<i>P. 'Capitatum attar of rose'</i>	5,25	2,47	1,3	32,96	1,19	11,07	-	-	54,82
<i>P. 'Crispum variegated'</i>	-	39,18	-	-	-	-	-	19,63	59,82
<i>P. 'Lemon fancy'</i>	4,43	57,26	-	0,23	-	-	-	18,63	80,62
<i>P. 'Robert lemon rose'</i>	3,88	1,02	2,25	29,65	1,22	14,48	-	0,57	61,47

### II.3 Analyses après classification des COV par voie de biosynthèse

Les analyses faites directement sur l'ensemble des composés ont déjà montré de fortes corrélations entre l'odeur des *Pelargonium* et leur biochimie. Néanmoins, la meilleure technique de mesure des distances pour comparer les espèces entre elles est la présence et l'absence de molécules faisant référence à l'existence ou non de la voie de biosynthèse et non une mesure quantitative (Levin et al. 2003).

Nous avons donc rassemblé en une seule dénomination les molécules issues de la même voie de biosynthèse. Pour la constitution de ces groupes, nous nous sommes aussi servi des résultats obtenus lors de la caractérisation des terpène synthases (résultat I). Nous avons cependant gardé le caractère quantitatif lié à ces molécules car les reliant à l'odeur, le poids relatif de chaque groupe biosynthétique est important. En effet, tous nos *Pelargonium* étant très proches il est probable qu'ils partagent de nombreuses voies de biosynthèse.

Nous avons donc séparé les monoterpènes en fonction des terpène synthases et des carbocations obtenus suite à leurs activités (figure 95). Pour cela, nous nous sommes basés sur les revues de Degenhardt et al. (2009) et de Keszei et al. (2010). Nous avons constitué 8 sous-groupes dont les deux plus importants regroupent les molécules issues de l'activité potentielle de la GES (géraniol, géraniol, citronellol, citronellal, nérol...) et de la limonène synthase, LIMS (limonène, menthone, isomenthone, pipéritone...).

Les sequiterpènes ont été séparés en 7 sous-groupes selon la même logique que pour les monoterpènes (figure 96). Par exemple, nous avons rassemblé les molécules venant du squelette guaiane ( $\alpha$ -guaiène, 1(5), 1 1-guaiadiène, 6,9-guaiadiène) ou du squelette eudesmane ( $\alpha$ -elemène,  $\beta$ -élémenène,  $\beta$ -élémol, 10- $\gamma$ -épi eudesmol...) (de Kraker et al. 1998).

A cela s'ajoute 2 groupes qui ne sont pas des terpènes. Le groupe des molécules issues de la voie de benzénoïdes/phénylpropanoïdes (eugénol, méthyleugénol, méthylchavicol...) et le groupe comprenant des esters du butyrate (butyl butyrate, heptyl butyrate, octyl butyrate...) (figure 95).

Au total, 17 groupes ont ainsi été constitués englobant 101 composés représentant la très grande majorité des composés du *Pelargonium*.

- Résultats II : Diversité des COV dans le genre *Pelargonium* -

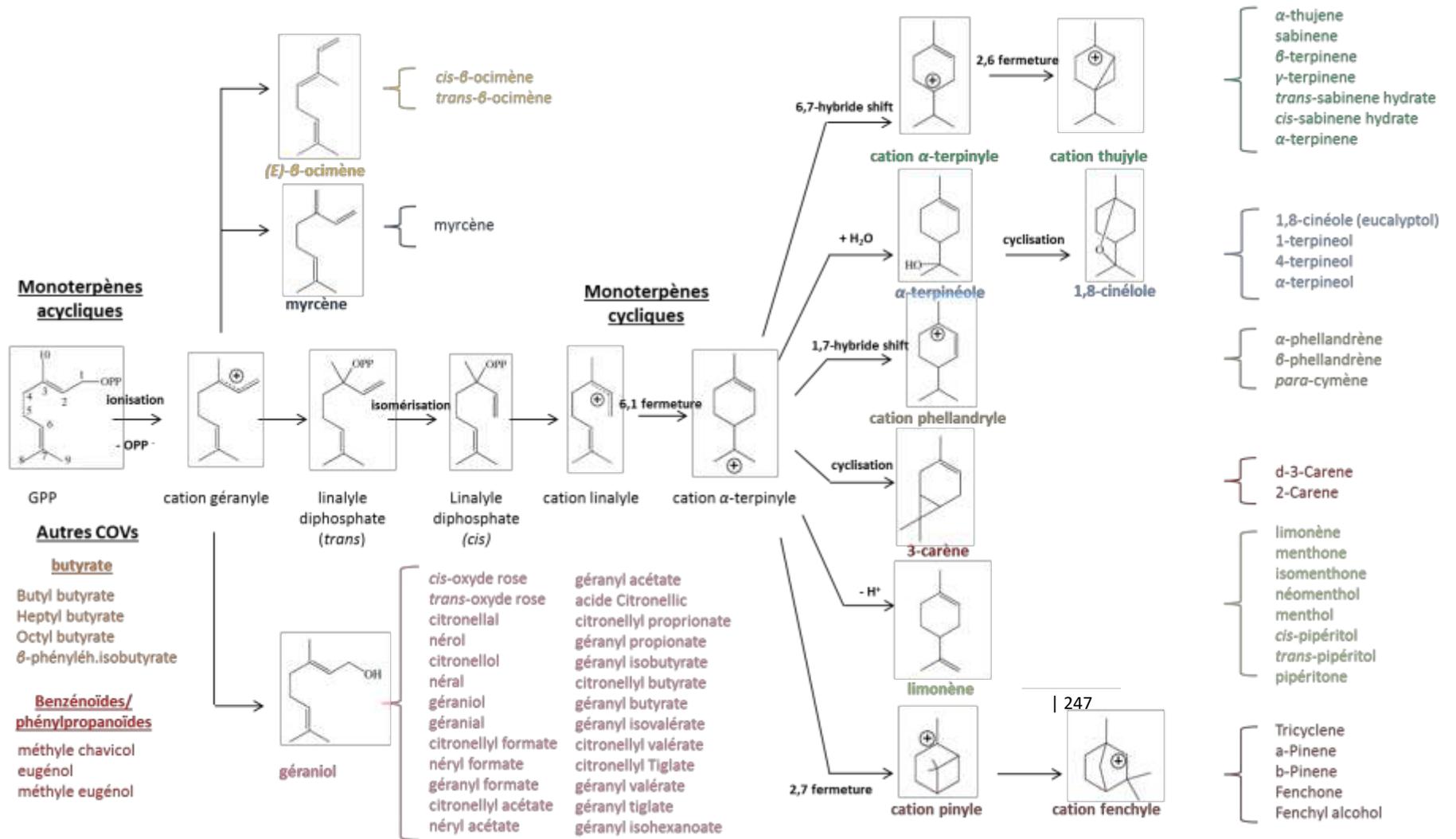


Figure 95 | Classement des principaux composés (monoterpènes, benzénoïdes/phénylpropanoïdes et dérivés d'acide gras) présents dans les extraits de *Pelargonium* en fonction de leurs voies de biosynthèse et de leur monoterpène synthèses putatives. Huit groupes de monoterpènes ont été définis, regroupant 57 monoterpènes et dérivés; 1 groupe de benzénoïdes/phénylpropanoïdes regroupant 4 composés et 1 groupe de 4 composés 'butyrate', ayant une odeur très caractéristique et représentant un descripteur olfactif.

- Résultats II : Diversité des COV dans le genre *Pelargonium* -

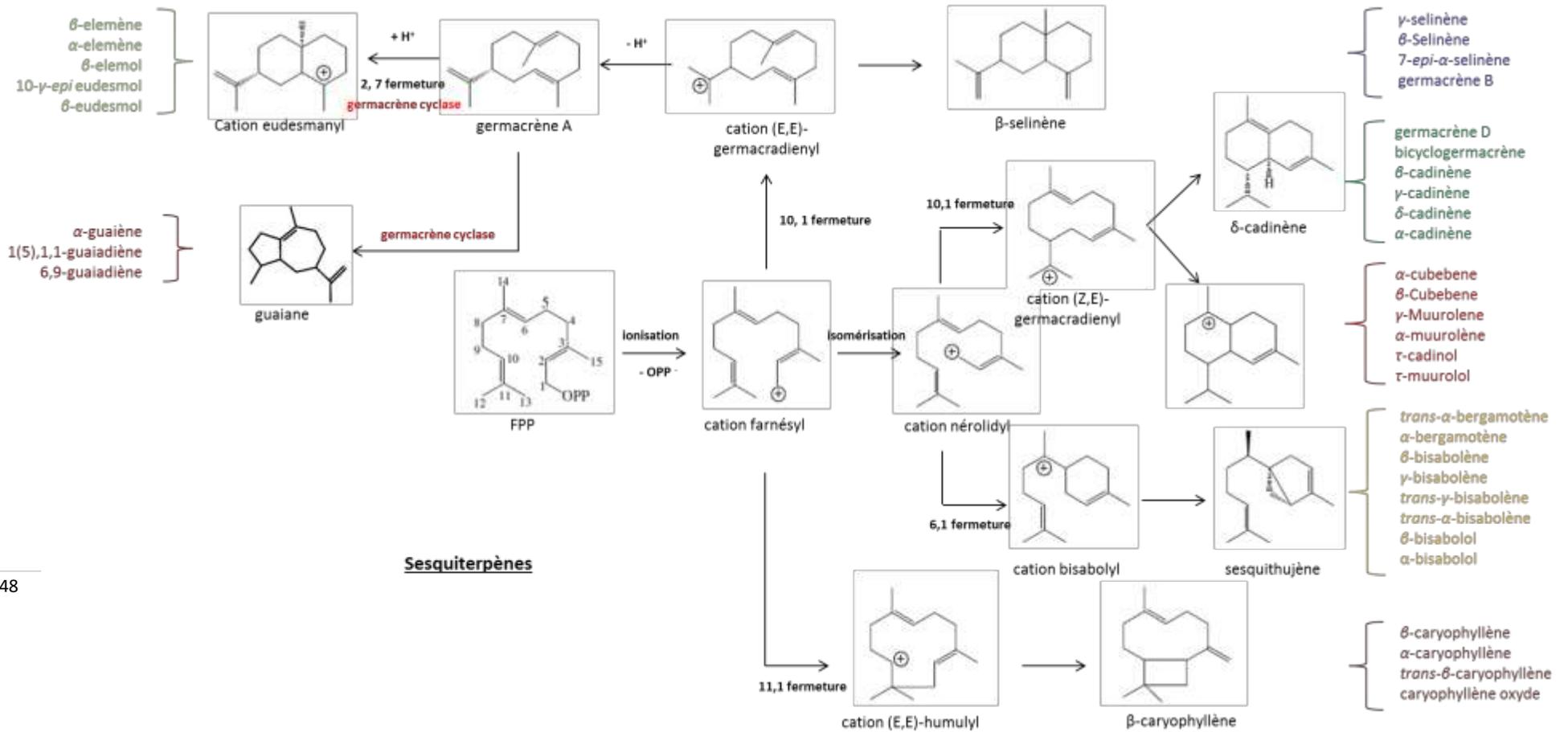


Figure 96 | Classement des principaux sesquiterpènes présents dans les extraits de *Pelargonium* en fonction de leurs sesquiterpène synthèses putatives. Sept groupes de sesquiterpènes ont été définis, regroupant 36 sesquiterpènes.

### II.3.1 Analyse en composantes principales

Une analyse en composantes principales a ensuite été effectuée après la classification des composés en groupes de biosynthèse. Le résultat de l'ACP est présenté en **annexe 43**. Les pourcentages explicatifs des variables des axes primaire (19%) et secondaire (14,7%) sont bien supérieurs à ceux obtenus précédemment dans les ACP. Nous avons donc une meilleure séparation des groupes même si certains groupes sont maintenant superposés. Cette observation sera expliquée lors de l'analyse discriminante.

### II.3.2 Analyse discriminante

Une analyse discriminante a aussi été effectuée après la classification des composés en groupes de biosynthèse. Les résultats sont présentés sur la **figure 97**. Les groupes 'rose', 'citron' et 'florale' sont superposés et une fois analysés avec le filtre des voies biosynthèses, il n'est plus possible de discriminer ces groupes. Dans ces groupes, l'odeur du citron, amenée notamment par les molécules comme le géraniol et le néral sont toutes issues de la GES (**figure 98**) qui est aussi responsable des molécules d'odeur rosée comme les géraniol, citronellol, nérol (**tableaux 22**)... Ces deux groupes rassemblent donc des *Pelargonium* très proches au niveau de leur biosynthèse. On observe aussi que l'étendue des groupes 'Rose' et 'Epices' s'est considérablement réduite ce qui signifie qu'ils sont mieux définis qu'avec les analyses précédentes.

Le groupe 'Epices' comprend 2 *Pelargonium* atypiques, *P.* 'Lady lilac' et *P.* 'Pepper'. *P.* 'Lady lilac' est morphologiquement très proche des *P.* 'Fragrance'. Si l'on regarde de plus près sa composition chimique, il a comme les autres *P.* 'Fragrance' une forte concentration en méthyleugénol (64%). Ce qui fait sa singularité c'est la présence en grande quantité d' $\alpha$ -bisabolol (9,85%) qu'il est seul à produire à l'exception de *P.* 'Prince of orange' (0,38%). Pour *P.* 'Pepper', il est étonnant que celui-ci ait été classé comme 'Epices' et non comme 'Boisé' par les parfumeurs, vu sa proximité avec ce groupe comme l'illustre l'analyse discriminante. Il est, en effet, très proche morphologiquement de *P. mutans*, dont il dérive certainement, et très proche chimiquement d'autres 'Boisé'. Il est possible que lors de l'évaluation des parfumeurs, le nom des cultivars ait influencé leur analyse. A leur décharge, celui-ci contient néanmoins beaucoup de phellandrène qui a bien une odeur poivrée, comme son nom le suggère. Les phellandrènes sont des molécules discriminantes pour ce groupe 'Boisé' comme le montre la **figure 98**. Un test à l'aveugle aurait peut-être permis de classer ce cultivar dans le groupe 'Boisé' et d'améliorer encore les résultats de l'ACP pour ces deux groupes.

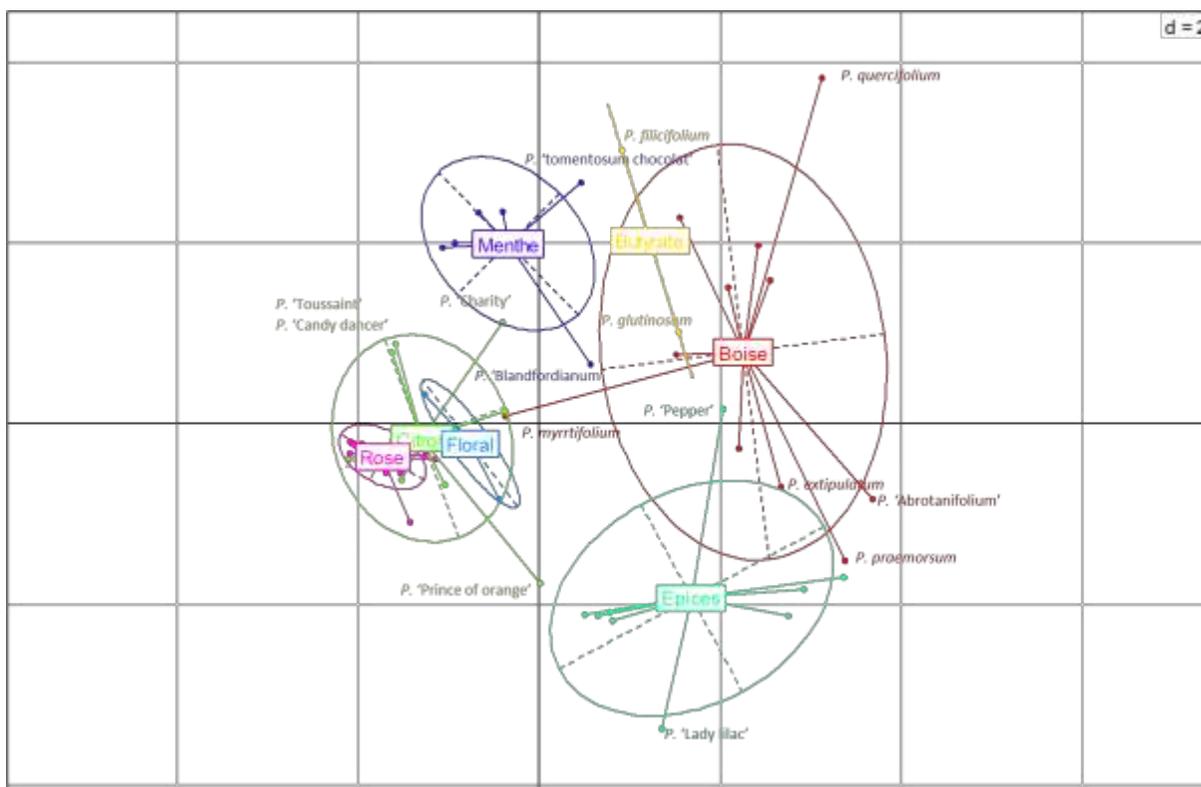


Figure 97 | Analyse discriminante de 56 *Pelargonium* après classification des composés selon les voies de biosynthèse. Les principaux composés chimiques (101) ont été regroupés en 17 groupes représentant les voies de biosynthèse principales. Les variétés classées 'fruité' et 'aromatique' ont été éliminées. Analyses réalisées avec le package R mixPmics. La proportion de variation expliquée par l'axe des abscisses est de 36% et de 17% pour l'axe des ordonnées.

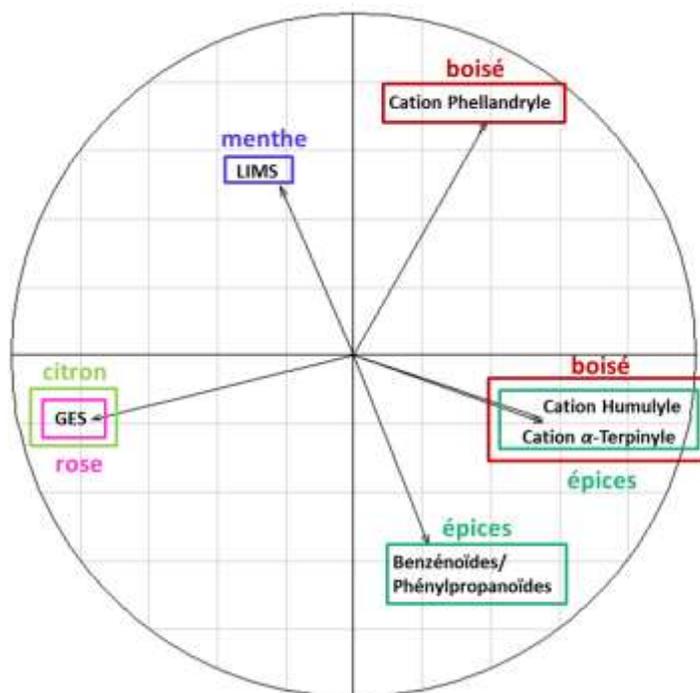


Figure 98 | Cercle des corrélations des composés les plus discriminants (coefficient VIP supérieur à 1). Analyse des groupes olfactifs 'menthe', 'citron', 'rose', 'floral', 'épice', 'butyrate', 'boisé' dont les principaux composés (101) sont classés en 17 groupes en fonction des voies de biosynthèse.

Le groupe **'Boisé'** est toujours très étendu à cause de l'extrême hétérogénéité des *Pelargonium* le composant. Certains *Pelargonium* sont atypiques comme *P. myrrtifolium*, très proche de l'ensemble 'rose-citron-floral'. *P. quercifolium* est aussi un peu éloigné à cause des concentrations élevées en  $\alpha$ -phellandrène (8,75%),  $\beta$ -phellandrène (1,6%) et *para*-cymène (10,2%) très discriminants pour ce groupe. Remarquons aussi sa grande concentration en  $\beta$ -élémol (7,82%), présent aussi chez *P. 'Royal oak'* (3,09%) qui est certainement issu de *P. quercifolium*. Il a aussi une concentration élevée en heptyl butyrate (8,75%) présent à moins de 0,5% chez les autres *P.* de ce groupe et qui contribue à le rendre atypique. *P. extipulatum*, *P. 'Abrotanifolium'* et *P. praemorsum* sont proches les uns des autres et chez tous on observe de grandes concentrations en  $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -pinène qui sont responsables des notes boisées. Il est cependant intéressant de noter que les proportions  $\alpha$ -pinène/ $\beta$ -pinène chez *P. extipulatum* (38%-13%) et chez *P. praemorsum* (8%-32%) sont inversées. Des terpène synthases pour chaque composé ayant été caractérisées (**annexe 16**), il est probable que nous ayons affaire à deux terpène synthases régulées différemment pour ces deux espèces botaniques.

Le groupe **'Menthe'** est bien identifié comme très discriminé par les composés issus de l'activité de la limonène synthase (**figure 98**). En effet, toutes les molécules du type menthe (menthone, isomenthone, menthol...) sont des molécules qui viennent de la LIMS (**figure 45 – introduction**). *P. 'Tomentosum chocolat'* se rapproche du groupe 'Boisé' à cause de sa concentration importante en  $\alpha$ -phellandrène et  $\beta$ -phellandrène comme déjà vu plus haut. *P. 'Blandfordianum'* est proche des deux axes et il ne présente pas de profil très caractéristique et produit de nombreuses molécules mais en faible concentration par rapport aux autres *Pelargonium*.

Dans le groupe **'Citron'**, *P. 'Toussaint'* et *P. 'Candy dancer'* sont proches et éloignés du barycentre à cause leur production importante d'isomenthone (35,57% et 36,13%). Il est probable qu'il s'agit d'une seule et même variété. *P. 'Charity'* est encore plus proche du groupe **'Menthe'** car celui-ci produit 53% de pipéritone qui dérive du limonène tout comme le menthone et l'isomenthone (**figure 45 – introduction**). Néanmoins ce composé ne semble pas très puissant car il est complètement couvert par l'odeur de citron venant du citronellal pourtant biosynthétisé à hauteur de 2,34% couvrant aussi l'odeur de rose du citronellole (15,64%). L'odeur de citron est donc donnée par un composé présent à 2,34% ! *P. 'Prince of orange'* biosynthétise beaucoup de géraniol mais a néanmoins été classé dans le groupe **'Citron'** plutôt que dans le groupe 'rose' à cause du géranyl acétate (26%) qui lui donne une forte odeur fruitée.

### II.3.3 Classification hiérarchique agglomérative

Nous avons ensuite effectué une classification hiérarchique agglomérative effectuée avec les distances euclidiennes et avec une méthode de liaison complète sur ces 17 groupes pour les 56 *Pelargonium*. Le dendrogramme présente 3 grands clades (figure 99). Le premier regroupe les 5 *P. 'Epices'* ayant une concentration très importante en méthyleugénol (>64%). Les autres *P. 'Epices'* dont la concentration en méthyleugénol ne dépasse pas 25% (pourtant prépondérant pour l'odeur) sont très proches des '*Boisé*' car ils biosynthétisent tous beaucoup d' $\alpha$ -pinène, de  $\beta$ -pinène et de sabinène qui se retrouvent aussi chez les *Pelargonium* '*Boisé*'.

Le deuxième clade est celui des *Pelargonium* '*Rose*' et '*Citron*' qui ont en commun de biosynthétiser beaucoup de molécules issues du géraniol et donc produites à l'origine par la GES (30-90%) (tableau 22). On observe bien que *P. 'Toussaint'* et *P. 'Candy dancer'* sont très proches. Après ce traitement de données, on note qu'à présent, les 4 cultivars '*rosat*' sont tous très proches, ce qui n'était pas le cas sur le premier dendrogramme (figure 94). *P. cv. 'rosat Egypte'* et *P. cv. 'rosat Grasse'* forme un clade ce qui était attendu puisque ce sont les seuls à produire en quantité du 10- $\gamma$ -épi eudesmol.

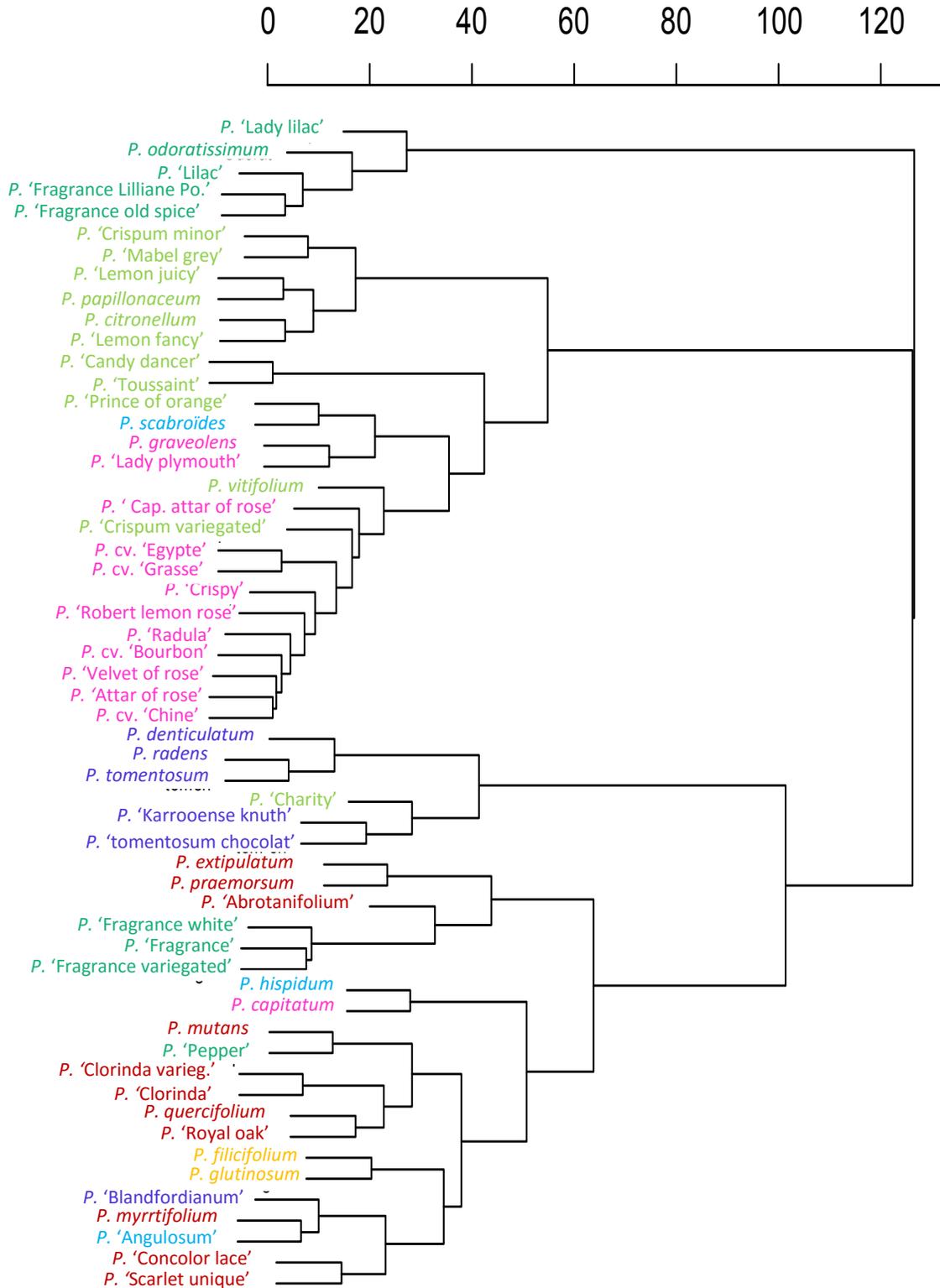
Il est aussi très intéressant d'observer que *P. cv. 'rosat Chine'* et *P. 'Attar of rose'* sont extrêmement proches, comme en témoigne leur ratio géraniol/citronellol ainsi que le pourcentage de 6,9-guaiadiène. *P. 'Attar of rose'* est probablement un *Pelargonium* venu de Chine et commercialisé sous un autre nom. *P. cv. 'Bourbon'* est aussi très proche de *P. cv. 'rosat Chine'* mais pas aussi proche qu'on aurait pu le penser car son ratio G/C est suffisamment différent pour que deux autres *Pelargonium* les séparent.

*P. quercifolium* et *P. 'Royal oak'* sont réunis sur le dendrogramme et ont une composition chimique très proche. Le nom complet de *P. 'Royal oak'* est en fait *P. 'Quercifolium royal oak'* d'après le conservatoire qui nous l'a fourni. Il s'agit donc seulement d'un cultivar aux feuilles panachées. Cette couleur panachée des feuilles a aussi été sélectionnée sur d'autres variétés comme *P. tomentosum* et *P. 'Tomentosum chocolat'*; *P. 'Pepper'* et *P. mutans* ou encore *P. clorinda* et *P. 'Clorinda variegated'*. Toutes ces paires sont réunies dans le dendrogramme à l'exception des deux *tomentosum*. On voit que ces manipulations affectent non seulement la morphologie de la feuille mais aussi la production des composés.

On observe enfin que les deux '*Butyrate*' sont maintenant dans le même clade car ils produisent beaucoup d'esters de 'butyrate', qu'aucun autre *Pelargonium* ne synthétise.

Ce traitement des données, a permis de mettre en évidence des différences très fines intra-groupe comme cela a pu être montré dans le groupe '*Rose*' et '*Citron*' même si on a perdu un peu de précision

entre les groupes pour l'analyse discriminante. Pour l'analyse en clustering, les résultats sont beaucoup plus précis que ceux de l'analyse brute.



**Figure 99 | Dendrogramme issu d'une classification hiérarchique effectuée avec une distance euclidienne et avec une méthode de liaison complète.** Pour ce dendrogramme, les 101 composés les plus importants des 56 accessions de *Pelargonium* ont été regroupés en 17 groupes représentant les voies de biosynthèses communes. Les variétés classées 'fruité' et 'aromatique' ont été éliminées.

### III. CONCLUSIONS

Ces analyses exhaustives réalisées sur 64 différentes variétés de *Pelargonium* ont donné de bonnes corrélations entre les descriptifs olfactifs et la biochimie. De plus, nous avons pu mettre en évidence sans équivoque des liens très forts de parenté entre différents hybrides, cultivars et espèces botaniques. Dans de nombreux cas, les liens unissant des variétés vraisemblablement issues d'un parent proche sont proches dans les analyses statistiques.

Ces analyses sont aussi très intéressantes pour comprendre les voies de biosynthèses. Par exemple, il n'y a pour l'instant aucune  $\alpha$ -phellandrène synthase caractérisée mais au moins 3  $\beta$ -phellandrène synthases pour les espèces *Abies grandis* (Bohlman et al. 1999), *Picea sitchensis* (Keeling et al. 2011) et *Lavandula angustifolia* (Demissie et al. 2011). Toutes ces phellandrène synthases produisent très majoritairement le  $\beta$ -phellandrène et un peu d' $\alpha$ -phellandrène. Pour les *Pelargonium*, ce ratio  $\beta/\alpha$  est inférieur à 1 et semble donc être inversé si l'on regarde les résultats des tests d'activités des autres phellandrène synthases. Par contre, si l'on regarde la structure de ces deux molécules (annexe 30), on voit que l'isomère  $\alpha$ -phellandrène a ses deux doubles liaisons sur le cycle aromatique alors que l'isomère  $\beta$ -phellandrène en a une sur le méthyle situé en position *para*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le  $\beta$ -phellandrène pourrait être produit en quantité importante par une  $\beta$ -phellandrène synthase, comme chez les autres plantes, mais que celui-ci s'isomériserait ensuite dans sa forme la plus stable l' $\alpha$ -phellandrène. D'autres MTPS donne aussi de l' $\alpha$ -phellandrène comme produit minoritaire comme la limonène synthase (Landman et al. 2007), la 1,8-cinéole synthase (Demissie et al. 2012) ou encore la fenchol synthase (Benabdelkader et al. 2015) mais pas dans les proportions rencontrées chez les *Pelargonium*.

Globalement, les molécules discriminantes sont des molécules qui ont une odeur en relation directe avec le groupe pour lequel elles sont discriminantes. Néanmoins, il se peut aussi que certaines molécules aient une odeur différente de celle du groupe qu'elles discriminent. Ces molécules sont donc des molécules très spécifiques de ce groupe et qui sont proches, au niveau de la biosynthèse, d'autres molécules ayant bien l'odeur caractéristique de ce groupe. Ces molécules peuvent donc servir de traceurs pour l'odeur des *Pelargonium*.

Nous voyons aussi que les informations obtenues après un traitement des données qui tient compte de nos connaissances sur les voies de biosynthèse peuvent être plus intéressantes que celles obtenues à partir des données brutes. C'est particulièrement le cas pour les cultivars 'rosat' dont l'information était brouillée à cause de molécules très proches présentes en très grandes concentrations.

Nous avons aussi montré que dans certains cas, une faible concentration d'un composé était prédominante au niveau de l'odeur comme pour les aldéhydes néral, géranial et citronellal à la forte odeur de citron. Il est bien démontré que toutes les molécules n'ont pas le même seuil de détection et que certaines sont très puissantes olfactivement. L'analyse chimique regroupe les cultivars selon leur composition chimique alors qu'au nez elles auront une odeur particulière, due à des composés qui peuvent être mineurs. Ceci trace la limite des regroupements que nous avons réalisés dans cette partie de la thèse.

Nous n'avons pas pu réellement exploiter le descripteur olfactif secondaire mais ces analyses sont tout à fait envisageables dans le futur. Peut-être aurions-nous défini des sous-groupes encore plus précis. Le nombre restreint de 9 descripteurs est aussi une des raisons pour laquelle certains groupes étaient très dispersés et l'utilisation d'autres descripteurs nous aurait probablement permis d'avoir encore une séparation plus fine.

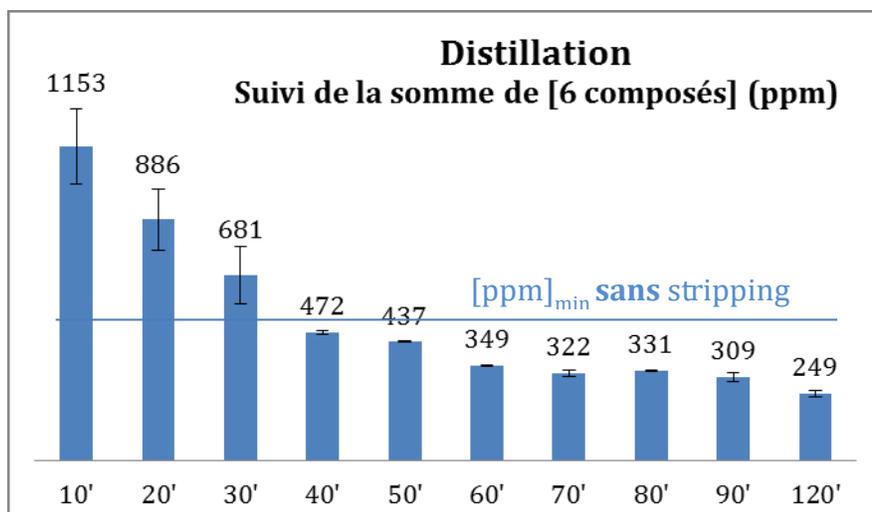


## I. AMÉLIORATIONS DU PROCÉDÉ D'EXTRACTION

L'action prioritaire que nous avons menée au niveau de la distillation a été de s'assurer qu'il ne restait que très peu d'HE dans les drèches en extrayant le matériel végétal à la fin de la distillation. e. Nous n'avons trouvé que très peu d'HE résiduelle confirmant que la distillation vapeur était efficace. Nous nous sommes donc concentré à optimiser le temps de distillation ainsi que l'opération de décantation car nous suspicions une perte importante d'HE non décantée.

### I.1 Optimisation de la distillation

Dans le but de vérifier l'efficacité de la distillation, une cinétique a été réalisée afin de visualiser le moment où le coût de production de vapeur devient plus important que le revenu lié à la production d'HE. Pour cela, des échantillons d'eau sortant du condenseur ont été extraits et analysés pendant la distillation (**figure 100**). Brièvement, La distillation de 1000 kg de *Pelargonium* cv. 'rosat Egypte' frais a été suivie durant 120 min. Des prélèvements d'échantillons de 100 mL d'eau de condensation (point 8 **figure 67 – Chapitre II**) ont été effectués toutes les 10 min. Ces eaux sont extraites selon le protocole décrit dans le chapitre matériel et méthodes et les concentrations des composés sont quantifiées à l'aide d'una analyse GC-FID. Ces extractions ont été réalisées sur trois distillations différentes. Les résultats sont présentés sous la forme de la somme des concentrations des 6 composés les plus importants : isomenthone, citronellol, géraniole, citronellyl formate, 10- $\gamma$ -épi eudesmol et linalol. Les analyses de la cinétique de distillation pour chacun des 6 composés sont présentées en **annexe 44**.



**Figure 100 | Cinétique de distillation du *Pelargonium*.** Les 6 composés représentant 75% du total des composés dont les concentrations en ppm sont suivies sont : linalol, isomenthone, citronellol, géraniole, citronellyl formate, 10- $\gamma$ -épi eudesmol. 100 mL d'eau de distillation ont été extraits. Ces extractions ont été réalisées sur 6 distillations différentes avec 3 réplicats pour chacune mesure. [ppm]<sub>min</sub> signifie la composition minimum en COV de l'eau de distillation pour que la distillation soit rentable.

Les analyses des HE obtenues toutes les 10 min ont aussi permis de s'assurer que distiller plus longtemps n'occasionnait pas de modifications de la qualité de l'HE. Aucune différence significative entre les qualités d'HE prélevées à différents temps n'a été observée. Une analyse plus fine en distinguant le comportement de chaque composé peut être faite (annexe 44). Ainsi, Le linalol est plus difficile à distiller. Le géraniol et le citronellol présentent des courbes de cinétique de distillation assez semblables et le fait d'arrêter plus tôt ou plus tard n'influence donc pas le ratio entre eux. L'isomenthone et le citronellyl formate se distillent quant à eux très rapidement et cela se confirme aussi dans l'HE qui est plus mentholée en début de distillation. Enfin, il est à noter que le 10-γ-épi eudesmol se retrouve en concentration assez constante tout au long de la distillation car, étant plus lourd, il est moins facile à distiller que les alcools monoterpéniques. La concentration minimale en COV que doit atteindre l'eau de distillation pour assurer une rentabilité se calcule comme suit :

- La production de 1000 kg de vapeur à 8 bars coûte 18 € (Tableau 23) et permet de distiller 500 min.
- Le coût de 1 min de distillation est donc de  $18\text{€}/500 = 0,036 \text{ €}$
- L'HE produite durant 1 min et donc sa valorisation potentielle dépend de la concentration en composés d'intérêt à chaque instant de la distillation. Il faut donc calculer la concentration minimale en HE que doit avoir l'eau distillée (prélevée après le condenseur au point 8 de la figure 67 au chapitre 2) pour que la distillation soit rentable. En tenant compte de l'efficacité de la distillation l'équation est donc la suivante :

$$0,036 \text{ (€)} < 2 \text{ (L)} * ([\text{ppm}]_{\text{min}} - [450] \text{ (mg.L}^{-1}\text{)/1000}) * (80 \text{ (€)/1000})$$

Donc,  $[\text{ppm}]_{\text{min}} > [675 \text{ ppm}]$

La distillation sera donc rentable si la concentration en HE de l'eau de distillation est supérieure à 675 ppm.

**Tableau 23 | Données concernant les coûts, les paramètres de distillation et le prix de l'HE**

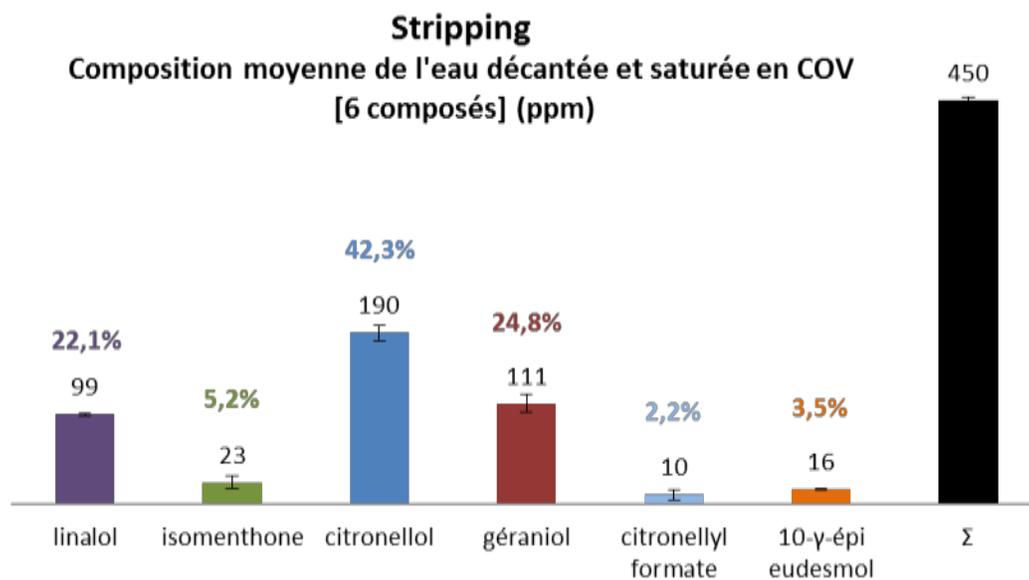
<b>Production de 1000 kg de vapeur d'eau</b>	<b>18 €</b>
<b>Valorisation de l'HE (1 kg)</b>	<b>80 €</b>
<b>Ratio de stripping<sup>98</sup></b>	<b>1/10</b>
<b>Débit de distillation</b>	<b>2 L.min<sup>-1</sup></b>
<b>Efficacité de décantation<sup>99</sup></b>	<b>[450 ppm]</b>
<b>Efficacité du stripping<sup>100</sup></b>	<b>[5 ppm]</b>

<sup>98</sup> Le ratio de stripping est la quantité de vapeur d'eau ascendante sur la quantité d'eau à stripper descendante.

<sup>99</sup> Efficacité de la distillation =  $[\text{ppm}]_{\text{max}}$  en composés en-dessous de laquelle l'huile ne décante pas. C'est la concentration de l'eau à saturation en composés organiques qui se fait après l'étape de la décantation.

## I.2 Optimisation de la distillation avec stripping

Dans beaucoup de distillations, l'eau après la décantation est toujours saturée en COV d'intérêts. En effet, ces composés sont soit à la limite de leur solubilité pour composés hydrophobes, ou alors ils ont une densité proche de celle de l'eau et il faudrait une décantation très longue pour les faire décanter. Il se peut aussi que ces composés soient hydrosolubles comme pour la rose, mais dans ce cas le stripping ne pourra pas aider à la récupération de ces derniers. Pour la distillation du Pelargonium, nous suspicions aussi qu'une partie des eaux de décantations (**point 10 figure 67 chapitre II**) contenaient des composés volatils, qu'il serait peut-être intéressant d'essayer de récupérer. Nous avons donc tout d'abord évalué l'intérêt économique d'une redistillation de ces eaux de décantation. Pour cela, une série d'échantillons ont été prélevés à la fin de la décantation, dans l'eau qui était jusqu'à présent jetée. Ces eaux ont été extraites avec du dichlorométhane en présence d'un standard interne pour quantifier les composés présents (**figure 101**).



**Figure 101 | Analyse de la composition moyenne des eaux de distillation après une distillation de 60 min.** 100 mL d'eau de distillation ont été extraits. Ces extractions ont été réalisées sur 6 distillations différentes avec 3 réplicats pour chacune des mesures.

Ces analyses des eaux jetées après la décantation montrent qu'une quantité importante de composés ne sont pas décanter et donc perdus. Ces composés sont en concentration maximale de saturation dans

<sup>100</sup> Efficacité du stripping = [ppm]<sub>max</sub> en composés qui n'arrivent pas à être strippés et sont donc déchargés. Cette analyse se fait dans les eaux épuisées de stripping.

l'eau (souvent très chaude) après l'opération de décantation. Abaisser la température de l'eau de condensation permettrait donc d'augmenter un peu le rendement en HE lors de l'étape de décantation mais il faudrait pour cela augmenter le débit d'eau de refroidissement alors que c'est une ressource rare dans le désert. Cette option n'est donc pas possible. L'installation d'une unité de stripping semblait donc la meilleure solution pour reconcentrer ces composés et permettre une deuxième décantation. L'appareil le plus indiqué pour cette opération est la colonne de stripping (**figure 68 chapitre II** et **annexe 45** pour le schéma industriel).

La concentration minimale en COV que doit atteindre l'eau de distillation pour assurer une rentabilité si l'on utilise une unité de stripping pour retraiter les eaux de décantation se calcule comme suit :

- La production de 1000 kg de vapeur à 8 bars coûte 18 € (**Tableau 23**) et permet de distiller 500 min. + 10% (18€) qui sont liés au coût du stripping. Le ratio de stripping est en effet de 1/10. Il faut donc environ 20 € pour distiller et stripper 500 min.

- Le coût de 1 min de distillation est donc de  $20\text{€}/500 = 0,04 \text{ €}$

- L'HE produite durant 1 min et donc sa valorisation potentielle dépend de la concentration en composés d'intérêt à chaque instant de la distillation. Il faut donc calculer la concentration minimale en HE que doit avoir l'eau distillée (prélevée après le condenseur au point 8 de la **figure 67**) pour que la distillation soit rentable.

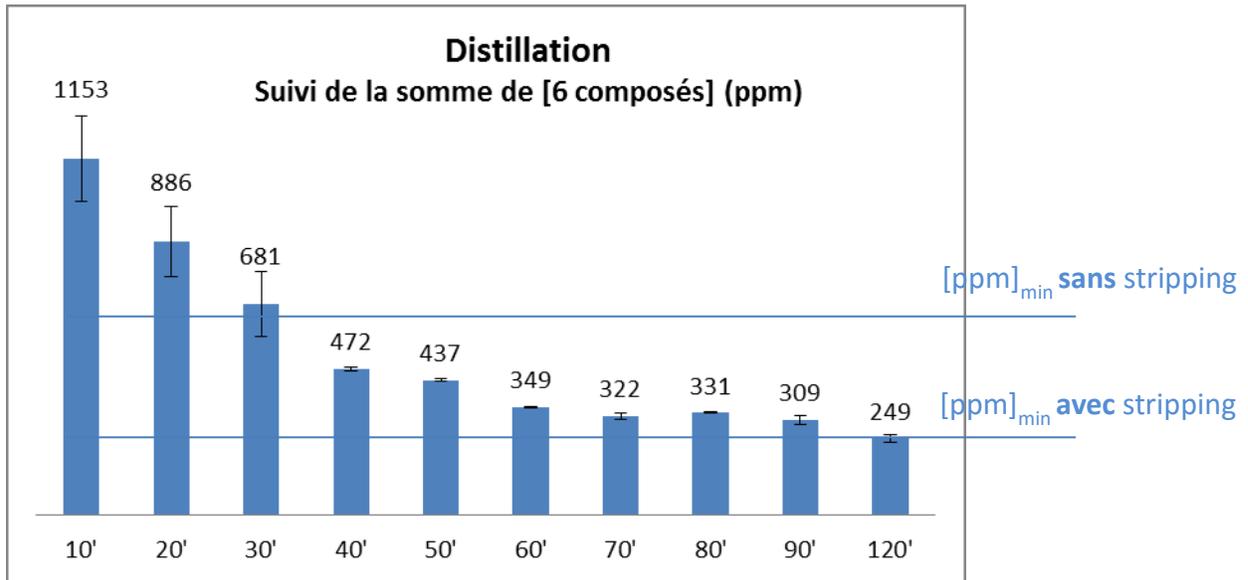
En tenant compte, cette fois de l'efficacité du stripping qui fait diminuer l'efficacité totale de l'opération de [450 ppm] à [5 ppm] avec seulement un rajout de 10% en dépense énergétique. L'équation est donc la suivante :

$$0,04 \text{ (€)} < 2 \text{ (L)} * ([\text{ppm}] \text{ (mg.L}^{-1})/1000) * (80 \text{ (€)}/1000)$$

Ce qui fait, **[ppm]<sub>min</sub> > [250 ppm]**

La distillation sera donc rentable si la concentration de l'eau de distillation est supérieure à 250 ppm.

L'utilisation du stripping nous permet donc de continuer la distillation jusqu'à 120 min alors que sans stripping, il est nécessaire d'arrêter la distillation après 40 min (**figure 102**). Ces résultats sont cependant à nuancer car la rentabilité dépend beaucoup du prix de l'énergie qui augmente actuellement en Égypte ainsi que de l'efficacité de chaque chaudière.



**Figure 102 | Cinétique de distillation du *Pelargonium* et concentration minimale en COV de l'eau de distillation pour une distillation équipée ou non d'une unité de stripping.** Les 6 composés représentant 75% du total des composés dont les concentrations en ppm sont suivies sont : linalol, isomenthone, citronellol, géraniol, citronellyl formate, 10-γ-épi eudesmol. 100 mL d'eau de distillation ont été extraits. Ces extractions ont été réalisées sur 6 distillations différentes avec 3 réplicats pour chaque mesure. [ppm]<sub>min</sub> signifie la composition minimum en COV de l'eau de distillation pour que la distillation soit rentable.

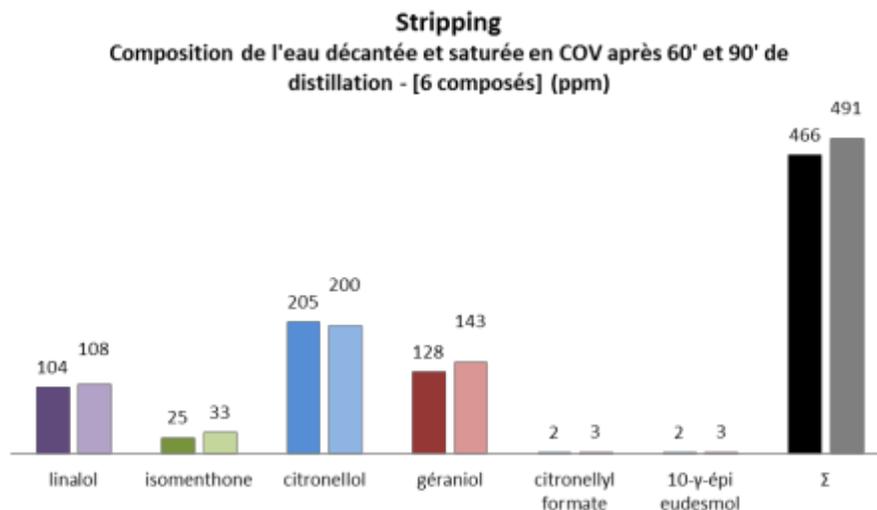
Le calcul de l'augmentation du rendement généré par l'installation d'une unité de stripping se calcule comme suit :

La concentration en COV de l'eau de décantation est de 450 ppm mais dans ce nombre, seuls les 6 composés les plus importants ont été dosés. Ceux-ci ne représentent que 75% du total de l'essence contenue dans les eaux de distillation. La concentration en COV totale de l'eau perdue est donc de 600ppm.

Grâce au stripping on récupère donc 71,4 g d'HE ( $[(595) \cdot 120] / 120$  (120 litres d'eau seront distillés en 60 min)).

Or, une distillation produit environ 1100 g d'HE, l'augmentation potentielle du rendement due au stripping est donc de 6,5% ( $((1100 + 71,4) / 1100) \cdot 100 - 100$ ).

Ensuite, nous avons aussi voulu vérifier la qualité de l'HE et l'intérêt de distiller jusqu'à 90 min au lieu des 60 min habituelles (figure 103). L'analyse des eaux extraites montre que la composition de l'HE est très similaire pour les 2 temps de distillation. On observe une légère augmentation de la concentration des composés à 90 min, probablement due à l'augmentation de température en fin de la distillation, qui augmente la solubilité des composés.



**Figure 103 | Analyse de la composition des eaux de distillation après 60 et 90 min de distillation.** 100 mL d'eau de distillation ont été extraits. Ces extractions ont été réalisées sur 6 distillations différentes avec 3 réplicats pour chacune mesure.

Nous avons finalement analysé l'influence du mélange de l'HE conventionnelle avec l'HE récupérée par stripping. Un essai pilote de stripping a été réalisé à Grasse sur environ 100 L et l'HE obtenue a été analysée. Les rendements théoriques, avec une augmentation de 6,5%, ont bien été confirmés. La composition chimique de l'HE issue du stripping est assez différente de celle de l'HE conventionnelle, par exemple, elle contient une concentration élevée de linalol. Cependant, un mélange des 2 types d'HE dans une proportion de 92/8 permet d'obtenir une HE conforme aux spécifications des parfumeurs. (annexe 46).

Le stripping est installé depuis 2 ans dans l'unité de distillation en Égypte et fonctionne parfaitement. Nous obtenons chaque année une augmentation de rendement de 7%. Quelques autres améliorations, plus mineures, du procédé de distillation ont aussi été réalisées mais ne seront pas décrites dans la thèse.

Les avancées les plus importantes en termes de rendement ont été réalisées sur la partie agricole et sont l'objet de la partie suivante.

## II. AMÉLIORATIONS DES PRATIQUES CULTURALES DU *PELARGONIUM* EN ÉGYPTÉ

### II.1 Amélioration des paramètres de la plantation

La plantation est une étape cruciale dans la culture du *Pelargonium* puisqu'elle représente une partie très importante du coût total et qu'elle conditionne aussi fortement le rendement à l'hectare final.

Nous avons tout d'abord observé une mortalité élevée des boutures, jusqu'à 60%, nous obligeant à replanter une deuxième fois dans une période non optimale. Le faible taux de reprise entraîne une faible couverture et donc un faible rendement par surface. Le coût lié à la plantation manuelle (420 00 boutures.Ha<sup>-1</sup>) et celui de replantation est très important, représentant 10% du coût total la première année.

Pour diminuer ce taux de mortalité élevé, nous avons planté systématiquement d'octobre à mi-novembre. A partir de mi-novembre, les nuits étant trop froides, les boutures ne s'enracinent plus correctement. La température optimale d'enracinement est comprise entre 17°C et 23°C. Nous avons également favorisé la formation des racines en les imbibant dans de l'eau additionnée d'une hormone d'enracinement, l'AIB à une concentration de 100 ppm. L'ajout de 2500 ppm de fongicide (Pilartop® qui remplace le Captane interdit par la législation européenne) empêche le développement des champignons. La préparation du terrain, avec par exemple l'humidification du sol, est aussi très importante (**annexe 47**). Nous avons enfin planté des boutures plus petites (4-5 nœuds) et effeuillées partiellement (3-4 feuilles restantes) pour minimiser la déshydratation de la bouture.

Toutes ces mesures ont permis d'abaisser le taux de mortalité à 5% et d'éviter une replantation coûteuse.

Le deuxième paramètre que nous avons fait varier est l'écartement des lignes de plantation. Une plantation plus serrée permet d'augmenter la production de biomasse par unité de surface. Elle permet aussi de limiter le développement des mauvaises herbes dont l'arrachage est très chronophage. Nous sommes ainsi passés de 15 000 à plus de 26 000 plantes.Ha<sup>-1</sup>. La mécanisation de cette étape de plantation est à l'étude.

Des essais de plantations en présence d'un paillage en plastique noir n'ont pas permis de réduire le développement des adventices car celles-ci perçaient systématiquement le paillage pourtant de bonne qualité (annexe 47). De plus cette technique n'a permis de réduire la consommation d'eau que de 5% car une fois le plant de *Pelargonium* bien développé, l'ombre portée par les feuilles joue le même effet que le paillage. Cette technique de paillage, très coûteuse, a donc été abandonnée.

Nos plantations sont irriguées par goutte à goutte et non par inondation, nous n'avons donc pas besoin de butter les plants de *Pelargonium* et la plantation se fait directement sur une surface plane. Des analyses des sols ont montré que les zones contenant plus d'argile donnaient de meilleurs rendements et que les plantes souffraient moins du manque d'eau. En effet, l'argile a une capacité de rétention d'eau importante et contrebalance l'effet drainant du sable. Les parties des champs moins riches en argile ont donc été amendées avec de l'argile.

## II.2 Amélioration des paramètres de croissance

La croissance du *Pelargonium* est assez lente au début à cause de l'enracinement de la bouture mais aussi car les nuits dans le désert égyptien sont très froides de décembre à février. Ceci explique pourquoi il est impossible de faire 3 récoltes par an comme c'est le cas à l'île de la Réunion ou deux comme en Chine. En Egypte, la croissance reprend au mois de mars et est maximale en avril-mai. De plus il s'agit d'augmenter le rendement de la biomasse mais aussi de l'HE. Des photos prises à différentes périodes de l'année sont présentées en **annexe 48**.

Une recherche bibliographique résumée dans la revue *Blerot et al. (2015)*, nous a suggéré plusieurs amendements possibles. Ces amendements ont été testés en 2013 sur une surface réduite mais permettant d'effectuer une distillation industrielle (utilisation de 800 à 1000 kg de végétal). L'année 2014 nous permettrait ensuite de confirmer ces résultats, d'affiner les traitements, voire de combiner ceux-ci. Le meilleur traitement de 2014 serait alors répliqué à grande échelle sur plusieurs hectares en 2015.

### II.2.1 Rendements obtenus en 2013

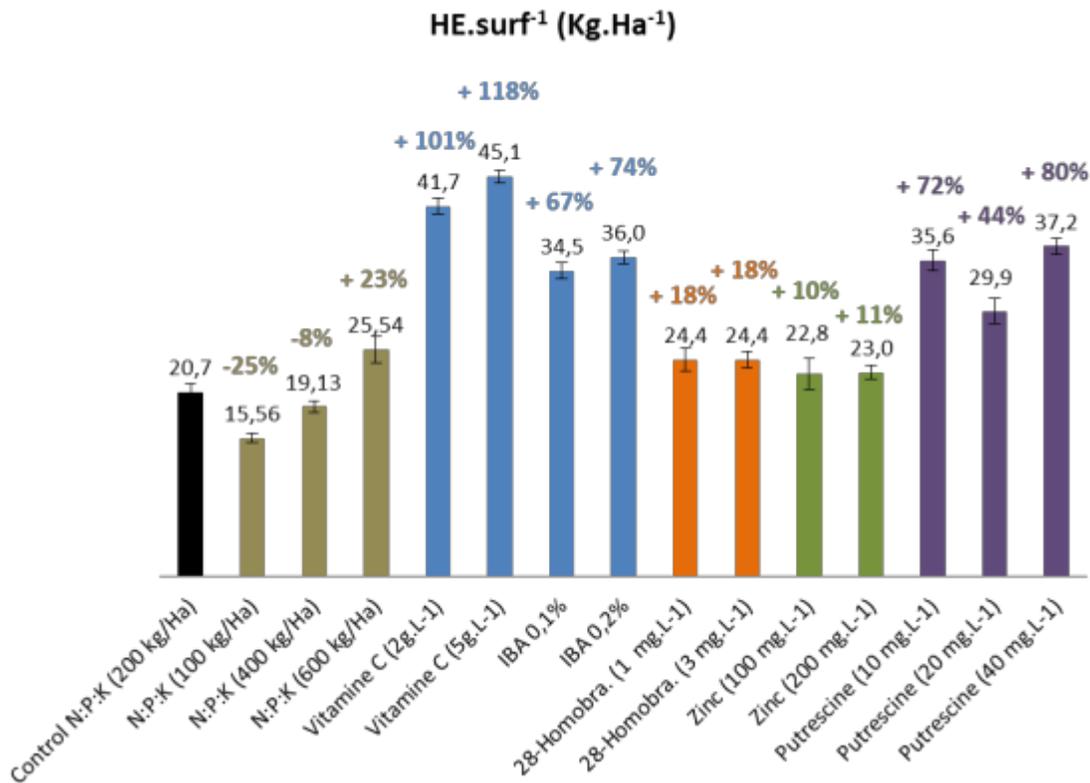
Les résultats concernant la quantité de biomasse et le rendement en HE pour 14 traitements différents sont donnés en totalité en **annexe 49**. Plusieurs observations peuvent être faites.

