



HAL
open science

Étude de la biosynthèse des terpènes et de leur régulation chez *Pelargonium x hybridum*

Laure Marie Bernadette Martinelli

► **