Le rendement en biomasse végétale augmente généralement lorsque l'on augmente la quantité d'engrais (de 100 à 600 kg.Ha<sup>-1</sup>). La valeur maximale est atteinte avec une quantité de 600 kg.Ha<sup>-1</sup>. Par contre le changement de fertilisation n'a pas d'effet sur le rendement en HE. Avec une fertilisation à 600 kg.Ha<sup>-1</sup> d'engrais, on a finalement une production en HE par unité de surface supérieure de 23% par rapport à la concentration habituelle de 200 kg.Ha<sup>-1</sup> (**figure 104**).

Les traitements avec des agents d'enracinement montrent des tendances identiques (AIB et vitamine C, **annexe 49**), avec une augmentation importante du rendement en d'HE/T poids frais (**annexe 49**). Il est à noter que ces parcelles ont été les dernières à être distillées durant la journée et ont donc passé un peu plus de temps après la coupe (environ 3 heures) avec une perte d'eau potentielle, sûrement minime (préfanage). Par contre, le rendement en HE par unité de surface (**figure 104**), qui n'est pas influencé par le préfanage est aussi fortement augmenté. Ce résultat devra être confirmé en 2014.

Les résultats du traitement au 28-Homobrassinolide et au zinc donnent des résultats similaires et en accord avec la littérature. La **figure 104** nous montre une légère augmentation totale de l'HE produite par surface mais étant donné que la concentration par kg de biomasse fraîche est inférieure, le gain sera probablement compensé par une plus grande consommation énergétique, plus de main d'œuvre nécessaire... Il est par contre intéressant de coupler ces traitements bénéfiques pour la croissance végétale avec un traitement jouant sur la concentration en HE (vitamine C ou putrescine). Ces essais seront menés en 2014.

Le dernier traitement concerne la pulvérisation foliaire de putrescine à différentes concentrations. Les résultats en **annexe 49** montrent une augmentation à la fois de la biomasse mais aussi de la production d'HE par kg de biomasse. C'est l'un des traitements les plus efficaces pour augmenter le rendement en HE par unité de surface (**figure 104**).



**Figure 104 | Rendements en kg d'HE par Ha obtenus sur les différentes parcelles expérimentales en 2013.** La barre noire représente les résultats obtenus sur les 6 parcelles contrôle. Les barres brunes présentent la fertilisation en NPK, les barres bleues les traitements aux agents d'enracinement, les oranges aux phytohormones, les vertes concernent les résultats obtenus avec une pulvérisation foliaire de zinc et les barres mauves l'utilisation de la putrescine. Les barres d'erreur représentent l'écart type (n = 3).

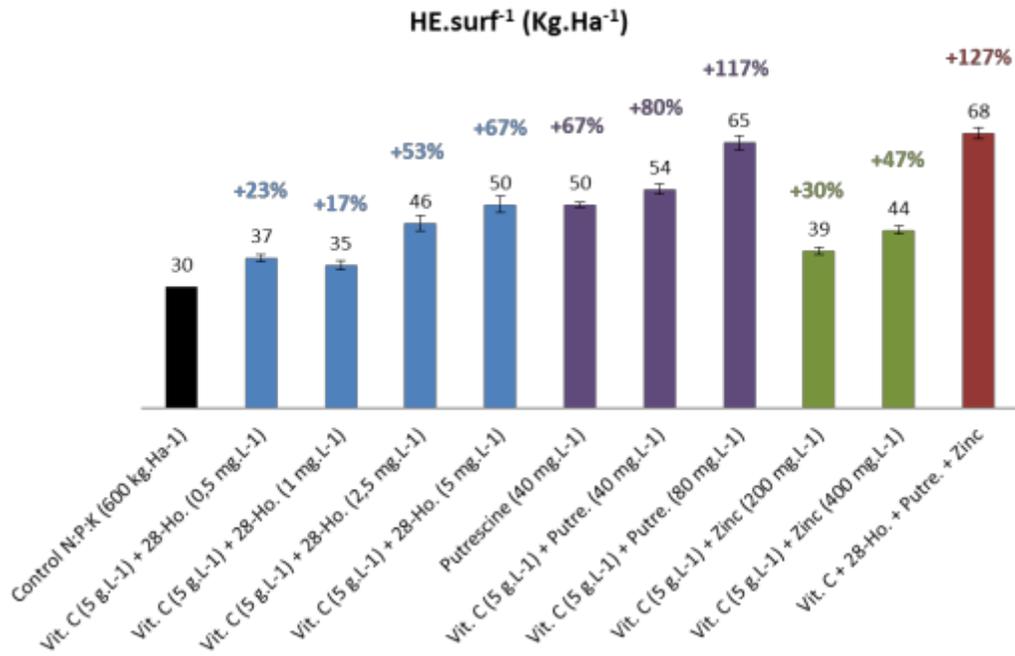
## II.2.2 Rendements obtenus en 2014

D'une manière générale, les résultats de 2014 confirment ceux de 2013. Nous avons utilisé une fertilisation de 600 kg.Ha<sup>-1</sup> en NPK car elle avait donné les meilleurs rendements en 2013. De ce fait, tous les résultats en terme de biomasse sont légèrement supérieurs.

On observe une augmentation importante (~+ 70%) de la biomasse produite (**annexe 50, Figure 105**) pour les trois traitements suivants : putrescine (80 mg.L<sup>-1</sup>) + vit. C (5 mg.L<sup>-1</sup>) ; zinc (400 mg.L<sup>-1</sup>) + vit. C (5mg.L<sup>-1</sup>) et le mélange. De manière surprenante, les traitements avec le 28-homobrassinolide n'ont entraîné qu'une faible augmentation du rendement de la biomasse (-10 à + 32%) alors que les résultats de 2013 étaient plus nets. Il est cependant difficile de comparer car ce traitement est associé avec celui à la vitamine C qui n'avait pas eu d'effet sur le rendement en biomasse en 2013.

Au niveau de la quantité d'HE par kg de biomasse, les résultats sont assez similaires pour tous les traitements et les rendements sont tous supérieurs au contrôle (+ 25 - 30%) sauf pour le traitement au zinc. Les résultats pour le zinc confirment ceux de 2013 ; ce traitement avait donné de très bons résultats en terme de quantité de biomasse mais de mauvais résultats en termes de quantité d'HE par kg de biomasse malgré l'ajout de la vitamine C.

Si l'on combine maintenant la production de biomasse et la quantité d'HE produit par kg de biomasse, on obtient le résultat qui nous intéresse le plus, à savoir la quantité d'HE produite par unité de surface (**figure 105**). Alors que la parcelle contrôle donne des résultats similaires à 2013 et comparables aux rendements d'une plantation conventionnelle en bordure de Nil, les résultats obtenus avec la putrescine (jusqu'à + 113%) confirment l'intérêt d'utiliser cette hormone.



**Figure 105 | Rendements en kg d'HE par Ha obtenus sur les parcelles expérimentales en 2014.** La barre noire représente les résultats obtenus sur les 3 parcelles contrôle, les barres bleues présentent les réponses aux agents d'enracinement ainsi qu'à l'utilisation du 28-homobrassinolide, les barres mauves présentent les résultats obtenus avec la putrescine seule ou en mélange avec la vitamine C, les vertes analysent les résultats obtenus lors de la pulvérisation foliaire du zinc et de la vitamine C et enfin la barre rouge présente les résultats pour la combinaison de l'ensemble des traitements (vit. C à 5 mg.L<sup>-1</sup>; 28-ho. à 2,5 mg.L<sup>-1</sup>; putrescine à 40 mg.L<sup>-1</sup>; zinc 200 mg.L<sup>-1</sup>).

### II.2.3 Rendements obtenus en 2015

Pour minimiser le nombre de traitements, nous avons choisi de conserver le traitement avec 80 mg.L<sup>-1</sup> de putrescine, sans ajout de vitamine C, mais avec un traitement à l'AIB pour l'enracinement des boutures.

Avec une plantation très serrée (30 cm x 30 cm), très peu de mortalité grâce à une maîtrise de la reprise en champ des boutures, un traitement optimisé et 3 ans d'expérience de plantation, nous avons obtenu de très bons résultats sur la parcelle expérimentale en 2015. En effet, en une seule coupe précoce en juin, nous avons produit en moyenne 65 kg.Ha<sup>-1</sup> d'HE avec une production totale de plus de 600 kg d'HE. Ce rendement de 65 kg d'HE à l'Hectare est très bon puisqu'en général en Égypte avec une coupe, les paysans obtiennent entre 30 et 40 kg.Ha<sup>-1</sup> d'HE, ce qui est comparable à 2 coupes en Chine et 3 coupes à l'île de la Réunion.

### II.3 Etude de l'impact de la taille sur le rendement en HE

Chez la plupart des plantes aromatiques, le développement des trichomes glandulaires qui sécrètent l'HE a lieu sur les jeunes feuilles. Lors de l'élongation de la feuille, les trichomes continuent à se former mais à une vitesse réduite par rapport à la croissance de la surface foliaire. La densité de trichomes sécréteurs est donc plus élevée chez les jeunes feuilles (Turner *et al.* 2000 a, b). Il pourrait donc être intéressant de faire varier la taille de la plante (figure 106) afin d'influencer le développement de jeunes feuilles. Une coupe précoce d'architecture pourrait avoir un effet sur la ramification des branches et sur le nombre de jeunes feuilles sur ces rameaux.

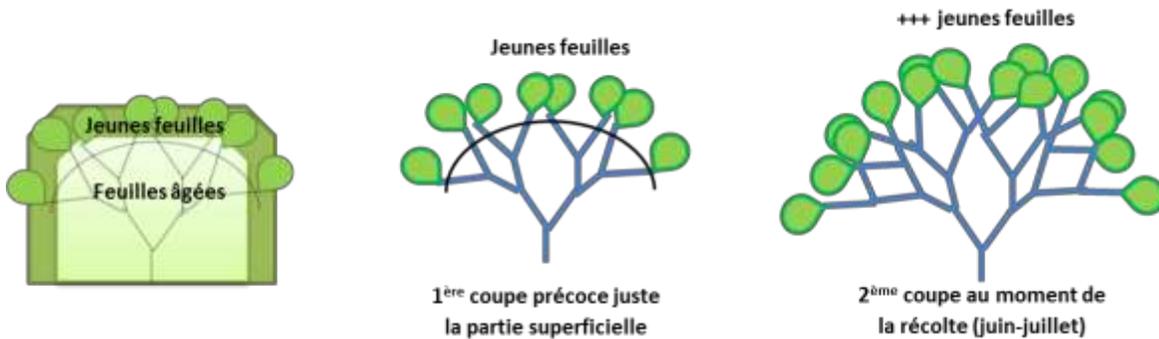


Figure 106 | Schéma représentant l'effet hypothétique d'une coupe précoce sur le développement des jeunes feuilles chez le *Pelargonium*

Pour tester si une taille pouvait être avantageuse, des analyses d'extraits hexane de COV de feuilles jeunes et de feuilles âgées ont été effectuées sur des plantes cultivées en champ en Egypte (voir Matériel et méthodes). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 107.

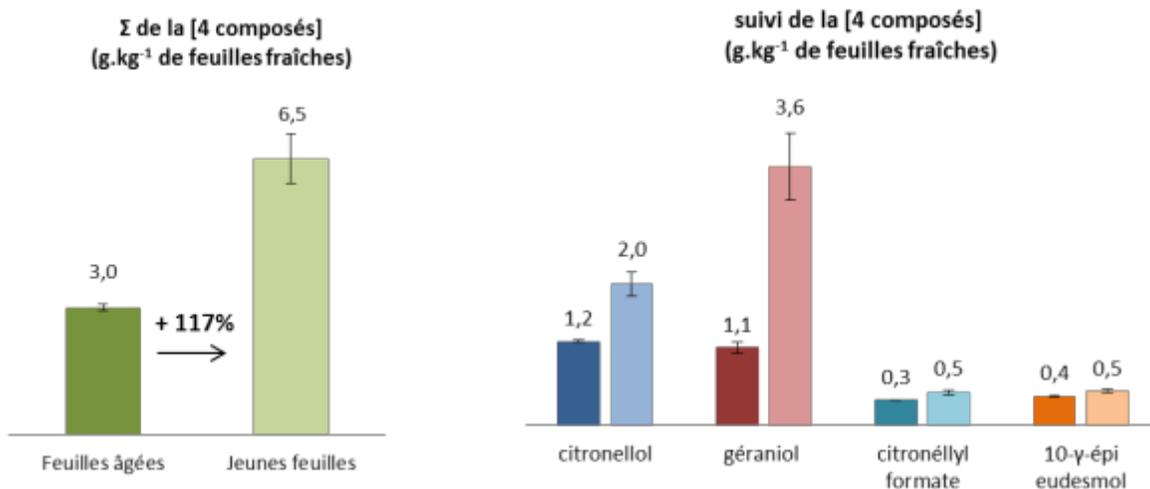


Figure 107 | Quantification de quatre composés majeurs dans les jeunes feuilles et les feuilles âgées extraites à l'hexane. Le graphique de gauche représente la quantité totale de ces quatre composés extrapolée pour un kilo de feuilles fraîches tandis que le graphique de droite donne la répartition par composés.

Les rendements en HE sont très élevés, 0,30% pour les feuilles âgées et 0,65% pour les jeunes feuilles. Ceci s'explique par le fait que lors d'une distillation commerciale (rendement environ 0,11%), la totalité de la plante est utilisée, avec les tiges qui sont beaucoup moins riches en HE. Le ratio poids de feuilles/poids de branches est d'environ 1/3. Lorsque l'on charge un alambic de distillation, on le charge donc à plus de 2/3 avec des branches qui ne contiennent pas ou très peu d'essence.

La **figure 107** montre que la concentration en essence dans les jeunes feuilles est plus de deux fois supérieure à celle des feuilles âgées. Cela confirme donc bien l'hypothèse d'une densité de trichomes plus élevée ou d'une biosynthèse de terpènes plus active dans les jeunes feuilles que dans les feuilles plus âgées. On aura donc tout intérêt à essayer de faire produire de nombreuses jeunes feuilles au *Pelargonium*. On peut imaginer une coupe très en surface mais réalisée plusieurs fois dans l'année.

Il est aussi intéressant de noter que les jeunes feuilles ont une concentration en géraniol bien supérieure à celle du citronellol, ce qui n'est pas le cas des feuilles plus âgées. Pour le citronellyl formate et le 10- $\gamma$ -épi eudesmol, les différences sont moins marquées. Ceci aura des conséquences sur la qualité de l'HE, qui seront commentées dans la partie discussion.

## II.4 Amélioration des paramètres de la récolte

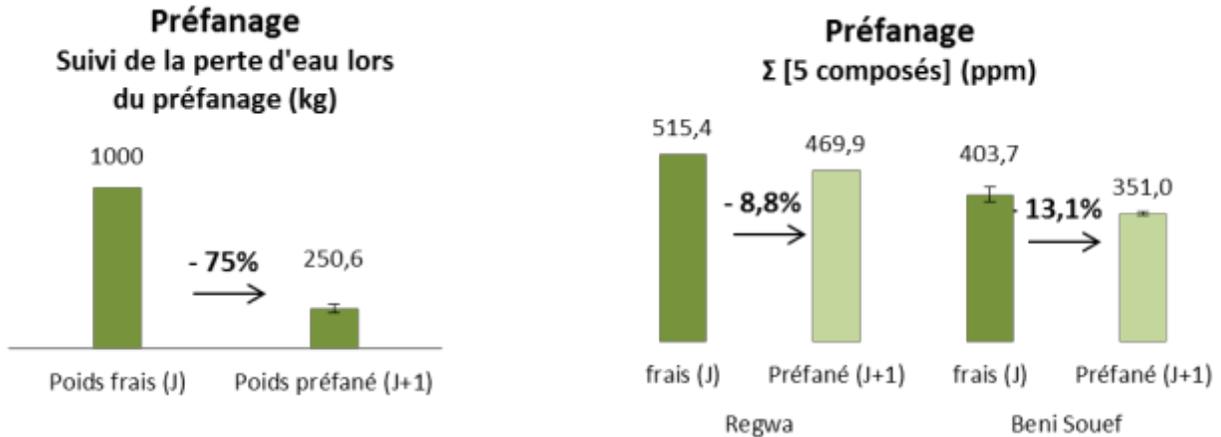
La récolte du *Pelargonium* en Égypte se fait de façon manuelle et une seule fois par an vers le mois de juillet (**annexe 51**). Choisir le moment de la récolte est crucial pour obtenir une concentration maximale en HE d'une qualité conforme aux standards (norme ISO et standards internes à IFF-LMR).

### II.4.1 Le préfanage

#### II.4.1.1 Expérience de préfanage en Égypte

Nous l'avons vu (paragraphe II.2.1 de l'introduction), le préfanage est une technique traditionnelle qui permet d'éliminer une partie de l'eau présente dans les feuilles de *Pelargonium* pour faciliter son transport jusqu'à la distillerie et optimiser sa distillation. Ayant notre propre distillerie et nos champs à proximité, nous avons voulu évaluer l'intérêt ou non d'un préfanage (qui est avéré pour un paysan situé loin de la distillerie et dépendant d'un distillateur privé).

Nous avons donc mis à préfaner au soleil pendant 24h 1000 kg d'un mélange de feuilles et de tiges de *Pelargonium*. Nous avons ensuite mesuré le poids après le préfanage, et la concentration en HE avec ou sans préfanage. Ces mesures ont été réalisées une seule fois à Regwa et deux fois à Beni Souef (**figure 108**).



**Figure 108 | Suivi de la perte en eau et en HE pendant l'opération de préfanage.** Le graphique de gauche représente la perte d'eau moyenne sur 3 lots de 1000 kg de *Pelargonium* exposés en plein soleil durant 24h. Le graphique de droite représente la somme de la concentration en HE de 3 lots pour les cinq composés majoritaires de l'essence pendant la même exposition.

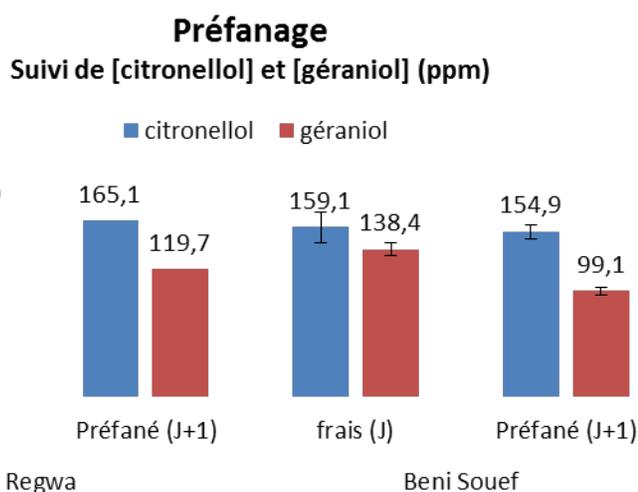
Le préfanage fait perdre environ 75% de son poids au *Pelargonium*. Compte tenu de la capacité de compression de la matière végétale, ce préfanage permettra de remplir un alambic de distillation avec environ 1,5 fois plus de biomasse. Sachant qu'il faut 120 kg de vapeur pour distiller 1000 kg de végétal (1 alambic) pour un coût de 2,20 €, le préfanage nous permettra de distiller 1500 kg avec la même quantité de vapeur et donc de réduire ce coût (de 3,3 à 2,20 €). Il faut aussi tenir compte de l'économie en temps de chargement, en occupation de matériel et en force de travail même si ces données sont difficilement quantifiables.

La **figure 108** montre que le préfanage entraîne aussi une perte de rendement en HE par unité de végétal de départ. Si l'on ne perd en moyenne que 10% d'HE (hypothèse basse), la perte due au préfanage est de :

$$(1100 * 1,5 * 10^{-1}) * (80/1000) = 13,2 \text{ € pour } 1500 \text{ kg de } \textit{Pelargonium} \text{ frais.}$$

Le préfanage ne se justifie donc pas dans notre cas.

La **figure 109** présente l'influence du préfanage sur les concentrations en géraniol et citronellol. Les autres composés ne présentent pas de modifications. On observe une baisse de la concentration en géraniol. Cette baisse peut être due au franchissement de la barrière cuticulaire par le géraniol, en particulier sous l'effet de la température ou, plus probablement, à l'éclatement d'un certain nombre de trichomes glandulaires, toujours sous l'effet de la chaleur. Il n'est pas possible de savoir si cette baisse concerne uniquement le géraniol. En effet, il est possible que les concentrations des deux composés diminuent de manière similaire et qu'une partie du géraniol soit converti en citronellol pendant le préfanage.



**Figure 109 | Suivi des pertes en citronellol et en géraniol pendant l'opération de préfanage**

#### II.4.1.2 Expérience de préfanage à Grasse

Une expérience similaire de préfanage a été réalisée à Grasse avec les deux cultivars *P. cv.* 'rosat Chine' et 'rosat Égypte' cultivés depuis 2 ans dans un champ expérimental. Dans ce cas, le préfanage s'est effectué en intérieur sous une température de 25°C et sans lumière solaire directe. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 110** pour la perte en poids des feuilles et dans la **figure 111** pour l'analyse chimique.

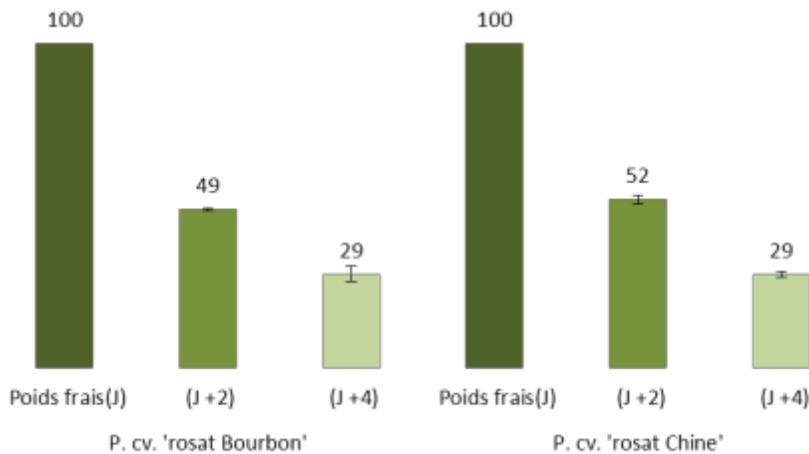
La **figure 110** montre que la perte en eau est beaucoup moins rapide que lors de l'expérience en Égypte, ce qui s'explique par la température très inférieure. Après quatre jours de préfanage, la même perte de poids est cependant atteinte (-71% pour l'expérience grasse et -75% en Égypte).

Les ratios géraniol/citronellol (C/G) sont standardisés pour les différents types d'HE commerciales. Pour l'HE Bourbon, le rapport obtenu dans notre expérience est légèrement supérieur à celui attendu (2,4

pour 1,3). Il est très proche du standard pour l'HE Chine (5,6 pour 5,1). La **figure 111** montre une diminution dès J2 de la concentration en géraniol, alors que celle du citronellol se maintient pendant 2 jours et jusqu'à 4 jours pour l'HE Bourbon. Les ratios C/G ont augmenté donc avec le temps de préfanage comme cela avait été déjà observé dans l'expérience réalisée en Égypte.

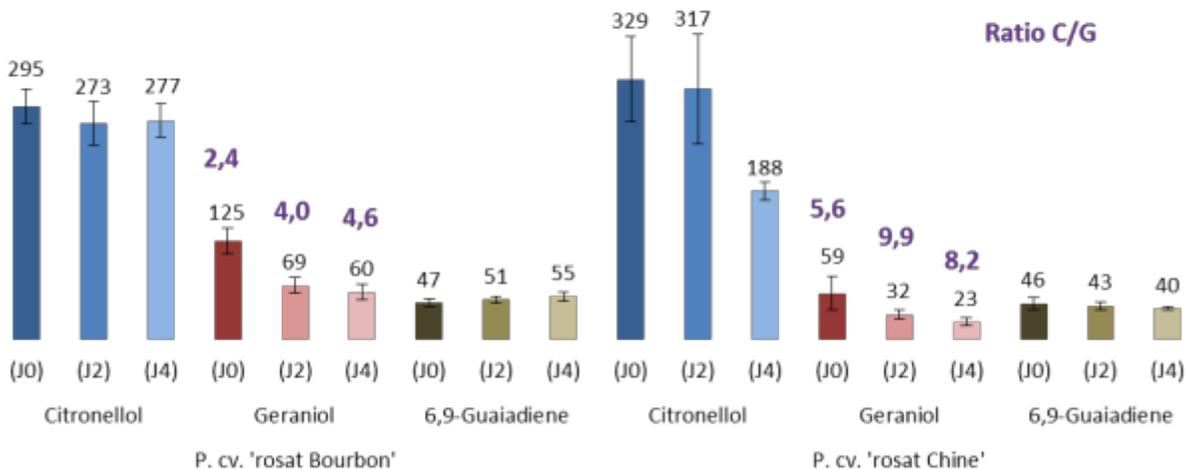
La concentration en 6,9-guaiadiène n'est pas affectée par le préfanage, probablement du fait de sa volatilité plus faible.

### Suivi de la perte d'eau lors du préfanage (g)



**Figure 110 | Suivi de la perte en eau pendant l'opération de préfanage à Grasse.** Le graphique représente la perte d'eau moyenne sur 3 lots de 100 g de *Pelargonium* cv. 'rosat Égypte' et 'rosat Chine' lors d'un préfanage à 25°C sans lumière solaire directe.

### Suivi des [citronellol], [géraniol] et [6,9-guaiadiène] (ppm)



**Figure 111 | Suivi de la perte en citronellol, géraniol et 6,9-guaiadiène pendant l'opération de préfanage.** Le graphique représente la perte en concentration moyenne sur 3 lots de 100 g de *Pelargonium* cv. 'rosat Égypte' et 'rosat Chine' lors d'un préfanage à 25°C sans lumière solaire directe.

#### II.4.2 La coupe

Traditionnellement en Égypte, les paysans ne font qu'une seule coupe au mois de juillet et replantent chaque année leur champ avec une partie du champ de l'année précédente non récolté. En effet, une surface de champ est multipliée par un facteur 20 par bouturage. Dans notre cas nous pouvons même multiplier la surface par 60 puisque nous n'avons presque plus de mortalité des boutures et pouvons donc planter 3 fois plus écarté qu'en culture traditionnelle. Nous avons donc testé la possibilité d'effectuer une deuxième coupe vers le mois d'octobre juste avant de replanter les champs. Pour cela, il est nécessaire de laisser plusieurs branches entières afin que la reprise soit meilleure et la première coupe est donc délicate. Les rendements en végétaux et en HE lors de cette deuxième coupe se sont révélés très inférieurs à ceux la première coupe (de 20% environ). De plus, cette deuxième coupe entraîne des surcoûts de désherbage, de récolte et de distillation, ainsi que l'immobilisation du terrain très cher en Égypte. Cette possibilité n'a donc pas été retenue.

Nous avons aussi évalué la possibilité de cultiver le *Pelargonium* comme une plante pérenne. En effet, une partie importante des coûts sont liés à la plantation et à l'installation des lignes d'irrigation. De plus, nous apportons tous les éléments nutritifs par fertirrigation puisque nous sommes sur un support pauvre, le sable. Le risque d'épuisement des sols, qui avait été observé à la Réunion, est donc faible. Cependant ; nous avons observé que les plantes se développent beaucoup moins bien en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> années. De plus, maintenir les champs d'une année sur l'autre est très coûteux en désherbage. La culture pérenne n'a donc pas été retenue.

Enfin, nous avons observé qu'un stress hydrique d'une semaine, avec arrêt de l'irrigation, augmentait le rendement en HE des *Pelargonium*. Cette pratique est très répandue en Egypte et nous prévoyons de quantifier son effet.

### II.4.3 La période de récolte

Un suivi des plantations par extraction de l'essence sur une petite échelle a été réalisé afin de déterminer la meilleure période de récolte. Les résultats de ces études préliminaires ne seront pas détaillés dans cette thèse. La conclusion principale est que la concentration en HE est maximale lors de la floraison. En 2015, nous avons observé un décalage de la floraison dans nos plantations (15 à 30 jours plus tôt que les années précédentes). Il est à noter que cette précocité s'est traduite par de très bons rendements en HE (65 kg d'HE.Ha<sup>-1</sup>) mais avec une modification de la qualité de l'HE (tableau 24).

**Tableau 24 | Comparaison de la composition, analysée par GC-FID (%), des HE de qualité conventionnelle (HE<sub>conv</sub>) avec l'HE produite en 2015 à Regwa récoltée précocement (HE<sub>Regwa</sub>)**

Composés	Spécifications IFF-LMR	HE <sub>conv</sub> Égypte	HE <sub>Regwa</sub> 2015	Effet
α-Pinène		0,35	0,72	
Limonène	< 0,4%	0,14	0,49	
Oxyde de rose cis	0,7-1,5%	0,81	0,69	↘ Hors spécification
Oxyde de rose trans	0,3-0,6%	0,32	0,24	↘ Hors spécification
Menthone	<2,1%	0,80	0,32	
Isomenthone	4-8%	4,95	5,95	↗
Linalol	4-8%	4,73	10,40	↗↗ Hors spécification
β-caryophyllène		1,30	1,01	
6,9-Guaiadiène	<0,5%	0,34	0,2	
Citronellyl formate	5-8%	7,32	6,43	↘
Géranyl formate	2-6%	3,39	4,31	↗
Citronellol	26-34%	28,37	20,75	↘↘ Hors spécification
Géraniol	11-18%	15,06	20,64	↗↗ Hors spécification
Géranyl butyrate	0,7-2%	1,47	1,13	
Géranyl tiglate	0,9-2%	1,50	1,56	
Phényléthyl tiglate	0,5-1,2%	1,01	0,92	
10-γ-épi Eudesmol	4.5-6%	6,75	4,76	↘

La différence de pourcentage est très importante dans le cas du géraniol, qui augmente (+5,6%) dans les mêmes proportions que le citronellol diminue (- 7,6%). Les dérivés de ces deux molécules, citronellyl formate et géranyl formate suivent les mêmes tendances. On observe aussi que la concentration d'isomenthone augmente alors que celle de la menthone diminue. Le dernier changement majeur est la concentration de linalol qui augmente de façon très importante et sort ainsi des spécifications.

Ainsi, cette récolte précoce a donné un rendement élevé mais a aussi changé de façon importante la qualité de l'HE.

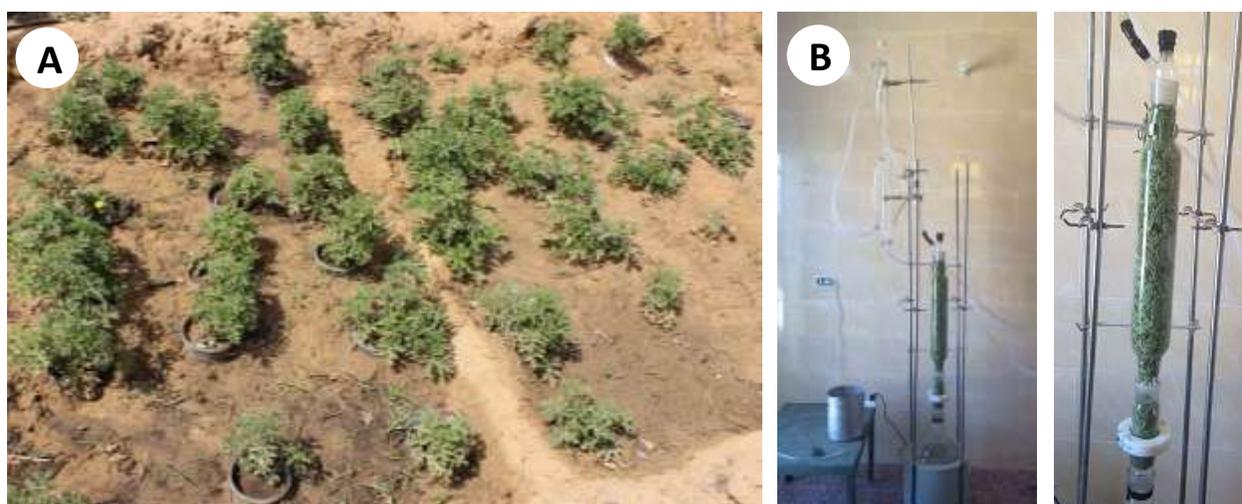
## II.5 Etude de l'influence des conditions de culture sur la composition de l'HE pour les cultivars 'rosat'.

### II.5.1 Production de *P. cv. 'rosat Chine'* et *P. cv. 'rosat Bourbon'* en Égypte.

L'HE du *P. cv. 'rosat Chine'*, comme l'HE *P. cv. 'rosat Bourbon'* est très importante pour IFF-LMR, puisqu'elle est produite en quantités presque similaires à l'HE égyptienne avec un prix d'achat supérieur. De plus, certains signaux du marché chinois font craindre pour la pérennité de la filière. Les deux HE ont des compositions chimiques voisines mais différentes et ne sont pas substituables (**tableau 14 – Chapitre III**). Il serait donc intéressant pour IFF-LMR d'essayer de produire une HE présentant les caractéristiques de l'HE chinoise en Égypte pour en contrôler la production et transposer les résultats de nos recherches faites en Égypte.

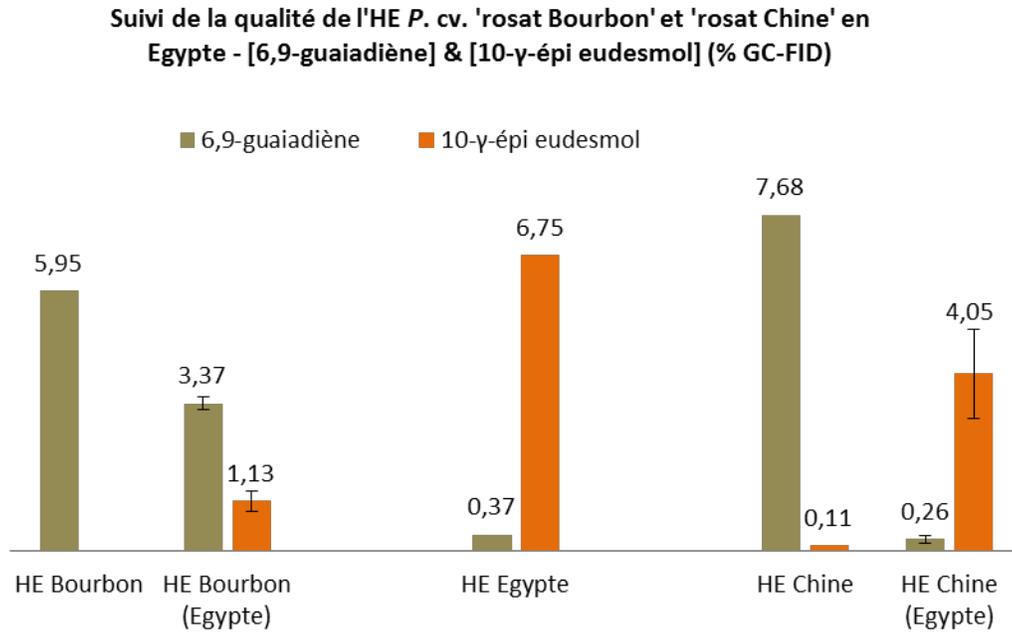
Afin d'évaluer cette possibilité, nous avons tout d'abord multiplié à Grasse des plants de *Pelargonium* venant de Chine puis les avons expédiés en Égypte. Nous avons également fait des essais avec les cultivars 'rosat Bourbon' et 'Toussaint'. Les plantes ont été cultivées dans les mêmes conditions durant l'année 2014 puis distillées en laboratoire (**figures 112 A et B**). Les HE ont été analysés par GC-FID.

Les résultats complets de composition chimique de ces HE sont donnés en **annexe 52**. Les résultats concernant les composés d'intérêts comme le 10- $\gamma$ -épi eudesmol et le 6,9-guaiadiène, qui discriminent normalement les HE de provenances différentes, (**figure 113**) ou encore le géraniol et le citronellol (**figure 114**) sont détaillés ci-dessous.



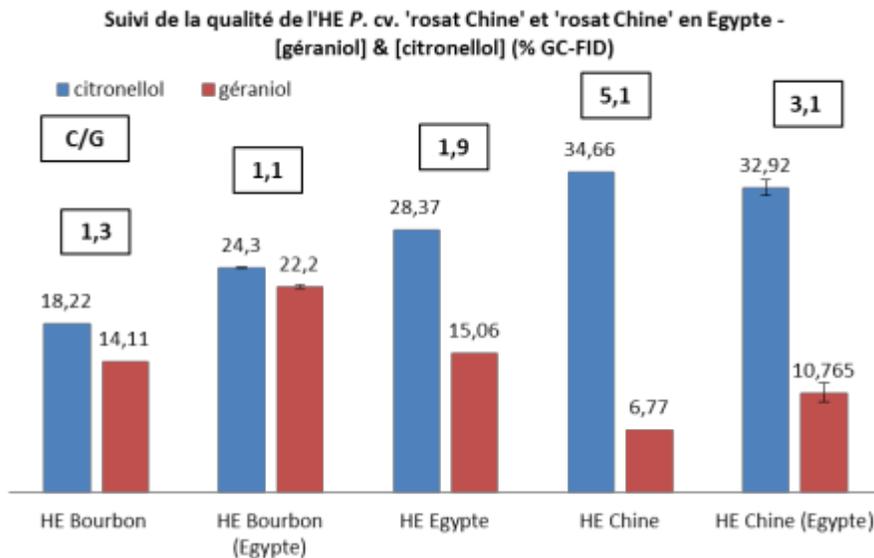
**Figure 112 | Expérience de transplantation des cultivars *P. cv. 'rosat Chine'* et '*rosat Bourbon*' en Égypte.**

**A** – Culture des pieds de *P. cv. 'rosat Chine'* (à gauche de l'image) et '*rosat Bourbon*' (à droite de l'image) en vue de tester leur adaptabilité aux conditions de culture en Égypte et la qualité de leurs HE. **B** – Appareillage pour la distillation à la vapeur au laboratoire en Égypte.



**Figure 113 | Concentrations (% GC-FID) du 6,9-guaiadiène et du 10-γ-épi eudesmol dans l'HE de *P. cv. 'rosat Bourbon'* et '*rosat Chine'* cultivés en Égypte**

Si l'on compare les HE commerciales avec celles obtenues au cours de l'expérience en Égypte, on constate que le cultivar *P. cv. 'rosat Bourbon'* produit moins de 6,9-guaiadiène et une quantité non négligeable de 10-γ-épi eudesmol alors que l'HE Bourbon n'en contient pas ou à l'état de traces. Le même phénomène est observé, de façon encore plus accentuée, pour le cultivar *P. cv. 'rosat Chine'* puisque celui-ci ne produit presque plus de 6,9-guaiadiène et une quantité très importante de 10-γ-épi eudesmol. Les concentrations de ces deux composés se rapprochent donc de celles du cultivar '*rosat Égypte'*'.



**Figure 114 | Suivi de la proportion (% GC-FID) du géraniol et du citronellol dans l'HE de *P. cv. 'rosat Bourbon'* et '*rosat Chine'* cultivés en Égypte.**

Pour ce qui concerne le monoterpène géraniol, le profil de l'HE Bourbon produite en Egypte se rapproche plus de celui de l'HE Égypte. La totalité des alcools monoterpéniques représente 46,5% (pour 32,3% pour une production à la Réunion), ce qui est très proche de la valeur de 43,4% obtenue avec le cultivar *P. cv. 'rosat Egypte'*. Le ratio C/G (1,1) change peu avec la transplantation (1,3) et est assez éloigné de celui de l'HE Égypte (1,9).

Pour le cultivar *P. cv. 'rosat Chine'* le ratio C/G (3,1) diminue mais reste assez proche de son ratio lorsqu'il est cultivé en Chine (5,1). Pour la totalité des alcools monoterpéniques, les proportions restent similaires (41,4% en Chine et 43,7% en Égypte). Ainsi, alors que pour le 6,9-guaiadiène et le 10- $\gamma$ -épi eudesmol, les changements sont importants, pour le géraniol et le citronellol, les différences sont moins nettes.

#### **II.5.2 Culture des 4 *Pelargonium* 'rosats' dans des conditions de température et de substrat contrôlées au LBVpam**

Afin de savoir si les conditions de culture peuvent influencer la composition en HE des *Pelargonium*, comme le laisse supposer l'expérience de transplantations des cultivars en Egypte décrite ci-dessus, des expériences en conditions contrôlées ont été réalisées au LBVpam en phytotron. Seize jeunes plants de *Pelargonium* des quatre cultivars 'rosat' ont été cultivés dans 2 environnements de température et d'humidité différents (chaud (18 - 36°C) et sec (HR<sup>101</sup> = 24-38%) ou tempéré (17 - 26°C) et humide (HR = 52-60%)) et sur 2 substrats distincts (sable et terreau). Ceux-ci ont été cultivés dans ces conditions pendant 2 mois (extraction de janvier) jusqu'à quatre mois (extraction mars). Les résultats complets, exprimés en ppm de composé en fonction du poids sec des feuilles et en % du composé dans l'essence totale produite, sont présentés en **annexe 53-57**. Des résultats partiels sont présentés dans les figures suivantes. Il est à noter que certaines des boutures du cultivar 'rosat Bourbon' cultivées dans les conditions particulières 'sable et haute température' n'ont pas repris et cette condition n'a donc pas pu être expérimentée. Les résultats notés menthone/isomenthone représentent la somme des composés menthone + isomenthone, ces deux pics étant difficiles à séparer avec notre colonne apolaire.

---

<sup>101</sup> HR pour humidité relative (%)

## Menthone et isomenthone

Les résultats suivant la même tendance pour les quatre cultivars, j'ai choisi d'illustrer cette analyse par les résultats du cultivar Égypte (figure 115). Quel que soit le substrat, la concentration en menthone/isomenthone augmente avec la température, surtout après 2 mois de culture. Après 4 mois, les concentrations diminuent mais restent supérieures pour les températures hautes. Il est intéressant de remarquer que les pourcentages de menthone/isomenthone sont similaires en janvier et en mars, ce qui signifie c'est la somme totale des composés qui diminue après quatre mois lorsque la température est trop haute. Les résultats complets sont présentés en annexe 53.

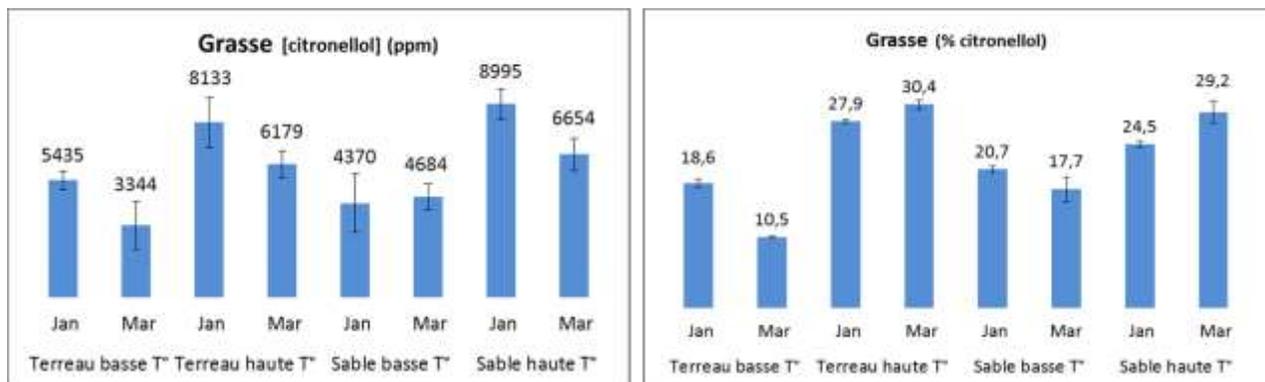


**Figure 115 | Quantification absolue et relative de la menthone et de l'isomenthone (ppm et %) du *P. 'rosat Egypte'* dans des conditions de température, d'humidité et de substrat contrôlées.** Les extractions ont été réalisées après deux et quatre mois de culture.

## Citronellol

Pour le cultivar *P. cv. 'rosat Grasse'*, la concentration de citronellol augmente avec la température, indépendamment du substrat utilisé (figure 116). Les pourcentages de citronellol dans l'HE sont aussi plus élevés en condition de haute température, quel que soit le substrat. Cette tendance est globalement similaire pour les cultivars 'rosat Égypte' et 'rosat Bourbon' mais de manière moins nette que pour 'rosat Grasse'. Comme pour la menthone/isomenthone, ce phénomène de production accrue à haute température semble s'atténuer après 4 mois de culture. L'intensité de la diminution de concentration en ppm est même assez importante pour ces trois cultivars même si cela ne se reflète pas dans le % de citronellol. Les résultats complets sont présentés en annexe 54.

Le cultivar 'rosat Chine' est différent puisqu'on n'observe pas d'augmentation absolue du citronellol (ppm). Par contre comme les autres cultivars, les températures plus élevées ont bien une influence sur la qualité de l'huile puisque l'on observe une augmentation du citronellol en pourcentage. Il est à noter que le cultivar 'rosat Chine' a globalement une production plus importante en citronellol que le cultivar 'rosat Bourbon'. Cette observation est à mettre en parallèle avec les rendements importants en citronellol du cultivar 'rosat Chine' dont l'HE est utilisée pour faire un isolat de citronellol.



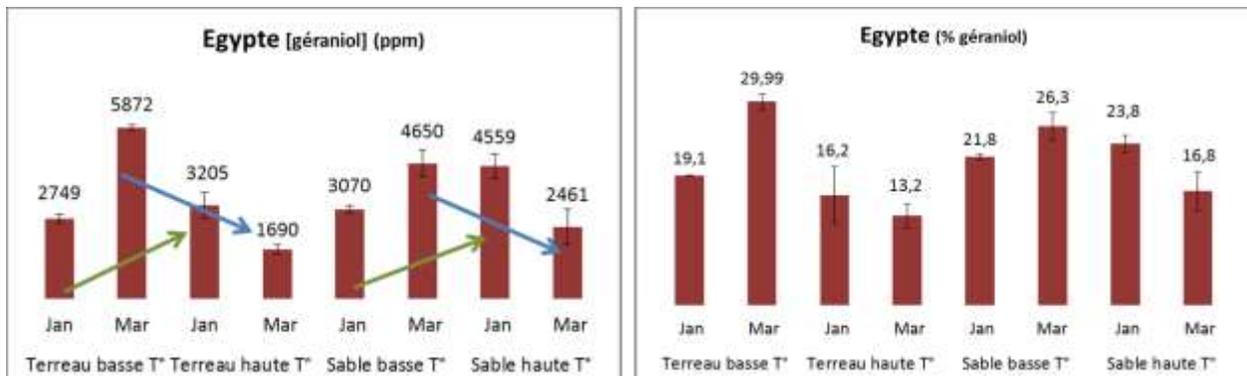
**Figure 116 | Quantification absolue et relative du citronellol (ppm et %) du *P. 'rosat Grasse'* dans des conditions de température, d'humidité et de substrat contrôlées.** Les extractions ont été réalisées après deux et quatre mois de culture.

## Géraniole

Les résultats pour le géraniole suivent tous la même tendance mais avec un décalage dans le temps pour les cultivars *P. cv. 'rosat Bourbon'*, '*rosat Égypte*' et '*rosat Grasse*', alors que l'effet est immédiat pour *P. cv. 'rosat Chine*'. De plus, la nature du substrat a un effet sur les tendances observées. Les résultats pour le cultivar '*rosat Égypte*' sont présentés dans la **figure 117**.

Pour le *P. cv. 'rosat Chine*' (**annexe 55 et 56**), on observe une concentration en géraniole plus importante dès le mois de janvier à haute température et ce, quel que soit le type de substrat. Ce résultat est retrouvé dans le % de ce composé dans l'HE.

Pour *P. cv. 'rosat Bourbon'*, '*rosat Égypte*' et '*rosat Grasse*', après 2 mois, la concentration en géraniole (flèches vertes) est plus élevée à haute température (sauf pour Grasse sur substrats terreau). À l'inverse, après 4 mois de culture la concentration en géraniole est inférieure à haute température, (flèches bleues) comme dans le cas du *P. cv. 'rosat Chine*'.



### 10- $\gamma$ -épi eudesmol et 6,9-guaiadiène

Les résultats sur le cultivar 'rosat Bourbon' montrent une concentration élevée en 10- $\gamma$ -épi eudesmol à haute température (figure 118) à 2 mois de culture et une proportion de ce composé toujours importante après 4 mois de culture. La production de 10- $\gamma$ -épi eudesmol est aussi déjà importante pour des températures basses que ce soit après 2 mois et 4 mois. Rappelons que l'HE de 'rosat Bourbon' commerciale, distillée à partir de *Pelargonium* cultivés sur l'île de la Réunion, contient très peu de 10- $\gamma$ -épi eudesmol. La diminution du 6,9-guaiadiène est très nette pour les températures importantes dans le terreau. Malheureusement les résultats dans le substrat sable ne sont pas disponibles pour *P. cv.* 'rosat Bourbon'. A basse température, on observe que dans le substrat sable après 2 mois, la production totale de ces deux sesquiterpènes est bien inférieure. Cette différence a tendance à diminuer après 4 mois.

Les résultats pour le cultivar 'rosat Chine' (annexe 57) sont moins nets mais montrent après quatre mois de culture une faible production de 10- $\gamma$ -épi eudesmol et cela pour les 2 conditions de températures. Le substrat ne semble pas avoir d'influence déterminante. Pour les cultivars *P. cv.* 'rosat Egypte' et 'rosat Grasse' (annexe 57), la production de 6,9-guaiadiène déjà très faible après 2 mois, diminue encore après 4 mois et cela quelles que soient les conditions de culture.

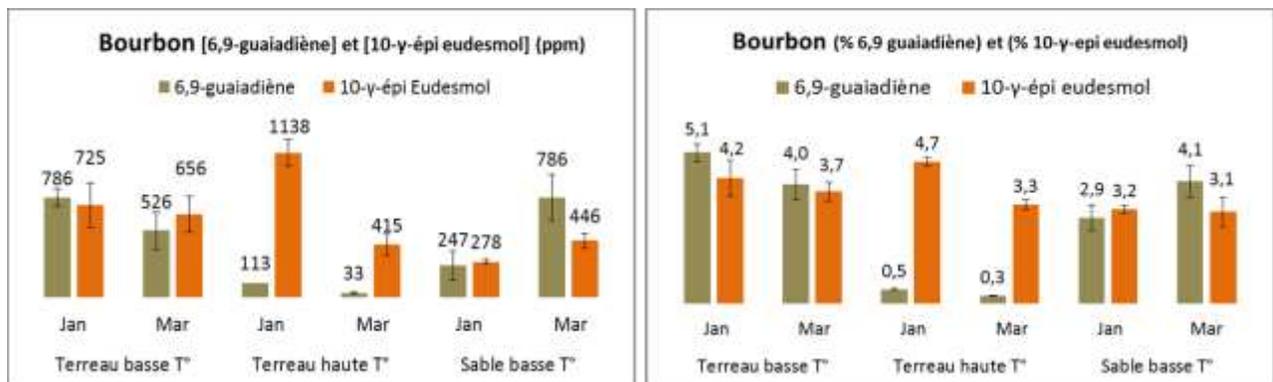


Figure 118 | Quantification absolue et relative du 10- $\gamma$ -épi eudesmol et du 6,9-guaiadiène (ppm et %) du *P. 'rosat Bourbon'* dans des conditions de température, d'humidité et de substrat contrôlées. Les extractions ont été réalisées après deux et quatre mois de culture.

### III. CONCLUSIONS

#### La production d'HE en Egypte

Le projet Egyptien a beaucoup évolué depuis les premières plantations en 2013. Les connaissances acquises sur la culture du *Pelargonium*, sa distillation et sa biochimie ont pu être mises directement en application dans le champ. Les figures 119 et 120 présentent l'évolution des rendements par hectare et les coûts de production pour 1 kg d'HE.

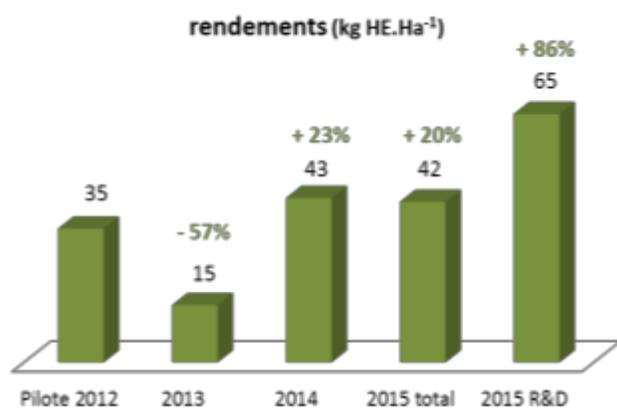


Figure 119 | Analyse des rendements en HE par Ha de plantation de *Pelargonium* en Égypte pour les années 2012 à 2015. '2015 R&D' représente les derniers résultats issus de la plantation de recherche et '2015 total' représente les résultats de 2014 appliqués sur une grande surface.

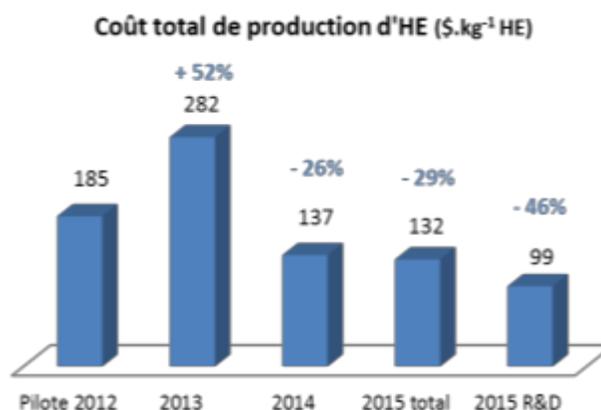


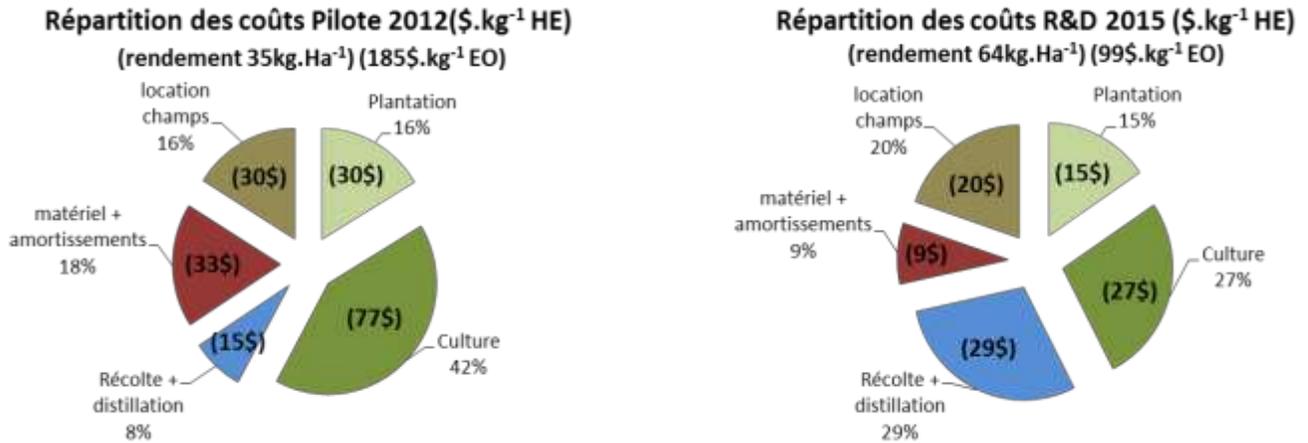
Figure 120 | Coût total de production par kg d'HE de *Pelargonium* en Égypte pour les années 2012 à 2015. '2015 R&D' représente les derniers résultats issus de la plantation de recherche et '2015 total' représente les résultats de 2014 appliqués sur une grande

La première année a été assez mauvaise en terme de rendement à l'hectare et donc en terme de coût par kg d'HE. Les lignes de plantations étaient trop espacées et une forte mortalité des boutures a aussi impacté la densité de plants par hectare. Ce mauvais couvremment de la surface a engendré des coûts d'arrachage d'adventices et de replantations importants.

En 2014 une plantation plus resserrée et une mortalité moins importante lors de la plantation, nous ont permis d'augmenter de façon significative les rendements à l'hectare. Les différentes fertilisations ont aussi contribué à l'augmentation du rendement. Nos coûts restaient cependant élevés.

En 2015, sur la parcelle optimisée pour la R&D, les rendements ont été très élevés puisque nous avons obtenu une moyenne de 65 kg.Ha<sup>-1</sup> en une seule coupe. Néanmoins l'HE obtenue ne rentre pas dans les spécifications à cause du pourcentage élevé en géraniol. Un préfanage d'une journée dans le champ pourrait peut-être rétablir un ratio plus proche de la qualité conventionnelle.

Une plantation annuelle avec une seule coupe est donc finalement le type de culture que nous avons choisi de privilégier. Il est aussi envisagé de mécaniser la plantation et la récolte. De plus, l'occupation du terrain étant très chère (figure 121), la plantation d'une autre plante aromatique comme le basilic est prévue. En conclusion, les connaissances acquises au cours de cette thèse nous permettent d'envisager l'avenir de la culture du *Pelargonium* Egyptien pour la production d'HE avec optimisme.



**Figure 121 | Analyse détaillée des coûts de production par kg d'HE de *Pelargonium* en Égypte.** Ces coûts de production ont été évalués pour une surface de 0,4 Ha (2012) et de 4 Ha (2015 R&D) qui représente le meilleur résultat à ce jour. Les coûts de plantations comprennent : la préparation du terrain, le coût des boutures, la mise en place du système d'irrigation, la plantation elle-même; les coûts de cultures comprennent : les intrants (fertilisants...), l'arrachage des adventives, l'irrigation; Le poste 'récolte et distillation' concerne tous les frais de récolte, de transport et de chargement des alambics de distillation ainsi que l'énergie et l'amortissement de la distillerie; Le poste 'matériel et amortissement' prend en compte le coût du système d'irrigation, de paillage, des tracteurs et autres machines agricoles; la location des champs est fixée d'après la valeur du terrain dans la zone de Regwa.

Malheureusement nos coûts de production sont toujours supérieurs à ceux du marché puisque nous produisons au mieux à 99 \$ .kg<sup>-1</sup> même avec un rendement optimisé (annexe 58). Cependant nous contrôlons toute la production depuis la plantation jusqu'à la distillation et tous nos coûts sont pris en compte. Il est très difficile de descendre en-dessous du prix de marché car ce prix ne reflète en rien les coûts réels de production. En effet, les petits producteurs ne prennent pas en compte le prix de leur terrain, le nombre d'heures de travail qu'ils passent au champ et n'étant pas organisés, ils dépendent encore trop des gros distillateurs. La rareté du terrain en Égypte et l'accroissement continu de la population changera certainement les pratiques et la culture du *Pelargonium* devra aussi évoluer sous peine que les champs de *Pelargonium* soient utilisés pour produire une culture plus rentable. Néanmoins, nous continuerons toujours notre effort pour l'amélioration de cette filière et d'autres pistes sont envisagées comme nous le verrons par la suite.

### Les changements de la qualité de l'HE

La qualité de l'HE est fortement dépendante des pratiques culturales et de l'environnement. Ainsi une plantation où les apports nutritifs sont bien contrôlés avance la floraison et le pic de rendement de plusieurs semaines. Il est intéressant de noter que le pic de production en essence dans les feuilles est corrélé avec la floraison. Cette observation est peut-être à mettre en relation avec l'activité des insectes, pas seulement pollinisateurs, qui sont présents dans les champs à cette période. Cela donne en tout cas une information facilement observable pour les paysans qui savent très bien quand ils doivent récolter le *Pelargonium*. Lors d'une récolte précoce, les conditions climatiques sont différentes et cela a pour résultat un changement important dans la qualité de l'HE avec une proportion plus importante de géraniol et une diminution de la concentration en citronellol. Nous avons vu qu'un préfanage avait un impact sensible sur ce ratio. Cette opération, si l'on accepte une certaine perte de rendement, pourrait ainsi aider à rétablir un profil conforme pour l'HE.

Les résultats concernant le géraniol obtenus en conditions contrôlées pour le *P. cv. 'rosat Egypte'* sont à mettre en parallèle de ceux observés en champ en Egypte. Lorsque l'on récolte précocément dans l'année en Égypte, on obtient aussi un ratio C/G d'environ 1 (concentration de 20% dans l'HE pour les deux composés). Dans le cas d'une récolte en juillet, le ratio C/G est de 2 (avec 30% de citronellol et 15% de géraniol) (**tableau 14 – Chapitre III**). Sous atmosphère contrôlée, on observe que le ratio s'approche de 2 lorsque le *Pelargonium* est cultivé à haute température dans le substrat terre. Le ratio pour le sable est inférieur mais semble évoluer avec le temps puisqu'il passe de 0,8 à 1,3 de janvier à mars. Un extrait récolté 8 à 9 mois après la plantation (temps de séjour classique d'un *Pelargonium* en champ) aurait peut-être donné ce ratio de 2.

Le ratio C/G (**annexe 1**) dans l'HE est habituellement d'environ 1,3 pour le cultivar 'rosat Bourbon'. Nous retrouvons donc bien ce ratio à haute température. Il est étonnant que les conditions chaudes n'influencent pas ce ratio' alors qu'elles impactent fortement la biosynthèse du 10- $\gamma$ -épi eudesmol et du 6,9-guaiadiène, qui varient à l'inverse l'un de l'autre. Il est possible que ces enzymes soient affectées différemment. Pour le cultivar 'rosat Chine', les ratios sont très différents selon que le *Pelargonium* est cultivé à haute ou basse température. Alors que le ratio dans l'HE chine est d'environ 5, on observe ici un ratio bien inférieur pour des températures tempérées et un ratio très supérieur pour des températures élevées. Il est possible que les conditions de culture en Chine soient intermédiaires.

Il est aussi intéressant de noter que les changements observés au niveau de la production en 10- $\gamma$ -épi eudesmol et en 6,9-guaiadiène, pour les cultivars *P. cv.* 'rosat Bourbon' et 'rosat Chine', ont aussi été obtenus sous atmosphère contrôlée au laboratoire. Les résultats observés au laboratoire montrent la même tendance même si ceux-ci sont moins nets que ceux obtenus en Egypte.

Le type de substrat ne paraît pas avoir d'influence très importante sur la production des terpènes. Le substrat a par contre une influence importante sur les pratiques culturales comme la fertilisation ou l'irrigation ainsi que sur le développement de la microfaune pouvant induire dans certains cas des maladies responsables d'une baisse de rendement significative de la masse végétale. En Egypte, jusqu'à présent nous n'avons pas observé de dépérissement lié à une bactérie ou un champignon probablement à cause de l'extrême rigueur des conditions de culture.

Il est manifeste que l'environnement et les conditions de culture affectent la qualité de l'HE. Il semble donc très difficile de pouvoir reproduire une qualité de type 'Chine' en Egypte. Ces résultats très intéressants feront l'objet d'une discussion approfondie dans le chapitre qui suit.

## DISCUSSION

Tout au long de cette thèse, nous avons suivi la production d'HE par le *Pelargonium*, du niveau le plus fondamental avec la caractérisation des TPS responsables de la biosynthèse des terpènes, jusqu'à l'étude des paramètres agronomiques en champ qui influencent la production de l'HE. L'HE, composée en très grande majorité de monoterpènes et de sesquiterpènes, est produite dans les trichomes glandulaires par l'action de terpène synthases. Les terpènes peuvent ensuite être réarrangés en d'autres molécules et l'HE est finalement stockée dans l'espace sous-cuticulaire. Nous avons démontré comment l'expression des gènes des TPS était régulée de manière transcriptionnelle. Enfin nous avons montré qu'en suivant de bonnes pratiques culturales et en optimisant le procédé d'extraction, nous pouvions produire une HE soutenable et de bonne qualité.

Dans cette discussion, j'aborderai 4 questions qui ont été posées au cours de cette thèse et auxquelles nos résultats apportent partiellement des réponses. Ceci me permettra ensuite de proposer quelques perspectives issues de ce travail.

- Comment le géraniol est-il produit chez le *Pelargonium* ?
- Comment le géraniol est-il métabolisé en citronellol et dérivés et quels sont les paramètres qui influencent cette transformation ?
- Quelle est l'influence de l'environnement sur la synthèse des terpènes et la qualité de l'HE ?
- Les cultivars 'rosat' sont-ils issus d'un seul et même croisement ?

### ***Comment le géraniol est-il produit chez le Pelargonium ?***

Avant 2015, une seule voie de biosynthèse était connue pour la production de géraniol chez les plantes. Cette voie implique l'action d'une MTPS, la géraniol synthase, qui a comme substrat le GPP et donne comme unique produit du géraniol. Cette étape enzymatique est très importante chez un grand nombre de plantes et l'enzyme a déjà été caractérisée à 10 reprises chez des plantes appartenant à 7 ordres différents ([annexe 59](#)).

En 2015, une nouvelle voie de biosynthèse a été découverte chez les roses. Chez cette plante, c'est sous l'action d'une Nudix hydrolase que le GPP est déphosphorylé pour donner du géranyle monophosphate (*Magnard et al. 2015*). La deuxième étape enzymatique nécessaire pour la production de géraniol n'a pas encore été formellement démontrée mais implique probablement une phosphatase.

Chez le *Pelargonium*, nous avons caractérisé formellement au cours de cette thèse la géraniol synthase, PhGES, qui s'est révélée être la plus petite géraniol synthase caractérisée jusqu'ici. PhGES n'est cependant pas présente et/ou fonctionnelle chez tous les *Pelargonium* que nous avons analysés. Les différences d'expression, que nous avons mesurées par qPCR, expliquent l'absence de production de géraniol chez certains cultivars. L'arbre phylogénétique des plantes à fleurs, présenté en **annexe 59**, montre que les 10 GES ont été caractérisées chez des plantes appartenant à des clades assez éloignés des Rosacées. Les deux plantes les plus proches phylogénétiquement du rosier sont le *Pelargonium* et le citron verruqueux (*Citrus jambhiri*) qui appartiennent aux Rosidées. Le géraniol est donc produit dans ce clade des Rosidées de deux façons différentes. La voie originale via une Nudix hydrolase a été mise en évidence uniquement dans le sous-clade des Fabidées alors que dans le sous-clade des Malvidées, chez *Pelargonium x hybridum* et *Citrus jambhiri*, le géraniol est produit par une GES.

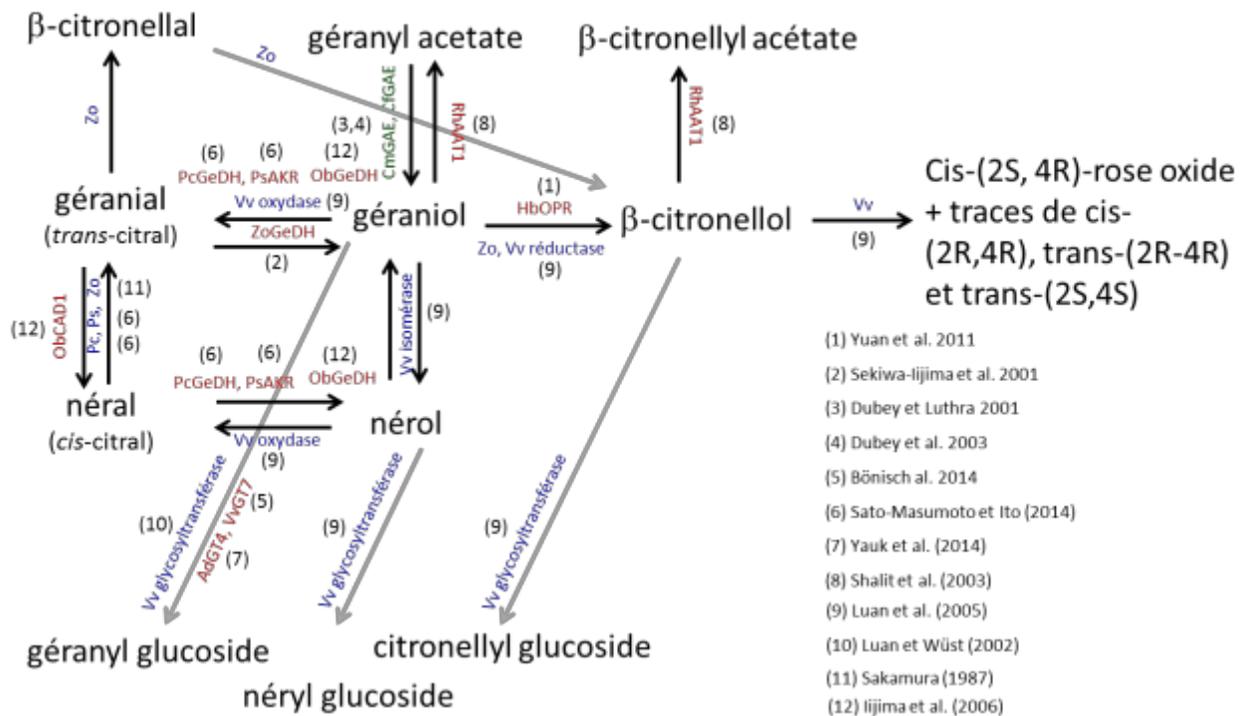
Ce qui rapproche la rose du *Pelargonium* est la quantité importante de géraniol et citronellol produits. Chez *Rosa x damascena*, le géraniol et ses dérivés représentent 65 à 70% du total de l'HE commercialisée, ce qui est similaire aux valeurs de l'HE du *Pelargonium* cv. 'rosat'. Par contre, les deux plantes produisent le géraniol par deux voies de biosynthèse différentes, dans des cellules très différentes (cellule coniques pour la rose et trichomes glandulaires pour le *Pelargonium*). Dans le cas de la rose, le géraniol est produit par la fleur et est émis de manière continue par les pétales (avec un rythme circadien mais sans stockage) afin d'attirer les pollinisateurs. Pour le *Pelargonium*, le géraniol est produit par les feuilles et stocké dans les trichomes, dans l'espace sous-cuticulaire pour servir très certainement de moyens de défense constitutive directe. En particulier, le géraniol est synthétisé dans les feuilles jeunes (les extractions d'ARN ont été faites sur des feuilles très jeunes) et en quantité très importante, peut-être parce que ces jeunes feuilles sont très vulnérables à l'attaque des insectes.

Dans la plupart des espèces, les GES ont été caractérisées soit dans le fruit, soit dans les feuilles (**annexe 59**). La seule voie produisant du géraniol dans une fleur est la voie de la NUDIX hydrolase. Est-ce parce que la voie de la NUDIX est plus facilement régulée que de la GES et pourrait permettre à la fleur de s'adapter à ses pollinisateurs plus rapidement ? Quoiqu'il en soit, le géraniol a certainement un rôle important pour les plantes et leurs interactions avec les insectes puisque celles-ci ont emprunté deux voies indépendantes pour le produire.

### Comment le géraniol est-il métabolisé en citronellol et dérivés et quels sont les paramètres qui influencent cette transformation ?

Les données de la littérature montrent que le géraniol est le précurseur d'une série de réactions qui conduisent à des molécules (citronellol, citronellal, géranial...), principalement d'odeur rosée ou citronnée, très importantes dans l'HE de *Pelargonium*. Ces réactions sont-elles enzymatiques ou chimiques ? Si elles sont enzymatiques, quels types d'enzymes en sont responsables... ? Les résultats obtenus durant cette thèse permettent d'apporter des éléments de réponse.

Chez certaines plantes, plusieurs enzymes catalysant ces réactions ont déjà été caractérisées (figure 122)



**Figure 122 | Hypothèses concernant les voies de biosynthèse du géraniol et de ses dérivés chez les plantes.**

Abréviations : Ad - *Actinidia deliciosa*; Cm - *Cymbopogon martinii*; Cf - *Cymbopogon flexuosus*; Hb - *Hevea brasiliensis*; Ob - *Ocimum basilicum*; Pc - *Perilla citriodora*; Ps - *Perilla setoyensis*; Rh - *Rosa hybrida*; Vv - *Vitis vinifera*; Zo - *Zingiber officinale*; AAT - Alcool acétyle transférase; CAD - cinnamyl alcool déshydrogénase; KR - Aldo/keto réductase; GAE - Géranyl acétate estérase; GeDH - Géraniol déshydrogénase; GES - géranol synthase; GT - UDP-glycosyltransférase; OPR - 12, oxophytodienoate réductase. Les enzymes en bleu sont des enzymes supposées; en vert, des enzymes purifiées et en rouge, des gènes clonés.

L'enzyme permettant de convertir le géraniol en citronellol est une 12, oxophytodienoate réductase du groupe des 'Old Yellow Enzymes ou OYE', caractérisée chez l'hévéa (Yuan et al. 2011). Les résultats de l'étude ne laissent pas de doute quant à la capacité de cette enzyme à catalyser la réduction du géranol en citronellol mais nous ne savons pas si cette enzyme est impliquée dans la synthèse du citronellol chez

le *Pelargonium* ou chez la rose. Ainsi, d'autres enzymes OYE<sup>102</sup> de bactéries ou de levures avaient aussi montré cette capacité (Yuan et al. 2011).

L'extraction des COV d'un grand nombre de *Pelargonium* à odeur de rose et de citron nous a permis de mettre en évidence l'extrême diversité chimique et les quantités très variables de géraniol et de citronnellol présentes dans ces accessions. Il est donc vraisemblable que chez le *Pelargonium*, la transformation du géraniol en citronnellol est aussi enzymatique et non chimique.

En effet, le **tableau 22** (chapitre IV) permet de subdiviser les accessions de *Pelargonium* en 3 grands groupes (**figure 123**). Les accessions du **groupe I** produisent beaucoup de géraniol et de néral et ont une forte odeur de citron. Les accessions du **groupe II** produisent beaucoup de citronnellol et de citronnellal et ont aussi une odeur de citron mais moins marquée que ceux du groupe I. Les accessions du **groupe III**, qui sont probablement des hybrides, produisent toutes ces molécules ainsi que beaucoup de géraniol et ont une forte odeur de rose.

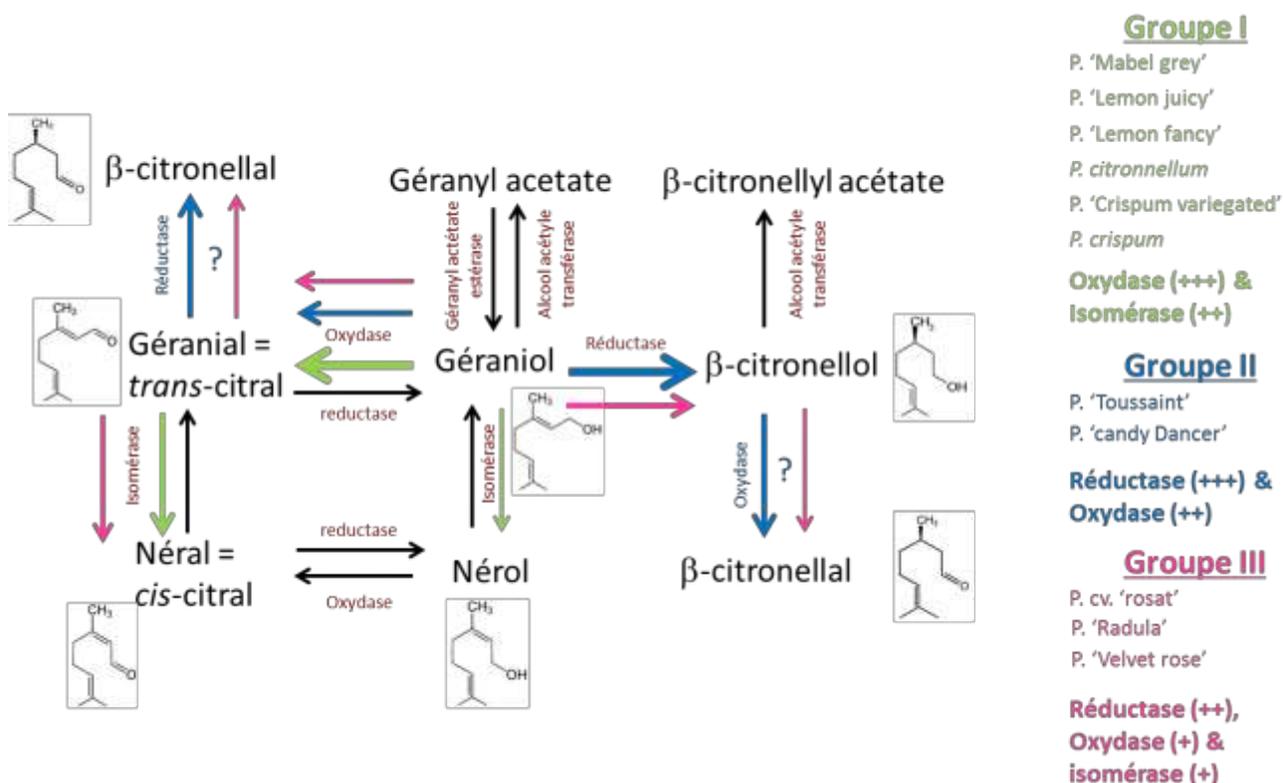


Figure 123 | Classification des *Pelargonium* selon la compositions chimique de leurs HE, en lien avec l'activité de leurs enzymes hypothétiques.

<sup>102</sup> OYE pour Old yellow enzyme

### Groupe I

Ce groupe comprend les accessions ne produisant pas du tout de citronellol, citronellal et citronellyl formate. Ces *Pelargonium* semblent donc avoir perdu ou avoir subi une mutation sur le gène de la réductase et ne peuvent donc transformer le géraniol en citronellol et ses dérivés. Une autre hypothèse serait que la capacité à produire du citronellol est apparue de manière dérivée dans le genre *Pelargonium* et que les parents de ces variétés ne possédaient pas cette capacité. Par contre ces variétés semblent transformer de façon très efficace le géraniol en géraniol et ont donc une oxydase très active (+++). Il est probable que le néral, produit aussi en très grande quantité dans ces cultivars, ne provient pas du nérol mais plutôt de géraniol par l'intermédiaire d'une isomérase assez active (++) (*Iijima et al. 2006*). En effet, une forte concentration en géraniol est corrélée avec une grande concentration de néral chez tous ces *Pelargonium* (**tableau 22 – chapitre IV**). Peut-être est-ce d'ailleurs la même isomérase qui isomériserait le géraniol en nérol...

### Groupe II

A l'inverse, certaines variétés transforment de façon très efficace le géraniol en citronellol et ont donc une réductase très active (+++). Ces *Pelargonium* produisent aussi beaucoup de géraniol et ont une oxydase ayant une bonne activité (++) . On voit en effet que le géraniol est consommé complètement pour donner du citronellol et du géraniol. Ce groupe pourrait aussi avoir perdu l'activité isomérase puisqu'il ne produit pas du tout de nérol ou de néral.

### Groupe III

Ce dernier groupe rassemble les *P. cv. 'rosat'* et les autres *Pelargonium* à odeur de rose. Ce groupe produit toutes les molécules ci-dessus mais le géraniol est présent en grande concentration. Les ratios géraniol-citronellol-géraniol sont différents d'une variété à une autre ce qui s'expliquerait par une différence d'activité pour chaque enzyme impliquée. Néanmoins, la faible quantité de citronellal produite dans ce groupe, soutient l'hypothèse d'une formation du citronellal via le géraniol par une réductase et non via le citronellol via une oxydase.

Le géranyle acétate est très peu produit par les *Pelargonium* sauf pour le cultivar *P. 'Prince of orange'* (25,92%) qui produit aussi beaucoup de géraniol (22,95%) mais pas du tout de citronellol et n'a donc pas de réductase fonctionnelle, et une oxydase très peu active (0,45% de géraniol). C'est probablement chez

ce *Pelargonium* qu'il serait le plus judicieux de caractériser l'enzyme Alcool Acétyl Transférase comme cela a déjà été fait sur la Rose (*Rosa x hybrida*) (Shalit et al. 2008).

Le citronellyl acétate est aussi très peu produit sauf chez *P. scabroides* (18,97%). Ce cultivar produit bien du citronellole (3,41%) probablement consommé en grande partie pour donner du citronellyl acétate grâce à l'activité d'une Alcool Acétyl Transférase. Ne produisant pas du tout de géraniol (pas d'oxydase), ni de nérol (pas d'isomérase), il pourrait être utilisé aussi pour caractériser l'Alcool Acétyl Transférase.

Le géraniol, qui est à l'origine de la synthèse de nombreuses molécules, peut être de ce fait finalement peu présent dans l'HE. C'est notamment le cas pour *P. 'Toussaint'* qui a bien une GES très productive comme démontré dans le chapitre résultat I mais qui a aussi probablement une réductase et une oxydase très actives consommant entièrement le géraniol produit.

Le *Pelargonium* est donc un modèle très intéressant pour étudier toutes ces réactions impliquant des terpènes et une analyse transcriptomique comparative de plusieurs cultivars clés devrait permettre de caractériser les enzymes catalysant ces transformations très fréquentes chez de nombreuses plantes.

### **Quelle est l'influence de l'environnement sur la synthèse des terpènes et la qualité de l'HE ?**

Durant cette thèse, nous avons observé des fluctuations des quantités de certains terpènes en fonction de l'environnement. Il s'agit du monoterpène géraniol et de sa réduction en citronellol, ainsi que des molécules guaiadiène et 10- $\gamma$ -épi eudesmol. Bien que nous ne l'ayons pas démontré, il est possible que ces fluctuations de concentrations en fonction des paramètres environnementaux soient dues à des fluctuations de l'activité des TPS que nous avons caractérisées, géraniol synthase et eudesmol synthases, ainsi que d'autres enzymes non encore caractérisées.

#### Ratio Citronellol/Géraniol

Plusieurs expériences réalisées durant cette thèse nous permettent de supposer que les enzymes impliquées dans la formation du géraniol et du citronellol sont régulées par l'environnement. En laboratoire et en conditions contrôlées, nous avons montré que chez tous les *P. cv. 'rosat'*, une augmentation de température et un environnement plus sec induisaient une augmentation de la concentration en citronellol et une diminution concomitante de la concentration en géraniol. Il se pourrait donc que l'enzyme, une réductase, responsable de la transformation du géraniol en citronellol, soit plus active à haute température que la GES. On pourrait aussi imaginer que le géraniol est plus sensible à une élévation de température. On observe aussi une formation plus importante de géraniol dans les feuilles jeunes et ce qui laisse supposer un décalage dans la fenêtre d'expression des 2 enzymes, GES et citronellol synthase. Ainsi lors d'une coupe précoce du *Pelargonium*, avant les fortes chaleurs, le géraniol produit est seulement partiellement transformé en citronellol. Il serait donc très intéressant de suivre le niveau d'expression par qPCR de la GES dans une plantation de *Pelargonium* ainsi que de la citronellol synthase (réductase) qui reste à caractériser. On peut aussi émettre l'hypothèse que la GES est moins stable que la réductase. En effet, lors du préfanage, les plantes de *Pelargonium* sont laissées dans le champ sous le soleil durant 24h. On observe alors une augmentation de la concentration citronellol au détriment du géraniol. Est-ce parce que la GES est moins stable et cesse de produire du géraniol ou est-ce que c'est l'activité de la réductase qui augmente ? Y-a-t-il d'autres enzymes en amont dans la voie des terpènes qui réagissent à une augmentation de la température ? Là encore, on pourrait aussi imaginer que le géraniol est plus sensible à une élévation de température. Quoiqu'il en soit, jouer sur les conditions environnementales pourra nous permettre d'orienter la qualité de de l'HE de *Pelargonium* dans le sens souhaité par les parfumeurs.

Nous avons vu aussi que de jeunes feuilles contenaient plus de géraniol que de citronellol. Pour avoir une représentation spatio-temporelle de la synthèse de ces composés dans les feuilles, nous pourrions tout d'abord faire une cinétique plus fine des feuilles très jeunes aux feuilles très âgées. De plus nous pourrions aussi cartographier la synthèse au sein d'une même feuille, en mettant en relation l'expression des TPS et les concentrations en monoterpènes. Cette étude pourrait aussi concerner d'autres molécules comme l'ensemble des esters de géranyle. Ce type d'expérience a déjà été réalisé chez la menthe (*Mentha x piperita*) où il a été démontré que la menthone était réduite en menthol de façon plus importante dans les feuilles âgées et même au sein d'une même feuille où cette réduction était plus importante à l'extrémité distale de la feuille. Ces études montrent aussi une disparition progressive du limonène au profit de la menthone et finalement du menthol (Brun et al. 1991 ; Voirin et Bayet 1996).

#### 10- $\gamma$ -épi eudesmol et le 6,9-guaiadiène

Ces deux sesquiterpènes sont importants pour caractériser l'origine de HE de *Pelargonium* mais jouent aussi un rôle dans l'odeur de l'HE qui sera plus rosée (6,9-guaiadiène) ou plus épicée (10- $\gamma$ -épi eudesmol). Ayant comme ambition de produire la qualité type *P. cv. 'rosat Chine'* en Egypte, nous avons voulu vérifier l'impact de l'environnement sur la biosynthèse de ces composés clés. De manière surprenante, nous avons observé que lorsque les cultivars *P. cv. 'rosat Bourbon'* et '*rosat Chine'* sont plantés en Egypte, ils produisent de façon très importante du 10- $\gamma$ -épi eudesmol après un an. Le même phénomène est observé en conditions contrôlées après 4 mois de culture à des températures élevées. Ce phénomène est donc observé à la fois dans les conditions extrêmes des champs en Egypte (50°C au soleil une partie de la journée) et en serre à 35°C. Le paramètre luminosité, que nous n'avons pas fait varier, a peut-être aussi un effet sur la composition de l'HE. On peut émettre l'hypothèse que l'enzyme EDS, responsable de la synthèse du sesquiterpène 10- $\gamma$ -épi-eudesmol est transcrite de façon plus importante, ou fonctionne de manière optimale à haute température. Ainsi l'HE récoltée précocement en Egypte au mois de mai a une concentration en 10- $\gamma$ -épi-eudesmol inférieure à celle d'une HE conventionnelle (tableau 24 – Chapitre 5). Cette hypothèse pourrait être testée en suivant l'expression de *PhEDS* par qPCR sur une plantation de *Pelargonium* en champ ou en serre sur des plants cultivés en conditions contrôlées. Si l'expression reste similaire tout au long de l'année, c'est que soit son activité est optimale à des températures plus élevées, soit ce sont d'autres enzymes comme la FPPS qui sont exprimées à plus haute température mais alors nous devrions avoir une augmentation de tous les sesquiterpènes. Une étude de l'influence de la température sur les paramètres enzymatiques de *PhEDS in vitro* apporterait aussi des éléments de réponse.

### **Les cultivars 'rosat' sont-ils issus d'un seul et même croisement ?**

Comme nous l'avons expliqué dans notre revue sur le *Pelargonium* (Blerot et al. 2015), les hybrides cultivés actuellement de par le monde sont tous issus d'un croisement entre l'espèce *P. capitatum* (à odeur de rose mais à faible rendement en HE) et l'une des deux espèces *P. graveolens* ou *P. radens* (à odeur de menthe et à fort rendement en HE). Au début des années 90, des travaux de recherches menés notamment par le CIRAD à l'île de la Réunion visaient à augmenter d'une part la résistance de l'hybride *Pelargonium* vis-à-vis d'une bactérie (*Pseudomonas solanacearum*) et différentes maladies fongiques comme l'antracnose... Ce programme de recherche avait aussi comme objectif d'augmenter les rendements et la qualité de l'HE. Les chercheurs ont donc réinitié des croisements entre les trois parents. Ils se sont aperçu d'une part que les rendements et la qualité étaient très différents d'un descendant à l'autre au sein d'un même croisement mais aussi que le choix du parent *P. capitatum* était crucial pour la qualité et le rendement en HE (Demarne 1989). A la suite de ces premiers résultats, une étude complète a été réalisée dans le but d'avoir un inventaire complet des chémotypes issus des populations sauvages de *P. capitatum* en Afrique du Sud. Cette étude a démontré l'existence de 8 chémotypes de *P. capitatum* dont certains présentaient une production importante de 6,9-guaiadiène ou/et de 10- $\gamma$ -épi eudesmol (Demarne et al. 1993, Viljoen et al. 1995).

L'analyse de la composition des HE apparaît donc comme un moyen assez fiable de reconnaissance et de caractérisation non seulement des espèces botaniques de la section *Pelargonium* mais aussi des hybrides et cultivars comme nous l'avons vu dans le chapitre résultat II. Les compositions en HE doivent donc être une aide pour clarifier le statut et les provenances des différents cultivars.

Les quatre cultivars 'rosat' présentent tous des HE différentes quand ils sont cultivés dans leurs environnements propres (table 2 - Blerot et al. 2015) mais aussi quand ils sont cultivés au même endroit comme à Grasse (annexe 34). En effet, même si on a vu que la production du 6,9-guaiadiène et du 10- $\gamma$ -épi eudesmol était très influencée par l'environnement, la production de citronellol et géraniol garde, elle, un profil caractéristique du cultivar quel que soit l'endroit où celui-ci est cultivé (voir chapitre V II-5.1). Il est aussi intéressant de noter que les quatre cultivars *P. cv. 'rosat'*, cultivés au même endroit dans les serres du LBPam, si l'on somme les composés issus de la GES, ont tous des pourcentages très proches (64-66%) (tableau 22 – Chapitre IV). Cependant, il existe entre eux une différence dans les ratios entre ces composés. Ainsi, nos expériences ont permis de montrer qu'une partie des différences dans la composition des HE est due à l'individu lui-même et est peu modifiable par l'environnement.

Néanmoins, une partie de ces différences, notamment la production du 6,9-guaiadiène et/ou du 10- $\gamma$ -épi eudesmol, sont dues à l'environnement. Ainsi, même cultivés au même endroit, les 4 *P. cv.* 'rosat' produisent une HE toujours bien identifiable et caractéristique. Il semble donc bien y avoir des différences génétiques entre ces *Pelargonium*.

Il est donc vraisemblable que les 4 cultivars 'rosat' sont soit issus de croisement différents avec d'autres individus mais provenant des mêmes espèces soit pour certains (*P. cv.* 'rosat Chine' et *P. cv.* 'rosat Bourbon' ou *P. cv.* 'rosat Egypte' et *P. cv.* 'rosat Grasse') issus du même croisement mais provenant de graines différentes. En effet, on a vu que le même croisement pouvait donner des descendants F1 très différents probablement à cause de la complexité génétique des parents. Il est difficile de mettre en évidence une différence génétique entre ces cultivars car ils sont très proches les uns des autres et ont tous des ploïdies élevées (heptaploïdes). La différence entre les individus se joue certainement sur des formes alléliques situées à plusieurs loci. La différence génétique peut par contre être mise en évidence au niveau transcriptomique (qPCR) et métabolomique (HE). Ainsi, l'analyse des HE fournit une véritable empreinte métabolomique de la plante plus facile à caractériser que les gènes eux-mêmes à cause de la polyploïdie des *Pelargonium*.

## PERSPECTIVES

Pour obtenir une HE à un prix attractif pour l'industrie et ainsi rendre pérenne la production d'HE de *Pelargonium*, nous avons la possibilité de travailler sur trois axes majoritaires : le procédé d'extraction, la culture de *Pelargonium* et la qualité de l'hydride lui-même.

Nous nous sommes attachés depuis maintenant plusieurs années à optimiser notre procédé d'extraction qui est actuellement très performant puisque nous arrivons en un minimum de temps, d'opérations et d'énergie à extraire une fraction très importante de l'essence du végétal. Ainsi, cette piste d'amélioration ne représente probablement plus un gain potentiel significatif que ce soit en terme de rendement ou en terme de qualité.

De même, beaucoup de progrès ont été réalisés ces dernières années, notamment dans notre champ expérimental en Egypte, quant à l'itinéraire agricole et aux pratiques culturales du *Pelargonium*. Même si l'amélioration est encore possible pour cet axe, notamment en mécanisant la plantation et la récolte du *Pelargonium*, nous avons l'intuition que des gains de rendement et de qualité significatifs passeront forcément par une amélioration de l'hybride actuellement utilisé pour la production d'HE.

La perspective ouverte par cette thèse, en plus des nombreuses connaissances engrangées sur le *Pelargonium*, est la création d'un nouvel hybride à odeur de rose très performant en termes de qualité et de quantité. Nous avons déposé pour cela un projet ANR en 2016, en collaboration avec le LBVpam et l'INRA d'angers afin de réinitier de nouveaux croisements. Pour cette sélection, nous devons poursuivre la caractérisation des gènes les plus importants (limonène synthase et 6,9 guaiadiène synthase) mais aussi approfondir les connaissances sur les allèles des terpène synthases déjà caractérisées. Cela nous permettra d'acquérir de nouveaux outils pour analyser quels parents seraient les plus favorables pour les croisements mais aussi dans la progéniture lesquels sont les plus désirables pour produire les composés d'intérêt de l'HE en plus grande quantité, et ainsi de sélectionner les meilleurs cultivars.

Nous avons déjà montré par exemple que la géraniol synthase était régulée au niveau transcriptionnel et que cette expression était directement responsable de la quantité de géraniol produit. Ainsi l'expression des gènes sélectionnés pourra être suivie par qPCR dans les différentes espèces et cultivars afin de comprendre comment ces expressions ont un impact sur la production de la qualité de l'HE. Le *Pelargonium* étant génétiquement transformable (*Hassanein et al. 2005* et nos propres résultats), nous

pourrons suivre l'effet d'une surexpression ou d'une extinction des gènes *in planta*. Dans le but de corrélérer la présence d'un ou de plusieurs allèles des gènes des voies de biosynthèse avec la capacité de produire les composés odorants désirables, nous choisirons plusieurs chémotypes sauvages d'Afrique du Sud. Je suis déjà en contact avec une botaniste qui finalise les papiers relatifs au protocole de Nagoya pour le transfert des plantes. Une fois l'analyse par GC-MS des chémotypes de *P. capitatum* les plus pertinents pour les croisements, ceux-ci seront croisés avec les deux autres parents.

En parallèle des hybridations, des analyses détaillées des allèles des gènes d'intérêt seront effectuées sur les parents ainsi que sur la descendance. Cette descendance pourra être cultivée dans un premier temps sous serre et ensuite en plein champ à Grasse afin d'analyser la ségrégation des traits odorants dans la descendance en corrélation avec l'expression des terpène synthases étudiées.

De plus, au niveau fondamental, le *Pelargonium* pourrait fournir un modèle très attractif pour comprendre la réaction enzymatique entre le géraniol et le citronellol. En effet, le ratio entre le citronellol et le géraniol est une des caractéristiques qui est déterminante en termes de qualité pour l'HE et qui permet de différencier notamment l'origine de l'HE comme nous l'avons vu. En effet, de nombreuses variétés ne produisent que du géraniol et ses dérivés mais très peu de citronellol. A l'inverse certaines variétés transforment très efficacement le géraniol en citronellol. L'intérêt est que ces variétés sont très proches les unes des autres produisant beaucoup d'autres terpènes en commun et ne se différenciant significativement que par cette différence de production entre le géraniol et ses dérivés et le citronellol et ses dérivés. Une analyse transcriptomique comparative permettrait de cibler quelques gènes différentiellement exprimés entre ces espèces. La caractérisation ultérieure de ceux-ci pourrait nous permettre d'étudier cette enzyme très importante pour la production de nombreuses HE, pourtant pas encore caractérisée de manière complète chez un végétal produisant de grandes quantités de citronellol.

Enfin, nous avons vu que la chimie des VOC dans le genre *Pelargonium* était incroyablement variée. Il est tout à fait imaginable de procéder à d'autres croisements entre espèces botaniques présentant des terpènes d'intérêt et d'obtenir un extrait tout à fait intéressant. Ainsi, les parfumeurs d'IFF ont déjà identifié plusieurs espèces potentiellement intéressantes par elles-mêmes mais probablement qu'un croisement bien choisi avec une autre espèce pourrait permettre la production d'un extrait tout à fait original.

## BIBLIOGRAPHIE

### - A -

- Abbott E, Hall D, Hamberger B, Bohlmann J (2010) Laser microdissection of conifer stem tissues: isolation and analysis of high quality RNA, terpene synthase enzyme activity and terpenoid metabolites from resin ducts and cambial zone tissue of white spruce (*Picea glauca*). BMC Plant Biol 10:106.
- Ackermann JD (1986) Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. Lindelyana 1: 108.
- Adams RP (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (4th edition). Carol Stream, Allured Publ. Corporation.
- Agarwal AA, Konno K (2009) Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. Annu rev ecol syst 40: 311-331
- Aharoni A, Giri AP, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel W, Verstappen FWA, Verhoeven HA, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ (2003) Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Cell 15: 2866–2884
- Aharaoni A, Giri AP, Verstappen FWA, Berteau CM, Sevenier R, Sun Z, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ (2004) Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. Plant Cell 16: 3110-3131
- Alemdar S, Hartwig S, Frister T, König JC, Scheper T, Beutel S (2015) Heterologous Expression, Purification, and Biochemical Characterization of  $\alpha$ -Humulene Synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. Appl Biochem Biotechnol 177: 1-16
- Andersen F, Andersen KH, Bernois A, Brault C, Bruze M, Eudes H, Gadras C, Signoret AJ, Mose K, Müller BP, Toulemonde B, Andersen KE (2015) Reduced content of chloroatranol and atranol in oak moss absolute significantly reduces the elicitation potential of this fragrance material. Contact Dermatitis 72: 75-83
- Andersen L, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 64:5245–5250
- Andreou A, Feussner I (2009) Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. Phytochem 70: 1504-1510
- Andriotis VM, Krugger NJ, Pike MJ, Smith AM (2010) Plastidial glycolysis in developing *Arabidopsis* embryos. New Physiologist 185: 649-662.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P (2006) Chemical composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. J Agr Food Chem 54: 4364-4370

- Antón S, Kamińska M, Stpiczyńska M (2012) Comparative Structure of the Osmophores in the Flower of *Stanhopea graveolens* Lindley and *Cycnoches chlorochilon* Klotzsch (*Orchidaceae*). *Acta Agrobot* 65: 11–22
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399
- Arimura GI, Garms S, Maffei M, Bossi S, Schulze B, Leitner M, Mithoefer A, Boland W (2008) Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta* 227: 453-464.
- Arneth A, Niinemets U, Pressley S, Bäck J, Hari P, Karl T, Noe S, Prentice IC, Serça D, Hickler T, Wolf A, Smith B (2007) Process-based estimates of terrestrial ecosystem isoprene emissions: incorporating the effects of a direct CO<sub>2</sub>–isoprene interaction. *Atmos Chem Phys* 7: 31-53.
- Arneth A, Schurgers G, Lathiere J, Duhl T, Beerling DJ, Hewitt CN, Martin M, Guenther A (2011) Global terrestrial isoprene emission models: sensitivity to variability in climate and vegetation. *Atmos Chem Phys* 11: 8037-8052
- Aros D, Gonzalez V, Allemann RK, Müller CT, Rosati C, Rogers HJ (2012) Volatile emissions of scented *Alstroemeria* genotypes are dominated by terpenes, and a myrcene synthase gene is highly expressed in scented *Alstroemeria* flowers. *J Exp Bot* 63: 2739–2752.
- Asadollahi MA, Maury J, Møller K, Nielsen KF, Schalk M, Clark A, Nielsen J (2008) Production of Plant Sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 Repression on Sesquiterpene Biosynthesis. *Biotechnol Bioeng* 99: 666-677
- Atkinson R et Aray J (2003) Atmospheric degradation of volatile organic compounds. *Chem Rev* 103: 4605-4638.
- Atti-Santos AC, Pansera MR, Paroul N, Atti-Serafini L, Moyna P (2004) Seasonal variation in essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae) from South Brazil. *J Essent Oil res* 16: 294-295
- Attucci S, Aitken SM, Gulick P, Ibrahim RK (1995) Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys* 321: 493-500
- Auldridge ME, McCarty DR, Klee HJ (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9: 1–7.
- Ayad HS, Reda FA, Abdalla MSA (2010) Effect of putrescine and Zinc on vegetative growth, photosynthetic pigments, lipid peroxidation and essential oil content of geranium (*Pelargonium graveolens* L.). *World J Agric Sci* 6: 601-608
- Ayasse M (2006) Chap 10: Floral scent and pollinator attraction in sexually deceptive orchids. *In* Dudareva N & Pichersky E (ed.) *Biology of floral scent*. Taylor & Francis Group.

- B -

- Back KW, He SL, Kim KU, Shin DH (1998) Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol* 39: 899-904.
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MMM, Ramadan HAI, Saini KS, Redwan EM (2014) Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact* 13: 141
- Baldwin IT, Schultz JC (1983) Rapid changes in tree leaf chemistry induce by damage: Evidence for communication between plants. *Science* 221: 277-279
- Baldwin IT, Schmelz EA, Ohnmeiss TE (1994) Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana symvestris* sp. *J Chem Ecol* 20: 2139-2157
- Banthorpe DV, Charlwood BV, Francis MJO (1972) The Biosynthesis of Monoterpenes. *Chem Rev* 72: 115-149.
- Barbour JD, Farrar RR, Kennedy GG (1991) Interaction of fertilizer regime with host-plant resistance in tomato. *Entomol exp appl* 60:289-300
- Bate NJ, Riley JCM, Thomson JE, Rothstein SJ (1998) Quantitative and qualitative differences in C-6-volatile production from the lipoxygenase pathway in an alcohol dehydrogenase mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plantarum* 104: 97-104
- Bayer RG, Stael S, Csaszar E, Teige M (2011) Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics* 11: 1287-1299
- Belcour B, Courtois D, Ehret C, Petiard V (1993) Rapid production of irones by maturation of orris rhizomes with two bacterial strains. *Phytochem* 34: 1313-1315
- Benabdelkader T, Guitton Y, Pasquier B, Magnard JL, Jullien F, Kameli A, Legendre L (2015) Functional characterization of terpene synthases and chemotypic variation in three lavender species of section *Stoechas*. *Physiol Plantarum* 153: 43-47.
- Benini C (2014) Variabilité morphologique, génétique et chimique de *Cananga odorata* (Lam.) Hook F. & Thomson Forma genuina en vue de l'amélioration qualitative de la production de l'huile essentielle d'ylang-ylang dans les îles de l'Océan Indien. Thèse de doctorat. Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech.
- Bennett MH, Mansfield JW, Lewis MJ, Beale MH (2002) Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochem* 60: 255-261
- Berger RG (2015) Biotechnology as a source of natural volatile flavours. *Curr Opin Food Sci* 1: 38-43

- Bergougnoux V, Caissard J, Jullien F, Magnard J, Scalliet G, Cock JM, Hugueney P, Baudino S (2007) Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta* 226: 853-866.
- Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M (1994) Positive Selection Vectors Using the F Plasmid ccdB Killer Gene. *Gene* 148, 71-74.
- Besumbes O, Sauret-Gueto S, Phillips MA, Imperial S, Rodriguez-Conception M, Boronat A (2004) Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol Bioeng* 88: 168–175
- Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002) Golden Rice: Introducing the  $\beta$ -Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A deficiency. *J Nutr* 506S-510S.
- Bhatia V, Maisnam J, Jain A, Sharma KK, Bhattacharya R (2015) Aphid-repellent pheromone E- $\beta$ -farnesene is generated in transgenic *Arabidopsis thaliana* over-expressing farnesyl diphosphate synthase2. *Ann Bot* 115: 581-591
- Boatright J, Negre F, Chen X, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D, Dudareva N (2004) Understanding in vivo benzenoid metabolism in *Petunia* petal tissue. *Plant Physiol* 135:1993-2011
- Bohlmann J, Steele CL, Croteau R (1997) Monoterpene synthases from Grand fir (*Abies grandis*) – cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S-5S)-pinene synthase. *J Biol Chem* 272: 21784-21792
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *PNAS* 95: 4126-4133.
- Bohlmann J, Phillips M, Ramachandiran V, Katoh S, Croteau R (1999) cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the Tpsd gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Arch Biochem Biophys* 375: 261-269
- Bohlmann J, Martin D, Oldham NJ, Gershenzon J (2000) Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization and functional expression of a myrcene/(E)- $\beta$ -ocimene synthase. *Arch Biochem Biophys* 375: 261-269
- Bohlmann J, Stauber EJ, Krock B, Oldham NJ, Gershenzon J, Baldwin IT (2002) Gene expression of 5-epi-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuate* and *N. sylvestris*. *Phytochem* 60: 109-116
- Bönisch F, Frotscher J, Stanitzek S, Rühl E, Wüst M, Bitz O, Schwab W (2014) A UDP-Glucose: Monoterpenol Glucosyltransferase Adds to the Chemical Diversity of the Grapevine Metabolome. *Plant physiol* 165: 561-581
- Borg-Karlson AK (1990) Chemical and ethological studies of pollination in the genus *Orphys* (Orchidaceae). *Phytochem* 29: 1359.

- Bourgaud F, Hehn A, Larbat ER, Doerper ES, Gontier EE, Kellner ES, Matern EU (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev* 5:293-308
- Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-conception M (2004) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J* 40: 188–199
- 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
- Bouvier F, Rahier A, Camara B (2005) Biogenesis, molecular and function of plant isoprenoids. *Prog Lip Res* 44: 241-252
- Bouwmeester HJ, Konings MCJM, Gershenzon J, Karp F, Croteau R (1999) Cytochrome P-450 dependent (+)-limonene-6-hydroxylation in fruits caraway (*carum carvi*). *Phytochem* 50: 243-248
- Bouwmeester HJ, Kodde J, Verstappen FWA, Altug IG, de Kraker JW, Wallaart TE (2002) Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiol* 129: 134-144.
- Bouwmeester HJ (2006) Engineering the essence of plants. *Nat Biotechnol* 24: 1359-1361
- Blanc VM, Pichersky E (1995) Nucleotide sequence of a *Clarkia breweri* cDNA clone of Ipil, a gene encoding isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant physiol* 108: 190-197.
- Blanch JS, Llusia J, Niinements U, Noe SM, Peñuelas J (2011) Instantaneous and historical temperature effects on  $\alpha$ -pinene emissions in *Pinus halepensis* and *Quercus ilex*. *J Environ Biol* 32: 1-6
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brand G (2001) L’olfaction: de la molécule au comportement. Marseille, coll. Neurosciences cognitives, Solal
- Brash AR (1999) Lipoxygenases : Occurrence, functions, catalysis, and acquisition substrate. *J Biol Chem* 274 : 23679-23682
- Breitmaier E (2006) Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Weinhein, Wiley-VCH.
- Broun P (2004) Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr Opin Plant Biol* 7: 202-209.
- Broun P, Liu Y, Queen E, Schwarz Y, Abenes ML, Leibman M (2006) Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary control of terpenoid accumulation. *Phytochem Rev* 5: 27-38

- Buck LB (2004) Unraveling the sense of smell. Nobel Lecture, December 8, 2004
- Brüggemann N, Schnitzler JP (2002) Comparison of isoprene emission, intercellular isoprene concentration and photosynthetic performance in water-limited oak (*Quercus pubescens* Willd. And *Quercus robur* L.) saplings. Plant Biol 4: 456-463
- Brun N, Colson M, Perrin A, Voirin B (1991) Chemical and morphological studies of the effects of ageing on monoterpene composition in *Mentha x piperita* leaves. Can J Bot 69: 2271-2278
- Buré CM, Sellier NM (2004) Analysis of the essential oil of Indonesian patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) using GC/MS (EI/CI). J Essent Oil Res 16: 17-19
- Burke C, Wildung MR, Croteau R (1999) Geranyl diphosphate synthase: cloning expression and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. PNAS 96: 13062-13067
- Burke C, Croteau RB (2002) Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression and characterization. Arch Biochem Biophys 405: 130-136.
- Burke C, Klettke K, Croteau R (2004) Heteromeric geranyl diphosphate synthase from mint: construction of a functional fusion protein and inhibition by bisphosphonate substance analogs. Arch Biochem Biophys 422: 52-60
- Bushman W, Thompson JF, Vargas L, Landy A (1985) Control of directionality in lambda site specific recombination. Science 230:906-911.
- Busso D, Delagoutte-Busso B, 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
- Bustin SAV, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MV, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55: 611-22.
- Byun-McKay A, Godard KA, Toudefallah M, Martin DM, Alfaro R, King J, Bohlmann J, Plant AL (2006) Wound-induced terpene synthase gene expression in sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil. Plant Physiol 140: 1009-1021

- C -

- Caissard JC, Joly C, Bergougnoux V, Huguency P, Mauriat M, Baudino S (2004) Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. Rec Res Dev Cell Biol 2: 1-15
- Caissard JC (2007) Caractérisation de cellules impliquées dans l'excrétion de métabolites secondaires volatils. Habilitation à Diriger les Recherches. Université Jean Monnet, Saint-Etienne.

- Caissard JC, Baudino S (2012) Sécrétion et stockage des Huiles essentielles par les végétaux. In : La Chimie des huiles essentielles. Vuibert.
- Caissard JC, Olivier T, Delbecque C, Palle S, Garry PP, Audran A, Valot N, Moja S, Nicole F, Magnard JL, Legrand S, Baudino S, Jullien F (2012) Extracellular Localization of the Diterpene Sclareol in Clary Sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). PLOS ONE 10: 48253-48260
- Calogirou A, Larsen BR, Kotzias D (1999) Gas-phase terpene oxidation products: a review. Atmos Environ 33: 1423-1439.
- Cane DE (1999) Sesquiterpene biosynthesis: cyclisation mechanisms. In DE Cane, ed, Comprehensive Natural Product Chemistry. Isoprenoid Including Carotenoids and Steroids, vol 2. Pergamon Press, Oxford, pp 155-200.
- Caniard A, Zerbe P, Legrand S, Cohade A, Valot N, Magnard JL, Bohlmann J, Legendre L. Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. BMC Plant Biol 12: 119
- Cao KAL, Boitard S, Besse P (2011) Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. BMC Bioinformatics 12: 253-269
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodriguez-Conception M, Ferrer A, Boronat A, Campos N (2002) Expression and molecular analysis of the Arabidopsis gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Plant physiol 129: 1581-1591
- Cassuto E, Lash T, Sriprakash KS, Radding CM. 1971. Role of exonuclease and protein of phage lambda in genetic recombination. V. Recombination of lambda DNA in vitro. PNAS 68:1639-1643.
- Cervantes-Cervantes M, Gallagher CE, Zhu C, Wurtzel ET (2006) Maize cDNAs expressed in endosperm encode functional farnesyl diphosphate synthase with geranylgeranyl diphosphate synthase activity. Plant Physiol 141: 220-231
- Chaintreau A, Joulain D, Marin C, Schmidt CO, Vey M (2003) GC-MS quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. J Agr Food Chem 51: 6398-6403
- Chakib S (1998) Les essences de geranium: influences pédoclimatique et saisonnière sur les essences marocaines, classification par les méthodes d'analyse de données. Dissertation, Université d'Aix-Marseille III
- Chand S, Pande P, Prasad A et al. (2007) Influence of integrated supply of Vermicompost and Zinc-Enriched compost with two graded levels of iron and Zinc on the productivity of Geranium. Commun Soil Sci Plan 38: 2581-2599
- Chang SJ, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Mol Biol Report 11: 113-116

- Chappell J, Wolf F, Proulx J, Cuellar R, Saunders C (1995) Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol* 109 : 1337–1343
- Chappell J, Wu S, Schalk M, Clark A (2007) Transformed plants accumulating mono- and/or sesquiterpenes. WO 2007004104 A2. 11 janv. 2007
- Chen A, Kroon PA, Poulter CD (1994) Isoprenyl diphosphate synthases: Protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of a secondary structure. *Protein Sci* 3: 600-607
- Chen D, Ye H, Li G (2000) Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci* 155: 179–185
- Chen F, Tholl D, D’Auria JC, Farooq A, Pichersky E, Gershenzon J (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* 15: 481-494
- Chen F, Ro D, Petri J, Gershenzon J, Bohlmann J, Pichersky E, Tholl D (2004) Characterization of root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiol* 135: 1956-1966
- Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E (2011) The family of terpene synthases in plants: mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J* 66: 212-229
- Chen G, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z, Grierson D (2004) Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol* 136: 2641-2651.
- Chen X, Chen Y, Heinstein P, Davisson VJ (1995) Cloning, expression, and characterization of (+)-delta-cadinene synthase: A catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 324: 255-266.
- Cock JM, Swarup R, Dumas C (1997) Natural antisens transcripts of the s locus receptor kinase gene related sequences in *Brassica oleracea*. *Mol General Genet* 225: 514-524.
- Colby SM, Alonso WR, Katahira EJ, McGarvey DJ, Croteau R (1993) (4S)-Limonene synthase from the oil glands of Spearmint (*Mentha spicata*) – cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *J Biol Chem* 268: 23016-23024
- Colquhoun TA, Schwieterman ML, Wedde AE, Schimmel BCJ, Marciniak DM, Verdonk JC, Kim JY, Oh Y, Gális I, Baldwin IT, Clark DG (2011). EOBII controls flower opening by functioning as a general transcriptomic switch. *Plant Physiol* 156: 974–984.
- Connolly JD, Hill RA (1991) Dictionary of Terpenoids. Chapman and Hall, London.
- Cornelissen JHC (2007) Global negative vegetation feedback to climate warming responses of leaf litter decomposition rates in cold biomes. *Ecol Lett* 10:619-627

- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM (1997) Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60: 52-60
- Croteau R, Sood VK (1985) Metabolism of monoterpenes: evidence for the function of monoterpene catabolism in peppermint (*Mentha piperita*) rhizomes. *Plant Physiol* 77: 801-806.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Gruissem W, Jones R (eds.)
- Croteau RB, Davis EM, Ringer KL, Wildung MR (2005) (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* 92: 562-577
- Cunillera N, Arró M, Delourme D, Karst F, Boronat A, Ferrer A (1996) *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *J Biol Chem* 271: 7774-7780
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol* 133:462-469

- D -

- D'auria JC, Chen F, Pichersky E (2003) Characterization of an acetyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol* 130: 466-476
- Daimon T, Fujii T, Yokoyama T, Katsuma S, Shinoda T, Shimada T, Ishikawa Y (2012) Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkworm *Bombyx mandarina*: the effects of bombykal and bombykyl acetate. *J Chem Ecol* 38:1031-1035.
- Dattée Y, Fellous M (2011) *Biotechnologies végétales : Environnement, alimentation, santé*. Vuibert (ed.), 75015 Paris
- Daviet L, Schalk M (2010) Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway. *Flavour Frag J* 25: 123-127.
- de Kraker JW, Franssen MCR, de Groot A, König WA, Bouwmeester HJ (1998) (+)-Germacrene A Biosynthesis – The committed Step in the biosynthesis of Bitter Sesquiterpene Lactones in Chicory. *Plant Physiol* 117: 1381-1392.
- de Vega C, Herrera CM, Dötterl S (2014) Floral volatiles play a key role in specialized ant pollination. *Perspect Plant Ecol* 16:32-42.
- Demarne F (1989) L'amélioration variétale du « Geranium Rosat » (*Pelargonium* sp.) contribution systématique, caryologique, et biochimique. Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud centre d'Orsay.

- Demarne F, Viljoen AM, Van der Walt JJA (1993) A study of variation in the essential oil and morphology of *Pelargonium capitatum* (L.) L'Hérit. (Geraniaceae). Part I. The composition of the Oil. *J Essent Oil Res* 5: 493-499
- Demarne F (2002) 'Rose-scented geranium' a *Pelargonium* grown for the perfumery industry. In Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium*. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 194-211
- Degenhardt J, Gershenzon J (2000) Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: A herbivore-inducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. *Planta* 210: 815–822.
- Degenhardt J, Gershenzon J, Baldwin IT, Kessler A (2003) Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Curr Opin Biotechnol* 14: 169-176.
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochem* 70: 1621-1637
- Deguerry F, Pastore L, Wu SQ, Clark A, Chappell J, Schalk M (2006) The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Arch Biochem Biophys* 454: 123-136
- Dell B, McComb JA (1978) Plant resins – their formation, secretion and possible functions. *Adv Bot Res* 6: 276-316
- Demarly Y, Sibi M (1996) Amélioration des plantes et biotechnologies. John Libbey Eurotext (Ed.), Paris.
- Demissie ZA, Sarker LS, Mahmoud SS (2011) Cloning and functional characterization of  $\beta$ -phellandrene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Planta* 233: 685-696
- Demissie ZA, Cella MA, Sarker LS, Thompson TJ, Rheault MR, Mahmoud SS (2012) Cloning, functional characterization and genomic organization of 1,8-cineole synthases from *Lavandula*. *Plant Mol Biol* 79: 393-411
- Demole E; Lederer E; Mercier D (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv Chim Acta* 45: 675–85
- DeLoache WC, Russ ZN, Narcross L, Gonzales AM, Martin VJJ, Dueber JE (2015) An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. *Nat Chem Biol* 11: 465–471
- Dewick PM (1999) The biosynthesis of C-5-C-25 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep* 16: 97-130
- Diaz-Chavez ML, Moniodis J, Madilao LL, Jancsik S, Keeling CI, Barbour EL, Ghisalberti EL, Plummer JA, Jones CG, Bohlman J (2013) Biosynthesis of Sandalwood Oil: *Santalum album* CYP76F Cytochromes P450 Produce Santalols and Bergamotol. *Plos One* 8: 75053-75063

- Dicke M, van Poecke RMP, de Boer JG (2003) Inducible indirect defense of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic Appl Ecol* 4: 27-42.
- Dicke M, Loon JJA, Soler R (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat Biol Chem* 5: 317-324
- Dicke M, Baldwin IT (2010) The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends Plant Sci* 15:167-175
- Dicke M, Loreto F (2010) Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends Plant Sci* 15: 115-117
- Diemer F, Caissard JC, Moja S, Calchat JC, Jullien F (2001) Altered monoterpene composition in transgenic mint following the introduction of 4S-limonene synthase. *Plant Physiol Biochem* 39, 603-614
- Dogbo O, Camara B (1987) Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 920: 140-148
- Donath J, Boland W (1994) Biosynthesis of acyclic homoterpenes in higher-plants parallels steroid-hormone metabolism. *J Plant Physiol* 143: 473-478.
- Dong L, Miettinen K, Goedbloed M, Verstappen FWA, Voster A, Jongsma MA, Memelink J, van der Krol S, Bouwmeester HJ (2013) Characterization of two geraniol synthases from *Valeriana officinalis* and *Lippia dulcis*: Similar activity but difference in subcellular localization. *Metab Eng* 20: 198-211
- Dubey VS, Luthra R (2001) Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. motia) inflorescence development. *Phytochem* 57: 675-680
- Dubey VS, Bhalla R, Luthra R (2003) An esterase is involved in geraniol production during palmarosa inflorescence development. *Phytochem* 63: 257-264
- Dudareva N, Raguso RA, Wang J, Ross JR, Pichersky E (1998) Floral Scent Production in *Clarkia breweri*. III. Enzymatic Synthesis and Emission of Benzenoid Esters. *Plant Physiol* 116 : 599-604
- Dudareva N, Pichersky E (2000) Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol* 122: 627-633
- Dudareva N, Murfitt LM, Mann CJ, Gorenstein N, Kolosova N, Kish CM, Bonham C, Wood K (2000) Developmental regulation of methylbenzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell* 12: 949-961
- Dudareva N, Martin D, Kish CM, Kolosova N, Gorenstein N, Fäldt J, Miller B, Bohlmann J (2003) (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of the three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell* 15: 1227-1241

- Bibliographie -

Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* 135:1893:1902.

Dudareva N, Negre F (2005) Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 113-118

Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006) Plant volatiles : Recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 25: 417-440

Dudareva N, Pichersky E (2008) Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr Opin Biotechnol* 19: 181-189.

- E -

Engelberth J, Alborn HT, Schmlezer EA, Tumlinson JH (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *PNAS* 101: 1781-1785

Enserink M (2005) Infectious diseases: Source of a new hope against malaria is in short supply. *Science* 307: 33

Erb M, Lenk C, Degenhardt J, Turlings TCJ (2009) The underestimated role of roots in defense against leaf attacks. *Trends Plant Sci* 14: 653-659

- F -

Fahn A (1979) *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press London, New-York, San-Francisco

Fahn A (2000) Structure and function of secretory cells. In: Hallahan DL, Gray J (eds) *Advances in botanical research*, Vol 31. Elsevier Science, Amsterdam, pp 37-75.

Falara V, Pichersky E, Kanellis AK (2010) A copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes. *Plant Physiol* 154: 301-310.

Fall R, Monson RK (1992) Isoprene emission rate and intercellular isoprene concentration as influenced by stomatal distribution and conductance. *Plant Physiol* 100: 987-992

Fantaye CA, Fegenhardt J, Gershenzon J (2014) Plant volatiles as key players in diverse ecological interactions. *J Endocyt Cell Res* 25: 1-8.

FAO (2009). *How to Feed the World in 2050*. Rome.

- 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 Mol Biol* 72: 235-245
- Fauconnier M, Marlier M (1997) Fatty acid hydroperoxides pathways in plants. A Review. *Grasas y Aceites* 48: 30-37.
- Feron G, Clastre M, Ambid C (1990) Prenyltransferase compartmentation in cells of *Vitis vinifera* cultivated in vitro. *FEBS Lett* 271: 236-238
- Filella I, (2007) Volatile organic compounds emissions in Norway spruce (*Picea abies*) in response to temperature changes. *Physiol Plant* 130:58-66
- Fischbach RJ, Zimmer W, Schnitzler JP (2001) Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.) *Eur J Biochem* 268: 5633-5638
- Flesch G, Rohmer M (1988) Prokaryotic hopanoids: The biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between triterpenes and D-ribose. *Eur J Biochem* 175: 405-411
- Flores-Perez U, Pérez-Gil J, Clos M, Wright LP, Botella-Pavía P, Phillips MA, Ferrer A, Gershenzon J, Rodríguez-Concepción M (2010) Pleiotropic Regulatory Locus 1 (PRL1) Integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid Metabolism in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 3, 101-112
- Forti L, Di Mauro S, Cramarossa MR, Filippucci S, Turchetti B, Buzzini P (2015) Non-Conventional Yeasts Whole Cells as Efficient Biocatalysts for the Production of Flavors and Fragrances. *Molecules* 20: 10377-10398
- Fossati E, Narcross L, Ekins A, Falguyret J, Martin VJJ (2015) Synthesis of morphinan alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One* 10: 124459-124473
- Fraga BM (2006) Natural Sesquiterpenoids. *Nat Prod Rep* 23: 943-972
- Francis MJO, Allcock C (1969) Geraniol- $\beta$ -D-Glucoside; Occurrence and synthesis in rose flowers. *Phytochem* 8: 1339-1347
- Frank MR, Deyneka JM, Schuler MA (1996) Cloning of wound-induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in pea. *Plant Physiol* 110: 1035-1046
- Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM (2008) Plant defense priming against herbivores: Getting Ready for different battle. *Plant Physiol* 146: 818-824
- Fürestenberg-Hägg J, Zagrobelny M, Bak S (2013) Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci* 14: 10242-10297.

- G -

- Gaffe J, Bru J, Causse M, Vidal A, Stamitti-Bert L, Carde J, Gallusci P (2000) LEFPS1, a Tomato Farnesyl Pyrophosphate Gene Highly Expressed during Early Fruit Development. *Plant Physiol* 123: 1351–1362.
- Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, Interrante MF, Smolke CD (2015) Complete biosynthesis of opioids in yeast (2015) *Science* 349: 1095-1100
- Gallage NJ, Hansen EH, Kannangara R, Olsen CE, Motawia MS, Jorgensen K, Holme I, Hebelstrup K, Grisoni M, Moller BL (2014) Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nature Commun* 5: 4037-4050
- Gallais A (2011) Méthodes de création de variétés en amélioration des plantes. Quae (eds.) 78026 Versailles
- Gallais A (2015) Comprendre l'amélioration des plantes : Enjeux, méthodes, objectifs et critères de sélection. Quae (eds.) 78026 Versailles
- Gang DR, Wang JH, Dudareva N, Nam KH, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E (2001) An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol* 125: 539-555
- Gang DR, Beuerle T, Ullmann P, Werck-Reichhart D, Pichersky E (2002) Differential production of meta hydroxylated phenylpropanoids in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) peltate glandular trichomes and leaves is controlled by the activities of specific acetyltransferases and hydroxylases. *Plant Physiol* 130: 1536-1544
- Gershenzon J, Croteau RB (1993) Terpenoid biosynthesis: The basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes – In *Lipid Metabolism in Plants* (T.S. Moore, ed.), pp. 339-388. CRC Press, Boca Raton, FL. 1993.
- Gershenzon J, McConkey ME, Croteau RB (2000) Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol* 122: 205-214
- Gershenzon J, Dudareva N (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* 3: 408-414
- Ghosh S, Singh UK, Meli VS, Kumar V, Kumar A, Irfan M, Chakraborty N, Chakraborty S, Datta A (2013) Induction of Senescence and Identification of Differentially Genes in Tomato in Response to Monoterpene. *Plos One* 8: e76029
- Gianfagna TJ, Carter CD, Sacalis JN (1992) Temperature and photoperiod influence trichome density and sesquiterpene content of *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. *Plant Physiol* 100:1403–1405
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinera in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930.

- Goodman M (2009) Market Watch: Sales of biologics to show robust growth through to 2013. *Nature Review* 8: 837
- Goodwin TW (1977) The prenillipids of the membranes of higher plants – in *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants* (M. Tevini and H.K. Lichtenthaler, eds), pp. 29-47. Springer-Verlag, Berlin. 1977.
- Götz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talon M, Dopazo J, Conesa A (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids res* 36: 3420-3435
- Gouinguene SP et Turlings TCJ (2002) The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol* 129: 1296-1307.
- Ghozlan et Fernandez (2010) *L'herbier parfumé. Plume de carotte* (ed.)
- Grisson-Pigé L, Bessière JM, Hossaert-McKey M (2002a) Specific attraction of fig-pollinating wasps: role of volatile compounds released by tropical figs. *J Chem Ecol* 28: 283-295
- Grisson-Pigé L, Hossaert-McKey M, Greef JM, Bessière JM, (2002b) Fig volatile compounds – a first comparative study. *Phytochem* 61: 61-71
- Guenther A, Hewitt CN, Erickson D, et al (1995) A global model of natural volatile organic compound emissions. *J Geophys Res-Atmos* 100: 8873–8892.
- Guirimand G, Guihur A, Phillips MA, Oudin A, Glévarec G, Melin C, Papon N, Clastre M, St-Pierre B, Rodriguez-Conception M, Burlat V, Courdavault V (2012) A single gene encode isopentenyl diphosphate isomerase isoforms targeted to plastids, mitochondria and peroxysomes in *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol* 79: 443-459
- Guitton Y (2010) Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavendula*: aspect évolutifs et physiologiques. Thèse de Doctorat. LBVpam-Université Saint-Etienne.
- Günnewich N, Page JE, Köllner TG, Degenhardt J, Kutchan TM (2007) Functional expression and characterization of trichome-specific (-)-limonene synthase and (+)- $\alpha$ -pinene synthase from *Cannabis sativa*. *Nat Prod Commun* 2 : 223-232
- Gupta C, Prakash D, Gupta S (2015) A Biotechnological Approach to Microbial Based Perfumes and Flavours. *J Microbiol Exp* 2: 34-41
- Gutermann 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) Rose scent : genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *The Plant Cell* 14: 2325-2338
- Gutiérrez-Alcalà G, Calo L, Gros F, Caissard JC, Gotor C, Romero LC (2005) A versatile promoter for the expression of proteins in glandular and non-glandular trichomes from a variety of plants. *J Exp Bot* 56: 2487-2494

- H -

- Hamama L, Naouar A, Gala R, Voisine L, Pierre S, Jeauffre J, Cesbron D, Leplat F, Foucher F, Dorion N, Hibrand-Saint Oyant L (2012) Overexpression of RoDELLA impacts the height, branching, and flowering behavior of *Pelargonium x domesticum* transgenic plants. *Plant Cell Rep* 31: 2015-2029
- Hanson JR (2000) Diterpenoids. *Nat Prod Rep* 17: 165-174
- Hartwig S, Frister T, Alemdar S, Li Z, Scheper T, Beutel S (2015) SUMO-fusion, purification, and characterization of a (p)-zizaene synthase from *Chrysopogon zizanioides*. *Biochem Bioph Res Co* 458: 883-889
- He J, Gray J, Leisner S (2010) A *Pelargonium* ARGONAUTE4 gene shows organ specific expression and differences in RNA and protein levels. *J Plant Physiol* 167: 319-325
- Hefner J, Ketchum RE, Croteau R (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production. *Arch Biochem Biophys* 360: 62–74.
- Hendel-Rahmanim K, Masci T, Vainstein A, Weiss D (2007) Diurnal regulation of scent emission in rose flowers. *Planta* 226: 1491-1499
- Helsper JPDFG, Davies JA, Bouwmeester HJ, Krol AF, van Kampen MH (1998) Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa* hybrid L. cv. Honesty. *Planta* 207: 88-95
- Henry LK, Gutensohn M, Thomas ST, Noel JP, Dudareva N (2015) Orthologs of the archaeal isopentenyl phosphate kinase regulate terpenoid production in plants. *PNAS* 112: 10050-10055
- Hezari M, Lewis NG, Croteau R (1995) Purification and characterization of Taxa-4(5),11(12)-diene Synthase from Pacific Yew (*Taxus brevifolia*) that Catalyzes the first Committed Step of Taxol Biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 322: 437-444
- Hezari M, Ketchum REB, Gibson DM, Croteau R (1997) Taxol Production and Taxadiene Synthase Activity in *Taxus Canadensis* Cell Suspension Cultures. *Arch Biochem Biophys* 337: 185-190
- Hill RE, Sayer BG, Spencer D (1989) Biosynthesis of vitamin B6: incorporation of D-1-deoxyxylulose. *J Am Chem Soc* 111: 1916-1917
- Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R, Stüber D (1988) Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nat Biotechnol* 6: 1321–1325
- Hohn TM, Ohlrogge JB (1991) Expression of a fungal sesquiterpene cyclase gene in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 97: 460–462
- Holland JN, Cheng W, Crossley DA (1996) Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of below-ground C flux using carbon-14. *Oecologia* 107: 87-94

- Holopainen JK, Gershenzon J (2010) Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci* 15: 176-184
- Hosoi M, Ito M, Yagura T, Adams RP, Honda G (2004) cDNA isolation and functional expression of myrcene synthase from *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* 27: 1979-1985
- Houimli SIM, Denden M, Mouhandes BD (2010) Effect of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress. *Eura J Biosci* 4, 96-104.
- Howe GA, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu rev plant boil* 59: 41-66.
- Hsiao Y, Jeng M, Tsai W, Chuang Y, Li C, Wu T, Kuoh CS, Chen W, Chen H (2008) A novel homodimeric geranyldiphosphate synthase from orchid *Phalaenopsis bellina* lacking a DD(X)<sub>2-4</sub>D motif. *Plant J* 55: 719-733
- Hsieh FL, Chang TH, Ko TP, Wang AHJ (2011) Structure and Mechanism of an *Arabidopsis* Medium/Long-Chain-Length Prenyl Pyrophosphate Synthase. *Plant Physiol* 155: 1079-1090
- Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Res* 9: 868-877
- Huang K, Lee Y, Tseng Y, Wang S, Chu F (2015) Cloning and functional characterization of a monoterpene synthase gene from *Eleutherococcus trifoliatus*. *Holzforschung* 69: 163-171
- Huber DPW, Philippe RN, Godard KA, Sturrock RN, Bohlmann J (2005) Characterization of four terpene synthase cDNAs from methyl jasmonate-induced Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii*. *Phytochem* 66: 1427-1439
- Huguney P, Camara B (1990) Purification and characterization of farnesyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annum*. *FEBS Lett* 273: 235-238
- Hummel GM, Naumann M, Schurr U, Walter A (2007) Root growth dynamics of *Nicotiana attenuate* seedlings are affected by simulated herbivore attack. *Plant Cell Env* 30: 1326-1336.

- Ignea C, Ioannou E, Georgantea P, Loupassaki S, Triikka FA, Kanellis AK, Makris AM, Roussis V, Kampranis SC (2014) Reconstructing the chemical diversity of labdane-type diterpene biosynthesis in yeast. *Metab Eng* 28: 91-103.
- Ignea C, Triikka FA, Nikolaidis AK, Georgantea P, Ioannou E, Loupassaki S, Kefalas P, Kanellis AK, Roussis V, Makris AM, Kampranis SC (2015) Efficient diterpene production in yeast by engineering Erg20P into a geranylgeranyl diphosphate synthase. *Metab Eng* 27: 65-75.

- Iijima Y, Davidovich-Rikanati R, Fridman E, Gang DR, Bar E, Lewinsohn E, Pichersky E (2004a) The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiol* 136: 3724-3736
- Iijima Y, Gang DR, Fridman E, Lewinsohn E, Pichersky E (2004b) Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiol* 134: 370-379
- Iijima Y, Wang G, Fridman E, Pichersky E (2006) Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. *Arch Biochem Biophys* 448: 141-149
- Ishjhara M, Tsuneya T, Uneyama K (1993) Fragrant sesquiterpenes from agarwood. *Phytochem* 33: 1147-1155
- Ito M, Honda G (2007) Geraniol synthases from *Perilla* and their taxonomical significance. *Phytochem* 68: 446-453
- IPCC (2014) Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Field CB et al. eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 1-32.

- J -

- Jacquin-Joly E, Merlin C (2004) Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology. *J Chem Ecol* 30: 2359-2397
- Jajic I, Sarna T, Strzalka K (2015) Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. *Plants* 4: 393:411
- Jakobsen HB, Olsen CE (1994) Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta* 192: 365-371
- Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M (2001) A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 13: 1095-1107
- Jin J, Kim MJ, Dhandapani S, Tjhang JG, Yin J, Wong L, Sarojam R, Chua N, Jang I (2015) The floral transcriptome of ylang ylang (*Cananga odorata* var. *fruticosa*) uncovers biosynthetic pathways for volatile organic compounds and a multifunctional and novel sesquiterpene synthase. *J Exp Bot* 66: 3959-3979.
- Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T (2011) Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with gpt delta rats. *Toxicology* 290: 312-321

- Jones CG, Keeling CI, Ghisalberti EL, Barbour EL, Plummer JA, Bohlmann J (2008) Isolation of cDNA and functional characterization of two multi-product terpene synthase enzymes from sandalwood, *Santalum album* L. Arch Biochem Biophys 477: 121-130
- Jones CG, Moniodis J, Zulak KG, Scaffidi A, Plummer JA, Ghisalberti EL, Barbour EL, Bohlmann J (2011) Sandalwood Fragrance Biosynthesis Involves Sesquiterpene Synthases of Both the Terpene Synthase (TPS)-a and TPS-b Subfamilies, including Santalene Synthases. J Biol Chem 286: 17445-17454
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N (2010) Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. Prog Lipid Res 49: 128-158.
- Julliard JH, Douce R (1991) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. PNAS 88: 2042-2045.
- Jullien F, Moja S, Bony A, Legrand S, Petit C, Benabdelkader T, Poirot K, Fiorucci S, Guitton Y, Nicolé F, Baudino S, Magnard JL (2014) Isolation and functional characterization of a s-cadinol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia*. Plant Mol Biol 84: 227-241.

- K -

- Kampranis SC, Ioannidis D, Purvis A, Mahrez W, Ninga E, Katterelos NA, Anssour S, Dunwell JM, Degenhardt J, Makris AM, Goodenough PW, Johnson CB (2007) Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: Structural insights into the evolution of terpene synthase function. Plant Cell 19: 1994-2005
- Kampranis SC, Makris AM (2012) Developing a yeast cell factory for the production of terpenoids. Comput Struct Biotechnol J 3: 6-12
- Kanakidou M, Seinfeld JH, Pandis SN, Barnes I, Dentener FJ, Facchini MC, Van Dingenen R, Ervens B, Nenes A, Nielsen CJ, Swietlicki E, Putaud JP, Balkanski Y, Fuzzi S, Horth J, Moortgat GK, Winterhalter R, Myhre CEL, Tsigaridis K, Vignati E, Stephanou EG, Wilson J (2005) Organic aerosol and global climate modelling: a review. Atmos Chem Phys 5: 1053-1123
- Kant MR, Jonckheere W, Knecht B, Lemos F, Liu J, Schimmel BCJ, Villarroel CA, Ataíde LMS, Dermauw W, Glas JJ, Egas M, Janssen A, Van Leeuwen T, Schuurink RC, Sabelis MW, Alba JM (2015) Mechanisms and ecological consequences of plant defense induction and suppression in herbivore communities. Ann Bot 115: 1015-1051
- Kaplan I, Halitschke R, Kessler A, Sardanelli S, Denno RF (2008) Constitutive and induced defenses to herbivory in above and belowground plant tissues. Ecology 89: 392-406.
- Kappers IF, Aharoni A, van Herpen T, Luckerhoff LLP, Dicke M, Bouwmeester HJ (2005) Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis. Science 309: 2070-2072

- Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195
- Kazama H, Dan H, Imaseki H, Wasteneys GO (2004) Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells. *Plant Physiol* 134:1614–1623
- Keasling JD (2010) Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science* 330: 1356-1358.
- Keasling JD, Venter JC (2013) Applications of Synthetic Biology to Enhance Life. *In* *Bridge* (Ed. Fall).
- Keeling CI, Weisshaar S, Ralph SG, Jancsik S, Hamberger B, Dullat HK, Bohlmann J (2011) Transcriptome mining, functional characterization, and phylogeny of a large terpene synthase gene family in spruce (*Picea spp.*). *BMC Plant Biology* 11: 43-56
- Keenan T, Niinemets U, Sabate S, Gracia C, Peñuelas J (2009) Process based inventory of isoprenoid emissions from European forests: model comparisons, current knowledge and uncertainties. *Atmos Chem Phys* 9: 4053-4076
- Kegge W, Pierik R (2009) Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends Plant Sci* 15: 126-132
- Kennedy GG, Yamamoto RT, Dimock MB, Williams WG, Bordner J (1981) Effect of day length and light intensity on 2-tridecanone levels and resistance in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *Manduca sexta*. *J Chem Ecol* 7:707–716
- Kesselmeier J, Ciccioli P, Kuhn U, Stefani P, Biesenthal T, Rottenberger S, Wolf A, Vitullo M, Valentini R, Nobre A, Kabat P, Andreae MO (2002) *Global Biogeochem Cy* 16: 11-26
- Kessler A, Baldwin IT (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144
- Keszei A, Brubaker CL, Köllner T, Degenhardt J, Foley WJ (2010) Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from *Australian Myrtaceae*. *Phytochem* 71: 844-852.
- Ketchum REB, Gibson DM (1996) Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. *Plant Cell Tiss Org* 46: 9-16
- Khan R, Karandikar A, Wagle A et al. (2009) Changes in terpenoid profile in *Pelargonium graveolens* when cultivated at sea level. *Fafai J* 11: 55-58
- Khan ZR, Ampongnyarko K, Chiliswa P, Hassanali A, Kimani S, Lwande W, Overholt WA, Pickett JA, Smart LE, Wadhams LJ, Woodcock CM (1997) Intercropping increase parasitism of pests. *Nature* 388: 631-632.
- Khan ZR, Pickett JA, van den Berg J, Wadhams LJ, Woodcock CM (2000) Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and strigga control for maize and shoghum in Africa. *Pest manag Sci* 56: 957-962.

- Kim MY, Chang YJ, Bang MH, Baek NI, Jin J, Lee CH, Kim SU (2005) CDNA isolation and characterization of (+)-germancrene A synthase from *Ixeris dentate* form. *Albiflora Hara*. *J Plant Biol* 48: 178-186
- Kim SH, Chang YJ, Kim SU (2008) Tissue Specificity and Developmental Pattern of Amorpha-4,11-diene Synthase (ADS) Proved by ADS Promoter-Driven GUS Expression in the Heterologous Plant, *Arabidopsis thaliana*. *Planta Med* 74: 188-193
- Klein-Marcuschamer D, Ajikumar PK, Stephanopoulos G (2007) Engineering microbial cell factories for biosynthesis of isoprenoid molecules: beyond lycopene. *Trends Biotechnol* 25: 417-424
- Kleinwächter M, Paulsen J, Bloem E, Schnug E, Selmar D (2015) Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*). *Ind Crops Prod* 64: 158-166
- Kingstone DGI (1991) The chemistry of taxol. *Pharmacol Ther* 52:1-34.
- Knudsen JT, Tollsten L, Bergstrom G (1993) Floral scents – a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochem* 33: 253-280
- Knudsen JT et Gershenzon J (2006) The chemistry diversity of floral scent. In: *Biology of Floral Scent*. Pp. 27-52. Dudareva N et Pichersky E (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL.
- Köksal M, Jin Y, Coates RM, Croteau R, Christianson DW (2011) Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature* 469: 116-120
- Köllner TG, Schnee C, Gershenzon J, Degenhardt J (2004) The variability of sesquiterpenes cultivars is controlled by allelic emitted from two *Zea mays* variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell* 16: 1115–1131.
- Köllner TG, Schnee C, Li S, Svatos A, Schneider B, Gershenzon J, Degenhardt J, (2008) Protonation of a neutral (S)- $\beta$ -bisabolene intermediate is involved in (S)- $\beta$ -macrocarpene formation by the maize sesquiterpene synthases TPS6 and TPS11. *J Biol Chem* 283: 20779-20788.
- Kolosova 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 methyl benzoate in snapdragon flowers. *Plant Physiol* 126: 956-964.
- Kost C, Heil M (2006) Herbivore-induced plant volatiles induce and indirect defense in neighbouring plants. *J Ecol* 94: 619-628
- Krasnyanski S, May RA, Loskutov A, Ball TM, Sink KC (1999) Transformation of the limonene synthase gene into peppermint (*Mentha x piperita* L.) and preliminary studies on the essential oil profiles of single transgenic plants. *Theor Appl Genet* 99: 676–682
- Krings U, Berger RG (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 1-8

- Bibliographie -

Kumar ANA, Joshi G, Ram HYM (2012) Sandalwood: history, uses, present status and the future. *Curr Sci* 103: 1408-1416

Kumeta Y, Ito M (2010) Characterization of  $\delta$ -Guaiene Synthases from Cultured Cells of *Aquilaria*, Responsible for the formation of the Sesquiterpenes in Agarwood. *Plant Physiol* 154: 1998-2007

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

Kurz WA, Dymond CC, Stinson G, Rampley GJ, Neilson ET, Carroll AL, Ebata T, Safranyik L (2008) Mountain pine beetle and forest carbon feedback to climate change. *Nature* 452: 987-990

- L -

Laule O, Fürholz A, Chang H, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Gruissem W, Lange BM (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 100: 6866-6871

Kurz WA, Dymond CC, Stinson G, Rampley GJ, Neilson ET, Carroll AL, Ebata T, Safranyik L (2008) Mountain pine beetle and forest carbon feedback to climate change. *Nature* 452: 987-990

| 320

Lai L, Kang JX, Li R, Wang J, Witt WT, Yong HY, Hao Y, Wax DM, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Starzl TE, Prather RS, Dai Y (2006) Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnol* 24: 435-436

Landmann C, Fink B, Festner M, Dregus M, Engel KH, Schwab W (2007) Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Arch Biochem Biophys* 465: 417-429.

Landy A. 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58:913-949.

Lange BM, Croteau R (1999a) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365: 170-174

Lange BM, Croteau R (1999b) Genetic engineering of essential oil production in mint. *Curr Opin Plant Biol* 2: 139-144

Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *PNAS* 97: 13172-13177.

Lange BM (2015) The Evolution of Plant Secretory Structures and Emerges of Terpenoid Chemical Diversity. *Annu Rev Plant Biol* 66: 139-159

- Laothawornkitkul J, Taylor JE, Paul ND, Hewitt CN (2009) Biogenic volatile organic compounds in earth system. *New Phytologist* 183: 27-51
- Latchman DS (2003) *Eucaryotic transcription factors*. Academic Press, San Diego.
- Laule O, Fürholz A, Chang H, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grisse W, Lange M (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 100: 6866-6871
- Lavid N, Wang J, Shalit M, Gutterman I, Bar E, Beuerle T, Weiss D, Vainstein A, Pichersky E, Lewinsohn E (2002) O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol* 129: 1899-1907
- Lavy M, Lewinsohn E, Larkov O, Ravid U, Vainstein A, Weiss D (2002) Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Mol Breed* 9: 103-111
- Lee S, Chappell J (2008) Biochemical and genomic characterization of terpene synthases in *Magnolia grandiflora*. *Plant Physiol* 147: 1017-1033
- Légrand S, Valot N, Nicolé F, Moja S, Baudino S, Jullien F, Magnard JL, Caissard JC, Legendre L (2010) One-step identification of conserved miRNAs, their targets, potential transcription factors and effector genes of complete secondary metabolism pathways after 454 pyrosequencing of calyx cDNAs from the Labiate *Salvia sclarea* L. *Gene* 450: 55-62
- Leguet A, Gibernau M, Shintu L, Caldarelli S, Moja S, Baudino S, Caissard JC (2014) Evidence for early intracellular accumulation of volatile compounds during spadix development in *Arum italicum* L. and preliminary data on some tropical Aroids. *Naturwissenschaften* 101: 623-635
- Leonard E, Ajikumar PK, Thayer K, Xiao W, Mo JD, Tidor B, Stephanopoulos G, Prather KLJ (2010) Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. *PNAS* 107: 13654-13659
- Lesburg CA, Zhai GZ, Cane DE, Christianson DW (1997) Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* 277: 1820-1824.
- Levin RA, McDade LA, Raguso RA (2003) The systematic Utility of Floral and Vegetative Fragrance in Two Genera of *Nyctaginaceae*. *Syst. Biol* 52: 334-351.
- Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, Matsui K, Tadmor Y, Nam KH, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gepstein S, Pichersky E (2001) Enhanced Levels of the Aroma and Flavor Compound S-Linalool by Metabolic Engineering of the Terpenoid Pathway in Tomato Fruits. *Plant Physiol* 127: 1256-1265
- Li CP, Larkins BA (1996) Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthase. *Gene* 171: 193-196

- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA (2004) The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16:126–143
- Liang L, Guo Q, Zhang Z, Xu Y, Han X, Liu J (2014) Cloning, prokaryotic expression, and functional identification of a sesquiterpene synthase gene (AsSS4) from *Aquilaria sinensis*. *Yaoxue Xuebao* 49: 1724-1729
- 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. *Mitochondr DNA* 15: 153:158
- Liavonchanka AL, Feussner I (2006) Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* 163: 348-357
- Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plantarum* 101: 643-652.
- Lin CF, Shen BZ, Xu ZN, Köllner TG, Degenhardt J, Dooner HK (2008) Characterization of the monoterpene synthase gene *tps26*, the ortholog of a gene induced by insect herbivory in maize. *Plant Physiol* 146: 940-951
- Little DB, Croteau RB (2002). Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *Arch Biochem Biophys* 402: 120-135.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 25: 402–408
- Logan BA, Monson RK (1999) Thermotolerance of leaf discs from four isoprene-emitting species is not enhanced by exposure to exogenous isoprene. *Plant Physiol* 120: 821-826.
- Logan BA, Anchordoquy TJ, Monson RK, Pan RS (1999) The effect of isoprene on the properties of spinach thylakoids and phosphatidylcholine liposomes. *Plant Biol (Stuttg)* 1: 602-606
- Loivamäki M, Louis S, Cinege G, Zimmer I, Fischbach RJ, Schnitzler JP (2007) Circadian rhythms of isoprene biosynthesis in grey poplar leaves. *Plant Physiol* 143: 540-551
- Lombardero MJ, Pereira-Espinel J, Ayres MP (2013) Foliar terpene chemistry of *Pinus pinaster* and *P. radiata* responds differently to Methyl Jasmonate and feeding by larvae of the pine processionary moth. *Forest Ecol Manag* 310: 935-943.
- Loreto F, Ciccioli P, Brancaleoni E, Cecinato A, Frattoni M, Sharkey TD (1996) Different sources of reduced carbon contribute to the form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. *PNAS* 93: 9966-9969

- Loreto F, Ciccioli P, Brancaleoni E, Cecinato A, Frattoni M (1998) Measurement of isoprenoid content in leaves of Mediterranean *Quercus* spp. by a novel and sensitive method and estimation of the isoprenoid partition between liquid and gas phase inside the leaves. *Plant Sci* 136: 25-30
- Loreto F, Pinelli P, Brancaleoni E, Ciccioli P (2004) <sup>13</sup>C Labeling reveals chloroplastic and extrachloroplastic pools of dimethylallyl Pyrophosphate and their contribution to isoprene formation. *Plant Physiol* 135: 1903-1907
- Loreto F, Schnitzler J (2010) Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci* 15: 154-166.
- Loughrin JH, Hamilton-Kemp TR, Andersen RA, Hildebrand DF (1991) Circadian rhythm of volatile emission from flowers of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens*. *Physiol Plantarum* 83: 492-496
- Luan F, Wüst M (2002) Differential incorporation of 1-deoxy-d-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry* 60: 451-459
- Luan F, Mosandl A, Münch A, Wüst M (2005) Metabolism of geraniol in grape mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, *E/Z*-isomerization, oxidation and glycosylation. *Phytochem* 66: 295-303
- Luckenbach T, Epel D (2005) Nitromusk and Polycyclic Musk Compounds as Long-Term Inhibitors of Cellular Xenobiotic Defense Systems Mediated by Multidrug Transporters. *Environ Health Persp* 113: 17-24
- Lücker J, Bouwmeester HJ, Schwab W, Blaas J, van der Plas LHW, Verhoeven HA (2001) Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl-b-D-glucopyranoside. *Plant J* 27: 315-324
- Lücker J, Bowen P, Bohlmann J (2004) *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochem* 65: 2649-2659
- Lücker J, Schwab W, van Hautum B, Blaas J, van der Plas LHW, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA (2004) Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiol* 134: 510-519
- Lücker J, Schwab W, Franssen MCR, van der Plas LHW, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA (2004) Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis: two-step production of (C)-trans-isopiperitenol by tobacco. *Plant J* 39: 135-145
- Ludwig-Müller J (2000) Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regul* 32: 219-230

- M -

- 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*. *J Exp Bot* 63: 2809-2823
- Maffei ME, Gertsch J, Appendino G (2011) Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Nat Prod Rep* 28: 1359-1380.
- Mahmoud SS, Croteau RB (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofurane synthase. *PNAS* 98: 8915-8920
- Mahmoud SS, Croteau RB (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7: 366-373
- Mahmoud SS, Williams M, Croteau RB (2003) Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. *Phytochem* 65: 547-554
- Mahmoud SS, Williams M, Croteau R (2004) Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. *Phytochem* 65: 547-554
- Magnard J, Rocchia A, Caissard J, Vergne P, Sun P, Hecquet R, Dubois A, Hibrand-Saint Oyant L, Jullien F, Nicole F, Raymond O, Huguet S, Baltenweck R, Meyer S, Claudel P, Jeauffre J, Rohmer M, Foucher F, Huguency P, Bendahmane M, Baudino S (2015) Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses. *Science* 349: 81-83
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96: 713-723.
- Marks MD, Tian L, Wenger JP, Omburo SN, Soto-Fuentes W, He J, Gang DR, Weiblen GD, Dixon RA (2009) Identification of candidate genes affecting D9-tetrahydrocannabinol biosynthesis in *Cannabis sativa*. *J Exp Bot* 60: 3715-3726.
- Martin DM, Fäldt J, Bohlmann J (2004) Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol* 135: 1908-1927
- Martin DM, Toub O, Chiang A, Lo BC, Ohse S, Lund ST, Bohlmann J (2009) The bouquet of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) flowers arises from the biosynthesis of sesquiterpene volatiles in pollen grains. *PNAS* 106: 7245-7250
- Martin DM, Aubourg S, Schouwey MB, Daviet L, Schalk M, Toub O, Lund ST, Bohlmann J (2010) Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (*Vitis vinifera*) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays. *BMC Plant Biol* 10: 226-247
- Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD (2003) Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol* 21: 796-802

- Martins MP, Ouazzani J, Arcile G, Jeller AH, de Lima JPF, Seleglim MHR, Oliveira ALL, Deboni HM, Venâncio T, Yokoya NS, Fujii MT, Porto ALM (2015) Biohydroxylation of (-)-Ambrox®, (-)-Sclareol, and (+)-Sclareolide by whole Cells of Brazilian Marine-Derived Fungi. *Mar Biotechnol* 17: 211-218
- Maruyama T, Ito M, Kiuchi F, Honda G (2001) Molecular cloning, functional expression and characterization of d-limonene synthase from *Schizonepeta tenuifolia*. *Biol Pharm Bull* 24: 373-377
- Maruyama T, Saeki D, Ito M, Honda G (2002) Molecular cloning, functional expression and characterization of d-limonene synthase from *Agastache rugose*. *Biol Pharm Bull* 25: 661-665
- Matsui K, Ujita C, Fujimoto S, Wilkinson J, Hiatt B, Knauf V, Kajiwarra T, Feussner I (2000) Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyase from cucumber. *FEBS Lett* 481: 183-188.
- Maury J, Asadollahi MA, Møller K, Schalk M, Clark A, Formenti LR, Nielsen J (2008) Reconstruction of a bacterial isoprenoid biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* *FEBS Lett* 582 : 4032-4038
- McCormick AC, Unsicker SB, Gershenzon J (2012) The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. *Trends Plant Sci* 17:303-310
- McDowell ET, Kapteyn J, Schmidt A, Li C, Kang JH, Descour A, Shi F, Larson M, Schillmiller A, An LL, Jones AD, Pichersky E, Soderlund CA, Gang DR (2011) Comparative functional genomic analysis of *Solanum glandular trichome* types. *Plant Physiol* 155: 524-539.
- McFarlane H, Shin JJH, Bird DA, Samuels AL (2010) Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell* 22: 3066-3075
- McKay SAB, Hunter WL, Godard KA, Wang SX, Martin DM, Bohlmann J, Plant AL (2003) Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development and gene expression of (-)-pinene synthase in Sitka spruce. *Plant Physiol* 133: 368-378
- MacTavish HS, Davies NW, Menary RC (2000) Emission of volatiles from brown boronia flowers: some comparative observations. *Ann Bot* 86: 347-354
- Mehrshahi P, Stefano G, Andaloro JM, Brandizzi F, Froehlich JE, DellaPenna D (2013) Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *PNAS* 110: 12126-12131
- Mehrshahi P, Johnny C, DellaPenna D (2014) Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER. *Trends Plant Sci* 19: 501-507
- Mercke P, Kappers IF, Verstappen FWA, Vorst O, Dicke M, Bouwmeester HJ (2004) Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiol* 135: 2012–2024
- Michellon R (1975) Essais de bouturage du Géranium rosat. In: Report IRAT, Saint-Denis (Réunion), 1975
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Env* 33: 453-467.

- Milne PJ, Riemer DD, Zika RG, Brand LE (1995) Measurement of vertical distribution of isoprene in surface water, its chemical fate, and its emission from several phytoplankton monocultures. *Mar Chem* 48: 237-244
- Mithöfer A, Boland W (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Ann Rev Plant Biol* 63: 431-450
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11: 15-19
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16: 300-309
- Moniodis J, Jones CG, Barbour EL, Plummer JA, Ghisalberti EL, Bohlmann J (2015) The transcriptome of sesquiterpenoid biosynthesis in heartwood xylem of Western Australia sandalwood (*Santalum spicatum*). *Phytochem* 113: 79-86
- Monson RK, Fall R (1989) Isoprene emission from aspen leaves – influence of environment and relation to photosynthesis and photorespiration. *Plant Physiol* 90: 267–274.
- Mora-Pale M, Sanchez-Rodriguez SP, Linhardt RJ, Dordick JS, Koffas MAG (2014) Biochemical strategies for enhancing the *in vivo* production of natural products with pharmaceutical potential. *Curr Opin Biotechnol* 25: 86-94
- Morita M, Shitan N, Sawada K, Van Montagu MCE, Inzé D, Rischer H, Goosens A, Oksman-Caldentey K, Moriyama Y, Yazaki K (2009) Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (mate) transporter in *Nicotiana tabacum*. *PNAS* 106: 2447-2452
- Muchtaridi, Subarnas A, Apriyantono A, Mustarichie R (2010) Identification of Compounds in the Essential Oil of Nutmeg Seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) That Inhibit Locomotor Activity in Mice. *Int J Mol Sci* 11: 4771-4781
- Mueller MJ (2004) Archetype signals in plants: Phytoprostanes. *Curr Opin Plant Biol* 7: 441-448.
- Muñoz-Bertomeu, Arrillaga I, Ros R, Segura J (2006) Up-Regulation of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. *Plant Physiol* 142: 890–900
- Muñoz-Bertomeu, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2008) Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metab Eng* 10:166-177

- N -

- Nagegowda DA, Gutensohn M, Wilkerson CG, Dudareva N (2008) Two nearly identical terpene synthase catalyze the formation of nérolidol and linalool in snapdragon flowers. *Plant J* 55: 224-239
- Nageswara Rao M, Ganeshiah KN, Uma Shaanker R (2007) Assessing threats and mapping sandal resources to identify genetic 'hot-spot' for in-situ conservation in peninsular India. *Conserv Genet* 8: 925–935.
- Nakajima M, Toi N & Sugimura Y (1994) The Japanese market for perfumery products. *Proceedings of 4emes Rencontres Techniques et Economiques Plantes Aromatiques et Médicinales*, Nyons, France (pp. 71–75)
- Nakamura S, Shimada H, Masuda T, Ohta H, Takamiya K (2001) Two distinct isopentenyl diphosphate isomerase in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. *FEBS Lett* 506: 61-64
- Natsuaki KT, Tomaru K, Ushiku S, Ichikawa Y, Sugimura Y, Natsuaki T, Okuda S, Teranaka M (1994) Characterization of two viruses isolated from patchouli in Japan. *Plant Dis* 78: 1094–1097
- Negre F, Kish CM (2003) Regulation of methylbenzoate emission after pollinisation in snapdragon and petunia flowers. *Plant Cell* 15:2992-3006
- Nejad AR, Ismaili A (2014) Changes in growth, essential oil yield and composition of geranium (*Pelargonium graveolens* L.) as affected by growing media. *J Sci Food Agric* 94: 905-910
- Nielsen J (2013) Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered* 4: 207-211
- Niinemets U, Reichstein M (2003) Controls on the emission of plant volatiles through stomata: A sensitivity analysis. *J geophys res* 108: 4208-4217
- Niinemets U, Loreto F, Reichstein M (2004) Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends Plant Sci* 9: 180-186
- Niinemets U, Peñuelas J (2008) Gardening and urban landscaping: significant players in global change. *Trends Plant Sci* 13: 60-65.
- Niinemets U (2010) Mild versus severe stress and BVOCs: thresholds, priming and consequences. *Trends Plant Sci* 15: 145-153.
- Niinemets U, Arneth A, Kuhn U, Monson RK, Penuelas J, Staudt M (2010) The emission factor of volatile isoprenoids: stress, acclimatation, and developmental responses. *Biogeosciences* 7: 2203-2220

Noel JP, Dixon RA, Pichersky E, Zubieta C, Ferrer JL (2003) Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. In JT Romero, ed, Recent Advances in Phytochemistry, Vol 37. Elsevier Science, Oxford, pp 37-58

- O -

Ohara K, Ujihara T, Endo T, Sato F, Yazaki K (2003) Limonene production in tobacco with *Perilla limonene* synthase cDNA. J Exp Bot 54: 2635–2642

Ohnmeiss TE, McCloud ES, Lynds GY, Baldwin IT (1997) Within-plant relationships among wounding, jasmonic acid, and nicotine: implications for defense in *Nicotiana sylvestris*. New Phytologist 137: 441-452.

Oikawa PY, Lerdau MT (2013) Catabolism of volatile organic compounds influences plant survival. Trends Plant Sci 18: 695-703

Ormeno E, Bousquet-Mélou A, Mévy J-P, Greff S, Robles C, Bonin G, Fernandez C (2007a) Effect of intraspecific competition and substrate type on terpene emissions from some Mediterranean plant species. J Chem Ecol 33:277-286

Ormeno E, Fernandez C, Mévy J-P (2007b) Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. Phytochem 68: 840-852

Owen SM, Penuelas J (2005) Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. Trends Plant Sci 10:420-426

Owen SM, Penuelas J (2006) Response to Pichersky et al.: Plant volatils isoprenoids and their opportunistic functions. Trends Plant Sci 11:423

Owen SM, Penuelas J (2006b) Response to Firn and Jones: Volatile isoprenoids, a special case of secondary metabolism. Trends Plant Sci 11: 113-114

Oye K, Bubela T, Lawson JCH (2015) Regulate 'home-brew' opiates. Nature 521: 281-283

- P -

Paddon CJ, Keasling JD (2014) Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. Nature Reviews 12: 355-467

Paetzold H, Garms S, Bartram S, Wiczorek J, Urós-Gracia E, Rodríguez-Concepción M, Boland W, Strack D, Hause B, Walter MH (2010) The isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 controls isoprenoid profiles, precursor pathway allocation, and density of tomato trichomes. Mol Plant 3, 904-916.

Paiva NL (2000) An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication. J Plant Growth Reg 19: 131-143.

- Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis AK (2014) Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem* 2: 1-19
- Paranagama PA, Wimalasena S, Jayatilake GS, Jayawardena AL, Senanayake UM, Mubarak AM (2001) A comparison of essential oil constituents of bark, leaf, root and fruit of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blum) grown in Sri Lanka. *J Nat Sci Sri Lanka*: 147-153
- Paré WP, Tumilson JH (1999) Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol* 121: 325-331.
- Parveen If, Wang M, Zhao J, Chittiboyina AG, Tabanca N, Ali A, Baerson SR, Techen N, Chappell J, Khan I, Pan Z (2015). Investigating sesquiterpene biosynthesis in *Ginkgo biloba*: molecular cloning and functional characterization of (E,E)-farnesol and  $\alpha$ -bisabolene synthases. *Plant Mol Biol* 89: 451-662
- Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM (2014) Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol* 63: 233-239
- Park YS, Kunze S, Ni XZ, Feussner I, Kolomiets MV (2010) Comparative molecular and biochemical characterization of segmentally duplicated 9-lipoxygenase genes *ZmLOX4* and *ZmLOX5* of maize. *Planta* 231: 1425-1437
- Paulus HF, Gack C (1990) Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Orphys* (Orchidaceae). *Isr J Bot* 39:43
- Payet J (1982) Caractères morphologiques, anatomiques des Pelargoniums à feuilles odorantes et essai de classification numérique. Thèse, Université Paris-Sud-Orsay
- Peñuelas J, Llusà J, Gimeno BS (1999) Effects of ozone concentrations on biogenic volatile organic compounds emission in the Mediterranean region. *Environ Pollut* 105: 17-23
- Peñuelas J, Llusà J (2001) The complexity of factors driving volatile organic compounds emissions by plants. *Biol Plantarum* 44: 481-487
- Peñuelas J et Munné-Bosch (2005) Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci* 10: 166-169
- Peñuelas J, Staudt M (2010) BVOCs and global change. *Trends Plant Sci* 15:133-144
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic Acids Res* 30: 36-45

- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnol Lett* 26:509–515
- Phillips MA, Croteau RB (1999) Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci* 4: 184-190.
- Philipps MA, Wildung MR, Williams DC, Hyatt DC, Croteau R (2003) cDNA isolation, functional expression, and characterization of (+)-alpha-pinene synthase and (-)-alpha-pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): stereocontrol in pinene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 411: 267-276
- Philipps MA, D’Auria JC, Gershenzon J, Pichersky E (2008) The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerase are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell* 20: 677-696
- Picaud S, Olsson ME, Brodelius M, Brodelius PE (2006) Cloning, expression, purification and characterization of recombinant (+)-germacrene D synthase from *Zingiber officinale*. *Arch Biochem Biophys* 452: 17-28
- Picaud S, Olsson ME, Brodelius PE (2007) Improved conditions for production of recombinant plant sesquiterpene synthases in *Escherichia coli*. *Protein Express Purif* 51: 71-79
- Pichersky E, Raguso RA, Lewinsohn E, Croteau RB (1994) Floral scent production in *Clarkia* (*Onagraceae*) I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity. *Plant Physiol* 106: 1533-1540
- Pichersky E, Raguso RA, Lewinsohn E, Croteau RB (1994) Floral scent production in *Clarkia* (*Onagraceae*) II. The role of linalool synthase in floral scent production. *Plant Physiol* 106: 1541-1548
- Pichersky E, Gershenzon J (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* 5:237-243
- Pichersky E, Sharkey TD, Gershenzon J (2006a) Plant volatiles: a lack of function or a lack of knowledge? *Trends Plant Sci* 11: 421
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N (2006b) Biosynthesis of plant volatiles: Nature’s diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 489-521
- Poppy GM, Sutherland JP (2004) Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. *Physiol Entomol* 29: 257-268.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258:598–599.
- Portnoy V, Benyamini Y, Bar E, Harel-Beja R, Gepstein S, Giovannoni JJ, Schaffer AA, Burger J, Tadmor Y, Lewinsohn E, Katzir N (2008) The molecular and biochemical basis for varietal variation in sesquiterpene content in melon (*Cucumis melo* L.) rinds. *Plant Mol Biol* 66: 647-661

- Possell M, Hewitt CN, Beerling DJ (2005) The effects of glacial atmospheric CO<sub>2</sub> changes and implications for global budgets. *Global Change Biol* 15:1127-1140
- Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M (2012) New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol Plant* 5: 964-967
- Prasad A, Chattopadhyay A, Yadav A et al. (2008) Variation in the chemical composition and yield of essential oil of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) by the foliar application of metallic salts. *Flavour Frag J* 23: 133-136
- Prasad A, Chattopadhyay A, Chand S, Naqvi A A, Yadav A (2006) Effect of Soil Sodicity on Growth, Yield, Essential Oil Composition, and Cation Accumulation in Rose-Scented Geranium. *Commun Soil Sci Plan* 37: 1805-1817
- Prosser I, Altug IG, Phillips AL, Konig WA, Bouwmeester HJ, Beale MH (2004). Enantiospecific (+)- and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. *Arch Biochem Biophys* 432: 136-144.
- Prosser IM, Adams RJ, Beale MH, Hawkins ND, Phillips AL, Pickett JA, Field LM (2006) Cloning and functional characterisation of a cis-muroladiene synthase from black peppermint (*Mentha x piperita*) and direct evidence for a chemotype unable to synthesise farnesene. *Phytochem* 67: 1564-1571.

- Q -

- Qi Y, Katagiri F (2009) Purification of low-abundance Arabidopsis plasma-membrane protein complexes and identification of candidate components. *Plant J* 57: 932-944

- R -

- Rajeswara Rao BR (2002a) Cultivation and distillation of Geranium oil from *Pelargonium* species in India. In Lis-Balchin M (ed) *Geranium and Pelargonium*. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles, vol 27. Taylor & Francis, London, pp 212-217
- Rambla JL, Tikunov YM, Monforte AJ, Bovy AG, Granell A (2014) The expanded tomato fruit volatile landscape. *J Exp Bot* (2014) 65: 4613-4623
- Rana VS, Blazquez MA (2010) Essential oil composition of aerial parts of *Pelargonium graveolens* at different growth stages. *Indian Perfumer* 54:22-25
- Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, Gershenzon J, Turlings TCJ (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434: 732-737

- Rios-Esteva R, Turner GW, Lee JM, Croteau RB, Lange BM (2008) A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpene essential oil composition in peppermint. PNAS 105:2818-2823.
- Rivas F, Parra A, Martinez A, Garcia-Granados A (2013) Enzymatic glycosylation of terpenoids. Phytochem rev 12: 327-339
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat on gene expression in tobacco. Plant Physiol 130: 1143-1151
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) When Defense Pathway Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. Plant Physiol 134: 1683-1696
- Ro D, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature 440: 940-943
- Ro DK, Ehrling J, Keeling CI, Lin R, Mattheus N, Bohlmann J (2006) Microarray expression profiling and functional characterization of AtTPS genes: Duplicated *Arabidopsis thaliana* sesquiterpene synthase genes At4g13280 and At4g13300 encode root-specific and wound-inducible (Z)-gamma-bisabolene synthases. Arch Biochem Biophys 448: 104-116
- Rodriguez-Concepcion M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Güeto S, Lois LM, 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. Plant J 27: 213-222
- Roeder S, Hartmann AM, Effmert U, Piechulla B (2007) Regulation of simultaneous synthesis of floral scent terpenoids by the 1,8-cineole synthase of *Nicotiana suaveolens*. Plant Mol Biol 65: 107-124
- Rohdich F, Zepeck F, Adam P, Hecht S, Kaiser J, Laupitz R, Gräwert T, Amslinger S, Eisenreich W, Bacher A et al. (2003) The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. PNAS 100: 1586-1591
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem J 295: 517-524
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz SA, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, pp 365–386
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Mewes HW (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. Nucleic Acids Res 32 : 5539-5545
- Ruiz-Ramon F, Águila DJ, Egea-Cortines M, Weiss J (2014) Optimization of fragrance extraction: Daytime and flower age affect scent emission in simple and double *narcissi*. Ind Crop Prod 52: 671– 678

- S -

- Sakamura F (1987) Changes in volatile constituents of *zingiber officinale* rhizomes during storage and cultivation. *Phytochemistry* 26: 2207-2212
- Sakurai T, Namiki S, Kanzaki R (2014) Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in silkworm *Bombyx mori*. *Front Physiol* 5: 1- 20
- Salesse R, Gervais R (2012) *Odorat et goût, de la neurobiologie des sens chimiques aux applications*. Versailles, coll. Synthèse, Quae.
- Salesse R (2015) *Faut-il sentir bon pour séduire ?* Versailles, Quae.
- 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*. *Plant Cell* 21: 301-317
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuels L, McFarlane H (2012) Plant cell wall secretion and lipid traffic at membrane contact sites of the cortex. *Protoplasma* 249: S19-S23
- Sanmiya K, Ueno O, Matsuoka M, Yamamoto N (1999) Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 40: 348-354
- Sasaki K, Saito T, Lämsä M, Oksman-Caldentey K, Suzuki M, Ohyama K, Muranaka T, Ohara K, Yazaki K (2007) Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism. *Plant Cell Physiol* 48: 1254-1262
- Sato-Masumoto N, Ito M (2014) Two types of alcohol dehydrogenase from *Perilla* can form citral and perillaldehyde. *Phytochem* 104: 12-20
- Scalcinati G, Partow S, Siewers V, Schalk M, Daviet L, Nielsen J (2012a) Combined metabolic engineering of precursor and co-factor supply to increase  $\alpha$ -santalene production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Fact* 11: 117-132
- Scalcinati G, Knuf C, Siavash P, Chen Y, Maury J, Schalk M, Daviet L, Nielsen J, Siewers V (2012b) Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene  $\alpha$ -santalene in a fed-batch mode. *Metab Eng* 14: 91-103.
- Scalliet G, Piola F, Douady CJ, Réty S, Raymond O, Baudino S, Bordji K, Bendahmane M, Dumas C, Cock JM, Hugueney P (2008) Scent evolution in Chinese roses. *PNAS* 105: 5927-5932

- Schalk M, Pastore L, Mirata MA, Khim S, Schouwey M, Deguerry F, Pineda V, Rocci L, Daviet L (2012) Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants. *J Am Chem Soc* 134: 18900-18903.
- Schalk M, Deguerry F (2012) (Firmenich) WO2010134004A1
- Schaller A, Stintzi A (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis – structure, function, regulation. *Phytochem* 70: 1532-1538
- Schaub P, Al-Babili S, Drake R, Beyer P (2005) Why is golden rice (Yellow) instead of Red? *Plant Physiol* 138: 441-450.
- Schiestl FP, Ayass M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W (1999) Orchid pollinisation by sexual swindle. *Nature* 399: 421-422.
- Schiestl FP, Peakall R, Mant JG, Ibarra F, Schultz C, Franke S, Francke W (2003) The chemistry of sexual deception in an orchid-wasp pollination system. *Science* 302: 437.
- Schillmiller AL, Last RL, Pichersky E: Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J* 54: 702-711.
- Schillmiller A, Schauvinhold I, Larson M, Xu R, Charbonneau AL, Schmidt A, Wilkerson C, Last RL, Pichersky E (2009) Monoterpenes in glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *PNAS* 106: 10865-10870
- Schillmiller AL, Pichersky E, Last RL (2012) Taming the hydra of specialized metabolism: how systems biology and comparative approaches are revolutionizing plant biochemistry. *Curr Opin Plant Biol* 15: 338-344.
- Schmiderer C, Grassi P, Novak J, Weber M, Franz C (2008) Diversity of essential oil glands of clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). *Plant Biol* 10: 433-440
- Schnee C, Köllner TG, Held M, Turlings TCJ, Gershenzon J, Degenhardt J (2006) The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *PNAS* 103: 1129–1134.
- Schnitzler J, Graus M, Kreuzwieser J, Heizmann U, Rennenberg H, Wisthaler A, Hansel A (2004) Contribution of different carbon sources to isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Plant Physiol* 135: 152-160
- Schuhr CA, Radykewicz T, Sagner S, Latzel C, Zenk MH, Arigoni D, Bacher A, Rohdich F, Eisenreich W (2003) Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem Rev* 2: 3-16
- Schwachtje J, Baldwin IT (2008) Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? *Plant Physiol* 146: 845-851

- Schwender J, Müller C, Zeidler J, Lichtenthaler HK (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. FEBBS Lett 455: 140-144
- Seemann M, Zhai GZ, de Kraker JW, Paschall CM, Christianson DW, Cane DE (2002). Pentalenene synthase. Analysis of active site residues by sitedirected mutagenesis. J Am Chem Soc 124: 7681-7689.
- Sekiwa-Iijima Y, Aizawa Y, Kubota K (2001) Geraniol dehydrogenase activity related to aroma formation in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). J Agric Food Chem 49: 5902-5906.
- Selmar D, Kleinwächter M (2013) Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. Ind Crop Prod 42: 558-566
- 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 Physiol 131: 1868-1876
- Shangguan XX, Xu B, Yu ZX, Wang LJ, Chen J (2008) Promoter of a cotton fibre MYB gene functional in trichomes of *Arabidopsis* and glandular trichomes of tobacco. J Exp Bot 59: 3533-3542
- Sharkey TD, Singaas EL (1995) Why plants emit isoprene. Nature 374: 769
- Sharon-Asa L, Shalit M, Frydman A, Bar E, Holland D, Or E, Lavi U, Lewinsohn E, Eyal Y (2003) Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of sesquiterpene aroma compound valencene. Plant J 36: 664-674.
- Shepherd GM (2012) Neurogastronomy: how the brain creates flavor and why it matters. New York, Columbia University Press.
- Shepherd GM (2006) Smell images and the flavour system in the human brain. Nature 444:316-321
- Sheue C, Yang Y, Kuo-Huang L (2003) Altitudinal variation of resin ducts in *Pinus taiwanensis* Hayata (*Pinaceae*) needles. Bot Bull Acad Sin 44: 305-313
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Hara M, Ueda T, Kita M, Omura M (2004) Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. Plant Sci 166: 49-58
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Hara M, Omura M (2005a) Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8-cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc. Plant Sci 168: 987-995
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Omura M (2005b) Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. Sci Hortic 105: 507-512

- Shimada T, Endo T, Fujii H, Rodriguez A, Pena L, Omura M (2014) Characterization of three linalool synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. and analysis of linalool-mediated resistance against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Penicillium italicum* in citrus leaves and fruits. *Plant Sci* 229: 154-166
- Shishido H, Miyamoto Y, Ozawa R, Taniguchi S, Takabayashi J, Akimitsu K, Gomi K (2012) Geraniol synthase whose mRNA is induced by host-selective ACT-toxin in the ACT-toxin-insensitive rough lemon (*Citrus jambhiri*). *J Plant Physiol* 169: 1401– 1407
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I (1997) Airborn signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721.
- Simkin AJ, Guirimand G, Papon N, Courdavault V, Thabet I, Ginis O, Bouzid S, Gigliolo-Guivarch'h N, Clastre M (2011) Peroxisomal localization of the final steps of the Mevalonic acid pathway *in planta*. *Planta* 234: 903-914
- Simkin AJ, Miettinen K, Claudel P, Burlat V, Guirimand G, Courdavault V, Papon N, Meyer S, Godet S, St-Pierre B, Giglioli-Guivarc'h N, Fischer MJ, Memelink J, Clastre M (2013) Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. *Phytochem* 85: 36-43
- Singsaas EL, Laporte MM, Shi JZ, Monson RK, Bowling BR, Johnson K (1999) Kinetics of leaf temperature fluctuation affect isoprene emission from red oak (*Quercus rubra*) leaves. *Tree Physiol* 19: 917–924.
- Sitthithaworn W, Kojima N, Viroonchatapan E, Suh D, 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. *Chem Phar Bull* 49: 197-202
- Skubatz H, Kundel DD, Patt JM, Howald WN, Hartman TG, Meeuse BJD (1995) Pathway of terpene excretion by the appendix of *Sauromatum guttatum*. *PNAS* 92: 10084-10088
- 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
- Sommer S, Severin K, Camara B, Heide L (1995) Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochem* 38: 623-627
- Song L, Poulter CD (1994) Yeast farnesyl-diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II. *PNAS* 91: 3044-3048
- Spinelli F, Cellini A, Marchetti L, Mudigere N, Piovene C (2011) Emission and function of volatile organic compounds in response to abiotic stress. In: *Abiotic stress in plants – Mechanisms and Adaptations*, Pr. Arun Shanker (Ed.) In Tech

- Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, Prathapani N, Shklarman E, Ovadis M; Vainstein A (2010) EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoids volatiles' biosynthesis in petunia. *Plant Cell* 22: 1961–1976.
- Spitzer-Rimon B, Farhi M, Albo B, Can'ani A, Ben Zvi MM, Masci T, Edelbaum O, Yu Y, Shklarman E, Ovadis M, Vainstein A (2012) The R2R3-MYB-Like Regulatory Factor EOBI, Acting Downstream of EOBII, Regulates Scent Production by Activating ODO1 and Structural Scent-Related Genes in Petunia. *Plant Cell* 24: 5089-5105
- Spurgeon SL, Porter JW (1981) Introduction – in *Biosynthesis of Isoprenoids Compounds*, Vol. I (J.W. Porter and S.L. Spurgeon, eds), pp. 1-46. John Wiley and Sons, New-York. 1981.
- Srivastava AK, Srivastava SK, Syamsunda KV (2005) Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour Frag J* 20: 51-53
- Srivastava PL, Daramwar PP, Krithika R, Pandreka A, Shankar SS, Thulasiram HV (2015) Functional Characterization of Novel Sesquiterpene Synthases from Indian Sandalwood, *Santalum album*. *Nature Sci Rep* 5: 10095-10106.
- Starks CM, Back K, Chappell J, Noel JP (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science* 277: 1815-1820
- Steele CL, Crock J, Bohlmann J, Croteau R (1998) Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) – Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *J Biol Chem* 273: 2078-2089.
- Sticklen MB (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* 9: 433-443
- Stökl J, Paulus H, Dafni A, Schulz C, Francke W, Ayasse M (2005) Pollinator attracting odour signals in sexually deceptive orchids of the *Orphrys fusca* group. *Plant Syst Evol* 254: 105-120
- Strauss CR, Wilson B, Gooley PR, Williams PJ (1986) Role of monoterpenes in grape and wine flavor. In: Parliment T, Croteau R (Eds.) *Biogenesis of Aromas*. American Chemical Society, Washington DC, pp. 222-242.
- Suga T, Endo T (1991) Geranyl Diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium Roseum*. *Phytochem* 30: 1757-1761
- Sugimura Y, Padayhag BF, Ceniza MS, Kamata N, Eguchi S, Natsuaki T, Okuda S (1995) Essential oil production increased by using virus-free patchouli plants derived from meristem-tip culture. *Plant Pathol* 44: 510–515
- Sugimura Y, Kadotani N, Ueda Y, Shima K, Kitajima S, Furusawa T, Ikegami M (2005) Transgenic patchouli plants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Org* 82: 251–257

- Bibliographie -

Sun Z, Niinemets U, Hüve K, Rasulov B, Noe SM (2013) Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration leads to increased whole-plant isoprene emission in hybrid aspen (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*). *New Phytol* 198:799-800

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* (2014) 203:32-43.

Swamy KN, Rao SSR (2009) Effect of 24-epibrassinolide on growth, photosynthesis, and essential oil content of *Pelargonium graveolens* (L.) Herit. *Russ J Plant Physiol* 56: 616-620

Swamy KN, Rao SSR (2010) Influence of 28-homobrassinolide on growth, photosynthesis metabolite and essential oil content of geranium [*Pelargonium graveolens* (L.) Herit]. *Am J Plant Physiol* 5: 212-218

- T -

Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative non mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis. *PNAS* 95: 9879-9884

Takahashi S, Yeo Y, Greenhagen BT, McCullin T, Song L, Maurina-Brunker J, Rosson R, Noel JP, Chappell (2007) Metabolic Engineering of Sesquiterpene Metabolism in Yeast. *Biotechnol Bioeng*. 97: 170-181

| 338

Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. *Annu rev genet* 27: 205-233

Tegoni M, Campanacci V, Cambillau C (2004) Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends Biochem Sci* 29:257-264

Thodey K, Galanie S, Smolke CD (2014) A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opiates. *Nat Chem Biol* 10: 837-844

Tholl D, Kish CM, Orlova I, Sherman D, Gershenzon J, Pichersky E, Dudareva N (2004) Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyldiphosphate synthase. *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. *Plant J* 42: 757-771

Tholl D (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 9: 297-304

Tholl D, Sohrabi R, Huh J, Lee S (2011) The biochemistry of homoterpenes – Common constituents of floral and herbivore-induced plant volatile bouquets. *Phytochem* 72: 1635-1646.

Thompson JN (1989) Concepts of coevolution. *Trends Ecol Evo* 4: 179-183.

- Tijet N, Schneider C, Muller BL, Brash AR (2001) Biogenesis of Volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: Molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Arch Biochem Biophys* 286: 281-289.
- Tingey DT, Turner DP, Weber JA (1991) Factors controlling the emission of monoterpenes and other volatiles compounds. In *Trace Gas Emission by Plants* (Sharkey TD et al., eds) Academic Press: 93-120
- Trapp SC, Croteau RB (2001) Genomic organization of plant terpene synthase and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158: 811-832
- Troncoso C, Becerra J, Perez C, Hernandez V, San Martin A, Sanchez-Olate M, Rios D (2012) Induction of defensive defense responses in *Eucalyptus globulus* (labill) plants, against *Ctenarytaina eucalypti* (Maskell) (Hemiptera: Psyllidae). *Am J Plant Sci* 3: 589-595
- Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, Lenihan JR, Horning T, Anthony LC, Regentin R, Keasling JD, Renninger NS, Newman JD (2009) High-Level Production of Amorpha-4,11-Diene, a Precursor of the Antimalarial Agent Artemisinin, in *Escherichia coli*. *Plos One* 4: 4489-4500
- Turlings TCJ, Bernasconi M, Bertossa R, Bigler F, Caloz G, Dorn S (1998) The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biol Control* 11: 122-129
- Turlings TCJ, Ton J (2006) Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Curr Opin Plant Biol* 9: 421-427
- Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB (2000a) Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint. *Plant Physiol* 124: 655-663
- Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB (2000b) Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol* 124: 665-680
- Turner GW, Croteau RB (2004) Organization of Monoterpene Biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical Localizations of Geranyl Diphosphate Synthase, Limonene-6-Hydroxylase, Isopiperitenol Dehydrogenase, and Pulegone Reductase. *Plant Physiol* 127: 1383-1389

- U -

UNICEF (2000) *The State of World's Children: Statistical Tables*. UNICEF, New-York

Unisicker SB, Kunert G, Gershenzon J (2009) Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr Opin Plant Biol* 12: 479-485

- V -

- Van der Hoeven RS, Monforte AJ, Breeden D, Tanksley SD, Steffens JC (2000) Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and *L. Hirsutum*. *Plant Cell* 12, 2283-2294
- Van der Walt JJA, Demarne F (1988) *Pelargonium graveolens* and *P. radens*: A comparison of their morphology and essential oils. *S Afr J Bot* 54: 617-622
- Van Moerkercke A, Haring MA; Schuurink RC (2011). The transcription factor EMISSION OF BENZENOIDES II activates the MYB ODORANT1 promoter at a MYB binding site specific for fragrant petunias. *Plant J* 67: 917–928.
- Van Schie CCN, Haring MA, Schuurink RC (2007) Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Mol Biol* 64: 251-263
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.1–0034.11
- Vannice JC, Skaff DA, Keightley A, Addo JK, Wyckoff GJ, Mizioroko HM (2014) Identification in *Haloferax volcanii* of phosphomevalonate decarboxylase and isopentenyl phosphate kinase as catalysts of terminal enzyme reactions in an archaeal alternate mevalonate pathway. *J Bacteriol* 195: 1055-1063
- Velikova V, Várkonyi Z, Szabó M, Maslenkova L, Noguez I, Kovács L, Peeva V, Busheva M, Garab G, Sharkey TD, Loreto F (2011) Increased Thermostability of Thylakoid Membranes in Isoprene-Emitting Leaves Probes with Three Biophysical Techniques. *Plant Physiol* 157: 905-916.
- Velikova V, Sharkey TD, Loreto F (2012) Stabilization of thylakoid membranes in isoprene-emitting plants reduces formation of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* 7: 139-141.
- Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink R (2005) ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* 17: 1612-1624.
- Verma RK, Rahman L, Kukreja AK et al. (2008) Performance of rose scented geranium (*Pelargonium* species) cultivated on farmers field in the western Himalayan region of Uttarakhand, India. *Indian Perfumer* 52: 33-36
- Verma RS, Rahman L, Verma RK et al. (2010) Essential oil composition of four cultivars of rose-scented geranium flowers. *Indian perfumer* 54: 29-32
- Verma RS, Rahman L, Verma RK et al. (2013) Essential oil composition of *Pelargonium graveolens* L'Her. Ex Ait. Cultivars harvested in different seasons. *J Essent Oil Res* 25: 372-379

- Verpoorte R, Memelink J (2002) Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr Opin Biotechnol* 13: 181-187
- Vezzaro A, Krause ST, Nonis A, Ramina A, Degenhardt J, Ruperti B (2012) Isolation and characterization of terpene synthases potentially involved in flavor development of ripening olive (*Olea europaea*) fruits. *J Plant Physiol* 169: 908-914
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chem Biol* 5: 283-291.
- Viljoen AM, Van der Walt JJA, Swart JPJ, Demarne F (1995) A study of the variation in the essential oil of *Pelargonium capitatum* (L.) L'Hérit. (Geraniaceae). Part II. The chemotypes of *P. capitatum*. *J Essent Oil Res* 7: 605-611
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949-956
- Voirin B, Bayet C (1996) Developmental changes in the monoterpene composition of *Mentha x piperita* from individual peltate trichomes. *Phytochem* 43: 573-580
- Vranova E, Coman D, Gruissem W (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant* 5: 318-333.

- W -

- Wagner GJ (1991) Secreting glandular trichomes: More than just Hairs. *Plant Physiol* 96: 675-679.
- Walsh G (2005) Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl microbial biot* 67: 151-159.
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* 6: 3543-3557
- Wallaart TE, Bouwmeester HJ, Hille J, Poppinga L, Maijers NCA (2001) Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* 212: 460-465
- Walter J, Hein R, Beierkuhnlein C, Hammerl V, Jentsch A, Schädler M, Schuerings J, Kreyling J (2013) Combined effects of multifactor climate change and land-use on decomposition in temperate grassland. *Soil Biol Biochem* 60: 10-18.
- Wang CW, Oh MK, Liao JC (1999) Engineered Isoprenoid Pathway Enhances Astaxanthin Production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 62: 235-241

- Wang E, Wang R, DeParasis J, Loughrin JH, Gan S, Wagner JG (2001) Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat Biotechnol* 19: 371–374
- Wang G, Tian L, Aziz N, Broun P, Dai X, He J, King A, Zhao PX, Dixon RA (2008) Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiol* 148: 1254-1266.
- Wang G, Dixon RA (2009) Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. *PNAS* 106: 9914-9919
- Wang J, Dudareva N, Bhakta S, Raguso RA, 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 Physiol* 114 : 213-221
- Wang Y, Owen SM, Li Q, Peñuelas J (2007) Monoterpene emissions from rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in a changing landscape and climate: chemical speciation and environmental control. *Global Change Biol* 13:2270-2282.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93: 2325-1327.
- Ward JL, Baker JM, Llewellyn AM, Hawkins ND, Beale MH (2011) Metabolomic analysis of *Arabidopsis* reveals hemiterpenoid glycosides as products of a nitrate ion-regulated, carbon flux overflow. *PNAS* 108: 10762-10767
- Watanabe N, Watanabe S, Nakajima R, Moon J, Shimokihara K, Inagaki J, Etoh H, Asai T, Sakata K, Ina K (1993) Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymatic action during flower opening. *Biosci Biotech Bioch* 57: 1101-1106.
- Weiss EA (1997) *Essential Oil Crops*. Centre for Agriculture and Bioscience International, New York, NY
- Weitzel C, Simonsen HT (2015) Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes. *Phytochem Rev* 14: 7-24
- Widhalm JR, Jaini R, Morgan JA, Dudareva N (2015) Rethinking how volatiles are released from plant cells. *Trends Plant Sci* 20: 545-550
- Wilkinson MJ, Owen SM, Possell M, Hartwell J, Gould PD, Hall AJW, Vickers C, Hewitt CN (2006) Circadian control of isoprene emissions from oil palm (*Elaeis guineensis*). *Plant J* 47: 960-968
- Williams DC, McGarvey DJ, Katahira EJ, 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. *Biochem* 37: 12213-12220

- Bibliographie -

- Winzer T, Kern M, King AJ, Larson TR, Teodor RI, Donniger SL, Li Y, Dowle AA, Cartwright J, Bates R, Ashford D, Thomas J, Walker C, Bowser TA, Graham IA (2015) Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein. *Science* 349: 309-312
- Wise ML, Savage TJ, Katahira E, Croteau R (1998) Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) – cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *J Biol Chem* 273: 14891-14899
- Wise ML, Croteau R (1999) *Comprehensive Natural Products Chemistry, Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids, Vol 2*. Elsevier, Amsterdam, pp. 97-135.
- Wlikens RT, Shea GO, Halbreich S, Stamp NE (1996) Resource availability and the trichome defenses of tomato plants. *Oecologia* 106:181–191
- Wu S, Schoenbeck MA, Greenhagen BT, Takahashi S, Lee SB, Coates RM, Chappell J (2005) Surrogate splicing for functional analysis of sesquiterpene synthase genes. *Plant Physiol* 138: 1322-1333
- Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell J (2006) Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat Biotechnol* 24: 1441-1447

- X -

- Xu Y, Zhang Z, Wang M, Wei J, Chen H, Gao Z, Sui C, Luo H, Zhang X, Yang Y, Meng H, Li W (2013) Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis*. *BMC Genomics* 14: 227-242

| 343

- Y -

- Yahyaa M, Tholl D, Cormier G, Jensen R, Simon PW, Ibdah M (2015) Identification and Characterization of Terpene Synthases Potentially Involved in the Formation of Volatile Terpenes in Carrot (*Daucus carota* L.) Roots. *J Agr Food Chem* 63: 4870-4878
- Yan J, Kandianis CB, Harjes CE, Bai L, Kim E, Yang X, Skinner DJ, Fu Z, Mitchell S, Li Q, Fernandez MGS, Zaharieva M, Babu R, Fu Y, Palacios N, Li J, DellaPenna D, Brutnell T, Buckler ES, Warburton ML, Rocheford T (2010) Rare genetic variation at *Zea mays* crtRB1 increases  $\beta$ -carotene in maize grain. *Nat Genet* 42: 322–327
- Yang T, Li J, Wang HX, Zeng Y (2005) A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochem* 66: 285-293
- Yauk YK, Ged C, Wang MY, Matich AJ, Tessarotto L, Cooney JM, Chervin C, Atkinson RG (2014) Manipulation of flavour and aroma compound sequestration and release using a glycosyltransferase with specificity for terpene alcohols. *Plant J* 80: 317-330

- Yeo Y, Nybo SE, Chittiboyina AG, Weerasooriya AD, Wang Y, Gongora-Castillo E, Vaillancourt B, Buell CR, Della Penna D, Celiz MD, Jones AD, Wurtele ES, Ransom N, Dudareva N, Shaaban KA, Tibrewal N, Chandra S, Smillie T, Khan IA, Coates RM, Watt DS, Chappell J (2013) Functional identification of valerena-1,10-diene synthase, a terpene synthase catalyzing a unique chemical cascade in the biosynthesis of biologically active sesquiterpenes in *Valeriana officinalis*. *J Biol Chem* 288: 3163-3173
- Yew JY, Chung H (2015) Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. *Prog Lipid Res* 59: 88-105
- Yoon SH, Lee SH, Das A, Ryu HK, Jang HJ, Kim JY, Oh DK, Keasling JD, Kim SW (2009) Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of  $\beta$ -carotene in *E. coli*. *Biotechnol* 140: 218-226
- Young PJ, Arneth A, Schurgers G, Zeng G, Pyle JA (2009) The CO<sub>2</sub> inhibition of terrestrial isoprene emission significantly affects future ozone projections. *Atmos Chem Phys* 9: 2793–2803
- Yoshida T, Tamai T (1958) Physiological and ecological studies on the secretory function of the essential oil in *Pelargonium* species. I. The relation between the distribution of the oil glands and the percentage yield of the essential oil. *Jpn J Breed* 7: 235-240
- Yu F, Harada H, Yamakasi K, Okamoto S, Hirase S, Tanaka Y, Misawa N, Utsumi R (2008a) Isolation and functional characterization of a beta-eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *FEBS Lett* 582: 565-572
- Yu FN, Okamoto S, Nakasone K, Adachi K, Matsuda S, Harada H, Misawa N, Utsumi R (2008b) Molecular cloning and functional characterization of alpha-humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith.) *Planta* 227: 1291-1299
- Yu ZX, Wang LJ, Zhao B, Shan CM, Zhang YH, Chen DF, Chen XY (2015) Progressive Regulation of Sesquiterpene Biosynthesis in Arabidopsis and Patchouli (*Pogostemon cablin*) by miR156-Targeted SPL Transcription Factors. *Mol Plant* 8: 98-110.
- Yuan JS, Köllner TG, Wiggins G, Grant J, Degenhardt J, Chen F (2008) Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. *Plant J* 55: 491-503
- Yuan JS, Himanen S, Holopainen JK, Chen F, Stewart CN (2009) Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends Ecol Evo* 24: 323-331
- Yuan TT, Chen QQ, Zhao PJ, Zeng Y, Liu XZ, Lu S (2011) Identification of the enzymes responsible for the reduction of geraniol to citronellol. *Nat Prod Bioprospect* 1: 108-111
- Yuba A, Yazaki K, Tabata M, Honda G, Croteau R (1996) cDNA cloning characterization, and functional expression of 4S-(-)-limonene synthase from *Perilla frutescens*. *Arch Biochem Biophys* 332: 280-287

Yue Y, Yu R, Fan Y (2014) Characterization of two monoterpene synthases involved in floral scent formation in *Hedychium coronarium*. *Planta* 240: 745-762

- Z -

Ziegler J, Facchini PJ (2008) Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Ann Rev Plant Biol* 59: 735-769.

Zhan X, Zhang YH, Chen DF, Simonsen HT (2014) Metabolic engineering of the moss *Physcomitrella patens* to produce the sesquiterpenoids patchoulol and a/b-santalene. *Front Plant Sci* 5: 1-10

Zhang X, Rodriguez I, Mombaerts P, Firestein S (2004) Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. *Genomics* 83:802-811

Zhang Y, Mo L, Chen F, Lu M, Dong W, Wang Q, Xu F, Gu F (2014) Optimized Production of Vanillin from Green Vanilla Pods by Enzyme-Assisted Extraction Combined with Pre-Freezing and Thawing. *Molecules* 19: 2181-2198

Zhuang X, Chappell J (2015) Building Terpene Production Platforms in Yeast. *Biotechnol Bioeng* 112: 1854-1864.

Zwenger S, Basu C (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnol Mol Biol Rev* 3: 1-7



## ANNEXES

Annexe 1   Spécifications IFF-LMR des différents extraits obtenus à partir des cultivars de <i>Pelargonium</i> cv. 'rosat' .....	350
Annexe 2   Utilisation de l'HE de <i>Pelargonium</i> en parfumerie.....	351
Annexe 3   Analyse olfactive du parfum Géranium pour Monsieur.....	352
Annexe 4   Analyse olfactive du parfum Equipage Géranium.....	353
Annexe 5   Analyse olfactive du parfum Géranium Odorata.....	354
Annexe 6   Culture, récolte, distillation et collecte de l'HE traditionnelle de <i>Pelargonium</i> à Beni Souef en Égypte.....	355
Annexe 7   Marché mondial de l'HE de <i>Pelargonium</i> Égypte de 1985 à 2014 (source IFF-LMR) .....	356
Annexe 8   Rôle des composés terpénoïdes dans les plantes.....	357
Annexe 9   Nombre d'articles extrait de Web of Science avec la recherche.....	357
Annexe 10   Terpènes impliqués dans des mécanismes additionnels ou alternatifs de photo-protection.....	358
Annexe 11   Caractéristiques physiologiques modifiées par la sécheresse, la chaleur ou une combinaison des deux.....	359
Annexe 12   Transcrits et métabolites modifiés par la sécheresse, la chaleur ou une combinaison des deux.....	359
Annexe 13   Réactivité (basée sur la durée de vie atmosphérique) avec O <sub>3</sub> de composés représentant différents groupes de COV.....	360
Annexe 14   Effets potentiels des changements climatiques sur les signaux écologique liés aux COV.....	361
Annexe 15   Distribution des classes majeures des composés odorants floraux en fonction de leurs groupes fonctionnels.....	362
Annexe 16   Exemples de monoterpène synthèses caractérisées chez les plantes.....	363
Annexe 17   Exemples de sesquiterpène synthèses caractérisées chez les plantes.....	364
Annexe 18   Intérêt de l' $\alpha$ -pinène, du $\beta$ -pinène et du myrcène dans la synthèse chimique des composés aromatiques (IFF) .....	365
Annexe 19   Production d'amorphadiène via la voie du DXP ou du mévalonate et détails des opérons utilisés...366	366
Annexe 20   Présentation technique et olfactive du Clearwood™.....	367
Annexe 21   Représentation schématique de l'ingénierie de la voie de biosynthèse de l'acide artémisinique dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	368
Annexe 22   Protocole de mini-préparation d'ADN plasmidique avec le kit NucleoSpin® Plasmid.....	369
Annexe 23   Séquences des oligonucléotides utilisés dans cette thèse.....	370

Annexe 24   Solutions pour la purification des protéines.....	372
Annexe 25   Solutions pour l'analyse des protéines par SDS-PAGE.....	373
Annexe 26   Milieux de Culture <i>in vitro</i> du <i>Pelargonium</i> .....	374
Annexe 27   Composition des milieux de culture utilisés lors de la transformation stable du <i>Pelargonium</i> et de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	375
Annexe 28   Distillation du <i>Pelargonium</i> en Égypte en juin-juillet à Regwa.....	376
Annexe 29   Structures chimiques du géraniol et de ses dérivés composant l'HE du <i>Pelargonium</i> .....	377
Annexe 30   Structures chimiques des principaux monoterpènes cycliques et acycliques autres que le géraniol et ses dérivés composant l'HE du <i>Pelargonium</i> .....	378
Annexe 31   Structures chimiques des principaux sesquiterpènes et de leurs dérivés composant l'HE du <i>Pelargonium</i> .....	379
Annexe 32   Programme de fertirrigation de l'année 2013 pour les parcelles R&D de <i>Pelargonium</i> en Égypte....	380
Annexe 33   Relevés journaliers des températures (°C) de l'humidité relative (%).....	381
Annexe 34   Tableau de la composition chimique des absolus obtenus à partir de différents <i>Pelargonium</i> .....	382
Annexe 35   Séquence de la géraniol synthase de <i>Pelargonium x hybridum</i> 'rosat Grasse'.....	383
Annexe 36   Séquence de la 1,8-cinéole synthase de <i>Pelargonium x hybridum</i> 'rosat Grasse'.....	384
Annexe 37   Séquence de la myrcène synthase de <i>Pelargonium x hybridum</i> 'rosat Grasse'.....	385
Annexe 38   Séquence de la 10- $\gamma$ -épi eudesmol synthase de <i>Pelargonium x hybridum</i> 'rosat Grasse'.....	386
Annexe 39   Evaluation olfactive des <i>Pelargonium</i> odorants par les parfumeurs d'IFF.....	387
Annexe 40   Analyse des extraits hexaniques de 64 accessions de <i>Pelargonium</i> cultivés en serre auLBVpam.....	388
Annexe 41   ACP sur les 64 accessions de <i>Pelargonium</i> (1 individu par variété) pour les composés présent à une concentration > 1% dont l'aire a été rapportée au standard.....	397
Annexe 42   Variables explicatives de l'ACP sur 56 accessions de <i>Pelargonium</i> pour tous les composés.....	397
Annexe 43   ACP sur les 56 accessions de <i>Pelargonium</i> des compositions chimiques après regroupement des molécules en 17 groupes représentant les voies de biosynthèses communes.....	398
Annexe 44   Cinétique de distillation pour les six composés majoritaires de l'HE de <i>Pelargonium</i> .....	399
Annexe 45   Design industriel de l'appareil de stripping utilisé en Égypte dans le projet <i>Pelargonium</i> .....	400
Annexe 46   Analyse de la qualité finale de l'HE de <i>Pelargonium</i> avec intégration de l'HE récupérée grâce à l'opération de stripping.....	401
Annexe 47   Plantation de <i>Pelargonium</i> en Égypte en octobre-novembre à Regwa.....	402
Annexe 48   Evolution d'une plantation de <i>Pelargonium</i> d'octobre (plantation) à juin-juillet (récolte) .....	403

- Annexes -

Annexe 49   Rendements en biomasse et en HE pour les 14 parcelles en champ en 2013.....	404
Annexe 50   Rendements en biomasse et en HE pour 110 parcelles en champ en 2014.....	405
Annexe 51   Récolte du <i>Pelargonium</i> en juin-juillet à Regwa.....	406
Annexe 52   Composition de l'HE du <i>Pelargonium</i> cv. 'rosat Bourbon et Chine', cultivés en Égypte durant 1 an, analysée par GC-FID (% de l'aire des pics) .....	407
Annexe 53   Analyse par GC-FID du menthone et de l'isomenthone en concentration absolue [ppm] ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et relative (%) dans les extraits des différents cultivars de <i>Pelargonium</i> .....	408
Annexe 54   Analyse par GC-FID du citronellol en concentration absolue [ppm] ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et relative (%) dans les extraits des différents cultivars de <i>Pelargonium</i> .....	409
Annexe 55   Analyse par GC-FID du géraniol en concentration absolue [ppm] ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et relative (%) dans les extraits des différents cultivars de <i>Pelargonium</i> .....	410
Annexe 56   Analyse du ratio citronellol/géraniol dans les extraits des différents cultivars de <i>Pelargonium</i> .....	411
Annexe 57   Analyse du 6,9-guaiadiène et du 10- $\gamma$ -épi eudesmol en concentration absolue [ppm] .....	412
Annexe 58   Analyse des coûts de production de l'HE de <i>Pelargonium</i> de 2012 à 2015.....	413
Annexe 59   Enzymes responsables de la production de géraniol chez les plantes à fleurs.....	414

**Annexe 1 | Spécifications IFF-LMR des différents extraits obtenus à partir des cultivars de *Pelargonium* cv. 'rosat'**

Composés	Huiles essentielles			Rhodinol	Isolat de citronellol	Absolu
	Égypte	Bourbon	Chine	Ex 'Pelargonium Egypt'	Ex 'Pelargonium Chine'	Égypte
$\alpha$ -Pinène						
Limonène	< 0,4%					
cis-Oxyde de rose	0,7-1,5%	0,4-0,9%	1,3-2%			
trans-Oxyde de rose	0,3-0,6%	0,1-0,3%	0,5-0,9%			
Menthone	<2,1%	0,3-2%	<2,5%			
Isomenthone	4-8%	7-10%	4-7%			4-8%
Linalol	4-8%	8-11%	2-4,5%	0-0,8%		1-4%
$\beta$ -Caryophyllène		1-2%	0,7-2,5%	0-0,2%		
6,9-Guaiadiène	<0,5%	5-7%	5,6-7%	0-0,5%	1-8%	
Citronellyl formate	5-8%	7-10%	8-12%			5-8%
Géranyl formate	2-6%	5-7%	1-3%			2-6%
Citronellol	26-34%	19-22%	33-41%	75-86%	65-85%	20-30%
Nérol				0,3-1,5%		
Géranol	11-18%	15-18,5%	6-10%	11-19%	8-15%	15-25%
Géranyl butyrate	0,7-2%	0,1-0,3%	0,4-1,0%			
Citronellyl tiglate			0,5-1,5%			
Géranyl tiglate	0,9-2%	0,7-2%	1,0-1,6%			
Phényléthyl tiglate	0,5-1,2%	0,4-1%	0,4-1,0%			
10- $\gamma$ -épi Eudesmol	4,5-6%					4,5-6%

## Annexe 2 | Utilisation de l'HE de *Pelargonium* en parfumerie

Pour parler de l'utilisation du *Pelargonium* dans la parfumerie, j'ai choisi de reprendre le texte de mon ancienne professeure de l'ISIPCA<sup>103</sup>, Natalie Zagigaëff publié dans le livre *L'herbier parfumé (Ghozlan et Fernandez 2010)*.

### Une fleur unisexe

« Le géranium, on pense que c'est une rose en beaucoup moins cher, mais olfactivement parlant c'est une matière première qui a beaucoup d'autres aspects que son premier abord rosé. Elle a ce côté très alimentaire, voir gourmand, que j'ai beaucoup rencontré en Afrique du Nord. Ainsi, le géranium me rappelle le goût du loukoum et même celui du litchi dégusté en Asie. Les gens vous diront que c'est à cause de son aspect rosé mais pas uniquement. Il a aussi une fraîcheur mentholée, un peu givrée qui lui donne un caractère à la fois masculin et féminin, un aspect très frais, parfois même un peu agressif, évoquant une certaine masculinité, alors que son aspect rosé, alimentaire, lui confère un caractère féminin. Finalement, c'est une fleur unisexe qui réveille chez moi des souvenirs olfactifs agréables liés au Maghreb ».

### Un basic de l'accord de fougère

« Il faut savoir que le géranium entre dans le schéma de base de l'accord fougère. Jadis, c'était un accord bergamote-géranium-lavande, donc bien spécifique, sur un fond de notes boisées et de mousse de chêne, avec un côté poudré amandé apporté par la coumarine et les salicylates. Le géranium était donc la pièce maîtresse de la note de cœur florale exacerbée par la lavande. C'est ce qui lui donne ce caractère typique. Mais la place du géranium a beaucoup diminué dans les fougères aujourd'hui, laissant le terrain à des notes florales plus transparentes... Le géranium lui-même a évolué. Comme le vétiver Bourbon, le géranium Bourbon de l'île de la Réunion a tendance à disparaître tout en restant très cher. Aujourd'hui, on utilise un géranium qui vient d'Égypte et qui est beaucoup plus accessible ! ».



<sup>103</sup> ISIPCA pour Institut Supérieur International du Parfumerie, de la Cosmétique et de l'Aromatique

### Annexe 3 | Analyse olfactive du parfum *Géranium pour Monsieur*

## GERANIUM POUR MONSIEUR – FREDERIC MALLE (2009)



SON CREATEUR: DOMINIQUE ROPION

SA FAMILLE : FOUGERE AROMATIQUE (MASCULIN)

Une fraîcheur tenace habite « *Géranium pour Monsieur* » qui est une alternative aux « fougères aromatiques » classiques. Un cœur de géranium de Chine, des notes de menthe et d’anis, des épices comme le clou de girofle et la cannelle, du santal et un généreux cocktail de muscs blancs sont les principaux acteurs de ce parfum d’un genre inédit. Des produits rares comme le résinoïde encens ou le benjoin de Siam ajoutent une sophistication particulière à cette impression de fraîcheur et de netteté.

| 352

L’histoire de ce parfum est née de cet ingrédient précis, l’essence de géranium. Cette nouvelle fragrance a été créée pour incorporer des ingrédients masculins et opulents autour du thème principal qu’est le géranium. L’idée d’un parfum très épuré apportant une sensation de fraîcheur persistante est créé par un mix d’essence de géranium mélangé avec du Rhodinol (cœur du géranium Chine), mélangé avec une note anisée et mentholée. Les épices de la composition contribuent à son côté élégant, masculin (girofle et cannelle) et embellit par le santal et une nouvelle sorte de musc blanc qui retient l’effet fraîcheur et sophistiqué. Ce qui est le plus intéressant ce sont les nouvelles techniques appliquées pour l’extraction de matières premières naturelles. La cannelle a été extraite par le CO<sub>2</sub> supercritique, quant à l’absolu de menthe, il a été produit par la distillation moléculaire. (<http://www.fredericmalle.com>)

**Notes de tête** : Absolu de menthe, HE de menthe poivrée, essence de géranium Chine, rhodinol, anis

**Notes de cœur** : Cannelle CO<sub>2</sub> et girofle

**Notes de fond** : Musc blanc, santal, encens et benjoin



Annexe 4 | Analyse olfactive du parfum Equipage Géranium

**EQUIPAGE GERANIUM - HERMES (2015)**



SON CREATEUR : JEAN-CLAUDE ELLENA

SA FAMILLE: BOISEE – AROMATIQUE (HOMME)

C'est au tour d'équipage, premier masculin lancé par Hermès en 1970, un boisé aromatique et épicé signé [Guy Robert](#), d'être décliné en équipage Géranium.

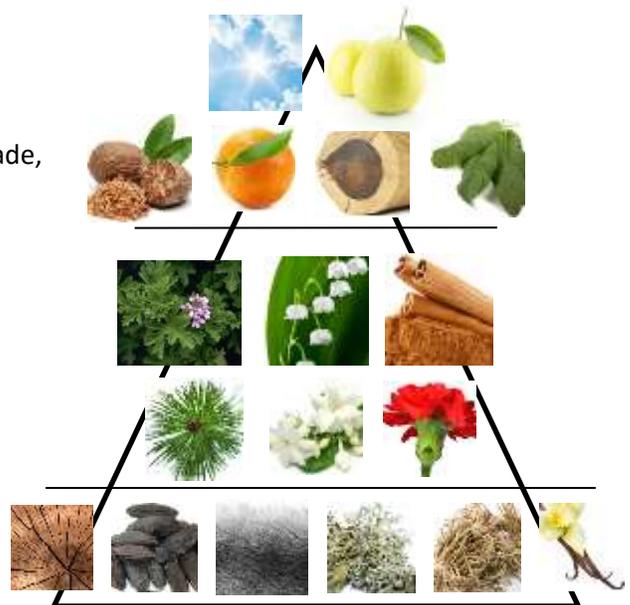
[Jean-Claude Ellena](#) déclare : « Mille fois j'ai voulu capturer l'odeur, mille fois elle s'est dérobée. Attiré par sa complexité, sa richesse, j'ai emmené ce parfum en voyage pour le découvrir. »

Le parfumeur aurait souligné l'accord épicé et le géranium, aux notes de rose et de menthe. Le santal apporterait « un côté caressant et charnel ».

**Notes de tête** : Aldéhydes, Orange, sauge, noix de muscade, bergamote, bois de rose

**Notes de cœur** : Géranium,  illet, Jasmin, Cannelle, Aiguille de sapin, muguet

**Notes de fond** : Santal, Musc, Fève Tonka, Vetiver, Mousse de chêne, Vanille



## Annexe 5 | Analyse olfactive du parfum *Géranium Odorata*

### GERANIUM ODORATA – DYPTIQUE (2014)



SON CREATEUR : FABRICE PELLEGRIN

SA FAMILLE : FLORAL – BOISE MUSC (MIXTE)

Bergamote, *Géranium Bourbon*, Poivre Rose, Cèdre - *Géranium Odorata* nous entraîne dans ces bosquets carmin dont la floraison printanière annonce l'événement d'une saison heureuse et ensoleillée. Tant masculin que féminin, le géranium partage quelques senteurs avec la rose. Il est vif, frais, pimpant... et pluriel.

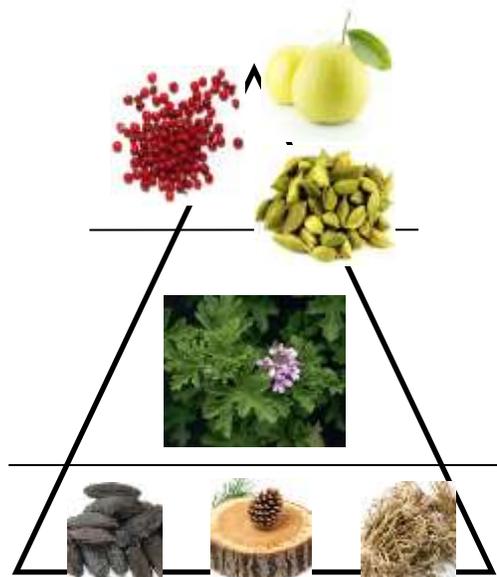
| 354

*Géranium Odorata* dévoile un départ hespéridé avec la bergamote, tandis que la cardamome et le poivre rose apportent un côté épicé. Le cœur de géranium laisse progressivement place à un sillage boisé mariant cèdre, vétiver et fève tonka (<http://www.diptyqueparis.fr>).

**Notes de tête** : Cardamome, Bergamote, Grain de poivre rose

**Notes de cœur** : *Géranium*

**Notes de fond** : Bois de Cèdre, Vétiver, Fève Tonka

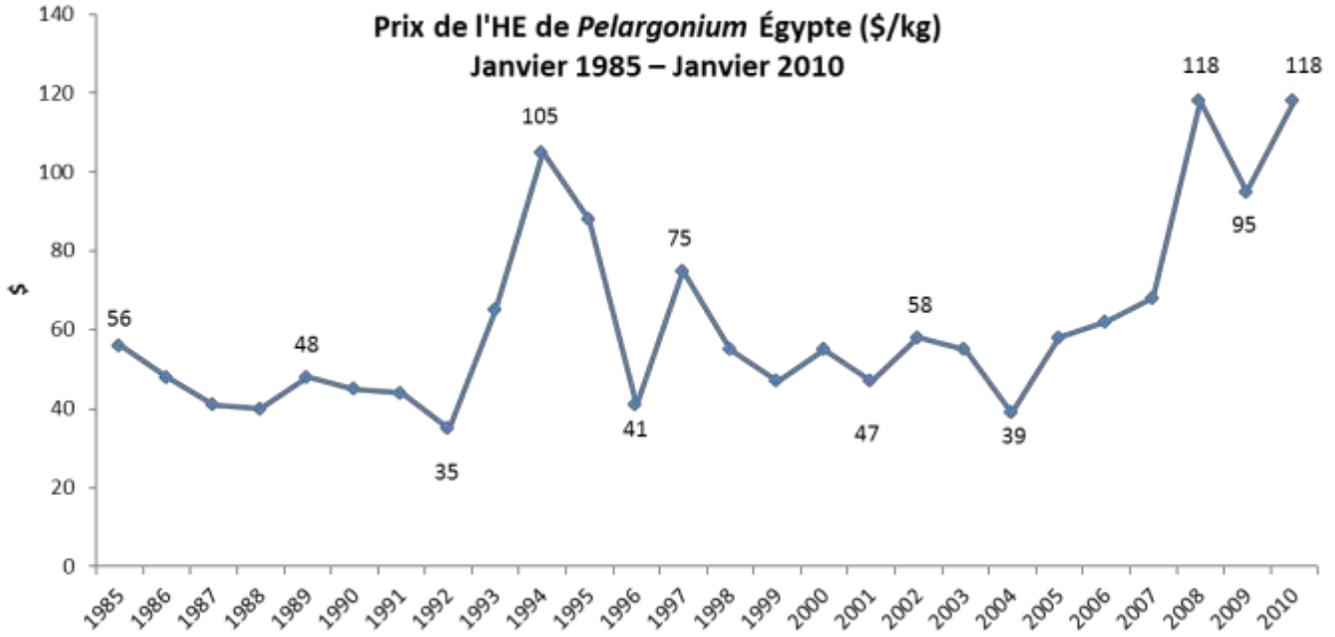


## Annexe 6 | Culture, récolte, distillation et collecte de l'HE traditionnelle de *Pelargonium* à Beni Souef en Égypte

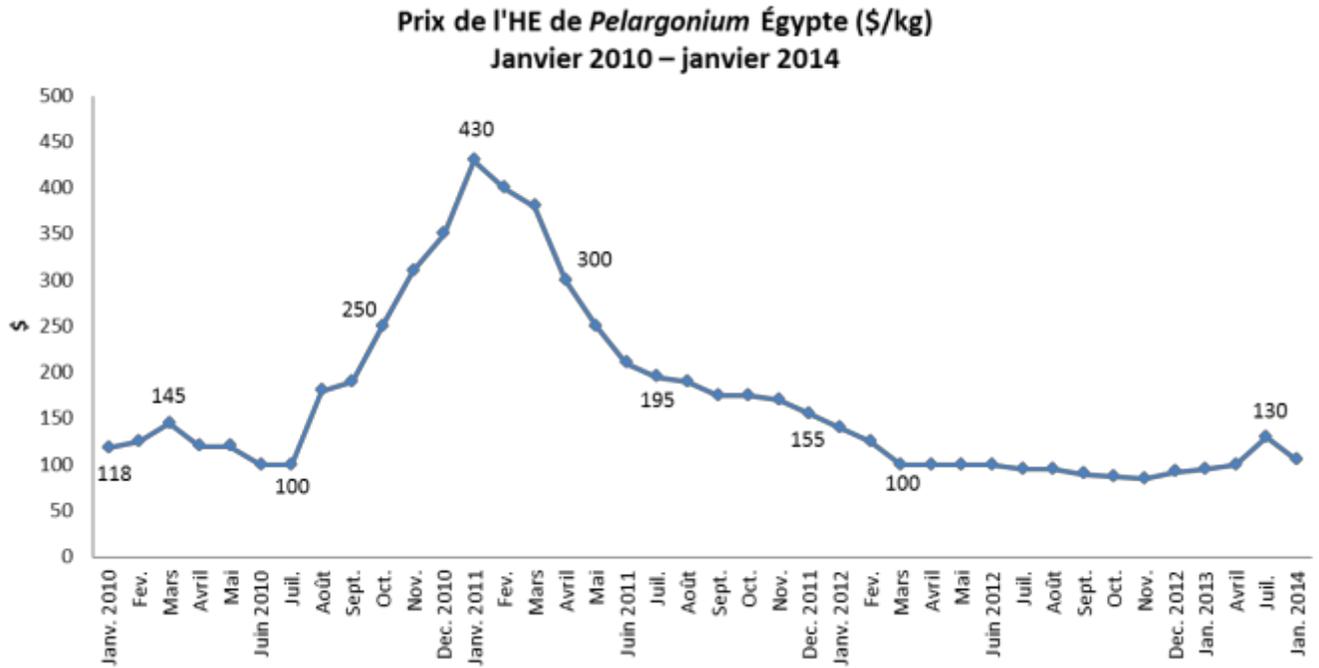


**A** – Co-culture de *Pelargonium* et d'oignon au début de la croissance du *Pelargonium*. **B** – Préfanage du *Pelargonium* pendant 2 jours dans le champ afin d'éliminer un maximum d'eau avant le transport et la distillation. **C** – *Pelargonium* stocké en tas et prêt à être distillé. **D** – Distillation du *Pelargonium* dans la distillerie privée (il n'existe pas de coopérative en Égypte). **E** – Récolte de l'HE dans les vases florentins. **F** – Quantification de l'HE par alambic de distillation et donc par fermier. **G** – Paiement en nature du fermier directement au propriétaire de la distillerie. Une quantité fixe est prélevée par distillation. Le fermier a alors le choix de vendre directement le reste de sa production au distillateur ou de repartir avec pour le vendre au plus offrant.

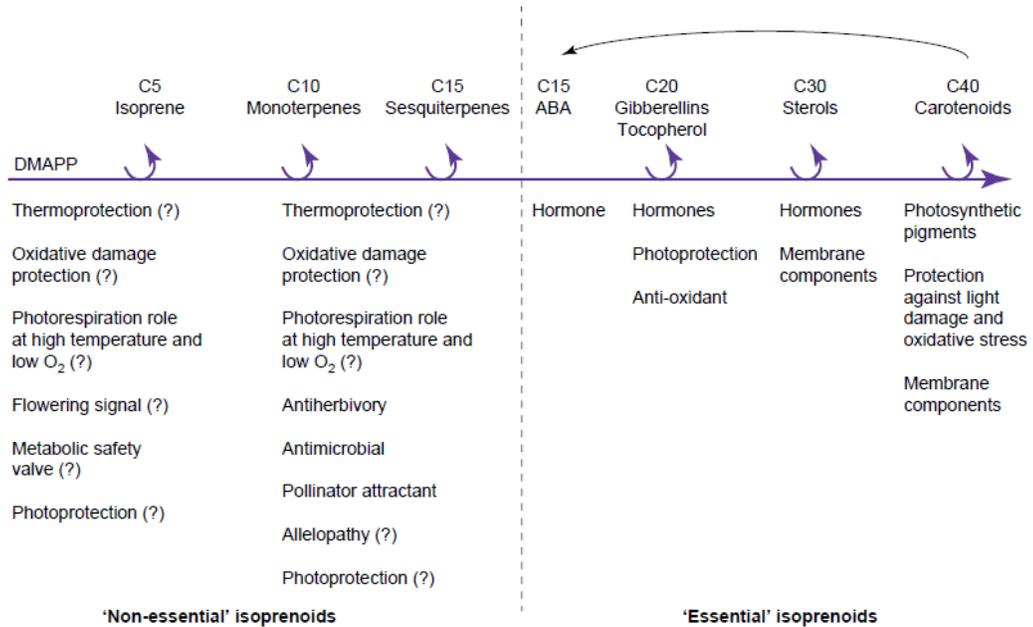
**Annexe 7 | Marché mondial de l'HE de *Pelargonium* Égypte de 1985 à 2014 (source IFF-LMR)**



| 356

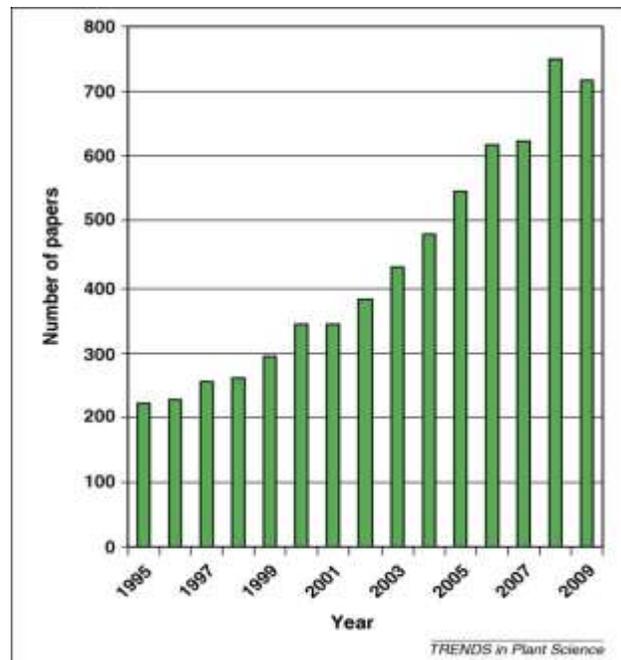


**Annexe 8 | Rôle des composés terpénoïdes dans les plantes (modifié d'après Owen et Penuelas 2005)**

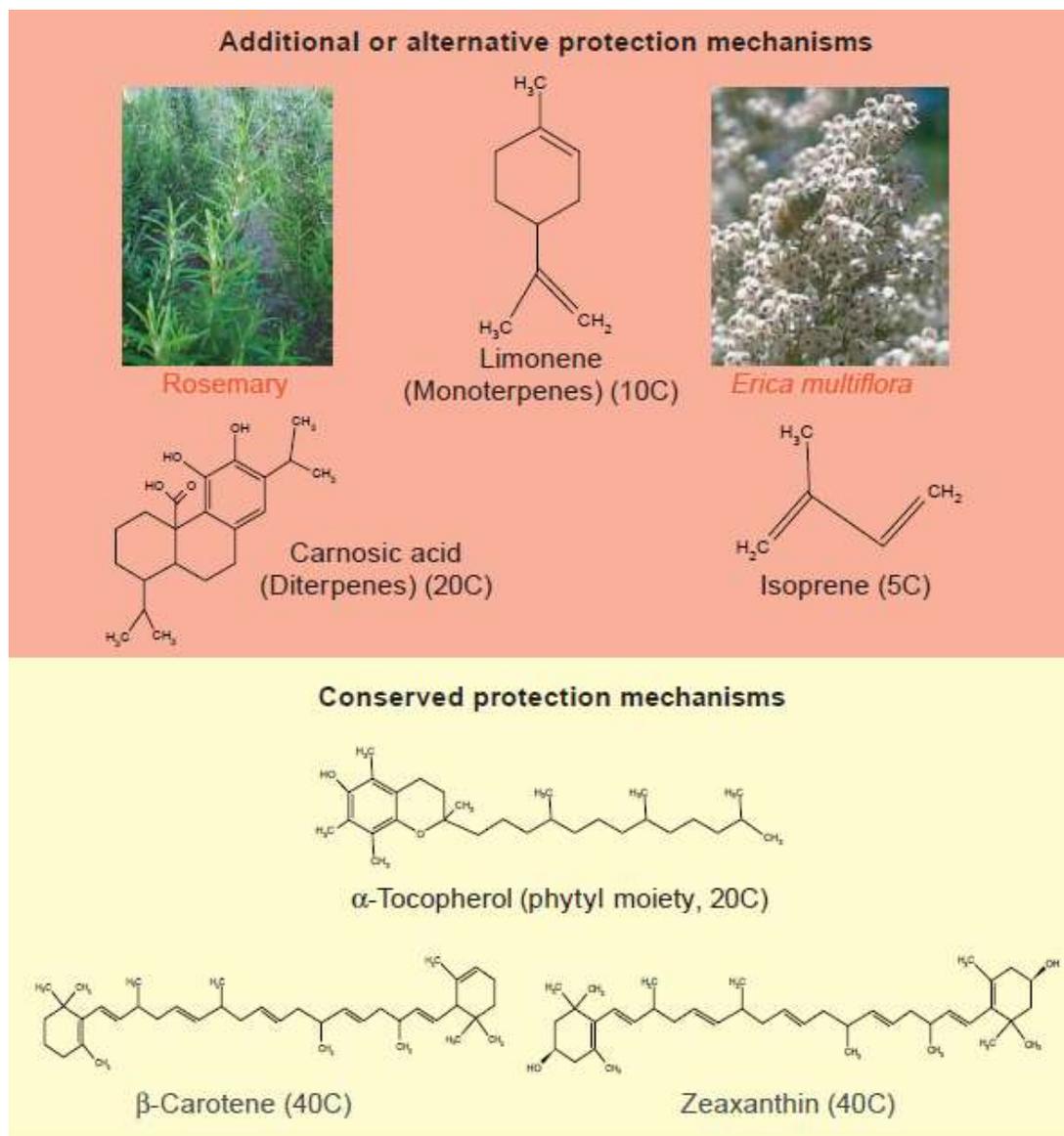


Les points d'interrogation indiquent que le rôle n'a pas été formellement démontré pour toutes les plantes émettant des terpénoïdes.

**Annexe 9 | Nombre d'articles extrait de Web of Science avec la recherche (« plant\* and volatile\* »). (D'après Dicke et Loreto 2010)**

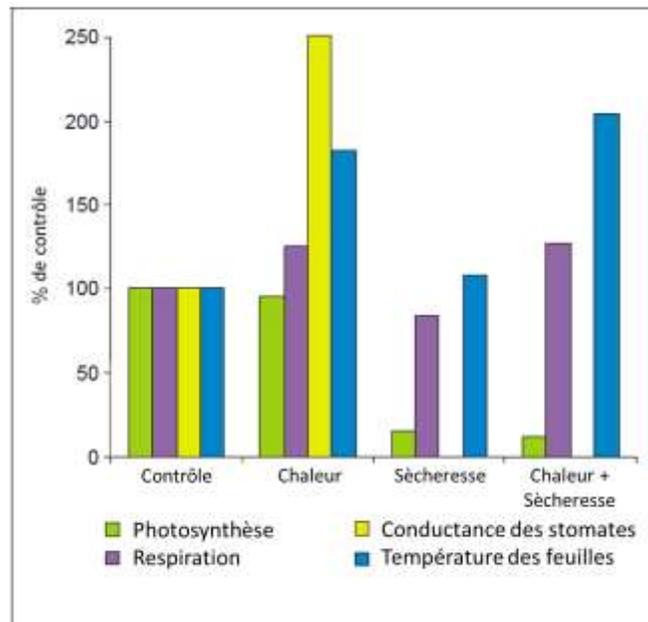


**Annexe 10 | Terpènes impliqués dans des mécanismes additionnels ou alternatifs de photo-protection**  
(modifié d'après Penuelas et Munné-Bosch 2005).



Plusieurs terpénoïdes aident à dissiper l'excès d'énergie dans les membranes photosynthétiques. Tous les organismes photosynthétiques contiennent des caroténoïdes (β-carotène ou Zéaxanthine) qui représentent des mécanismes très bien conservés de photo-protection. Certaines autres plantes, comme les plantes méditerranéennes, produisent d'autres terpénoïdes comme des monoterpènes qui pourraient aider à la plasticité de la photo-protection.

**Annexe 11 | Caractéristiques physiologiques modifiées par la sécheresse, la chaleur ou une combinaison des deux. (Modifiée d'après Mittler 2006).**



La combinaison de la sécheresse et de la chaleur entraîne des différences physiologiques spécifiques, par rapport à la chaleur et la sécheresse prises séparément.

**Annexe 12 | Transcrits et métabolites modifiés par la sécheresse, la chaleur ou une combinaison des deux. (Modifié d'après Mittler 2006).**

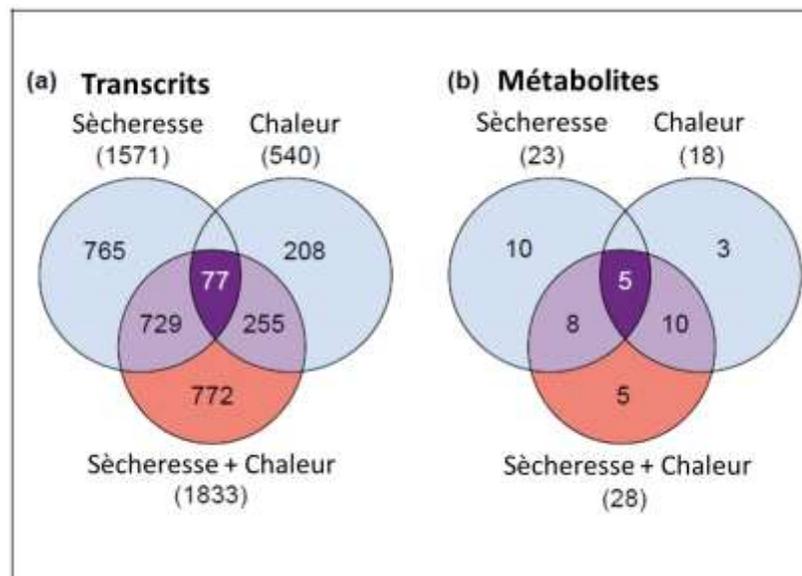
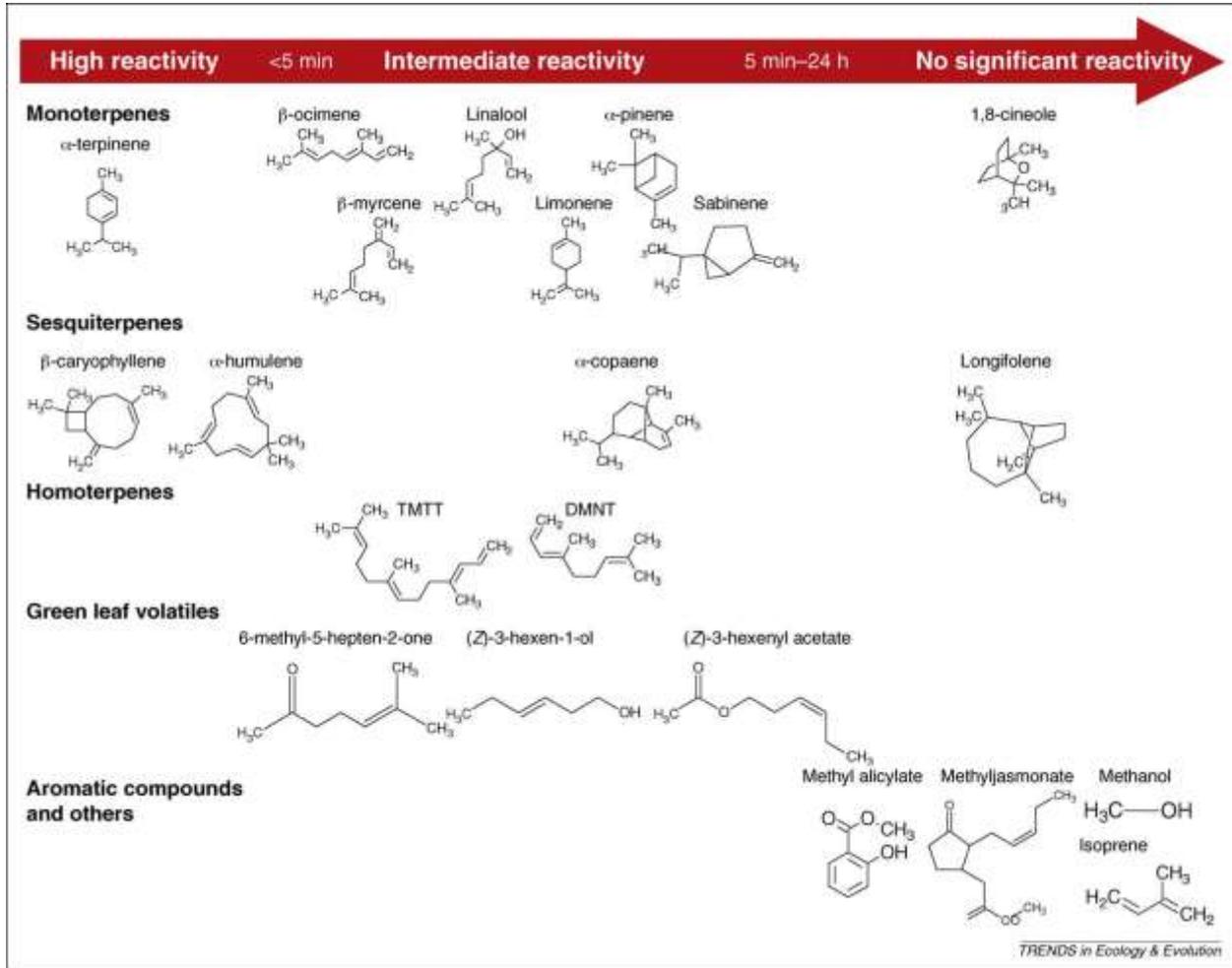


Diagramme de Venn montrant la superposition entre les (a) transcrits et (b) métabolites qui ont soit augmentés, soit diminués, suite à la sécheresse ou la chaleur ou encore une combinaison des deux. Le total des transcrits et métabolites est indiqué entre parenthèses.

**Annexe 13 | Réactivité (basée sur la durée de vie atmosphérique) avec O<sub>3</sub> de composés représentant différents groupes de COV (D'après Yuan et al. 2009).**



Le degré de réactivité avec l'O<sub>3</sub> est basé sur les propriétés structurales des COV comme la présence de doubles liaisons dans le squelette carboné. DMNT = (E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène; TMTT = (E,E)-4,8,12-triméthyl-1,3,7,11-tridecatetraène.

**Annexe 14 | Effets potentiels des changements climatiques sur les signaux écologique liés aux COV. (Modifié d'après Yuan et al. 2009)**

<b>Interaction type</b>	<b>Elevating temperature</b>	<b>Elevating CO<sub>2</sub></b>	<b>Elevating O<sub>3</sub></b>
(a) Pollination	Increase due to higher VOC synthesis and/or volatility	Difficult to predict	Decrease due to VOC degradation, leading to reduced reach of floral scent trails
(b) Aboveground herbivory (specialist herbivores ; generalist herbivores)	Decrease due to interference of specific signals or increase in VOC cue abundance No effect	Decrease in cue abundance	Decrease due to VOC degradation
(c) Fungal pathogens	Increase due to higher VOC synthesis and/or volatility	Difficult to predict	Increase by induced VOCs in leaf inner space
(d) Belowground herbivory	Difficult to predict	Difficult to predict	Difficult to predict
(e) Belowground predation	Difficult to predict	Difficult to predict	Difficult to predict
(f) Aboveground predation	Species specific; interference possible; e.g. higher isoprene emission due to increased temperature could lead to a negative (or no) effect on parasitoids	Species specific; decrease, no effect or increase in herbivore-induced VOCs	No effect or a decrease in parasitoid attraction by induced VOCs
(g) Plant–plant signals	Increase due to higher VOC synthesis and/or volatility, but interference possible	Difficult to predict	Decrease due to VOC degradation
(h) Root–root signals	Increase due to increased root allocation	Increase due to increased root allocation	Difficult to predict
(i) Frugivory	Increase due to higher synthesis and/or volatility	Difficult to predict	Decrease due to VOC degradation

**Annexe 15 | Distribution des classes majeures des composés odorants floraux en fonction de leurs groupes fonctionnels (modifié d'après Knudsen et Gershenzon 2006).**

Groupes fonctionnels	Total	Aliphatiques	Benzénoïdes et Phénylpropanoïdes	Composés en C5	Monoterpènes	Sesquiterpènes	Diterpènes	Terpènes irréguliers	Composés nitrogénés	Composés soufrés	Autres
Nombre de composés	1719	528	329	93	295	158	6	97	61	41	111
Hydrocarbonés	203		34	2	56	98	3	10			
Alcanes	46	40									6
Alcènes	58	54									4
Acides	36	11	3	2							
Aldéhydes	105	52	21	6	16	7		3			
Cétones	188	60	24	2	36	2		52			12
Alcools	286	86	47	7	87	31	3	20			5
Esters	475	195	119	74	40	9		7	2		29
Ethers	140	9	48		60	11		4			8
Composés chlorés	2	1	1								
Composés azotés	28		28								
Benzofuranes	1		1								
Benzopyranes	3		3								
Ammoniums	1								1		
Amides	5								5		
Amines	15								15		
Nitriles	5								5		
Nitrogènes	3								3		
Oximes	11								11		
Imidazoles	2								2		
Indoles	3								3		
Pyrazines	7								7		
Pyrazoles	1								1		
Pyridines	5								5		
Triazines	1								1		
Isothiocyanates	3									3	
Thiocyanates	1									1	
Sulfides	25									25	
Thioesters	3									3	
Thiols	4									4	
Sulfoxides	1									1	
Thiazole	2									2	
Thiafuranes	2									2	
Furanes	27										27
Pyranes	8										8
Naphtalènes	3										3
Azulènes	1										1
Composé spiro	8										8
Inconnus	1							1			

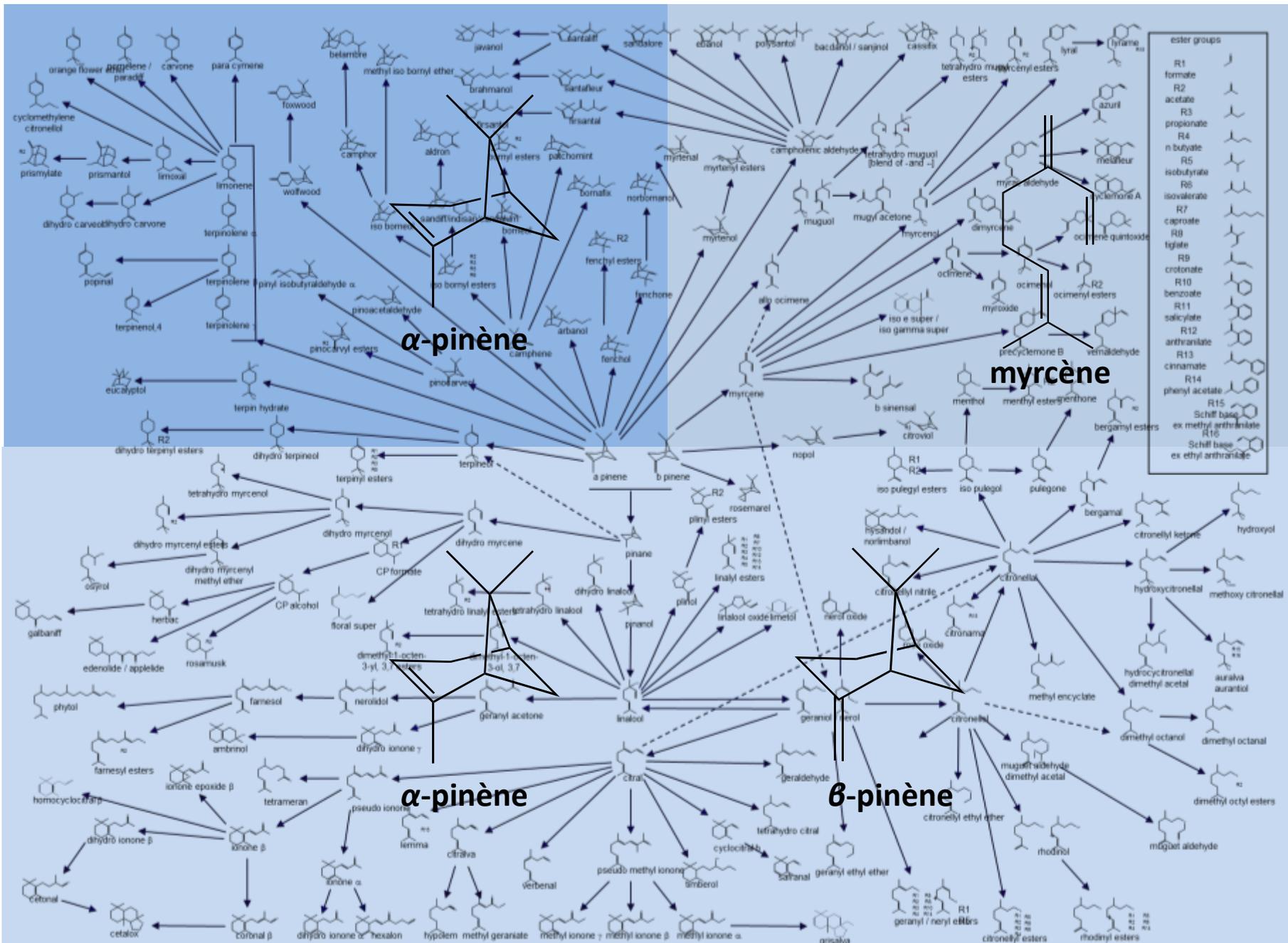
**Annexe 16 | Exemples de monoterpène synthèses caractérisées chez les plantes**

Produit majoritaire	Espèces	Références
<b>β-Myrcène</b>	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann et al. (1997)
<b>β-Myrcène</b>	<i>Antirrhinum majus</i>	Dudareva et al. (2003)
<b>β-Myrcène/(E)-β-Ocimène</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chen et al. (2003)
<b>β-Myrcène</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bohlmann et al. (2000)
<b>β-Myrcène</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Van Schie et al. (2007)
<b>β-Myrcène</b>	<i>Ocimum basilicum</i>	Iijima et al. (2004b)
<b>β-Myrcène</b>	<i>Perilla frutescens</i>	Hosoi et al. (2004)
<b>β-Myrcène</b>	<i>Picea abies</i>	Martin et al. (2004)
<b>β-Myrcène</b>	<i>Quercus ilex</i>	Fischbach et al. (2001)
<b>β-Pinène</b>	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann et al. (1997)
<b>β-Pinène</b>	<i>Citrus unshiu</i>	Shimada et al. (2004)
<b>β-Pinène</b>	<i>Picea abies</i>	Martin et al. (2004)
<b>α-Pinène</b>	<i>Fragaria vesca</i>	Aharoni et al. (2004)
<b>α-Pinène</b>	<i>Picea sitchensis</i>	McKay et al. (2003)
<b>α-Pinène</b>	<i>Pinus taeda</i>	Phillips et al. (2003)
<b>α-Pinène</b>	<i>Pinus taeda</i>	Phillips et al. (2003)
<b>α-Pinène</b>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Huber et al. (2005)
<b>α-Pinène</b>	<i>Lavandula stoechas</i>	Benabdelkader et al. (2015)
<b>(-)-(4S)-Limonène</b>	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann et al. (1997)
<b>(-)-(4S)-Limonène</b>	<i>Abies grandis</i>	Bohlmann et al. (1999)
<b>(-)-(4S)-Limonène</b>	<i>Cannabis sativa</i>	Günnewich et al. (2007)
<b>(-)-(4S)-Limonène</b>	<i>Mentha spicata</i>	Colby et al. (1993)
<b>(-)-(4S)-Limonène</b>	<i>Perilla frutescens</i>	Yuba et al. (1996)
<b>(-)-(4S)-Limonène</b>	<i>Picea abies</i>	Martin et al. (2004)
<b>(-)-(4S)-Limonène</b>	<i>Picea sitchensis</i>	Byun-McKay et al. (2006)
<b>(+)-(4R)-Limonène</b>	<i>Agastache rugosa</i>	Maruyama et al. (2002)
<b>(+)-(4R)-Limonène</b>	<i>Citrus unshiu</i>	Shimada et al. (2005)
<b>(+)-(4R)-Limonène</b>	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	Maruyama et al. (2001)
<b>(+)-(4R)-Limonène</b>	<i>Eleutherococcus trifoliatus</i>	Huang et al. (2015)
<b>Géraniol</b>	<i>Cinnamomum tenuipilum</i>	Yang et al. (2005)
<b>Géraniol</b>	<i>Ocimum basilicum</i>	Iijima et al. (2004a)
<b>Géraniol</b>	<i>Perilla citriodora</i>	Ito et Honda (2007)
<b>Géraniol</b>	<i>Perilla frutescens</i>	Ito et Honda (2007)
<b>Géraniol</b>	<i>Citrus jambhiri</i>	Shishido et al. (2012)
<b>Géraniol</b>	<i>Valeriana officinalis</i>	Dong et al. (2013)
<b>Géraniol</b>	<i>Lippia dulcis</i>	Dong et al. (2013)
<b>1,8-Cinéole</b>	<i>Citrus unshiu</i>	Shimada et al. (2005)
<b>1,8-Cinéole</b>	<i>Nicotiana suaveolens</i>	Roeder et al. (2007)
<b>1,8-Cinéole</b>	<i>Salvia fruticosa</i>	Kampranis et al. (2007)
<b>1,8-Cinéole</b>	<i>Salvia officinalis</i>	Wise et al. (1998)
<b>α-Terpinéol</b>	<i>Magnolia grandiflora</i>	Lee et Chappell (2008)
<b>α-Terpinéol</b>	<i>Pinus taeda</i>	Phillips et al. (2003)
<b>α-Terpinéol</b>	<i>Santalum album</i>	Jones et al. (2008)
<b>α-Terpinéol</b>	<i>Vitis vinifera</i>	Martin et Bohlmann (2004)
<b>α-Terpinéol</b>	<i>Zea mays</i>	Lin et al. (2008)
<b>Terpinolène</b>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Huber et al. (2005)
<b>Fenchol</b>	<i>Lavandula stoechas</i>	Benabdelkader et al. (2015)
<b>Sabinène</b>	<i>Hedychium coronarium</i>	Yue et al. (2014)
<b>Linalol</b>	<i>Hedychium coronarium</i>	Yue et al. (2014)
<b>Linalol</b>	<i>Citrus unshiu</i>	Shimada et al. (2014)

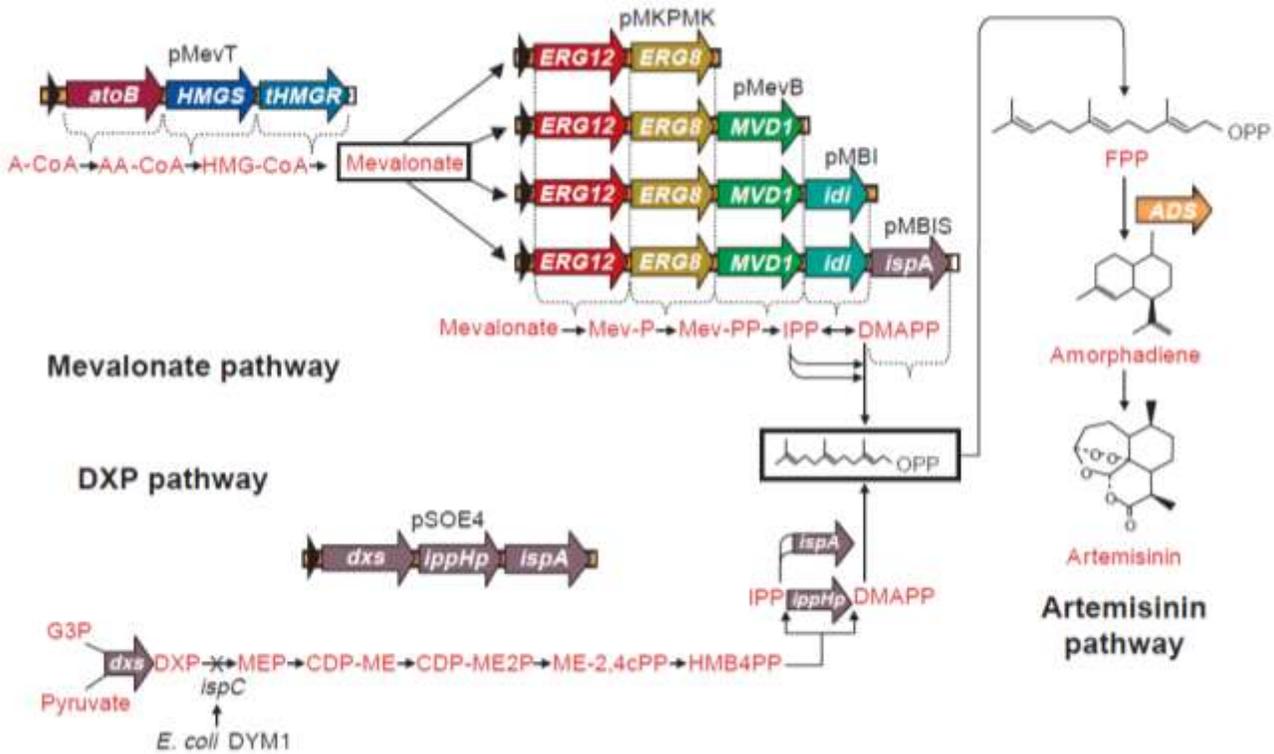
## Annexe 17 | Exemples de sesquiterpène synthèses caractérisées chez les plantes

Produit majoritaire	Espèces	Références
$\gamma$ -Bisabolène	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Huber et al. (2005)
$\gamma$ -Bisabolène	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ro et al. (2006)
$\alpha$ -Bisabolène	<i>Ginkgo biloba</i>	Parveen et al. (2015)
$\alpha$ -Bergamotène	<i>Lavandula angustifolia</i>	Landmann et al. (2007)
8- <i>epi</i> -Cédrol	<i>Artemisa annua</i>	Merck et al. (2009)
Valencène	<i>Citrus sinensis</i>	Sharon-Asa et al. (2003)
Valencène	<i>Vitis vinifera</i>	Lucker et al. (2004)
$\delta$ -Cadinène	<i>Cucumis melo</i>	Portnoy et al. (2008)
$\delta$ -Cadinène	<i>Gossypium arboreum</i>	Chen et al. (1995)
$\gamma$ -Cadinène	<i>Ocimum basilicum</i>	Iijima et al. (2004a)
$\alpha$ -Farnésène	<i>Cucumis melo</i>	Portnoy et al. (2008)
$\beta$ -Farnésène	<i>Zea mays</i>	Schnee et al. (2006)
Farnésol	<i>Ginkgo biloba</i>	Parveen et al. (2015)
Germacrène A	<i>Lactuca sativa</i>	Bennett et al. (2002)
Germacrène A	<i>Cichorium intybus</i>	Bouwmeester et al. (2002)
Germacrène A	<i>Ixeris dentata</i>	Kim et al. (2005)
Germacrène A	<i>Pogostemon cablin</i>	Deguerry et al. (2006)
Germacrène A	<i>Lavandula stoechas</i>	Benabdelkader et al. (2015)
Germacrène D	<i>Pogostemon cablin</i>	Deguerry et al. (2006)
Germacrène D	<i>Vitis vinifera</i>	Lucker et al. (2004)
Germacrène D	<i>Zingiber officinale</i>	Picaud et al. (2006)
$\delta$ -Elémène	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Van der Hoeven et al. (2000)
$\beta$ -Eudesmol	<i>Zingiber zerumbet</i>	Yu et al. (2008a)
$\beta$ -Cubébène	<i>Magnolia grandiflora</i>	Lee and Chappell (2008)
Cubébol	<i>Medicago truncatula</i>	Arimura et al. (2008)
5- <i>epi</i> -Aristolochène	<i>Nicotiana tabacum</i>	Wu et al. (2005)
5- <i>epi</i> -Aristolochène	<i>Capsicum annum</i>	Back et al. (1998)
$\alpha$ -Zingiberène	<i>Ocimum basilicum</i>	Iijima et al. (2004a)
Zingiberène	<i>Oryza sativa</i>	Yuan et al. (2008b)
Zizaène	<i>Chrysopogon zizanioides</i>	Hartwig et al. (2015)
Patchoulol	<i>Pogostemon cablin</i>	Deguerry et al. (2006)
$\alpha$ -Humulène	<i>Zingiber zerumbet</i>	Yu et al. (2008)
$\alpha$ -Humulène	<i>Zingiber zerumbet</i>	Alemdar et al. (2015)
$\gamma$ -Humulène	<i>Abies grandis</i>	Steele et al. (1998)
$\delta$ -Guaiène	<i>Aquilaria crassna</i>	Kumeta et Ito (2010)
$\delta$ -Guaiène	<i>Aquilaria sinensis</i>	Liang et al. (2014)
Sesquithujène	<i>Zea mays</i>	Köllner et al. (2004)
$\beta$ -Caryophyllène	<i>Cucumis sativus</i>	Mercke et al. (2004)
$\beta$ -Caryophyllène	<i>Zea mays</i>	Köllner et al. (2008)
$\beta$ -Caryophyllène	<i>Medicago truncatula</i>	Arimura et al. (2008)
$\beta$ -Caryophyllène	<i>Oryza sativa</i>	Yuan et al. (2008)
$\beta$ -Caryophyllène	<i>Daucus carota</i>	Yahyaa et al. (2015)
Néolidol	<i>Medicago truncatula</i>	Arimura et al. (2008)
Néolidol	<i>Antirrhinum majus</i>	Nagegowda et al. (2008)
$\delta$ -Selinène	<i>Abies grandis</i>	Steele et al. (1998)
$\beta$ -Selinène	<i>Ocimum basilicum</i>	Iijima et al. (2004a)
3,5-Muroladiène	<i>Mentha x piperita</i>	Prosser et al. (2006)
1,10-valérenadiène	<i>Valeriana officinalis</i>	Yeo et al. (2013)
Santalol	<i>Santalum album</i>	Diaz-Chavez et al. (2013)
$\tau$ -Cadinol	<i>Lavandula angustifolia</i>	Jullien et al. (2014)

Annexe 18 | Intérêt de l' $\alpha$ -pinène, du  $\beta$ -pinène et du myrcène dans la synthèse chimique des composés aromatiques (IFF)



**Annexe 19 | Production d'amorphadiène via la voie du DXP ou du mévalonate et détails des opérons utilisés (Modifié d'après Martin et al. 2003).**



Les triangles noirs représentent le promoteur  $P_{LAC}$  et *tHMGR* fait référence au produit tronqué du gène *HMGR*. Les gènes (tous les gènes sont isolés de *S. cerevisiae* sauf ceux spécifiquement précisés) et les enzymes sont notées : *atoB*, acétoacétyl-CoA thiolase d'*E. coli*; *HMGS*, HMG-CoA synthase; *tHMGR*, HMG-CoA réductase tronquée; *ERG1*, mévalonate kinase; *ERG8*, phosphomévalonate kinase; *MVD1*, mévalonate pyrophosphate décarboxylase; *idi*, IPP isomérase d'*E. coli*; *iphHp*, IPP isomérase de *Haematococcus pluvialis*; *dxs*, 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; *ispC*, 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase; *ispA*, FPP synthase d'*E. coli*; *ADS*, amorphadiène synthase. Intermédiaires des voies de biosynthèses : G3P, glycéraldéhyde 3-phosphate; DXP, 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate; CDP-ME, 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol; CDP-ME2P, 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol 2-phosphate; ME-2,4cPP, 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclopyrophosphate; HMB4PP, 1-hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butényl 4-pyrophosphate; IPP, isopentényl pyrophosphate; DMAPP, diméthylallyl pyrophosphate; FPP, farnésyl pyrophosphate; A-CoA, acétyl-CoA; AA-CoA acétoacétyl-CoA; HMG-CoA, hydrométhylglutaryl-CoA; Mev-P, mévalonate 5-phosphate; Mev-PP, mévalonate pyrophosphate.

Annexe 20 | Présentation technique et olfactive du Clearwood™

CLEARWOOD™  
970953

**Woody**

Patchouli

---

Mixture of sesquiterpenes and alcohols present in patchouli oil

**REFERENCES**  
 CAS number: 0084238-39-1  
 FEMA number: -  
 REACH number: n/a  
 Stabilizer: 0.05% of Tocopherol Alpha (E307)  
 Solvent: None added  
 Firmenich code: 970953

**OLFACTIVE NOTE**  
 Soft, clean version of Patchouli without the earthy, leathery and rubbery notes found in the natural oil.

**PERFUMERY USAGE**  
 CLEARWOOD™ can be used like patchouli or as a new woody building block at higher dosages.

**PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES**

appearance	Colourless to yellow liquid
flashpoint	>100°C
vapour pressure	0.34 Pa at 20 °C
purity	n/a
log p (measured)	n/a
boiling point	min 274 °C at 760 mmHg
molecular weight	n/a

**STABILITY & PERFORMANCE**

RECOMMENDED APPLICATIONS	STABILITY	TYPICAL % USE	SUBSTANTIVITY & REMARKS	
fine fragrances	■■■■■	0.5 - 20%	Heart and base note	
shampoo	■■■■■	0.5 - 5%	wet: ■■■■	dry: ■■■
shower gel	■■■■■	0.5 - 5%	foam: ■■■■	
soap	■■■■■	0.5 - 5%	foam: ■■■■	dry hand: ■■■■
detergent	■■■■■	0.5 - 10%	wet: ■■■■	dry: ■■■■
softener	■■■■■	0.5 - 10%	wet: ■■■■	dry: ■■■■
APC	■■■■■	0.5 - 5%	-	
candle	■■■■■	0.5 - 5%	cold wax: ■■■■	burning: ■■■■

**Tenacity**  
 Lasts 1 week on a smelling strip.

1 month  
 3 weeks  
 2 weeks  
 1 week  
 4 days  
 3 days  
 2 days  
 1 day  
 6 hours  
 3 hours  
 2 hours  
 1 hour

CLEARWOOD™ - 970953

**Firmenich** inspiring!



## Clearwood (Firmenich)™

\$4.00-\$20.00

CAS#0084238-39-1 - Firmenich description: Mixture of sesquiterpenes and alcohols present in patchouli oil.

Contains Stabilizer: 0.05% of Tocopherol Alpha (E307)

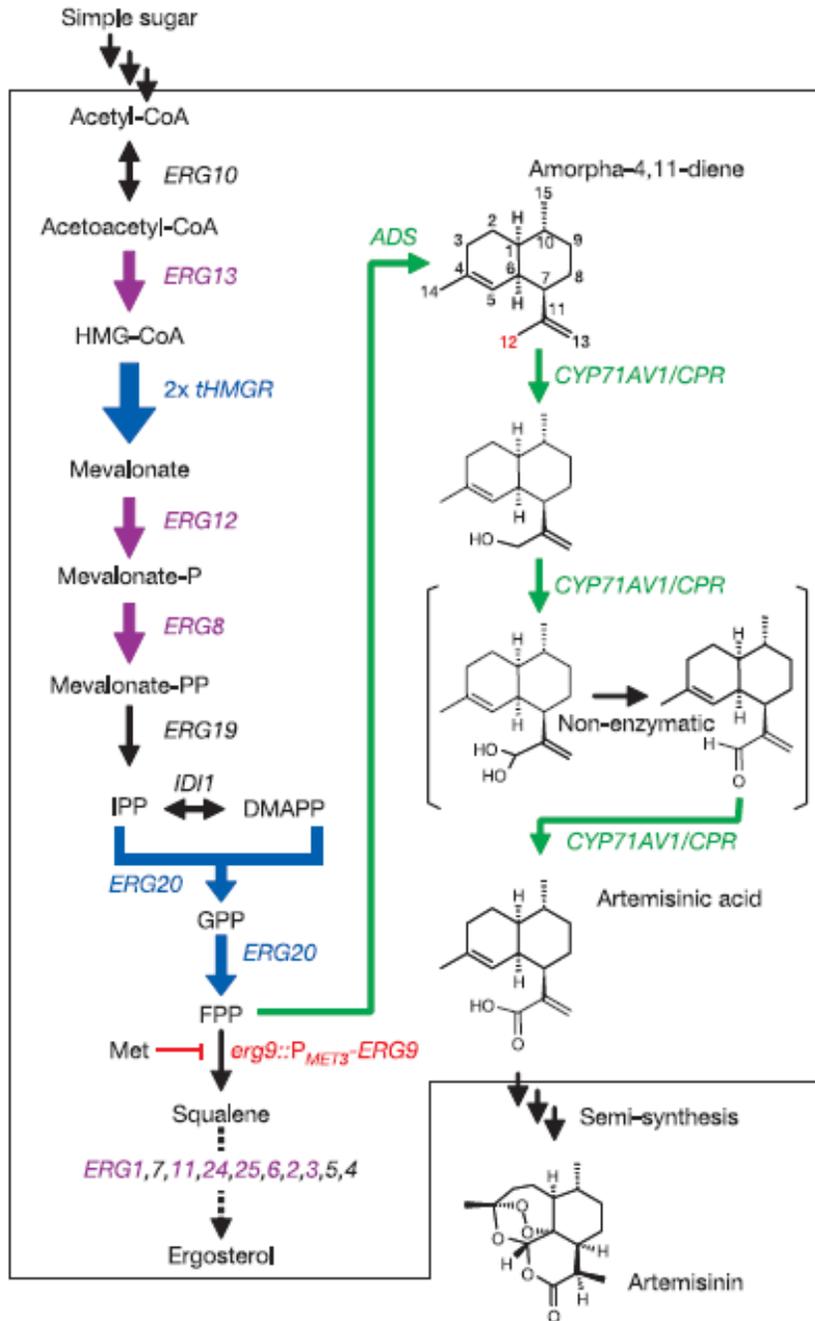
Firmenich Odor Description: Soft, clean version of Patchouli without the earthy, leathery and rubbery notes found in the natural oil.

Comments from Gary Marr, Master Perfumer at Firmenich:  
 "Clearwood™ is an intense and long lasting woody note, but at the same time, light and transparent. It differs from other dark woody notes by its simplicity and cleanliness. It brings great versatility and lends itself for use in every conceivable type of product from Home Care to Fine Fragrance."

CLEARWOOD MSDS



Annexe 21 | Représentation schématique de l'ingénierie de la voie de biosynthèse de l'acide artémisinique dans *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Ro et al. 2006).



| 368

Les gènes de la voie du mévalonate dans *S. cerevisiae* surexprimés sont notés avec des flèches bleues; ceux qui sont indirectement sur-régulés par l'expression d'*upc 2-1* sont en mauve et la ligne rouge montre la répression de ERG9. Les flèches vertes indiquant la voie de biosynthèse menant du FPP à l'acide artémisinique qui a été introduite dans *S. cerevisiae* à partir de *A. annua*. Les trois étapes d'oxydation qui convertissent l'amorphadiène en acide artémisinique par CYP71AV1/CPR sont montrées. Les étapes se déroulant dans *S. cerevisiae* sont montrées dans le cadre noir.

**Annexe 22 | Protocole de mini-préparation d'ADN plasmidique avec le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)**

<p><b>1. Récolte des cellules</b></p>	 <p>10min, 4°C, 2500g</p>
<p><b>2. Lyse cellulaire</b></p>	 <p><b>Tampon A1 250µl</b>  <b>Tampon A2 250µl</b>                      5min T° ambiante (TA)  <b>Tampon A3 300µl</b></p>
<p><b>3. Clarification du lysat</b></p>	 <p>10min, TA, 11000g</p>
<p><b>4. Fixation de l'ADN sur la membrane en silice</b></p>	 <p>Charge du surnageant</p> <p>1min, TA, 11000g</p>
<p><b>5. Lavage de la membrane en silice</b></p>	 <p><b>Tampon AW 500µl</b>                      1min, TA, 11000g  <b>Tampon A4 600µl</b>                      1min, TA, 11000g</p>
<p><b>6. Séchage de la membrane en silice</b></p>	 <p>2min, TA, 11000g</p>
<p><b>7. Elution de l'ADN</b></p>	 <p><b>Tampon AE 30µl</b>                      1min, TA                      1min, TA, 11000g</p>

## Annexe 23 | Séquences des oligonucléotides utilisés dans cette thèse

Protéine	Séquence	Long.	Tm <sup>104</sup>	% GC	Utilisation
B3E8	CACCATGATTCTCAATCTCCGATACAACAG	31	60	41	PCR/Gateway - Clonage de B3E8 avec le peptide signal
B3E8	TACAATCGGTCGCTAACAAG	20	49	45	PCR
B3E8	CTGAAATGATTCTCAATCTTCC	22	49	36	PCR
B3E8	ATGCTTCTGGCTCTTTACAACACTATC	28	56	39	PCR et séquençage - Amorce interne
B3E8	CTACATCTCTTATGCATTAATGTAATGAAATGGGCT	38	60	31	PCR
B3E8	CACCTTAGTCCGCGTGGTTCTATGATTCTCAATCTCCAATAC	44	67	43	PCR/Gateway - Ajout de la séquence pour le clonage et ajout d'un site de coupure à la thrombine
B3E8	CACCTTAGTCCGCGTGGTTCTATGGAGATACTGAGGCCGT	41	70	53	PCR/Gateway - Ajout de la séquence pour le clonage et ajout d'un site de coupure à la thrombine
PhCINS	ATGCTTGAAATTAATTAACGACCCAAC	29	55	34	PCR
PhCINS	CTCAATATGGCTTCTATGTCTCATTAC	28	55	35	PCR
PhCINS	AGTTAAGCTTTTCAAGGGACAGGTTGATG	29	58	41	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour la fin du gène (3'-RACE) (pour la RACE PCR)
PhCINS	TGTGGACTGTGGGTGATTCTATGAGC	27	59	48	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour la fin du gène (3'-RACE) (pour la NESTED PCR)
PhCINS	TTAGATCTTCTGATGAATTGCTTGACC	29	57	37	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour le début du gène (5'-RACE) (pour la RACE PCR)
PhCINS	TGTGATTCTTGCTCTCTTTTCTCATATACA	32	57	34	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour le début du gène (5'-RACE) (pour la NESTED PCR)
PhCINS	ATTAACGACCAACTATAACTTTATAGGCTGAATTAG	37	60	32	PCR/Gateway
PhCINS	CACCTTAGTACCGAGAGGGAGCCAAACCAAGTGGTTAGG	40	70	55	PCR/Gateway - Ajout de la séquence pour le clonage Gateway et ajout d'un site de coupure à la thromb.
PhEDS	CACCATGGCTTCCAATTAGTATCAGTAG	29	60	44	PCR/Gateway - Pour le clonage de PhEDS sans thrombine pour l'expression stable dans les plantes.
PhEDS	CAAATATCACACATACTGAGTACATCACAAC	32	57	34	PCR - Correspond au Contig41471
PhEDS	AAATGGCTTCCAATTAGTATCAGTAGC	28	56	39	PCR - Correspond au Contig41471
PhEDS	CACAAGGGCATGCCAAGACT	20	53	55	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour la fin du gène (3'-RACE) (pour la RACE PCR)
PhEDS	CAAGGGCATGCCAAGACTCG	20	55	60	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour la fin du gène (3'-RACE) (pour la NESTED PCR)
PhEDS	TGCACCAAGGTCTCCAGGTG	20	55	60	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour le début du gène (5'-RACE) (pour la RACE PCR)
PhEDS	CAAGGTCTCCAGGTGAGTTCTTGTA	26	59	50	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour le début du gène (5'-RACE) (pour la NESTED PCR)
PhEDS	GTCATGGTCATCGCTCGAGTCAAAG	25	59	52	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour le début du gène (5'-RACE) (pour la 2ème NESTED PCR)
PhEDS	TGACCATGACCTCTACACTTGTG	23	55	47	qPCR
PhEDS	AGCTTAGCATGCCTCTAACATCA	23	53	43	qPCR
PhEDS	TTACTTGGAATCATCATCAGTTGAAATGGGATCA	34	59	35	PCR/Gateway
PhEDS	CACCTCGTCCGCGTGGTTCTATGGCTTCCAATTAGTATC	42	70	52	PCR/Gateway - Ajout de la séquence pour le clonage Gateway et ajout d'un site de coupure à la thromb.
PhGES	CACCATGCAAGGACTTGTGTGAGA	25	57	48	PCR/Gateway - Pour le clonage de PhGES sans thrombine pour l'expression stable dans les plantes.
PhGES	CGAACCGATGGGTGCGAAAGAAC	22	56	54	PCR/Gateway - Pour le clonage de PhGES SANS stop pour l'expression transitoire (avec GFP en C-term).
PhGES	GACAAGTCTCAAGAAATGCAAGG	23	53	43	PCR

Les Tm sont calculés à l'aide du site (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) suivant la formule suivante :  $Tm = ((41(C+G-16,4)) / (\text{longueur primer})) + 64,9$ . (Wallace et al. 1979 ; Sambrook et al. 1989)

- Annexes -

Protéine	Séquence	Long.	Tm	% GC	Utilisation
PhGES	TCTTTTTATGATTCCAATTACGAACCG	28	54	32	PCR
PhGES	AAGGTGGCTTATCCAACATGA	23	51	39	PCR
PhGES	GACGGAAGTGGAAGTGGCTCTTTTTGGGGA	32	64	50	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour le début du gène (5'-RACE) (our la RACE PCR)
PhGES	TGATGTTTTGCTGTTGGTCAGTCCACTCATTGTGCT	38	64	42	RACE PCR - Amorce pour le kit Marathon - Pour le début du gène (5'-RACE) (pour la NESTED PCR)
PhGES	CGTGTCAATCAGCTCCATCATAGCGGTTG	30	62	50	Marche génomique
PhGES	CCCGGTTCTTGACCAATGCCTCTTTATTC	32	63	46	Marche génomique
PhGES	GTAGTCAAACAAAATTCTAACTGATTC	28	52	28	PCR - Pour tester sur ADNg le début de PhGES trouvé à partir de la PCR inverse
PhGES	AATGATTAGGGAGTTGTGGGTGG	23	55	47	qPCR
PhGES	GCATGATCTTCAACACCAGAGAA	23	53	43	qPCR
PhGES	ATGATTCCAATTACGAACCGATGGGTCG	28	59	46	PCR/Gateway
PhGES	TTACGAACCGATGGGTCGAAAGAAC	25	57	48	PCR/Gateway - Clonage de PhGES avec stop pour l'expression stable ou transitoire (avec GFP en N-terminal).
PhGES	CACCCTAGTCCCGGTGGTCTATGCAAGGCCTTGTTGTGA	41	70	53	PCR/Gateway - Ajout de la séquence pour clonage Gateway et ajout d'un site de coupure à la thrombine.
PhMYS	GTTCTTATTAACCTGTCCCACTTC	25	52	36	PCR
PhMYS	CCAATGGCTTCTATATCTCAATTAC	25	52	36	PCR
PhMYS	CAAGTACTAAACATTTGCATCCCTAGATGTGAG	33	60	39	PCR/Gateway
PhMYS	CACCTTAGTACCGAGAGGGAGCCAAACCAAGTGGTTAGG	40	70	55	PCR/Gateway - Ajout de séquence pour le clonage par Gateway et ajout d'un site de coupure à la thromb.
PhAct1	CAAGGAGATAACTGCCCTTGCT	23	57	52	PCR – Cont. absence d'ADN après trait. DNase des ARN et contrôle de la synthèse des ADNc après la RT-PCR
PhAct1	CCACATCTGCTGGAAGGACTG	22	56	54	PCR – Cont. absence d'ADN après trait. DNase des ARN et contrôle de la synthèse des ADNc après la RT-PCR
PhAct1	CAAGAGCTGGAGACTTCAAAGAC	23	55	47	qPCR
PhAct1	TGATGGAGTTGTATGTGGTTTCG	23	53	43	qPCR
EF1	ACTACTGCACTGTTATTGATGCC	23	53	43	qPCR
EF1	TGACCATCCTTAGAGATACCAGC	23	55	47	qPCR
GAPDH	TTGTTGATCTTGTTGTCCAGGTC	23	53	43	qPCR
GAPDH	GACTTTAGATGCTCCGATGTGTC	23	55	47	qPCR
TCTP	CGAGAAGCAAGAGGAATTCAAGA	23	53	43	qPCR
TCTP	TTAGCACTAACCTCCTTCAACC	23	53	43	qPCR
Tubulin	TCCATTTATGCTTTCTCCTCGTAC	23	53	43	qPCR
Tubulin	TTACATCTTAGGCACCACGTC	23	53	43	qPCR

## Annexe 24 | Solutions pour la purification des protéines

### Tampon Native Purification 5X

Composition pour 1 L de tampon	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 mM
NaCl	2,5 M
Ajuster le pH à 8 avec NaOH	

### Tampon d'éluion

Composition pour 15 mL de tampon	
Imidazole	500 mM
Tampon native purification 1X	qsq 15 mL
Ajuster le pH à 8 avec HCl	

### Tampon de lyse

Composition pour 10 mL de tampon	
Imidazole	10 mM
Glycérol 5%	500 µL
Tampon native purification 1X	qsq 10 mL
Ajuster le pH à 8 avec HCl	

### Tampon de reprise

Composition pour 10 mL de tampon	
SDS 2%	0,2 mL
Glycérol 20%	2 mL
Tris-HCl	62,5 mM
Eau dibistillée	qsq 10 mL

### Tampon de lavage

Composition pour 200 mL de tampon	
Imidazole	20 mM
Tampon native purification 1X	qsq 200 mL
Ajuster le pH à 8 avec HCl	

### Tampon de Landman

Composition pour 25 mL de tampon	
Tris-HCl	25 mM
Glycérol 5%	1,25 mL
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MnCl <sub>2</sub>	2 mM
Ajuster le pH à 7,5 (monoterpènes)	
Ajuster le pH à 8 (sesquiterpènes)	

| 372

### Solution A 10X

Composition pour 10 mL de solution	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM
NaCl	5 M
Eau dibistillée	qsq 10 mL

### Tampon imidazole 3M

Composition pour 5 mL de tampon	
Imidazole	3 M
Solution A 10X	438,5 µL
Solution B 10X	61,5 µL
Ajuster le pH à 8 avec HCl	

### Solution B 10X

Composition pour 10 mL de solution	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mM
NaCl	5 M
Eau dibistillée	qsq 10 mL

## Annexe 25 | Solutions pour l'analyse des protéines par SDS-PAGE

### Gel de séparation (pour 2 gels 8%)

Composition pour 15 mL de solution	
Tampon Séparation	5,2 mL
Eau distillée	10,48 mL
SDS à 20%	100 µL
APS à 10%	100 µL
Acrylamide 40%	4 mL
Temed	20 µL

### Bleu de dépôt 4X

Composition pour 10 mL de solution	
40% Tris-HCl pH 6,8	4 mL à 0,5M
40% (v/v) glycérol	4 mL
1% SDS 20%	0,5 mL
0,1% bleu de bromophénol	10 mg
1,54% DTT	1,54 mg
Eau distillée	qsq 10 mL

### Gel de concentration (pour 2 gels 8%)

Composition pour 8 mL de solution	
Tampon Concentration	2 mL
Eau distillée	4,87 mL
SDS à 20%	40 µL
APS à 10%	80 µL
Acrylamide 40%	1 mL
Temed	8 µL

### Tampon de migration (pour 1 cuve de 4 gels)

Composition pour 1 L de solution	
SDS à 10%	1 g
Tris	3,02 g
Glycine	14,41 g
Eau dibistillée	qsq 1 L

### Solution de coloration du gel (pour 1 L)

Composition pour 1 L de solution	
Bleu de Coomassie R250	1,5 g
Bleu de Coomassie G250	1,5 g
Acide acétique 10%	100 mL
Ethanol 40%	400 mL
Eau distillée	qsq 1 L

### Solution de décoloration du gel (pour 1 gel – 2 lavages)

Composition pour 5 L de solution	
Acide acétique 10%	500 mL
Ethanol 40%	2 L
Eau distillée	2,5 L

### Tampon de Laemli 1X

Composition pour 1 L de solution	
Tris (25mM)	3,03 g
Glycine (192 mM)	14, 42 g
SDS à 20% (0,1%)	5 mL
Eau distillée	qsq 1 L

## Annexe 26 | Milieux de Culture *in vitro* du *Pelargonium*

### Milieu de base (MB) (adapté de Murashige et Skoog 1962)

Composition pour 1 L de milieu	
Macro MS (x10)/2	50 mL
Micro MS (x1000)	1 mL
Fe EDTA MS (x200)	5 mL
Vitamines de Morel (x1000)	1 mL
Sucrose	20 g
<i>pH 5,8 (ajusté avec KOH 1N)</i>	
Phytigel	3 g
<i>Stérilisation du milieu à 115°C pendant 20 min</i>	

### Micropropagation à partir des nœuds

#### Milieu de micropropagation

Composition pour 1 L de milieu	
Macro MS (x10)/2	50 mL
Micro MS (x1000)	1 mL
Fe EDTA MS (x200)	5 mL
Vitamines de Morel (x1000)	1 mL
Sucrose	20 g
Phytigel	3 g
AIA (sm à 1 mg.mL <sup>-1</sup> )	1 mL
Charbon Actif	2 g
<i>pH 5,8 (ajusté avec KOH 1N)</i>	

| 374

### Micropropagation à partir des méristèmes

Composition pour 1 L de milieu	Milieux d'introduction		Milieu multiplication cellules/bourgeons	Milieu d'enracinement
	Milieu A	Milieu B		
Milieu MB	1 L	1 L	1 L	1 L
AIB	0,25			
AIA		0,5 mg	0,3 mg	1 mg
BAP	0,5 mg	0,1 mg	0,5 mg	
GA <sub>3</sub>	0,1 mg		0,1 mg	

### Micropropagation à partir des plantes-mères

Composition pour 1 L de milieu	
Milieu MB	1 L
AIA	1 mg
Charbon actif	2 g
<i>Si plantes donneuse d'explants et difficultés pour la régénération/transformation</i>	
Milieu MB	1 L
AIA	0,2 mg
BAP	0,3 mg

**Annexe 27 | Composition des milieux de culture utilisés lors de la transformation stable du *Pelargonium* et de *Nicotiana benthamiana*.**

Milieu SRM (Shooting)

Composition pour 1 L de milieu	
Macro MS (x10)	50 mL
Micro MS (x1000)	1 mL
Fe EDTA MS (x200)	5 mL
Vitamines de Morel (x1000)	1 mL
Sucrose	30 g
PVP-40 0,5% (p/v) (antioxydant)	5 g
MES 250 mM	14 mL
ANA	0,2 mg
BAP	0,5 mg
Zéatine	0,5 mg
<i>pH 5,8 (ajusté avec KOH 1N)</i>	
Phytigel	3 g
<i>Stérilisation du milieu à 115°C pendant 20 min</i>	

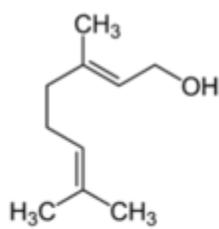
Milieu EM (Elongation)

Composition pour 1 L de milieu	
Macro MS (x10)	50 mL
Micro MS (x1000)	1 mL
Fe EDTA MS (x200)	5 mL
Vitamines de Morel (x1000)	1 mL
Sucrose	20 g
<i>pH 5,8 (ajusté avec KOH 1N)</i>	
Phytigel	3 g
<i>Stérilisation du milieu à 115°C pendant 20 min</i>	

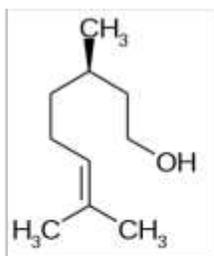
Annexe 28 | Distillation du *Pelargonium* en Égypte en juin-juillet à Regwa



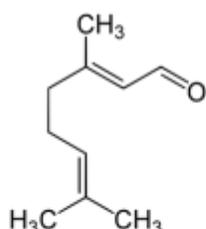
Annexe 29 | Structures chimiques du géraniol et de ses dérivés composant l'HE du *Pelargonium*



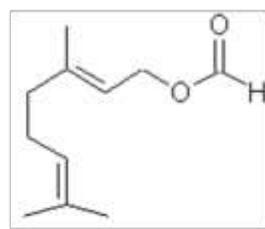
Géraniol



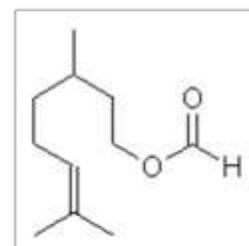
Citronellol



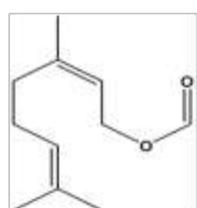
Géranial



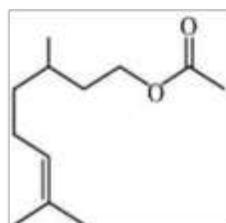
Géranyl formate



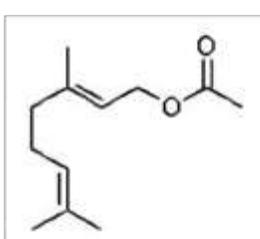
Citronellyl formate



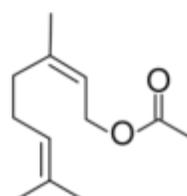
Nérylyl formate



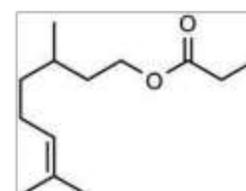
Citronellyl acétate



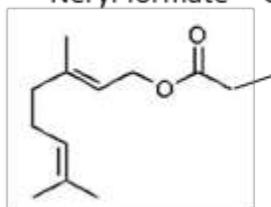
Géranyl acétate



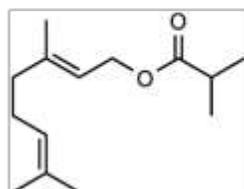
Nérylyl acétate



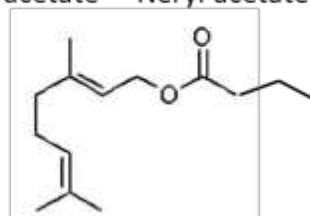
Citronellyl propionate



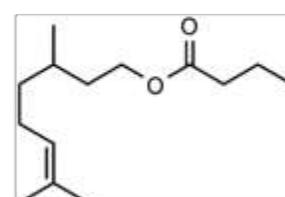
Géranyl propionate



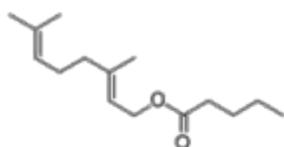
Géranyl isobutyrate



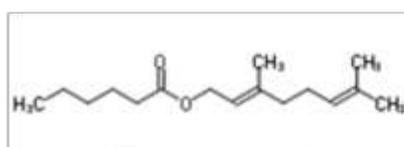
Géranyl butyrate



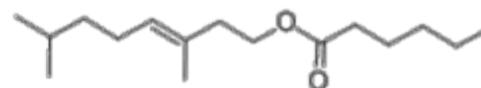
Citronellyl butyrate



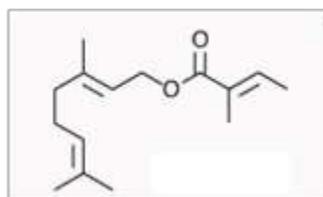
Géranyl valérate



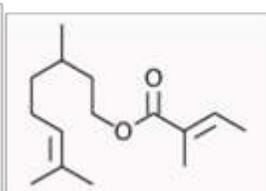
Géranyl caproate



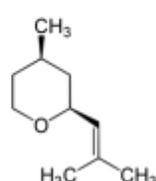
Citronellyl caproate



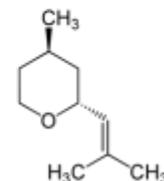
Géranyl tiglate



Citronellyl tiglate

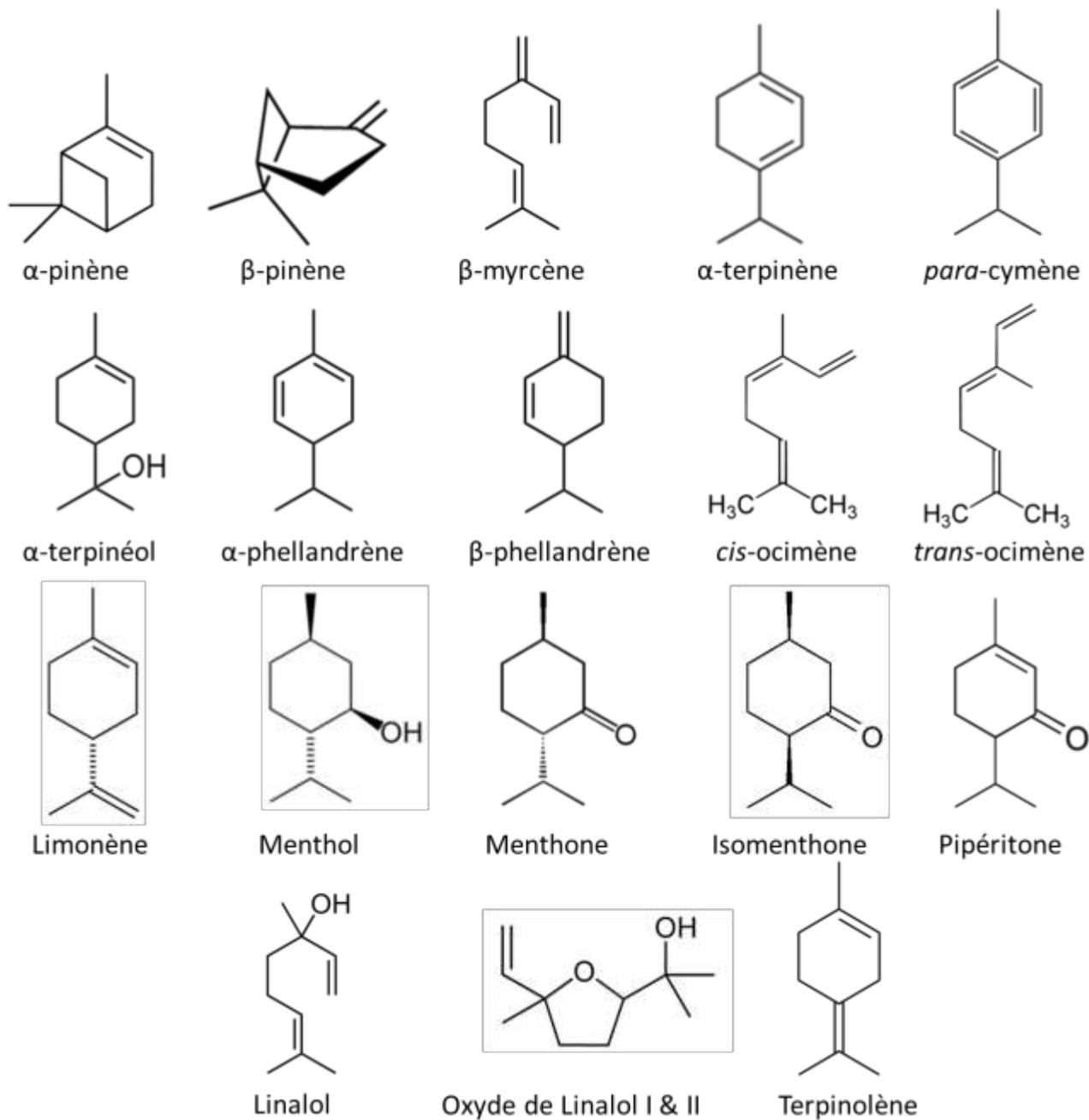


*cis*-oxyde de rose

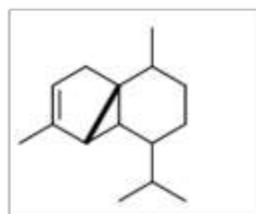


*trans*-oxyde de rose

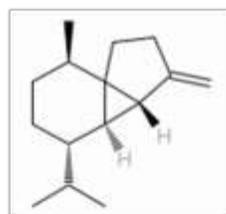
Annexe 30 | Structures chimiques des principaux monoterpènes cycliques et acycliques autres que le géraniol et ses dérivés composant l'HE du *Pelargonium*



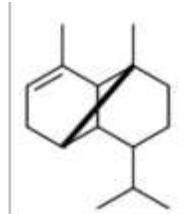
**Annexe 31 | Structures chimiques des principaux sesquiterpènes et de leurs dérivés composant l'HE du *Pelargonium***



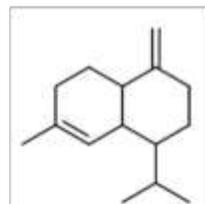
$\alpha$ -cubebene



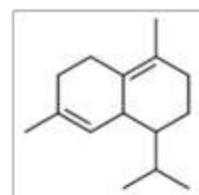
$\beta$ -cubebene



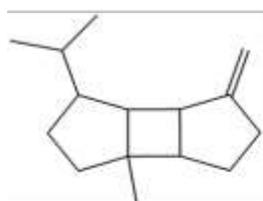
$\alpha$ -copaène



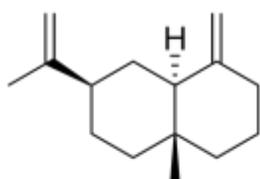
$\gamma$ -cadinène



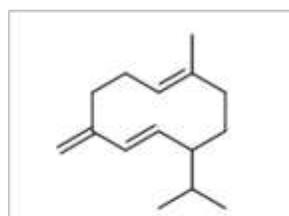
$\delta$ -cadinène



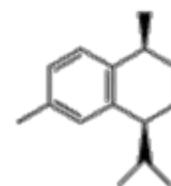
$\beta$ -bourbonène



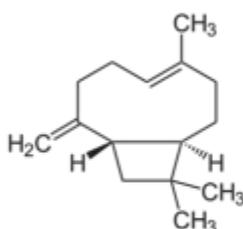
$\beta$ -selinène



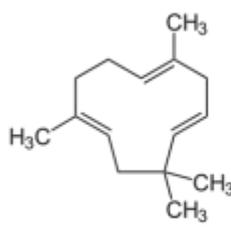
Germacrène D



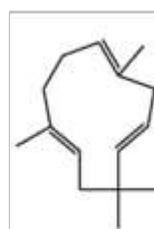
Calamenène



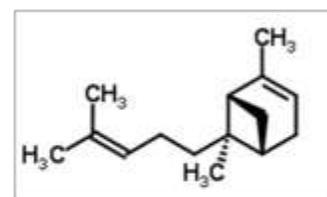
$\beta$ -caryophyllène



$\alpha$ -caryophyllène

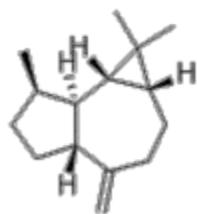


$\alpha$ -humulène

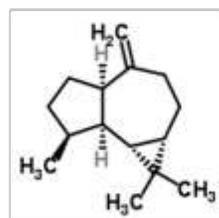


$\beta$ -trans bergamotène

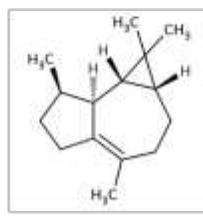
| 379



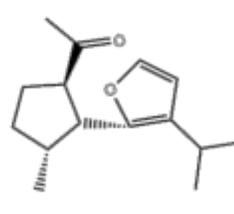
Aromadendrène



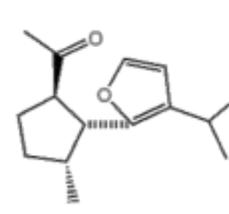
Alloaromadendrène



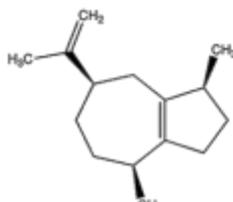
Viridiflorène



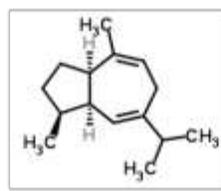
Furopelargone A



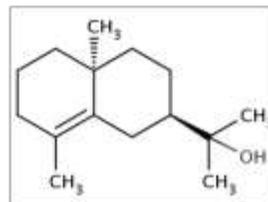
Furopelargone B



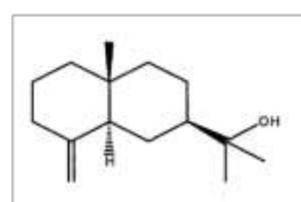
1(5),11-guaiadiène



6,9-guaiadiène



10-épi- $\gamma$ -eudesmol

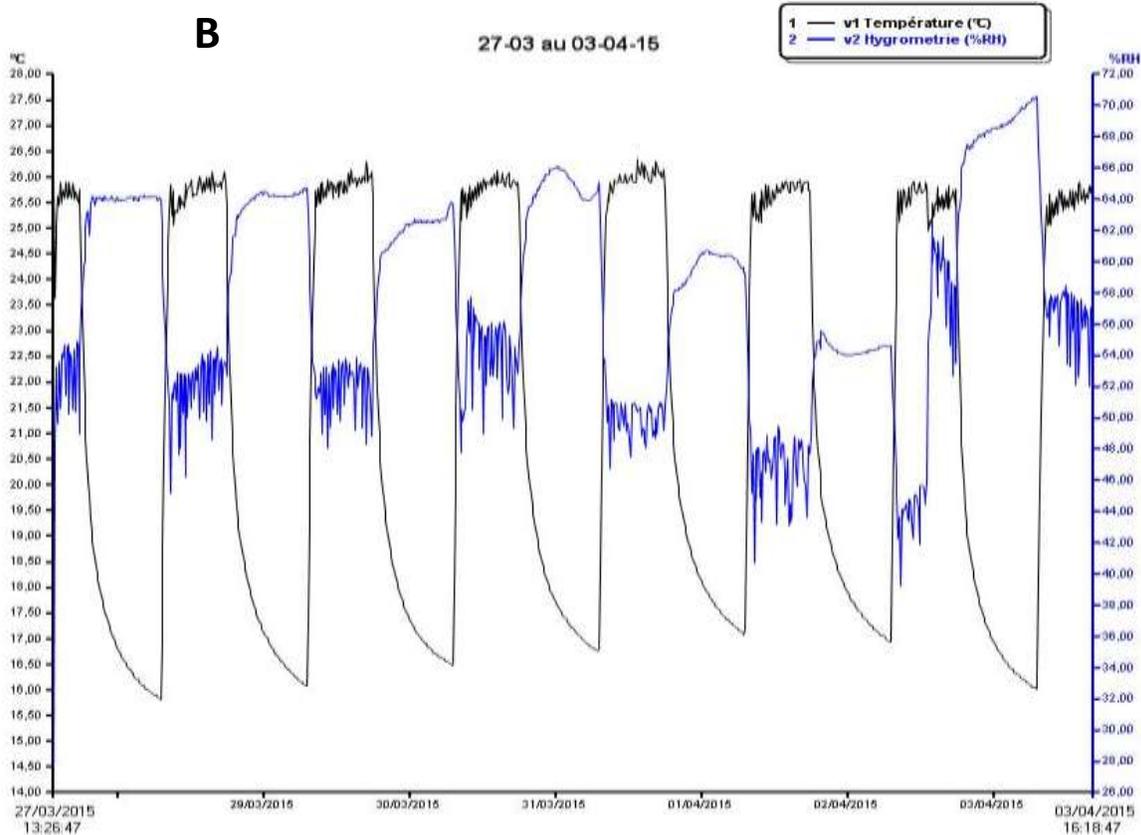
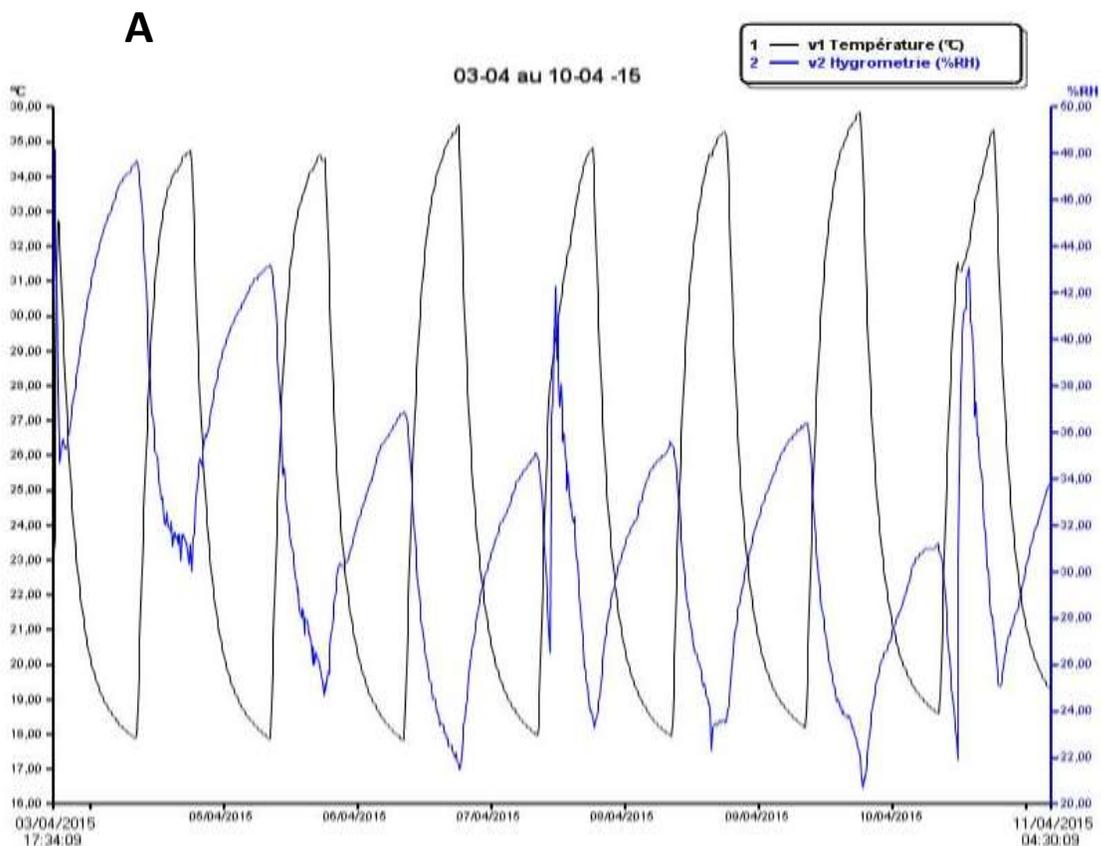


$\gamma$ -eudesmol

**Annexe 32 | Programme de fertirrigation de l'année 2013 pour les parcelles R&D de *Pelargonium* en Égypte.**

	Nb irr.mois <sup>-1</sup>	[conc. Fert.]	100 kg.Ha <sup>-1</sup>		200 kg.Ha <sup>-1</sup> (controle)		400 kg.Ha <sup>-1</sup>		600 kg.Ha <sup>-1</sup>	
			kg.irr. <sup>-1</sup>	Kg.ha <sup>-1</sup>	kg.irr. <sup>-1</sup>	Kg.ha <sup>-1</sup>	kg.irr. <sup>-1</sup>	Kg.ha <sup>-1</sup>	kg.irr. <sup>-1</sup>	Kg.ha <sup>-1</sup>
Octobre	5	1	0,65	3,25	1,3	6,5	2,6	13	3,9	19,5
Novembre	5	1	0,65	3,25	1,3	6,5	2,6	13	3,9	19,5
Décembre	5	1	0,65	3,25	1,3	6,5	2,6	13	3,9	19,5
Janvier	5	1	0,65	3,25	1,3	6,5	2,6	13	3,9	19,5
Février	5	1	0,65	3,25	1,3	6,5	2,6	13	3,9	19,5
Mars	5	2	1,3	6,5	2,6	13	5,2	26	7,8	39
Avril	10	4	2,6	26	5,2	52	10,4	104	15,6	156
Mai	10	4	2,6	26	5,2	52	10,4	104	15,6	156
Juin	10	2	1,3	13	2,6	26	5,2	52	7,8	78
Juillet	10	2	1,3	13	2,6	26	5,2	52	7,8	78
				100,75		201,5		403		604,5

**Annexe 33 | Relevés journaliers des températures (°C) de l'humidité relative (%). A – Conditions de températures hautes ; B – Conditions de températures basses (appareil Kistock KT100 de Kimo®).**



**Annexe 34 | Tableau de la composition chimique des absolus obtenus à partir de différents *Pelargonium*.** Ces absolus ont été obtenus à IFF-LMR, à partir de plantes cultivées dans le champ expérimental.

	HE de différentes espèces et cultivars de <i>Pelargonium</i> (% Relatif des constituants mentionnés**)									
	<i>P.</i> cv. 'rosat Bourbon'	<i>P.</i> cv. 'rosat Grasse'	<i>P.</i> cv. 'rosat Égypte'	<i>P.</i> cv. 'rosat Chine'	<i>P.</i> cv. 'Toussaint'	<i>P.</i> tomentosum	<i>P.</i> graveolens	<i>P.</i> quercifolium	<i>P. capitatum</i> chémotype 1	<i>P. capitatum</i> chémotype 2
tricyclène	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.4	0.02	0.71	N.D.	N.D.
α-thujène	N.D.	N.D.	N.D.	*	N.D.	*	*	0.86	*	N.D.
α-pinène	0.75	0.42	0.57	0.55	0.02	0.51	0.75	0.97	0.36	*
sabinène	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	*	N.D.	N.D.	0.28	*	N.D.
β-pinène	0.02	0.01	N.D.	0.02	*	0.04	0.02	0.13	N.D.	N.D.
β-myrcène	0.29	0.17	0.43	0.26	0.06	3.24	0.32	1,87	0.05	*
1,8-cinéole	N.D.	*	*	*	N.D.	N.D.	*	N.D.	N.D.	*
limonène	0.25	0.12	0.35	0.19	0.41	2.24	0.19	1.68	0.16	0.02
trans-sabinène hydrate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
cis-sabinène hydrate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
linalol	9.24	8.72	17.27	5.7	0.53	0.05	11.77	7.32	1.58	1.69
menthone	0.54	0.21	0.77	0.34	N.D.	31.76	0.29	N.D.	0.11	N.D.
isomenthone	8.02	5.33	6.85	7.69	31.21	26.38	6.74	N.D.	5.08	0.03
α-terpinéol	1,17	0.67	3.71	0.69	0.10	0.09	0.90	0.37	0.21	0.4
citronellol	18.2	26.19	21.41	36.74	53.13	N.D.	19.71	N.D.	56.04	3.97
géraniol	14.1	29.46	22.96	14.24	0.19	N.D.	33.42	0.15	4.72	6.81
citronellyl formate	9.4	5.47	3.92	8.09	0.04	N.D.	4.61	N.D.	9.12	1.56
6,9-guaiadiène	6.0	0.12	0.10	3.84	0.13	N.D.	0.13	0.19	6.8	10.0
β-élemol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.08	N.D.	N.D.
10-γ-épi eudesmol	N.D.	4.33	3.32	N.D.	N.D.	N.D.	3.31	0.06	N.D.	1.00
α-eudesmol	N.D.	0.13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.09	0.2	N.D.	1.95

(\*) Traces <0,01%

N.D. Non Détecté <0,005%

(\*\*) % à partir des aires de pic de GC-FID-identification par GC-MS - colonne apolaire HP1 60m x0.25mmx0.25µm

Annexe 35 | Séquence de la géranioyl synthase de *Pelargonium x hybridum* 'rosat Grasse' (PhGES)  
(1671 pb – 557 AA)



| 383

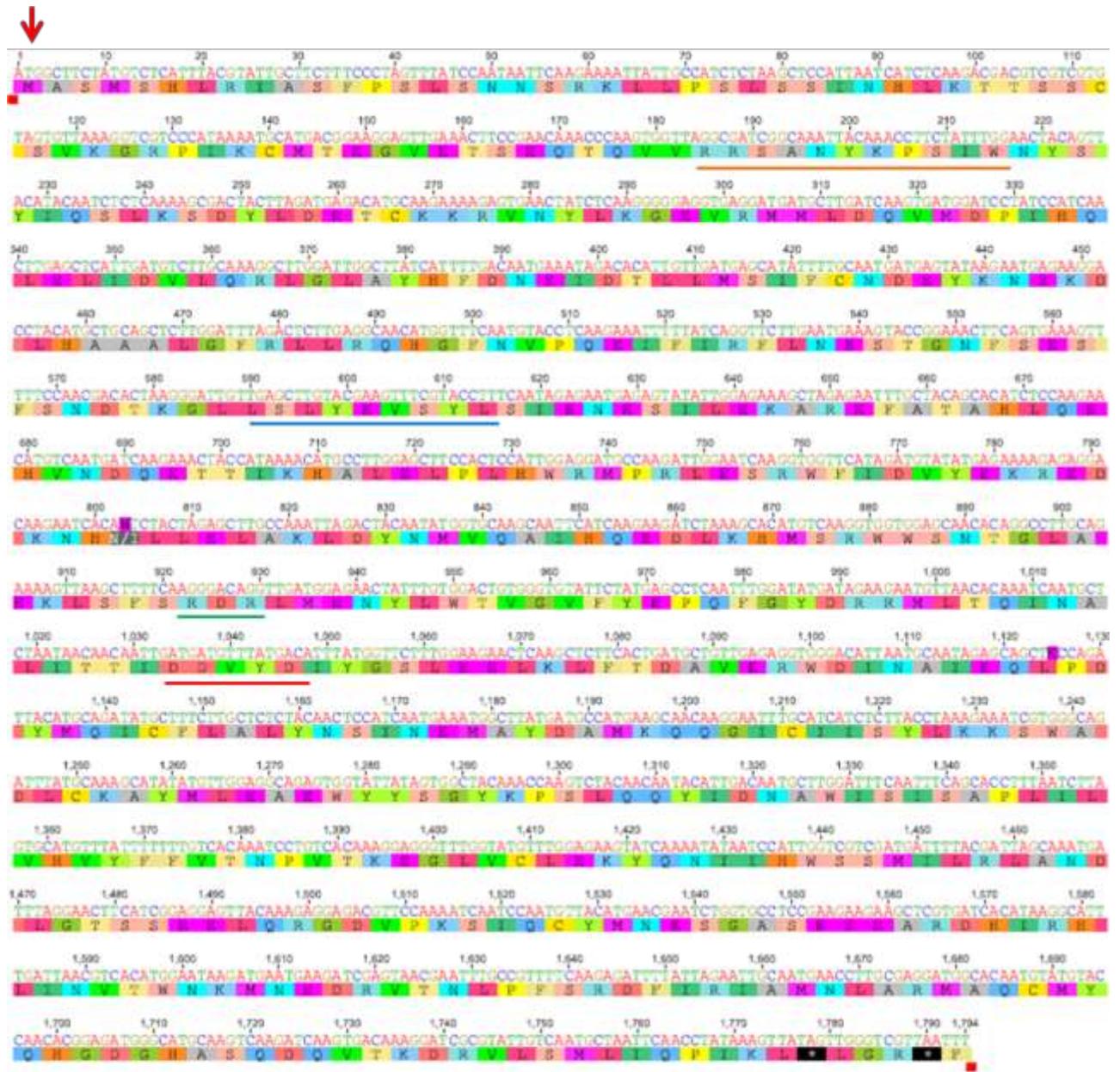
↓ Méthionine

— Séquence théorique LSLYEASYL - PhGES séquence LSLYEASYM

— Séquence RxR

— Séquence DDxxD

Annexe 36 | Séquence de la 1,8-cinéole synthase de *Pelargonium x hybridum* 'rosat Grasse' (PhCINS) (1779 pb – 593 AA)



| 384

↓ Méthionine

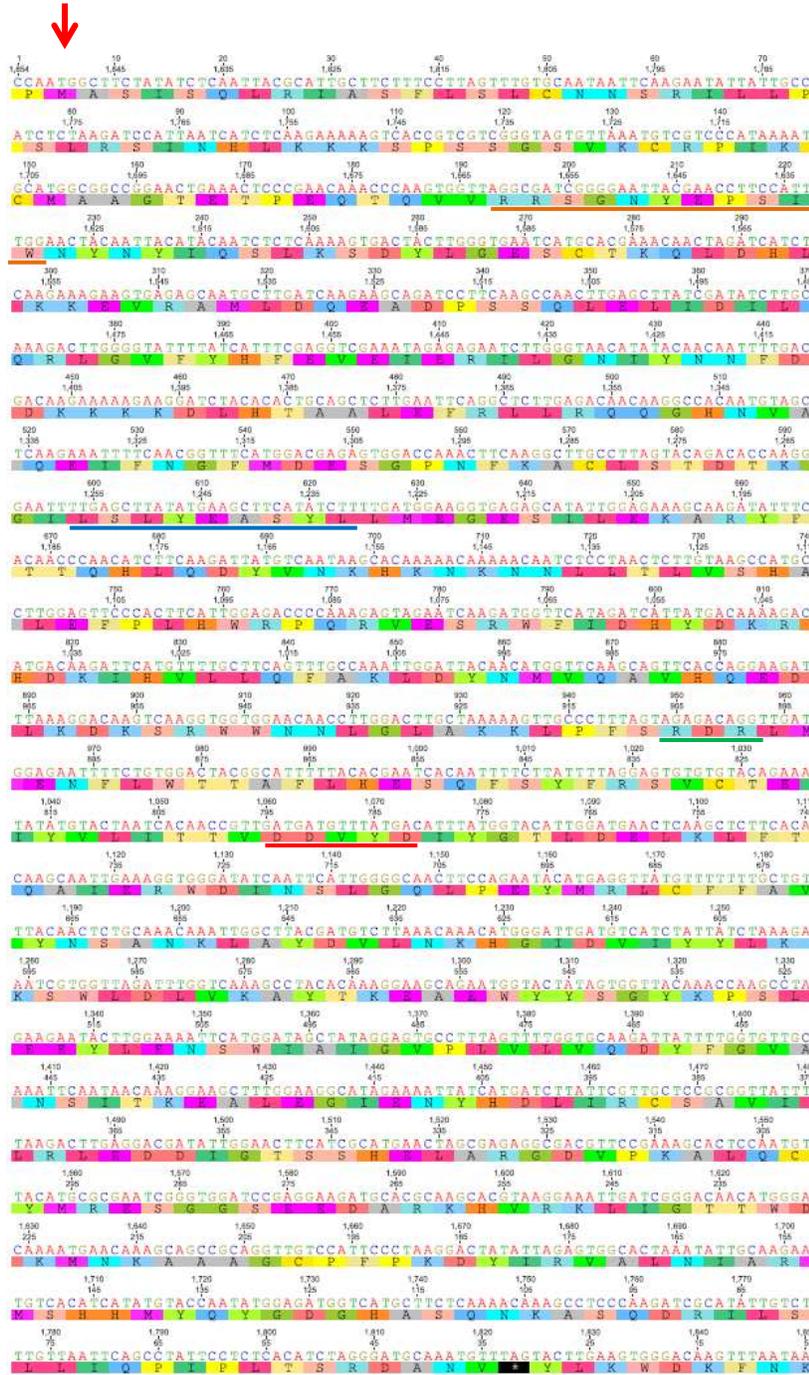
— Séquence RR<sub>x</sub>W

— Séquence théorique LSLYEASYL - PhCINS séquence LSLYEVSYL

— Séquence RxR

— Séquence DDxxD

Annexe 37 | Séquence de la myrcène synthase de *Pelargonium x hybridum* 'rosat Grasse' (PhMYS) (1821 pb – 607 AA)



↓ Méthionine

— Séquence RR<sub>x</sub>W

— Séquence théorique LSLYEASYL

— Séquence RxR

— Séquence DDxxD

Annexe 38 | Séquence de la 10- $\gamma$ -épi eudesmol synthase de *Pelargonium x hybridum* 'rosat Grasse' (PhEDS) (1704 pb – 568 AA)



↓ Méthionine

- Séquence RR<sub>x</sub>W - PhEDS séquence RS<sub>x</sub>W
- Séquence théorique LSLYEASYL - PhEDS séquence LSLYEASHL
- Séquence RxR
- Séquence DDxxD

**Annexe 39 | Evaluation olfactive des *Pelargonium* odorants par les parfumeurs d'IFF.**



Les *Pelargonium* ont été évalués olfactivement directement sur le végétal (tous), sur l'HE et sur l'absolu (certaines variétés uniquement) par les parfumeurs d'IFF (Dominique Ropion, Anne-Sophie Chapuis-Cariou, Pierre-Yves Cariou, Alexis Dadier et Fabien Durand).

**Annexe 40 | Analyse des extraits hexaniques de 64 accessions de *Pelargonium* cultivés en serre au LBVpam. Seuls les pics des COV (% de l'aire du pic de GC-FID) retrouvés dans l'HE ont été intégrés.**

	Descripteurs olfactifs 1	Descripteurs olfactifs 2	trans-2-hexenal	cis-3-hexenal + cis-3-hexenol	tricyclène	α-thujène	α-pinène	camphène	isabinène	limonille	β-pinène	lmyrcène	trans-3-hexenyl acétate	butyl butyrate	cis-3-hexenyl acétate	α-phellandrène	hexyl acétate	δ-3-carène	2-carène	para-cymène
1 <i>P. capitatum</i>	Rose	menthe		0,92			0,24		1,07		0,30	0,09				0,41				0,37
2 <i>P. radens</i>	Menthe	menthe		1,58								0,90				0,72				0,86
3 <i>P. graveolens</i>	Rose	menthe		0,43			0,35													
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>	Rose	menthe		0,31			0,61					0,33				0,28				
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>	Rose	menthe		0,32			0,54					0,24				0,19				
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>	Rose	menthe		1,01			0,51					0,17				0,15				
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>	Rose	menthe		0,88			0,44				0,14					0,09				
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>	Citron	rose		0,38			0,31					0,51				1,12				0,21
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>	Citron	rose		0,48			0,23					0,38				0,97				0,18
10 <i>P. tomentosum</i>	Menthe	menthe		0,74	0,82		0,75					1,21				2,54				
11 <i>P. 'Pepper'</i>	Epices	boisé		2,88		1,31			0,81		10,17	1,52			0,31	4,63				10,21
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>	Citron	rose		0,35								0,17								
13 <i>P. 'Clorinda'</i>	Bois	fruité		1,00			2,63	0,73	0,40		1,18	13,69				14,88			0,13	1,70
14 <i>P. 'Fragrance'</i>	Epices	aromat.		0,31	3,05		9,08	0,58	5,16		3,78	0,85	0,15			0,30			0,31	0,05
15 <i>P. citronnelum</i>	Citron	rose		0,39		0,34	0,13		0,50			0,09							0,19	0,23
16 <i>P. denticulatum</i>	Menthe	epices		0,61			0,28				0,14	2,45				2,15				0,15
17 <i>P. otaviens</i>	Fruité	boisé		0,40	0,59	11,95	5,58	0,61	0,78									1,82		
18 <i>P. crispum minor</i>	Citron	fruité		1,00																
19 <i>P. vitifolium</i>	Citron	epices		0,30	1,04		0,51	0,11			0,09	0,29				7,14				0,17
20 <i>P. 'Toronto'</i>	Fruité	epices	0,57	0,59	0,41	0,50	0,77					0,36				0,17			0,80	0,19
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>	Boisé	epices		0,80			0,36					0,33				1,69				0,37
22 <i>P. odoratissimum</i>	Epices	fruité		0,55						0,06										
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>	Menthe	boisé		1,65		0,20	0,88		0,34		0,12	0,56	0,11			1,13			0,18	1,84
24 <i>P. 'Charity'</i>	Citron	epices		0,77	0,25		0,31					0,46				1,95				0,27
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>	Fruité	epices		5,73	0,02		0,08		0,05			2,18	0,21							
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>	Boisé	epices		6,8	0,44		1,31		0,23			0,23								1,24
27 <i>P. 'Lavender'</i>	Aromat.	fruité		3,49			3,95		11,33		3,78	0,44	1,03						0,51	
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>	Citron	rose		0,65		0,26	0,11		0,2			0,05							0,08	0,63
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>	Rose	fruité	24,67				0,36						1		0,97					
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>	Citron	citron		0,33		0,14	0,06		0,21			0,05							0,04	0,43
31 <i>P. trifidum</i>	Aromat.	boisé		0,37	0,28	5,24	0,29	2,03			17,56	27,2								
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>	Epices	floral		0,81			0,34	0,05	0,04		0,32		0,31							
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>	Rose	menthe	2,55				0,3					0,17				0,1				
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>	Aromat.	epices		0,82			0,25					0,23				1,67				0,14
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>	Butyrate	fruité		1,81								0,66	1,88			8,57				4,8
36 <i>P. glutinosum</i>	Butyrate	boisé		2,32		0,3	0,12		3,41			0,13	0,38						0,22	0,28
37 <i>P. 'Royal oak'</i>	Boisé	epices	0,38	0,28	1,25		0,48		0,16			1,37				13,1			0,39	16,01
38 <i>P. quercifolium</i>	Boisé	epices		0,75		0,54	0,27		0,34			0,87				8,75			0,95	10,2
39 <i>P. 'Radula'</i>	Rose	citron		1,02			0,45					0,25				0,17				
40 <i>P. 'Karrooense knuth'</i>	Menthe	boisé		0,62	0,05		0,42		0,05		0,11	1,78				6,55				0,46
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>	Rose	menthe		0,64			0,62					0,27				0,22				
42 <i>P. 'Crispy'</i>	Rose	citron		1,11			0,07					0,29				1,15				0,06
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>	Boisé	aromat.	0,74			1,63	11,15		1,78		3,56	0,38	0,61			0,3			0,29	
44 <i>P. 'Angulosum'</i>	Floral	fruité		1,59	0,33								1,66							
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>	Rose	epices		0,33			0,4				0,08					0,18				
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>	Menthe	epices		0,55	0,47		0,5					3,39				17,39			0,11	1,84
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>	Boisé	fruité	1,33		3,77		1,91	0,54	0,22		1,07	16,81				17,24				1,61
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>	Citron	citron		1,58		0,37				3,06										0,64
49 <i>P. cucullatum</i>	Aromat.	floral		0,52																
50 <i>P. extipulatum</i>	Boisé	epices	4			2,35	37,22	1,07	1,36		12,53	0,45	1,41						0,25	0,21
51 <i>P. 'Fragrance Lilian Pott.'</i>	Epices	epices		0,23	0,16		0,17		0,25		0,09		0,13							
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>	Epices	epices		0,23			0,03		0,04				0,22							
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>	Epices	boisé	0,2	0,42	1,42	10,32	0,51	5,46		3,52	0,66					0,14				
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>	Epices	boisé			6,17	7,78	0,58	5,79		2,41	0,74					0,12			0,16	
55 <i>P. hispidum</i>	Floral	menthe	1,38				0,19					0,5				1,25				
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>	Citron	citron		0,07		0,23	0,1		0,31											0,59
57 <i>P. mutant</i>	Boisé	epices		2,12		1,06	4,64	0,31	0,53		4,35	1,62	0,4			3,31			1,01	9,93
58 <i>P. papillonaceum</i>	Citron	citron			1,69		0,79													
59 <i>P. myrtifolium</i>	Boisé	epices		6,49			1,63				0,77	1,17	7,98							
60 <i>P. praemorsum</i>	Boisé	fruité	0,76			8,76	8,24	0,31	6,56		31,8	1,18	1,07							
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>	Rose	menthe		0,94			0,35					0,19								
62 <i>P. scabroides</i>	Floral	fruité		0,24																
63 <i>P. 'Lilac'</i>	Epices	fruité		0,97		0,19	0,46	0,13	0,08		0,44		0,74							
64 <i>P. grossularoides</i>	Fruité	fruité		12,57	21,8		11,95				0,52	1,91	1,92						3,67	

- Annexes -

	limonène	β-phellandriène	β-terpinène	1,8-cinéole	2-heptyl acétate	cis-β-ocimène	trans-β-ocimène	γ-terpinène	2-octénol	trans-sabiène hydrate	cis-sabinène hydrate	α-terpinène	terpinolène	fenchone	oxyde de linalol	linalol	nonanol	nonanal	cis-oxyde de rose	thujone	phenarose	fenchyl alcool
1 <i>P. capitatum</i>			1,86			0,46													0,24			
2 <i>P. radens</i>	0,34	0,49				1,03	0,15									0,42						
3 <i>P. graveolens</i>																						
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>	0,11	0,25				0,24	0,08									0,20						
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>	0,09	0,18				0,27	0,04									0,09			0,18			
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>	0,06	0,10				0,05	0,02									0,16	0,11		0,37			
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>	0,02															0,19			0,40			
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>	0,45	0,99				1,27	0,17									0,16			0,20			
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>	0,34	0,84				0,99	0,11									0,57			0,26			
10 <i>P. tomentosum</i>	1,11	1,85				0,52	0,18						0,08									
11 <i>P. 'Pepper'</i>	2,73	1,50				1,15	0,22	17,46					1,00									
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>				0,18		0,77											0,64					
13 <i>P. 'Clorinda'</i>	1,33	3,48											0,20			5,62						
14 <i>P. 'Fragrance'</i>	2,62			4,06		0,17		0,60			5,92		0,15	3,19		2,28						1,10
15 <i>P. citronnelum</i>	0,08							1,60								1,90						
16 <i>P. denticulatum</i>	0,61	1,60				2,73	0,35									1,37						
17 <i>P. otaviens</i>	1,30					13,58	0,77	1,47								0,74						
18 <i>P. crispum minor</i>			1,17					0,31														
19 <i>P. vitifolium</i>	0,20	0,33				1,95	0,16									0,33						
20 <i>P. 'Toronto'</i>	0,26			0,14		5,56		6,11					0,19									
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>	1,01	0,30																				
22 <i>P. odoratissimum</i>																						
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>	0,65	2,92				1,81	0,19	1,24								0,95						0,10
24 <i>P. 'Charity'</i>	0,61	1,2				1,81	0,65									0,64						
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>	0,05															1,26						
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>	0,39	2,76				3,82	0,35	0,35							0,15	2,37						
27 <i>P. 'Lavender'</i>	0,29			1,97				1		0,43	1,43											
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>	0,07							0,99								1,67						
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>																			0,74			
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>	0,05					0,03		0,42								0,22		0,37				0,02
31 <i>P. trifidum</i>	0,66			2,2		2,67	0,19															
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>	0,34																					0,06
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>	0,08	0,12				0,2													0,76			
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>	0,69	0,6							0,12													
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>	0,86	1,7				2,84	0,31															
36 <i>P. glutinosum</i>	0,21							1,36														
37 <i>P. 'Royal oak'</i>	1,83	3,53				0,73	0,09	1,49							0,29	4,36						
38 <i>P. quercifolium</i>	0,96	1,6				7,93	0,85	4,49														
39 <i>P. 'Radula'</i>	0,06	0,16				0,29										0,06						
40 <i>P. 'Karooense knuth'</i>		1,88				4,5	0,62						0,09			1,01						
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>	0,07	0,2				0,26										0,14			0,16			
42 <i>P. 'Crispy'</i>	0,16	0,43				0,24										0,17						
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>	3,89			2,69			0,09	0,69		5,64	2,68		0,16	0,27								
44 <i>P. 'Angulosum'</i>																						
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>	0,04	0,1														0,1			0,07			
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>	1,63	4,27					0,13															
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>	0,98	3,37														5,28						
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>								0,41										0,48				
49 <i>P. cucullatum</i>																						
50 <i>P. extipulatum</i>	0,66			5,9				0,45														
51 <i>P. 'Fragrance Lilian Pott.'</i>	0,22			1,18										0,13		1,84						
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>	0,27			0,23										0,23							0,07	0,04
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>	1,81			3,57				0,36			8,28			1,93		2,28						
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>	4,45			3,24			0,21	0,34			5,92	0,1		6,3		3,03				0,15		0,7
55 <i>P. hispidum</i>	0,25	1,18				1,14	0,21									8,21						
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>	0,06							0,57								0,64	0,32					
57 <i>P. mutant</i>	1,51	0,99				0,95	0,55	5,86										0,55				
58 <i>P. papillonaceum</i>																						
59 <i>P. myrtifolium</i>																						
60 <i>P. praemorsum</i>	0,92			9,18				0,81														
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>	0,02																		0,43			
62 <i>P. scabroides</i>																1						
63 <i>P. 'Lilac'</i>	0,31			0,18			0,1															
64 <i>P. grossularoides</i>	1,81				10,78		3,62															

- Annexes -

	myrténol	décanal	linalyl acétate	octyl acétate	cis-pipéritol	trans-pipéritol	thymol méthyle éther	nérol	carvacrol méthyle éther	carvacrol méthyle éther isomère	citronellol	néral	pipéritone	2-décanal	géraniol	géraniol	citronellyl formate	néryl formate	bomnyl acétate	heptyl butyrate	cumyl alcool	lavendulyl acétate	
1 <i>P. capitatum</i>											5,73						23,97						
2 <i>P. radens</i>						0,34						0,60											
3 <i>P. graveolens</i>											34,74				0,64								
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>	0,08					0,06					16,76	0,44			24,30	2,87	7,99	0,24					
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>											34,48				8,05	1,52	14,13						
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>								0,39			29,03	0,64			13,34	1,39	9,97	0,11					
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>											21,90				25,61	1,84	6,69						
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>											39,19		0,34		0,23	2,48							
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>											38,48		0,49		0,45	2,48							
10 <i>P. tomentosum</i>						1,37							3,05										
11 <i>P. 'Pepper'</i>							2,42		5,53	0,65									0,22				
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>				1,04				0,54				0,13			22,95	0,45							
13 <i>P. 'Clorinda'</i>				3,79																			
14 <i>P. 'Fragrance'</i>					0,30								0,05										
15 <i>P. citronnelum</i>								1,53				15,91			0,83	63,30							
16 <i>P. denticulatum</i>						2,78										0,10							
17 <i>P. otaviens</i>																							
18 <i>P. crispum minor</i>								3,19				17,78			16,46	34,18		1,03					
19 <i>P. vitifolium</i>											4,52	0,16			0,10	0,13							
20 <i>P. 'Toronto'</i>				1,86																			
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>															0,40								
22 <i>P. odoratissimum</i>																							
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>													0,23										
24 <i>P. 'Charity'</i>						0,34					15,64		53,35										
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>												0,45			0,26	1,01							
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>																						0,65	
27 <i>P. 'Lavender'</i>																							
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>								2				15,45			6,89	49,5							
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>											23,71				1,6	0,29	10,28						
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>											0,22	23,66			3,72	61,57							
31 <i>P. trifidum</i>																							
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>																			0,04				
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>											33,22				8,68	1,37	12,33						
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>															0,78	0,19						0,13	
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>																						0,73	
36 <i>P. glutinosum</i>																						1,25	
37 <i>P. 'Royal oak'</i>																						0,27	
38 <i>P. quercifolium</i>																						8,26	
39 <i>P. 'Radula'</i>											31,38	0,44			10,58	2,01	11,49						
40 <i>P. 'Karrooense knuth'</i>						0,05					0,4		1,25			0,05							
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>											25,05	0,67			20,34	2,63	11,13						
42 <i>P. 'Crispy'</i>											10,11	0,24			42,27	1,55							
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>			0,09			0,62																	
44 <i>P. 'Angulosum'</i>																							
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>											32,96				5,25	2,47	11,07						
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>					0,13	0,12							0,29									0,33	
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>				4,99											0,1							0,36	
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>												19,63		0,65		39,18							
49 <i>P. cucullatum</i>				6,84													1,23						
50 <i>P. extipulatum</i>																							0,31
51 <i>P. 'Fragrance Lilian Pott.'</i>																							
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>																							
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>						0,29																	
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>						0,19																	
55 <i>P. hispidum</i>						0,39					10,44		0,41										
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>		0,09									0,23	18,63			4,43	57,26							
57 <i>P. mutant</i>				1,71			3,22		6,83	1,5													
58 <i>P. papilionaceum</i>											3,36												
59 <i>P. myrtifolium</i>																							
60 <i>P. praemorsum</i>																							0,23
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>											29,65	0,57			3,88	1,02	14,48						
62 <i>P. scabroides</i>											3,41												
63 <i>P. 'Lilac'</i>																						0,1	
64 <i>P. grossularoides</i>																							

- Annexes -

	1-terpinéol	trans-oxyde de rose	allocimène	butyl tiglate	citronellal	menthone	isopulégol	isopinocampphon	isomenthone	bornéol	pinocampphon	isocitral	néomenthol	4-terpinéol	hexyl butyrate	hexyl isobutyrate	trans-2-hexenyl butyrate	cryptone	menthol	methyl salicylate	α-terpinéol	méthyle chavicol
1 <i>P. capitatum</i>		0,22			0,11									0,13				0,16				
2 <i>P. radens</i>			0,36			1,69			81,78				0,24						1,07			
3 <i>P. graveolens</i>					1,35				5,03										0,22			
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>					0,31	0,04			9,77													
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>		0,06	0,08		0,93	0,04			7,79											0,22		
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>		0,16			0,62	0,30			7,25											0,25		
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>		0,17			0,26	0,21			8,48											0,19		
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>		0,22			8,00	0,33			35,57											0,45		
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>		0,08	0,21		7,60	0,37			36,13											0,41		
10 <i>P. tomentosum</i>			0,50			26,40			56,94				0,24									
11 <i>P. 'Pepper'</i>						0,18			0,54				0,50									
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>			0,10																			0,18
13 <i>P. 'Clorinda'</i>																			1,79		0,30	
14 <i>P. 'Fragrance'</i>						0,42				0,47				1,34								1,22
15 <i>P. citronnelum</i>												0,51										
16 <i>P. denticulatum</i>			1,05			0,97			71,68											0,33		
17 <i>P. otaviens</i>			3,51						0,89													
18 <i>P. crispum minor</i>																						
19 <i>P. vitifolium</i>			0,60		4,02		0,44															
20 <i>P. 'Toronto'</i>			1,95											0,14								
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>															0,90							
22 <i>P. odoratissimum</i>																				0,06		0,50
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>			0,46																	0,76		0,82
24 <i>P. 'Charity'</i>	0,29		0,48		2,35		0,48															
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>																						
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>			1,09																			
27 <i>P. 'Lavender'</i>													2,42									
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>													0,4									
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>		0,29			0,76				4,84											0,87		
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>														0,49								
31 <i>P. trifidum</i>			0,59					0,28			13,72			0,34								
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>																				0,05		0,21
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>		0,34			0,78				7,43											0,27		
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>																						
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>			0,74												3,33		0,39					
36 <i>P. glutinosum</i>														0,14	11,84		11,12					
37 <i>P. 'Royal oak'</i>			0,25												12,03		6,63					0,17
38 <i>P. quercifolium</i>			2,42														4,64	1				
39 <i>P. 'Radula'</i>			0,08		0,78				6,72											0,12		
40 <i>P. 'Ka rooense knuth'</i>			1,34			0,29			57,86											0,07		0,29
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>		0,06	0,09		0,36				7,65											0,1		
42 <i>P. 'Crispy'</i>					0,21	0,1			12,52											0,33		
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>										0,36				1,59								0,16
44 <i>P. 'Angulosum'</i>																						
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>					1,19				6,44											0,21		
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>			0,1			29,02			21,36						1,75		1,61	0,06				
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>															1,83							
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>																						
49 <i>P. cucullatum</i>																	0,59					
50 <i>P. extipulatum</i>										0,18												
51 <i>P. 'Fragrance Lillian Pott.'</i>																						0,52
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>									0,05											0,11		1,57
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>									0,14	0,4				0,65								1,27
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>			0,12						0,96	0,33				0,85								0,97
55 <i>P. hispidum</i>			0,32		1,72	0,5			18,28											0,84		0,74
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>														0,32								
57 <i>P. mutant</i>														0,34								
58 <i>P. papillonaceum</i>					5,26		0,88															
59 <i>P. myrtifolium</i>																						
60 <i>P. praemorsum</i>														0,5								0,38
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>		0,18			1,22				6,49											0,19		
62 <i>P. scabroides</i>																						
63 <i>P. 'Lilac'</i>																					0,18	0,34
64 <i>P. grossularoides</i>					0,73																	

- Annexes -

	géranyl formate	carvacrol	thymol	indole	méthyle géraniate	bicycloélémente	δ-élémente	α-cubébène	citronellyl acétate	néryl acétate	phényléthyl propionate	eugénol	2-undécenal	acide propanoïque	α-ylangène	3-phénylpropyl acétate	α-copaène	géranyl acétate	β-bourboène	β-ylangène	β-élémente	octyl butyrate	
1 <i>P. capitatum</i>	0,26						0,12		0,65								1,43			0,57	1,45		
2 <i>P. radens</i>																							
3 <i>P. graveolens</i>						0,92			0,47								0,61		0,21	0,16	0,86		
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>	8,07						0,09	0,09	0,37								0,22	0,42	0,08	0,09	0,52		
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>	1,50				0,06		0,07	0,09	0,37								0,28	0,07	0,21	0,10	0,60		
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>	4,66							0,13	0,27				0,19				0,44	0,45	0,38	0,14	0,37		
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>	4,83										0,26						0,40	0,46	0,57		0,27		
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>									0,08								0,15						
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>									0,15								0,17						
10 <i>P. tomentosum</i>																							
11 <i>P. 'Pepper'</i>			0,13																				
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>	0,13					3,67											0,27	25,92					
13 <i>P. 'Clorinda'</i>							0,50										0,20				4,86		
14 <i>P. 'Fragrance'</i>						2,75	1,89				0,13						1,23		0,14		0,49		
15 <i>P. citrionnelum</i>						0,91		0,05									0,21			0,07	0,04		
16 <i>P. denticulatum</i>																	0,19						
17 <i>P. otaviens</i>																							
18 <i>P. crispum minor</i>	1,65						0,29										0,30						
19 <i>P. vitifolium</i>																							
20 <i>P. 'Toronto'</i>						1,04										1,52	1,19				4,93		
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>						5,79											0,84	1,76			2,89		
22 <i>P. odoratissimum</i>			0,05			1,52	1,51					0,47									0,26		
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>						1,51											0,15				0,48		
24 <i>P. 'Charity'</i>																	0,11		0,71		0,7		
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>						3,37	0,65			3,35							0,91	4,64	1,27		0,7		
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>						1,05											0,52				4,95		
27 <i>P. 'Lavender'</i>						11,23																	
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>						1,51		0,15				0,05			0,09		0,48		0,12	0,16	0,08		
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>	0,88				0,34	0,26			0,29								0,33		0,42		0,37		
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>		0,08	0,13				0,05														0,03		
31 <i>P. trifidum</i>						2,64															0,23		
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>				0,06		2,04						0,29					0,32				0,52		
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>	2,16				0,09			0,08	0,35							0,32	0,12	0,76	0,12	0,49			
34 <i>P. 'Aurora unique'</i>						6,07				0,45						0,54	3,34		0,12	3,65		1	
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>						1,35															1,29		
36 <i>P. glutinosum</i>						4,9	0,27	0,2													0,56		
37 <i>P. 'Royal oak'</i>						1,17																	
38 <i>P. quercifolium</i>						2,22																	
39 <i>P. 'Radula'</i>	2,43				0,04	0,23	0,07		0,33							0,37	0,14		0,07	0,65			
40 <i>P. 'Karooense knuth'</i>						0,06										0,28				0,35			
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>	3,49					0,22	0,11	0,09	0,17							0,33	0,13		0,11	0,7			
42 <i>P. 'Crispy'</i>	0,05					0,33	0,06									0,38	0,26			0,4			
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>						3,6						0,1				0,67				0,12			
44 <i>P. 'Angulosum'</i>																		0,23					
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>	1,3					0,79		0,19	0,36							0,61			0,22	0,88			
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>						0,72										0,04				0,12			
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>						1,61	0,42									0,15				4,42			
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>																							
49 <i>P. cucullatum</i>														6,27			1,55				0,28		
50 <i>P. extipulatum</i>								0,22															
51 <i>P. 'Fragrance Lilian Pott.'</i>						1,68	0,63				0,39					0,3		0,09		0,18			
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>						1,32	0,52									0,26			0,04	0,15			
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>						2,37	1,13									1,12		0,37		0,36			
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>						2,28	1,22									1,13		0,23		0,39			
55 <i>P. hispidum</i>							0,29														0,72		
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>			0,16			0,14														0,07			
57 <i>P. mutant</i>																	0,46						
58 <i>P. papilionaceum</i>																							
59 <i>P. myrrifolium</i>																							
60 <i>P. praemorsum</i>						3,7										0,39							
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>	2,25				0,13			0,12	0,49							0,47	0,14	0,82	0,15	0,82			
62 <i>P. scabroides</i>									18,97							0,13	0,82						
63 <i>P. 'Lilac'</i>						1,66	1,15					0,13				0,24				0,43			
64 <i>P. grossularoides</i>						0,56										1,07							

- Annexes -

	cis-jasmone	β-phényléthyl isobutyrate	acide citronellique	α-gurjunène	méthyle eugénol	α-cedréne	β-caryophyllène	β-cedréne	α-linalène	β-cubénone	α-guaiène	α-élémane	trans-α-bergamotène	1(5), 1,1-guaiadiène	6,9-guaiadiène	cinamyl acétate	aromadendréne	citronellyl propionate	trans-β-farnésène	α-caryophyllène	trans-β-caryophyllène	α-humulène
1 <i>P. capitatum</i>				0,25			2,50				2,19				18,53							0,43
2 <i>P. radens</i>																						
3 <i>P. graveolens</i>							4,39							1,20	13,20						0,80	
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>		0,10					1,45							0,72	7,04		0,82				0,32	
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>		0,06					0,81							0,57	7,21		0,76				0,26	
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>		0,07					0,96								0,24		0,53				0,29	
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>							0,99								0,52							
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>							0,24											0,37				
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>							0,26										0,12	0,53				
10 <i>P. tomentosum</i>							0,16															
11 <i>P. 'Pepper'</i>							3,02														0,60	
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>							5,23														3,24	
13 <i>P. 'Clorinda'</i>				0,14			4,43							0,29	3,25					0,95	0,93	
14 <i>P. 'Fragrance'</i>					18,65		6,38					2,66					0,06				0,64	
15 <i>P. citronnelum</i>				0,04	0,04	0,18		0,34									0,19		0,08			
16 <i>P. denticulatum</i>		0,35																				
17 <i>P. otaviens</i>												3,93										
18 <i>P. crispum minor</i>																	0,96					
19 <i>P. vitifolium</i>			56,07														0,41					
20 <i>P. 'Toronto'</i>				0,09			13,91												4,51	3,01		
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>				0,23	1,20		13,95	0,26											0,48	1,55		
22 <i>P. odoratissimum</i>					88,48							1,80										0,34
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>		0,13			0,13		1,19						0,06		0,16		0,13				0,16	
24 <i>P. 'Charity'</i>							1,35															
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>				0,47			6,6							0,83	11,89						1,43	
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>							5,2		0,2					0,29	2,93						0,55	
27 <i>P. 'Lavender'</i>					0,6		1,22										1,14					
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>				0,1	0,17	0,28		0,51		0,5							0,35					
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>							0,8							0,28	4,71		0,26					
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>								0,05							0,42							
31 <i>P. trifidum</i>							2,8														0,2	
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>		0,03			72,88		2,98					2,3									0,3	
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>		0,11					0,82							0,52	6,38						0,24	
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>				0,21			12,28	0,22					0,53								1,38	
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>				0,21	0,46		0,97								2,07		1,4				0,38	
36 <i>P. glutinosum</i>				0,17			2,94															
37 <i>P. 'Royal oak'</i>							0,74								0,7							
38 <i>P. quercifolium</i>															0,43		0,31					
39 <i>P. 'Radula'</i>		0,12		0,06			1,09							0,64	8,17						0,24	
40 <i>P. 'Karrooense knuth'</i>							0,46							0,47	6,28						0,09	
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>		0,09					1,39							0,6	6,78		0,78				0,3	
42 <i>P. 'Crispy'</i>							0,55							0,57	6,11		0,5				0,13	
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>		0,09			0,29		19,16						0,36				0,11				10,84	
44 <i>P. 'Angulosum'</i>															0,53							
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>					0,07		3,75							1,11	10,22						0,76	
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>		0,39			0,09		2,53														0,38	
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>					0,1		3,67							0,24					0,92		0,66	
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>																						
49 <i>P. cucullatum</i>		1,86					0,41							0,51	6,48						0,72	
50 <i>P. extipulatum</i>							6,29														0,35	
51 <i>P. 'Fragrance Lilian Pott.'</i>					77,05		3,92				0,83										0,36	
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>					76,31		6,74				0,68	0,04									0,63	
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>					22,47		6,73				1,78	0,25									0,64	
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>					16,14		4,99				1,88	0,39									0,49	
55 <i>P. hispidum</i>					0,1		7,08							2,13	16,23		1,05				0,39	
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>															1,04							
57 <i>P. mutant</i>							8,9														1,28	
58 <i>P. papillonaceum</i>			73,94															0,34				
59 <i>P. myrtifolium</i>							5,37															
60 <i>P. praemorsum</i>																						
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>		0,13			0,09		1,24							0,83	9,54						0,36	
62 <i>P. scabroides</i>					0,23		9,69							1,18		4	1,4			1,25		
63 <i>P. 'Lilac'</i>		0,11			64		2,91					1,22		0,09			0,17				0,54	
64 <i>P. grossularoides</i>																						

- Annexes -

	allooramadrène	géranyl propionate	cedrène isomère	γ-curcumène	γ-murolène	germacrène D	γ-selinène	β-selinène	α-bergamotène	viridiflorène	bicyclogermacrène	α-murolène	α-bulnescène	β-cadinène	3E,6Z α-farnesène	3E,6E α-farnesène	β-bisabolène	géranyl isobutyrate	γ-bisabolène	γ-cadinène	δ-cadinène	7-épi-α-selinène
1 <i>P. capitatum</i>	0,63					11,93															3,26	
2 <i>P. radens</i>						0,95																
3 <i>P. graveolens</i>	0,19					5,52					1,75										0,65	0,56
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>	0,04	1,21				2,35		0,13									0,40			0,09	0,62	
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>	0,27	0,30				2,49				1,33							0,13				0,15	
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>	0,47	0,43				3,85				2,14							0,22				0,87	
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>	0,32					3,21				1,46	0,08									0,05	0,65	
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>	0,13					0,63																
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>						0,96					0,08											
10 <i>P. tomentosum</i>						0,12																
11 <i>P. 'Pepper'</i>						0,48																
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>										0,18	6,64	1,02							2,92	1,61	2,69	
13 <i>P. 'Clorinda'</i>	3,30					6,18					2,57				0,17				1,22		0,71	
14 <i>P. 'Fragrance'</i>	0,65					4,51	0,04				4,14					0,24			0,70		2,19	
15 <i>P. citronnelum</i>	0,17					2,68					1,72										0,30	
16 <i>P. denticulatum</i>						1,51																0,28
17 <i>P. otaviens</i>																						
18 <i>P. crispum minor</i>						7,49	5,04														0,26	0,79
19 <i>P. vitifolium</i>						1,60		0,10			0,24									0,15	1,00	
20 <i>P. 'Toronto'</i>					1,22	4,02				1,74	2,34	1,67								2,63	8,12	
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>	6,95		3,46	0,21		0,38				0,44	10,22	0,68				0,44				1,33	2,30	
22 <i>P. odoratissimum</i>						0,06					2,45											0,09
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>	0,22					1,14	0,17				3,35		0,54				0,11			0,16		
24 <i>P. 'Charity'</i>						1,49					0,3									0,62	1,23	
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>	0,78					15,63	0,55				6,71	0,64								0,34	0,6	
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>	4,82		1,55			0,82				0,18	2,42	0,66								1,57		
27 <i>P. 'Lavender'</i>										0,3	19,46									0,91	1,46	
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>					0,6	3,95				0,09	2,91	0,26		0,09						0,32	0,76	
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>	0,18					2,81				0,78	0,22									0,55		
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>						0,62	0,03				0,04						0,04					
31 <i>P. trifidum</i>	0,2										4,63									0,3		
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>	0,18					0,06					3,15	0,52								0,1	1,6	
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>	0,21	0,63				2,52				1,17								0,2			0,15	
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>	6,67		3,24	0,22		0,31				0,46	10,86	0,58			0,07		0,57			0,16	2,12	
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>	1,46					0,35				8,48	2,34									0,83		
36 <i>P. glutinosum</i>	7,15					2,08	0,61				8,79									0,87	0,3	
37 <i>P. 'Royal oak'</i>	1,49										1,38									0,06	0,25	
38 <i>P. quercifolium</i>	4,21					0,32					3,43									0,16		
39 <i>P. 'Radula'</i>	0,27	0,8				4,44				0,46	0,2							0,33		0,1	0,11	
40 <i>P. 'Karrooense knuth'</i>	0,1					1,74	0,16													0,34	0,6	
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>	0,19					3,34				1,11	0,45									0,14		
42 <i>P. 'Crispy'</i>	0,13	1,34				2,33	0,14				0,57								0,44	0,22	0,34	
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>	1,15					3,84					7,09					1,49	0,21					
44 <i>P. 'Angulosum'</i>						1,58															0,79	1,09
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>	0,18					4,42	0,29				1,42						0,09			0,41	0,56	
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>	0,1					0,88																
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>	2,67					5,29					2,55				0,32				1,03	0,14	0,46	
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>																						
49 <i>P. cucullatum</i>									1,64			1,8								3,19	8,22	
50 <i>P. extipulatum</i>																					1,49	
51 <i>P. 'Fragrance Lilian Pott'</i>	0,3					1					3,12						0,17		0,47		0,78	
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>	0,24					1,01					2,43						0,32		1,11			
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>	0,78					3,25					4,27						0,29		0,2		2,12	
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>	0,77					3,61					4,19						0,19		0,12	0,09	2,11	
55 <i>P. hispidum</i>							0,71															0,6
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>						1,59	0,12				0,33											
57 <i>P. mutant</i>						1,73																
58 <i>P. papillonaceum</i>						0,92																
59 <i>P. myrrifolium</i>																	0,26					
60 <i>P. praemorsum</i>	0,25					6,56					7,14											
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>	0,38	0,61				3,47				2,24	0,16							0,24			0,13	
62 <i>P. scabroides</i>	0,4			0,25						0,86	8,74						0,24		1,42	0,38	0,67	
63 <i>P. 'Lilac'</i>						0,08					3	0,21					0,49					1,2
64 <i>P. grossularoides</i>						2,07																

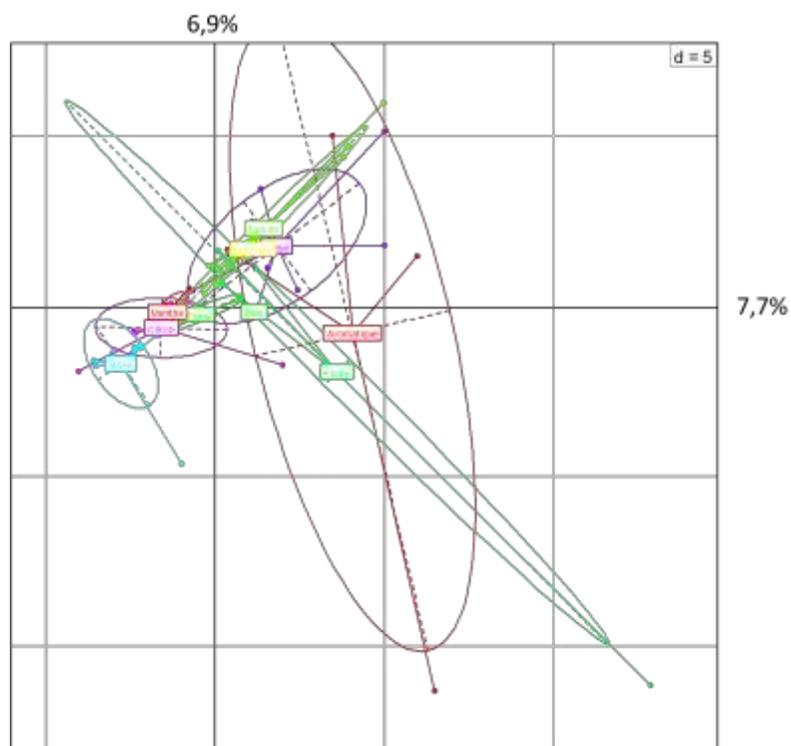
- Annexes -

	:10-épi zonarène	calamène	citronellyl butyrate	trans-γ-bisabolène	germacrène B	inéryl butyrate	naphthalène	α-cadinène	trans-α-bisabolène	β-élémol	igéranyl butyrate	inérolidol	γ-asarone	spathuléol	furupelargone	caryophyllène oxyde	viridiflorol	phényl éthyl tiglate	ledol	allofamesène	igéranyl isovalérate	cyclopropen-azulen-4-ol
1 <i>P. capitatum</i>		0,80					0,16								3,27							
2 <i>P. radens</i>												1,67							2,01			
3 <i>P. graveolens</i>																						
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>			0,37			0,21					0,92				0,11							
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>		0,12	0,59								0,18				0,37				1,68		0,17	
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>			0,17							0,23									1,34		0,20	
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>	0,12										0,50											
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>																						
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>			0,11																1,16			
10 <i>P. tomentosum</i>				0,09															1,32			
11 <i>P. 'Pepper'</i>																5,51						
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>				0,52																		
13 <i>P. 'Clorinda'</i>									0,19					0,84								
14 <i>P. 'Fragrance'</i>														1,05		0,17						
15 <i>P. citronnelum</i>										0,05	1,09			0,06								
16 <i>P. denticulatum</i>											0,65								2,59			
17 <i>P. otaviens</i>																						
18 <i>P. crispum minor</i>																						0,37
19 <i>P. vitifolium</i>																						
20 <i>P. 'Toronto'</i>																						
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>						0,77					2,11	12,17		3,28		2,76						
22 <i>P. odoratissimum</i>					0,19									0,08		0,09						
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>									0,20					0,70		0,73			3,42			
24 <i>P. 'Charity'</i>																						
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>														2,64		0,95			0,78			
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>										7,58				2,87		4,52						
27 <i>P. 'Lavender'</i>													14,69	0,9								
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>	0,05					0,12	0,1				0,07	1,55		0,22								
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>															1,07				0,91			
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>											0,04	3,44										
31 <i>P. trifidum</i>															0,34							
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>					0,27																	
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>		0,12	0,96								0,6				0,94				1,56		0,24	
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>						0,86				0,61	1,87	12,76					1,86					1,09
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>												6,59		4,22								
36 <i>P. glutinosum</i>										0,29		9,71										
37 <i>P. 'Royal oak'</i>										3,09				3,18								
38 <i>P. quercifolium</i>										7,82		0,86		3,25								
39 <i>P. 'Radula'</i>		0,07	0,82								0,56				0,12				1,31			
40 <i>P. 'Karrooense knuth'</i>										0,07					0,22							
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>										0,01					0,45					1,2		
42 <i>P. 'Crispy'</i>			0,1							0,13	0,65	0,17							1,42		0,18	
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>												0,32		1,57		1,33						
44 <i>P. 'Angulosum'</i>																						
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>		0,26				0,09					0,07				0,42	0,22			0,11			
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>														0,28		0,45			0,12			
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>									0,17					0,72		0,42				0,11		
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>																						
49 <i>P. cucullatum</i>			1,86							1,75											0,41	
50 <i>P. extipulatum</i>																	2,69					
51 <i>P. 'Fragrance Lillian Pott.'</i>														0,49		0,19						
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>																						
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>														1,63		0,7						
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>														2,08		0,48						
55 <i>P. hispidum</i>			5,05								0,6	1,95			0,48	0,2						
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>											0,07	7,51		0,05								
57 <i>P. mutant</i>																	1					
58 <i>P. papillonaceum</i>			5,08																			
59 <i>P. myrtifolium</i>																						
60 <i>P. praemorsum</i>														0,38								
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>		0,15	1,32								0,72				0,76	0,32			1,63		0,25	
62 <i>P. scabroides</i>			0,43						0,34					0,74		1,11						
63 <i>P. 'Lilac'</i>																0,13			0,15			
64 <i>P. grossularoides</i>																						

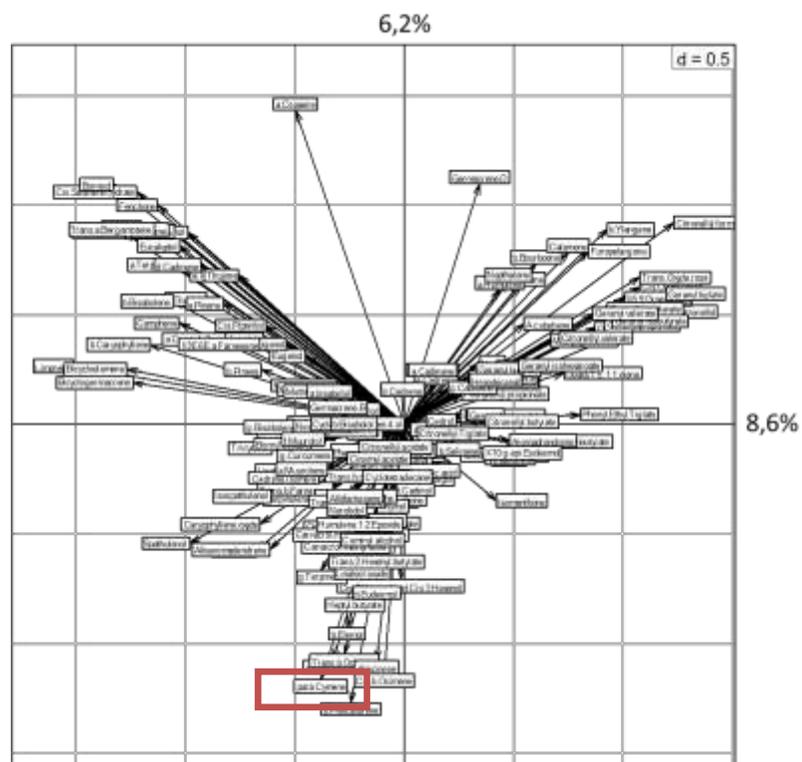
- Annexes -

	humulène 1,2 époxyde	cédrol	hexadécane	10-γ-épi eudesmol	citronellyl valérate	isopathuléol	τ-cadinol	τ-muurool	citronellyl tiglate	géranyl valérate	β-eudesmol	pogortol	intermédiol	β-bisabolol	méthyle jasmonate	α-bisabolol	cyclotétradécane	géranyl tiglate	géranyl isohexanoate
1 <i>P. capitatum</i>																			
2 <i>P. radens</i>																			
3 <i>P. graveolens</i>																			
4 <i>P. cv. 'Bourbon'</i>										0,13								1,83	0,28
5 <i>P. cv. 'Chine'</i>									1,74	0,06								2,12	0,16
6 <i>P. cv. 'Egypte'</i>				6,39					0,84		0,40							3,52	
7 <i>P. cv. 'Grasse'</i>				6,24														1,70	
8 <i>P. cv. 'Toussaint'</i>																		0,19	
9 <i>P. 'Candy dancer'</i>					0,16				1,04									0,18	
10 <i>P. tomentosum</i>																			
11 <i>P. 'Pepper'</i>	0,36						0,42												
12 <i>P. 'Prince of Orange'</i>														0,29		0,38			
13 <i>P. 'Clorinda'</i>																			
14 <i>P. 'Fragrance'</i>																			
15 <i>P. citronnelum</i>		0,20																	
16 <i>P. denticulatum</i>																			
17 <i>P. otaviens</i>																			
18 <i>P. crispum minor</i>			0,43															2,99	
19 <i>P. vitifolium</i>				13,18															
20 <i>P. 'Toronto'</i>							13,03	1,44											
21 <i>P. 'Scarlet unique'</i>								0,51											
22 <i>P. odoratissimum</i>																			
23 <i>P. 'Blandfordianum'</i>				2,29								1,40					0,74		
24 <i>P. 'Charity'</i>				6,16															
25 <i>P. 'Crispum peach'</i>																			
26 <i>P. 'Concolor lace'</i>																			
27 <i>P. 'Lavender'</i>																			
28 <i>P. 'Mabel grey'</i>		0,29																	
29 <i>P. 'Lady plymouth'</i>								0,72										1,12	
30 <i>P. 'Lemon juicy'</i>																			
31 <i>P. trifidum</i>													0,15						
32 <i>P. 'Lady lilac'</i>																			
33 <i>P. 'Attar of rose'</i>					0,31				1,42	0,1								2,12	
34 <i>P. 'Aurore unique'</i>							4,81	0,52											
35 <i>P. 'Filicifolium'</i>																			
36 <i>P. glutinosum</i>				2,73															
37 <i>P. 'Royal oak'</i>											0,46								
38 <i>P. quercifolium</i>						0,41					1,51								
39 <i>P. 'Radula'</i>									0,96									2,26	
40 <i>P. 'Karooense knuth'</i>				2,09															
41 <i>P. 'Velvet rose'</i>									0,6									2,2	
42 <i>P. 'Crispy'</i>				4,06			0,4											3,56	
43 <i>P. 'Abrotanifolium'</i>						0,2													
44 <i>P. 'Angulosum'</i>		0,83																	
45 <i>P. 'Capit. attar of rose'</i>																		0,08	
46 <i>P. 'Toment. chocolat'</i>																			
47 <i>P. 'Clorinda variegated'</i>																			
48 <i>P. 'Crispum variegated'</i>																		0,61	
49 <i>P. cucullatum</i>																			
50 <i>P. extipulatum</i>																			
51 <i>P. 'Fragrance Lilian Pott.'</i>																			
52 <i>P. 'Fragrance old spice'</i>																			
53 <i>P. 'Fragrance variegated'</i>																			
54 <i>P. 'Fragrance white'</i>						0,1													
55 <i>P. hispidum</i>				1,88					0,35										
56 <i>P. 'Lemon fancy'</i>																			
57 <i>P. mutant</i>																			
58 <i>P. papillonaceum</i>																			
59 <i>P. myrtifolium</i>																			
60 <i>P. praemorsum</i>																			
61 <i>P. 'Robert lemon rose'</i>					0,37				1,68	0,1								1,87	
62 <i>P. scabroides</i>				0,55		0,21			18,73										
63 <i>P. 'Lilac'</i>													1,14		0,16	9,85			
64 <i>P. grossularoides</i>																			

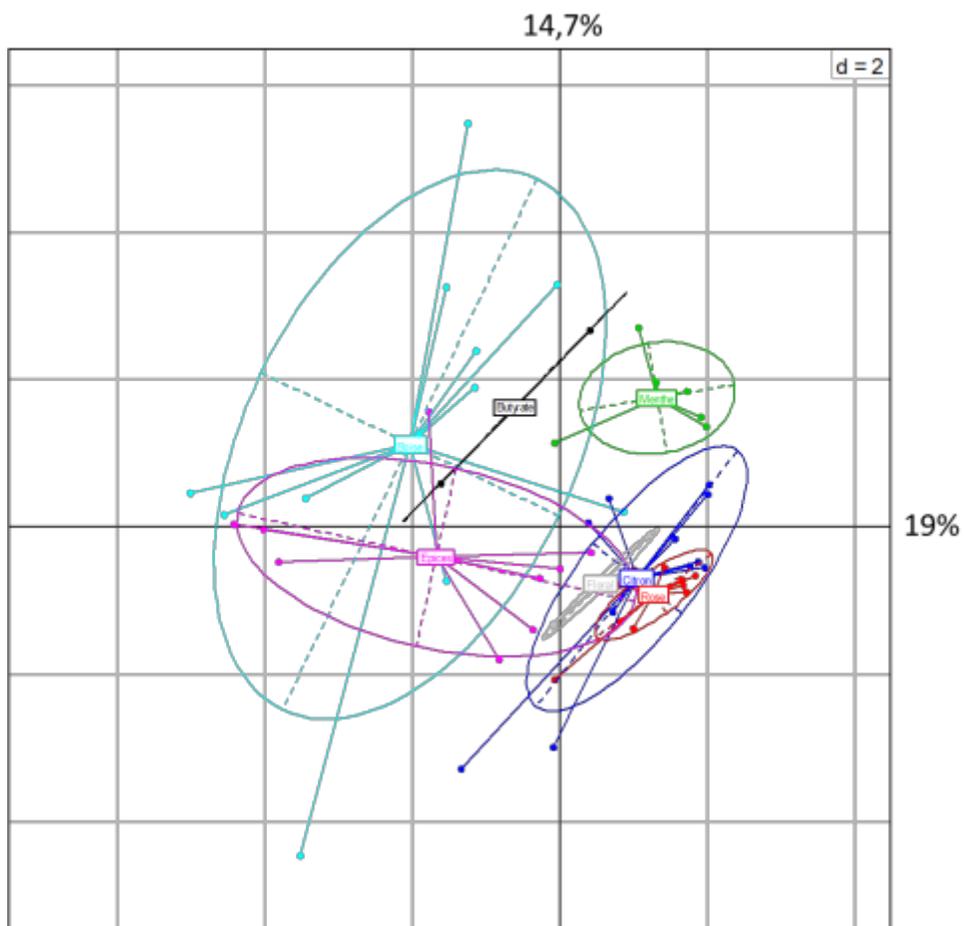
**Annexe 41 | ACP sur les 64 accessions de *Pelargonium* (1 individu par variété) pour les composés présent à une concentration > 1% dont l'aire a été rapportée au standard. L'axe des abscisses représente 7.7% de la variabilité et l'axe des ordonnées 6.9%.**



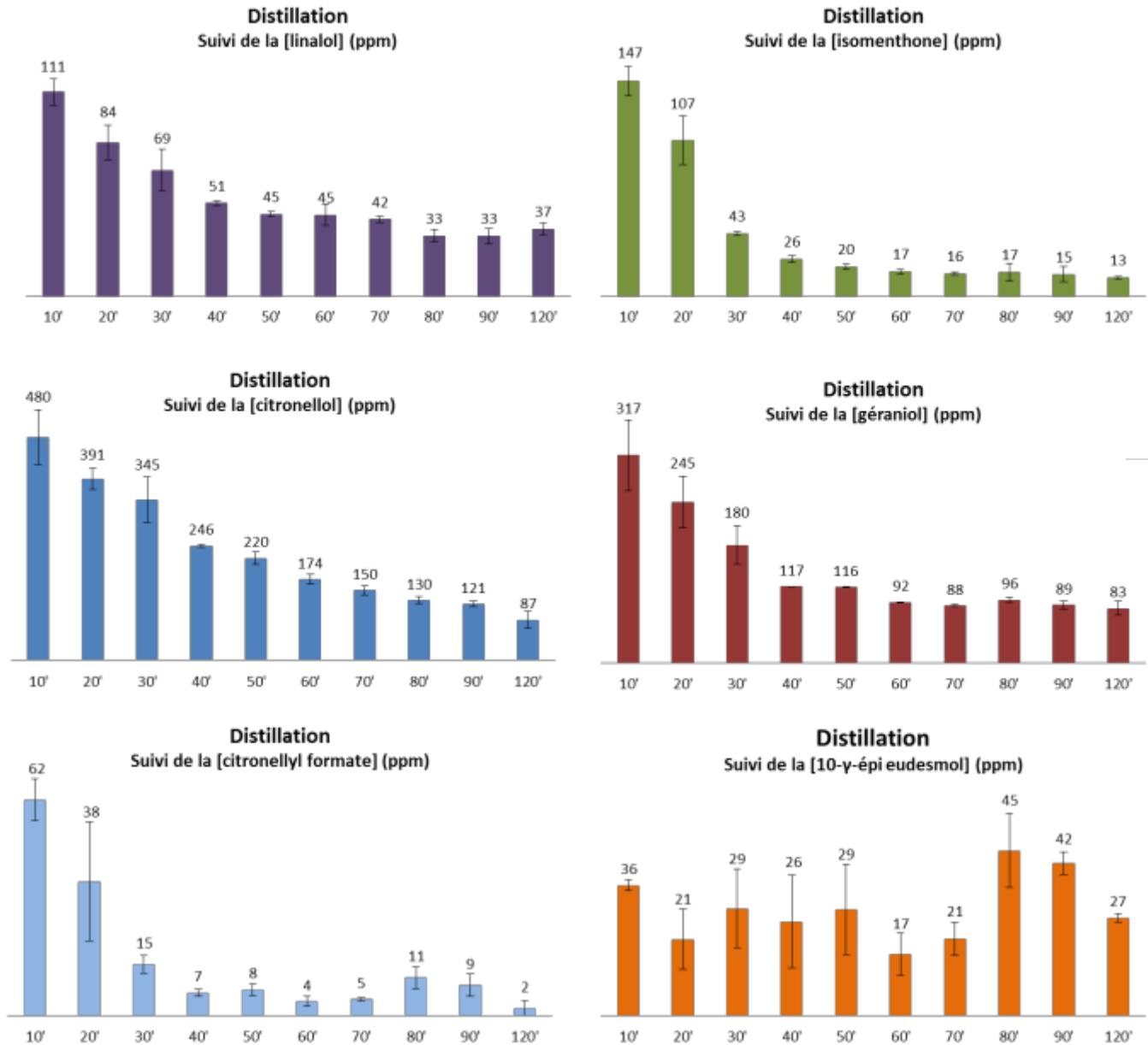
**Annexe 42 | Variables explicatives de l'ACP sur 56 accessions de *Pelargonium* pour tous les composés.**



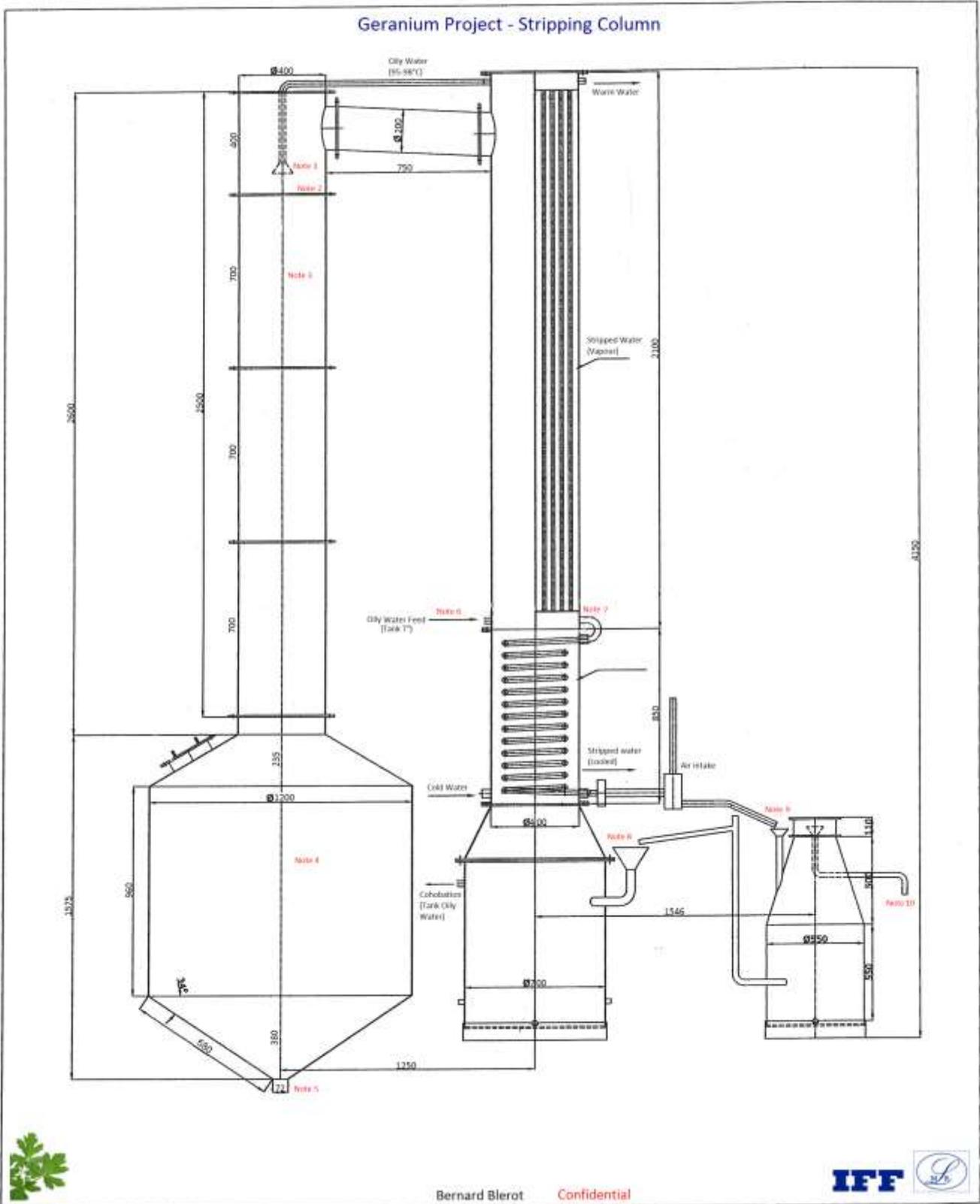
**Annexe 43 | ACP sur les 56 accessions de *Pelargonium* des compositions chimiques après regroupement des molécules en 17 groupes représentant les voies de biosynthèses communes. Les variétés classées fruité et aromatique ont été éliminées. 56 variétés avec 101 composés**



**Annexe 44 | Cinétique de distillation pour les six composés majoritaires de l'HE de *Pelargonium*.** Les concentrations sont exprimées en ppm ( $\mu\text{g}$  de composé. $\text{kg}^{-1}$  d'eau de distillation). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types ( $n = 9$ ).



Annexe 45 | Design industriel de l'appareil de stripping utilisé en Égypte dans le projet *Pelargonium*



| 400



Annexe 46 | Analyse de la qualité finale de l'HE de *Pelargonium* avec intégration de l'HE récupérée grâce à l'opération de stripping

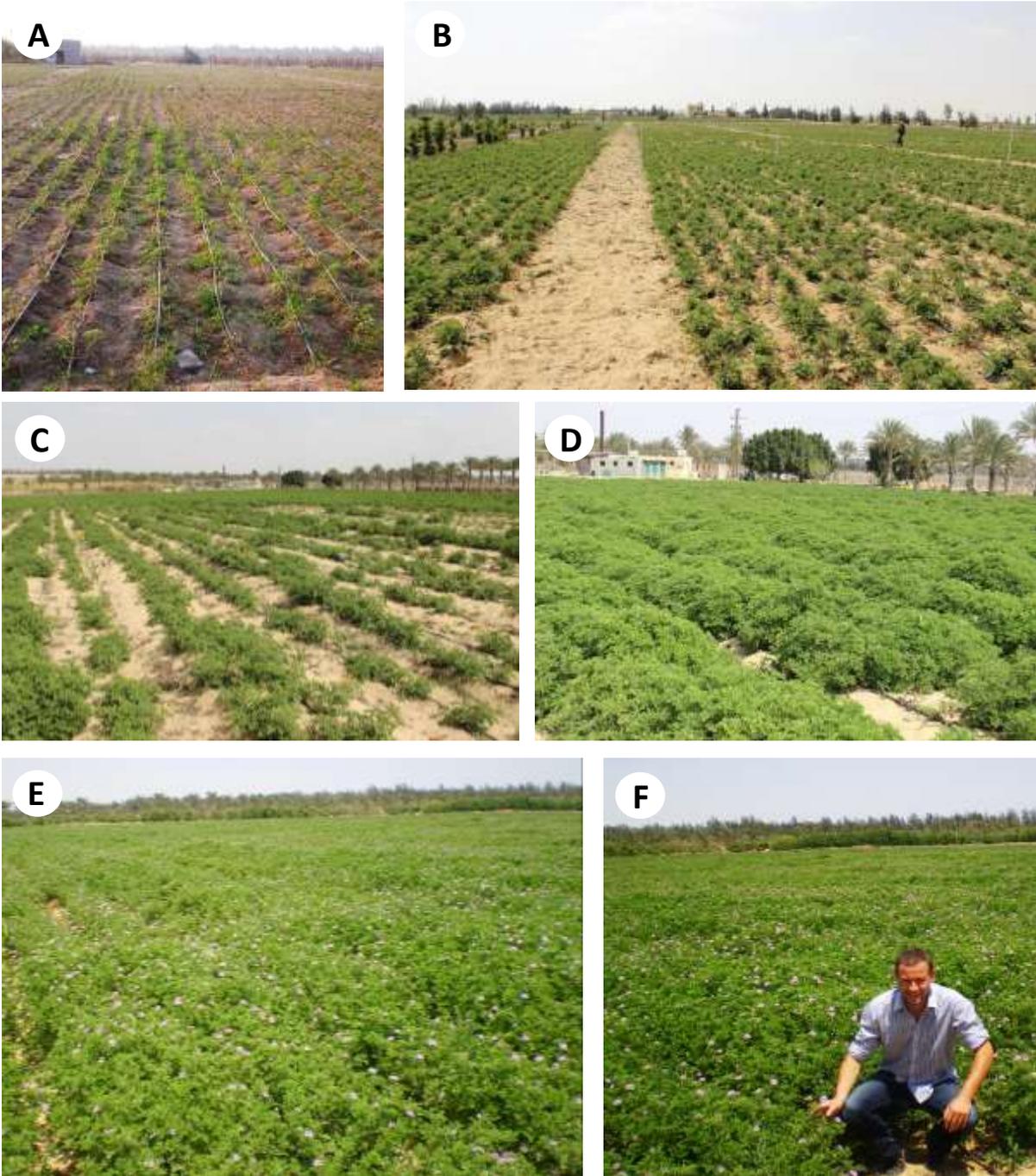
Composés	Spécifications HE <i>Pelargonium</i> IFF-LMR	HE <sub>conv</sub> Égypte	HE <sub>stripping</sub> Égypte	92% HE <sub>conv</sub> + 8% HE <sub>stripping</sub>
α-pinène		0,35		0,32
limonène	< 0,4%	0,14		0,13
cis-oxyde de rose	0,7-1,5%	0,81	0,45	0,78
trans-oxyde de rose	0,3-0,6%	0,32	0,13	0,30
menthone	<2,1%	0,80	0,51	0,78
isomenthone	4-8%	4,95	5,25	4,97
linalol	4-8%	4,73	17,45	5,75
β-caryophyllène		1,30		1,20
6,9-guaiadiène	<0,5%	0,34		0,31
citronellyl Formate	5-8%	7,32	0,11	6,74
géranyle Formate	2-6%	3,39		3,12
citronellol	26-34%	28,37	28,26	28,36
géraniol	11-18%	15,06	23,86	15,76
géranyl butyrate	0,7-2%	1,47		1,35
citronellyl tiglato		0,35		0,32
géranyl tiglato	0,9-2%	1,50		1,38
phényléthyl tiglato	0,5-1,2%	1,01		0,93
10-γ-épi eudesmol	4.5-6%	6,75	0,48	6,25

Annexe 47 | Plantation de *Pelargonium* en Égypte en octobre-novembre à Regwa



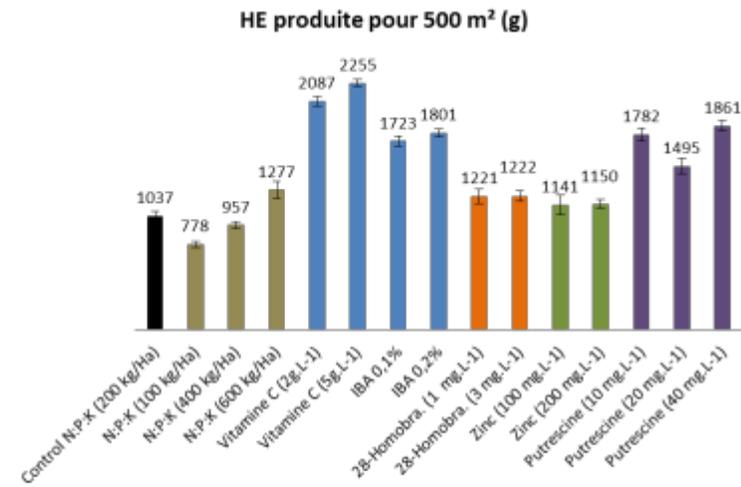
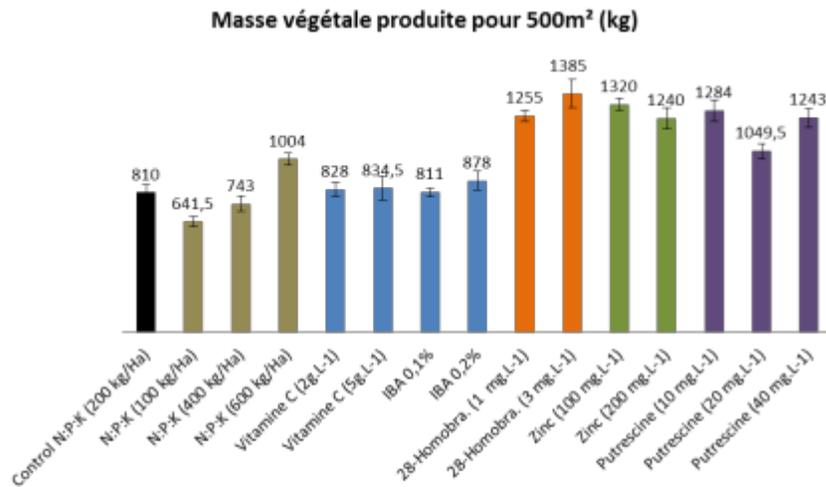
**A** – Essai d’installation d’un paillage mécanisé dans le but d’éviter les mauvaises herbes, de garder la chaleur et l’humidité pendant la nuit. **B** – Reprise d’une bouture de *Pelargonium* 3 semaines après sa plantation. **C** – Champ expérimental de *Pelargonium* avec un paillage en plastique noir. **D** – Forte mortalité des boutures sans traitement à l’AIB et à la vitamine C (< 60%). **E** – Préparation du terrain avec humidification pour la reprise les boutures. **F** – Plantation manuelle de nouvelles boutures (420 000 boutures par Ha). **G** – Très bonne reprise des boutures de *Pelargonium* suite au traitement (< 5% de mortalité).

Annexe 48 | Evolution d'une plantation de *Pelargonium* d'octobre (plantation) à juin-juillet (récolte)

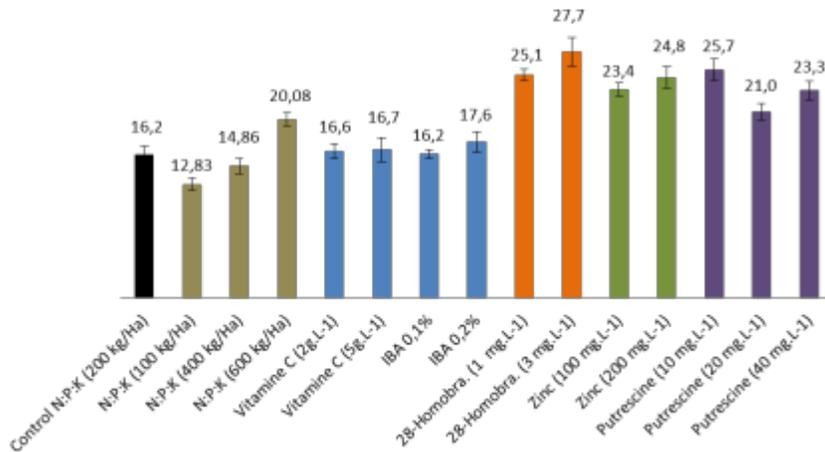


**A** – Reprise de la plantation au mois de novembre (15<sup>ème</sup> jour), il est impératif que les boutures soient enracinées avant la chute des températures nocturnes qui ont lieu en décembre sous peine d'une très faible croissance en mars. **B** – Peu de croissance jusqu'en fin février car les nuits sont très froides et ralentissent fortement la croissance du végétal (3<sup>ème</sup> mois). **C** – La reprise de la croissance s'amorce à partir du mois de mars (4<sup>ème</sup> mois). **D** – Forte croissance à partir du mois d'avril, l'apport en engrais doit augmenter à ce moment car la plante puise énormément dans le sol (5<sup>ème</sup> mois). **E** – Les premières fleurs apparaissent au mois de mai, cependant il est nécessaire d'attendre encore un peu l'augmentation de la quantité d'HE dans les feuilles (6<sup>ème</sup> mois). **F** – La plantation en pleine floraison et peut être récoltée. La parcelle ne sera plus irriguée pendant une semaine afin de provoquer un stress hydrique bénéfique à la production d'HE (7<sup>ème</sup> mois).

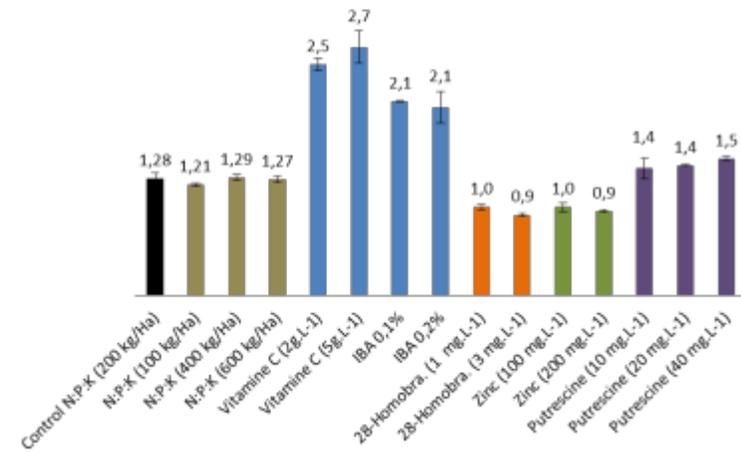
**Annexe 49 | Rendements en biomasse et en HE pour les 14 parcelles en champ en 2013.**



**Poids Frais.surf<sup>1</sup> (T.Ha<sup>-1</sup>)**

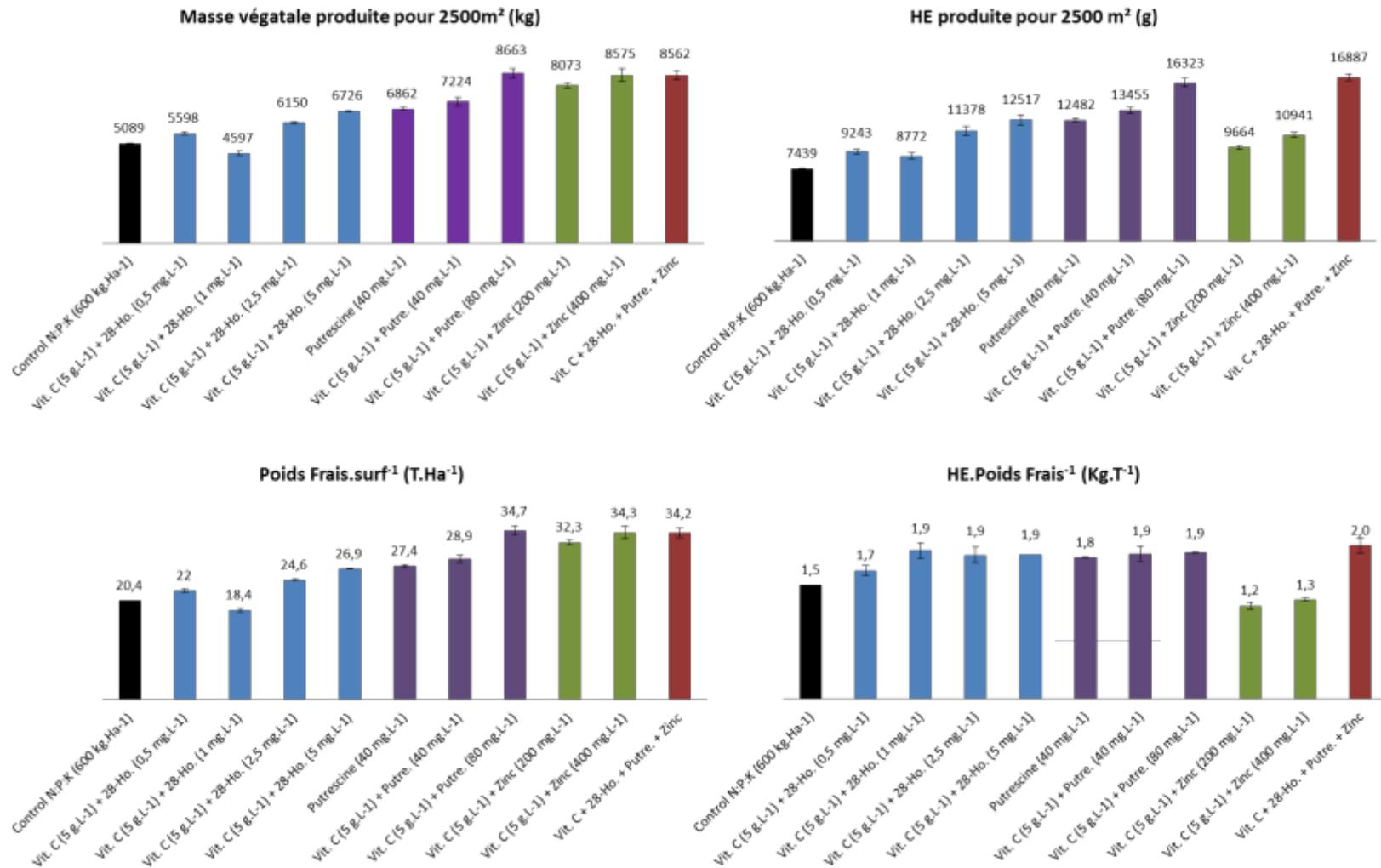


**HE.Poids Frais<sup>1</sup> (Kg.T<sup>-1</sup>)**



Les barres noires représentent les moyennes obtenues sur les parcelles de contrôle (n = 6) ; les barres brunes représentent les moyennes obtenues sur les parcelles de traitement avec les fertilisants (N:P:K) (3 traitements) (n = 2) ; les barres bleues représentent les moyennes obtenues sur les parcelles traitées avec des agents d'enracinement (vitamine C + IBA) (4 traitements) (n = 2) ; les barres oranges représentent les moyennes obtenues sur les parcelles traitées avec une phytohormone (28-homobrassinolide) (2 traitements) (n = 2) ; les barres vertes représentent les moyennes obtenues sur les parcelles traitées avec un micronutriment (zinc) (2 traitements) (n = 2) ; les barres mauves représentent les moyennes obtenues sur les parcelles traitées avec une phytohormone (putrescine) (3 traitements) (n = 2). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.

Annexe 50 | Rendements en biomasse et en HE pour 110 parcelles en champ en 2014.



Les barres noires représentent les moyennes obtenues sur les parcelles de contrôle (n = 3) ; les barres bleues représentent les moyennes obtenues sur les parcelles traitées avec un agent d'enracinement (vitamine C) et une phytohormone (28-homobrassinolide) (4 traitements) (n = 2) ; les barres mauves représentent les moyennes obtenues sur les parcelles traitées avec un agent d'enracinement (vitamine C) et une phytohormone (putrescine) (3 traitements) (n = 2) ; les barres vertes représentent les moyennes obtenues sur les parcelles traitées avec un agent d'enracinement (vitamine C) et un micronutriment (zinc) (2 traitements) (n = 2) ; les barres rouges représentent les moyennes obtenues sur des parcelles traitées avec l'ensemble des traitements (n = 2). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.

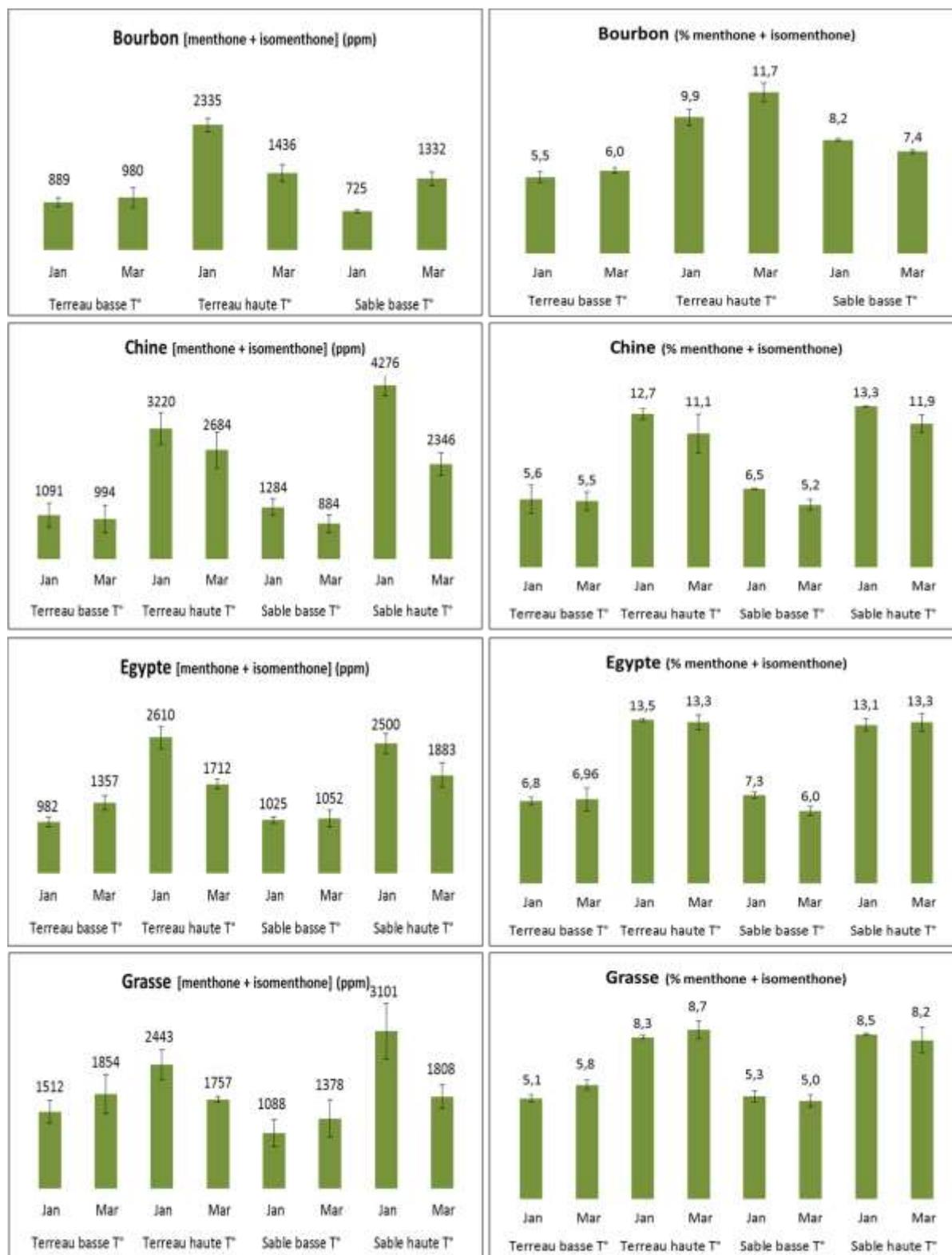
Annexe 51 | Récolte du *Pelargonium* en juin-juillet à Regwa



**Annexe 52 | Composition de l'HE du *Pelargonium* cv. 'rosat Bourbon et Chine', cultivés en Égypte durant 1 an, analysée par GC-FID (% de l'aire des pics)**

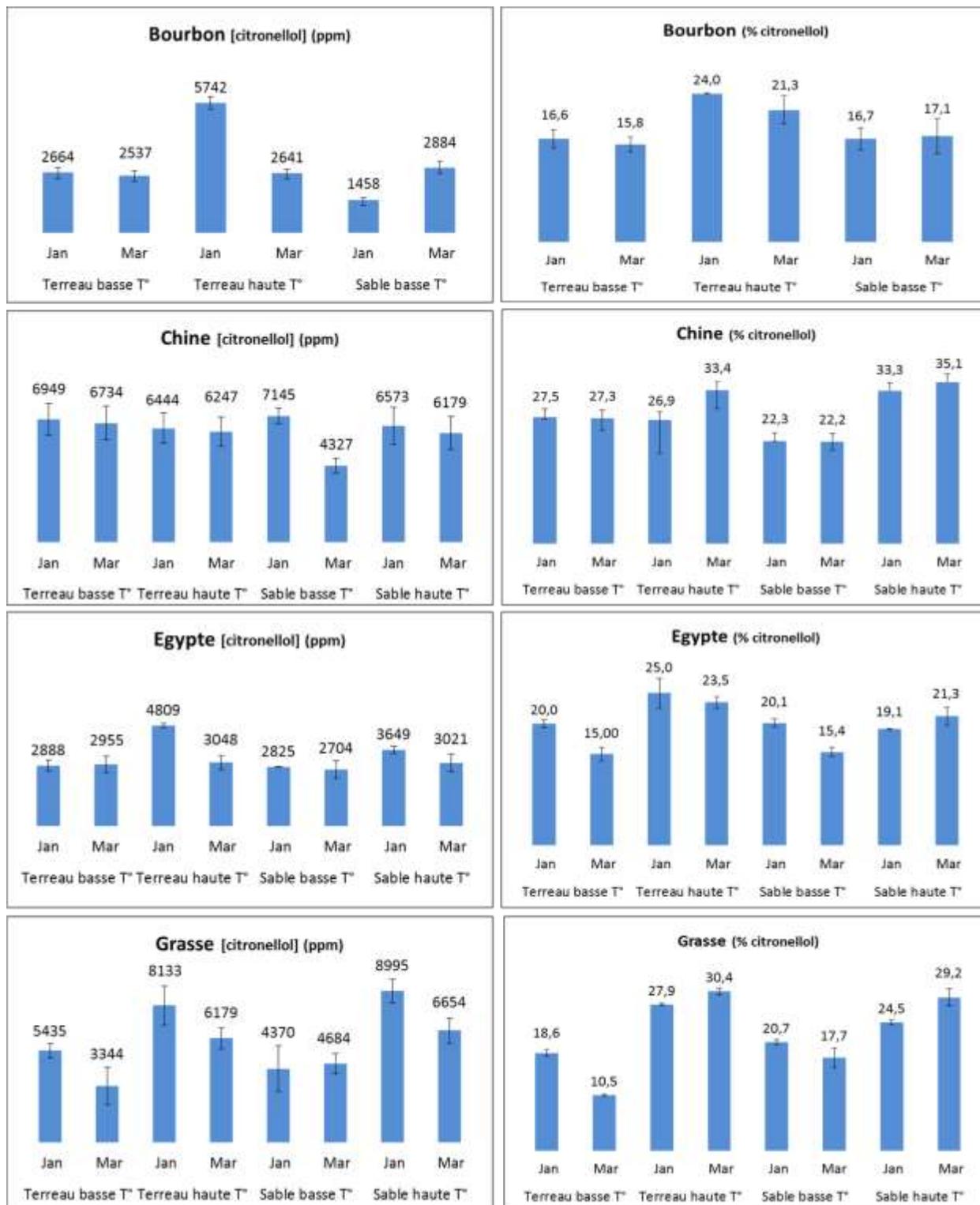
Composés	Specs IFF-LMR			HE <i>Pelargonium</i> cv. 'rosat'			Bourbon A	Bourbon B	Chine A	Chine B
	Égypte	Bourbon	Chine	Égypte	Bourbon	Chine	en Égypte	en Égypte	en Égypte	en Égypte
<i>α</i> -pinène				0,35	0,75	0,28	0,15	0,15	0,34	0,32
limonène	< 0,4%			0,14	0,25	0,09	0,06	0,05	0,16	0,11
<i>cis</i> -oxyde de rose	0,7-1,5%	0,4-0,9	1,3-2%	0,81	0,72	1,21	0,58	0,62	2	1,91
<i>trans</i> -oxyde de rose	0,3-0,6%	0,1-0,3	0,5-0,9%	0,32	0,27	0,48	0,23	0,23	0,83	0,69
menthone	<2,1%	0,3-2	<2,5%	0,8	0,54	1,79	0,16	0,29	0,18	0,24
isomenthone	4-8%	7-10	4-7%	4,95	8,02	3,88	6,57	7,28	7,09	7,89
menthone + isomenthone				5,75	8,56	5,67	6,73	7,57	7,27	8,13
linalol	4-8%	8-11	2-4,5%	4,73	2,3	2,30	3,84	4,03	2,15	2,43
$\beta$ -caryophyllène		1-2	0,7-2,5%	1,3	1,3	1,3	1,56	1,19	1,01	1,24
6,9-guaiadiène	<0,5%	5-7	5,6-7%	0,37	7,68	7,68	3,52	3,21	0,18	0,34
citronellyl formate	5-8%	7-10	8-12%	7,32	9,4	12,15	7,53	7,72	7,31	6,94
géranyl Formate	2-6%	5-7	1-3%	3,39	6,1	2,07	5,03	5,34	2,44	2,76
citronellol	26-34%	19-22	33-41%	28,37	18,22	34,66	24,39	24,28	33,73	32,11
géraniol	11-18%	15-18.5	6-10%	15,06	14,11	6,77	22,36	22,07	9,76	11,77
géranyl butyrate	0,7-2%	0,1-0,3	0,4-1,0%	1,47	1,49	0,83	1,51	1,05	0,52	0,59
citronellyl tiglate			0,5-1,5%	0,35	0,27	1	0,27	0,35	0,38	1,02
géranyl tiglate	0,9-2%	0,7-2	1,0-1,6%	1,5	1,65	1,65	1,44	1,23	1,72	1,98
phényléthyle tiglate	0,5-1,2%	0,4-1	0,4-1,0%	1,01	0,69	0,72	1	1,05	1,09	1,14
10- $\gamma$ -épi eudesmol	4.5-6%			6,75	ND	0,11	0,9	1,35	5,06	3,03

**Annexe 53 | Analyse par GC-FID du menthone et de l'isomenthone en concentration absolue [ppm] ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) et relative (%) dans les extraits des différents cultivars de *Pelargonium*.**



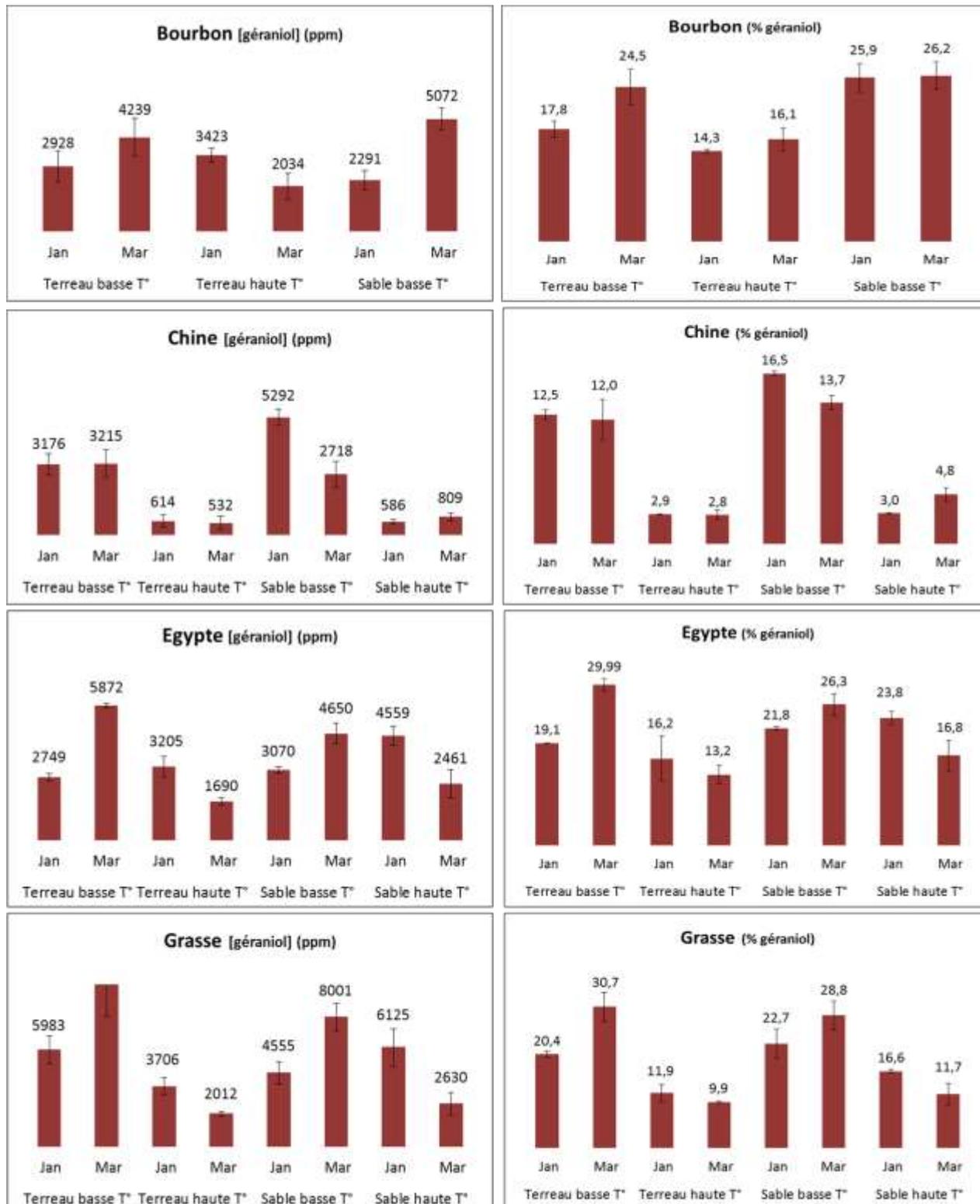
Les plants ont été cultivés en conditions de températures hautes (18 – 36°C) et d'humidité relative basse (24 – 38%) ou de températures basses (17 – 26°C) et d'humidité relative haute (52 – 60%) dans deux substrats différents (sable et terreau). Les analyses ont été réalisées après 2 mois (janvier) et 4 mois (mars) de culture sous atmosphère contrôlée. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 3).

**Annexe 54 | Analyse par GC-FID du citronellol en concentration absolue [ppm] ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et relative (%) dans les extraits des différents cultivars de *Pelargonium*.**



Les plants ont été cultivés en conditions de températures hautes (18 – 36°C) et d’humidité relative basse (24 – 38%) ou de températures basses (17 – 26°C) et d’humidité relative haute (52 – 60%) dans deux substrats différents (sable et terreau). Les analyses ont été réalisées après 2 mois (janvier) et 4 mois (mars) de culture sous atmosphère contrôlée. Les barres d’erreurs représentent les écarts-types (n = 3).

**Annexe 55 | Analyse par GC-FID du géraniol en concentration absolue [ppm] ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) et relative (%) dans les extraits des différents cultivars de *Pelargonium*.**



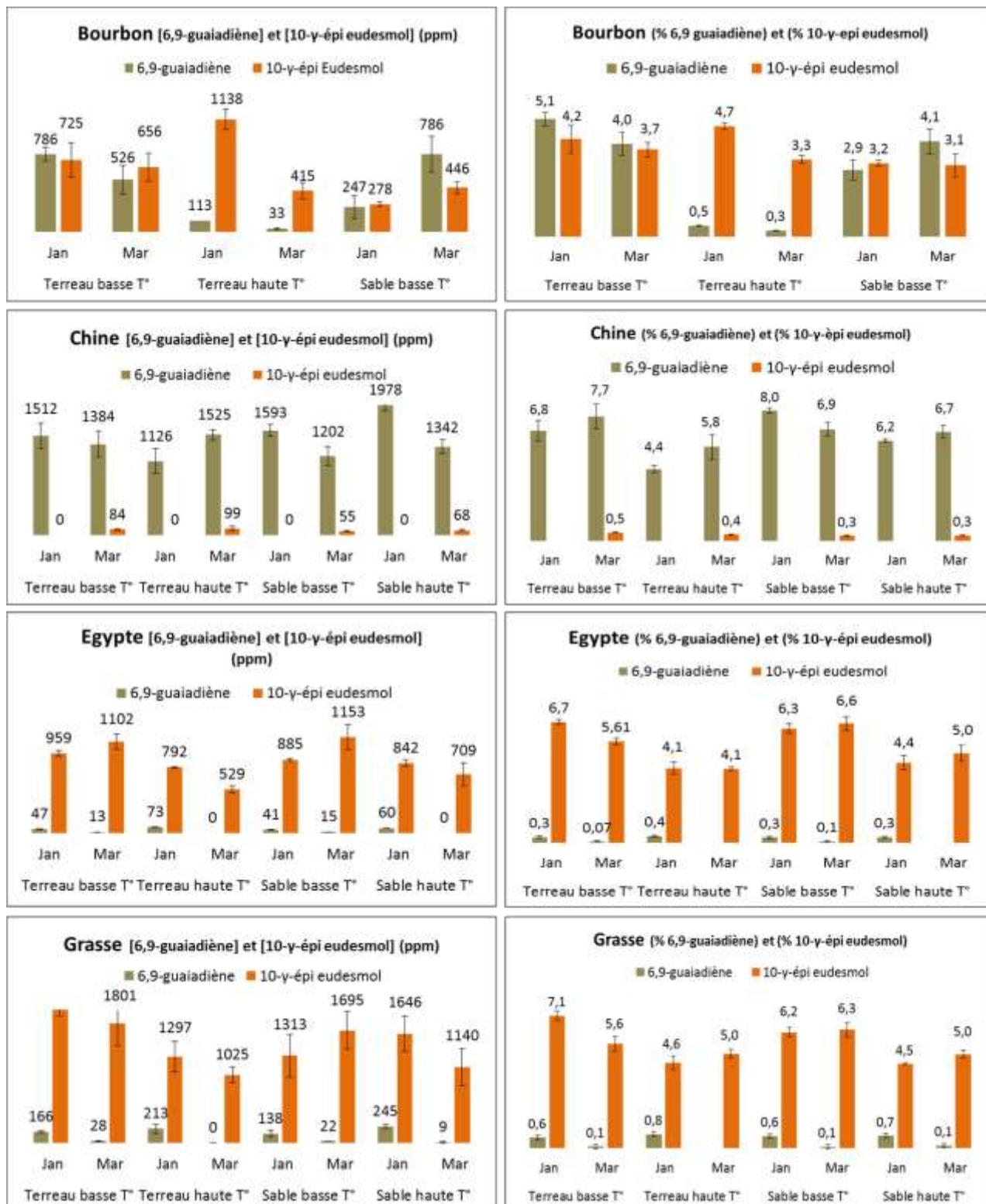
Les plants ont été cultivés en conditions de températures hautes (18 – 36°C) et d’humidité relative basse (24 – 38%) ou de températures basses (17 – 26°C) et d’humidité relative haute (52 – 60%) dans deux substrats différents (sable et terreau). Les analyses ont été réalisées après 2 mois (janvier) et 4 mois (mars) de culture sous atmosphère contrôlée. Les barres d’erreurs représentent les écarts-types (n = 3).

**Annexe 56 | Analyse du ratio citronnelol/géraniole dans les extraits des différents cultivars de *Pelargonium*.**



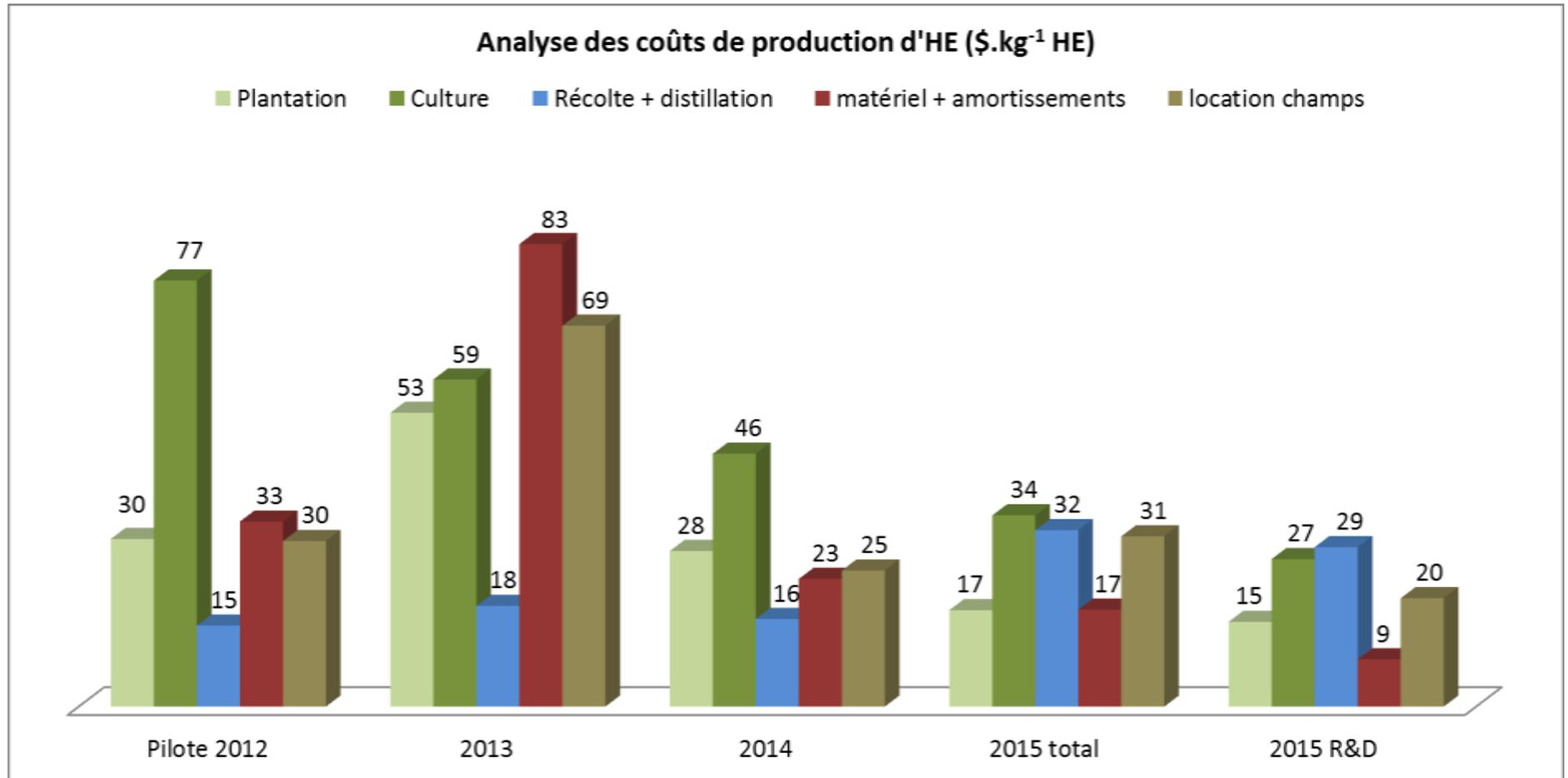
Les plants ont été cultivés en conditions de températures hautes (18 – 36°C) et d’humidité relative basse (24 – 38%) ou de températures basses (17 – 26°C) et d’humidité relative haute (52 – 60%) dans deux substrats différents (sable et terreau). Les analyses ont été réalisées après 2 mois (janvier) et 4 mois (mars) de culture sous atmosphère contrôlée. Les barres d’erreurs représentent les écarts-types (n = 3).

Annexe 57 | Analyse du 6,9-guaiadiène et du 10-γ-épi eudesmol en concentration absolue [ppm] ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et relative (%) dans les extraits des différents cultivars de *Pelargonium*.



Les plants ont été cultivés en conditions de températures basses (17 – 26°C) et d’humidité relative haute (52 – 60%) dans deux substrats différents (sable et terreau). Les analyses ont été réalisées après 2 mois (janvier) et 4 mois (mars) de culture sous atmosphère contrôlée. Les barres d’erreurs représentent les écarts-types (n = 3).

Annexe 58 | Analyse des coûts de production de l'HE de *Pelargonium* de 2012 à 2015.



Ces coûts de production ont été évalués pour une surface de 0,4 Ha (2012), 10 Ha (2013 et 2014), 13 Ha (2015 total) et 4 Ha (2015 R&D). Les coûts de plantations comprennent : la préparation du terrain, le coût des boutures, la mise en place du système d'irrigation, la plantation elle-même; les coûts de cultures comprennent : les intrants (fertilisants...), l'arrachage des mauvaises herbes, l'irrigation; Le poste 'récolte et distillation' concerne tous les frais de récolte, le transport et le chargement des alambics de distillation ainsi que l'énergie et l'amortissement de la distillerie; Le matériel et amortissement prennent en compte le coût du système d'irrigation, de paillage, des tracteurs et autres machines agricoles; la location des champs est fixée d'après la valeur d'un terrain dans la zone de Regwa.

Annexe 59 | Enzymes responsables de la production de géranol chez les plantes à fleurs

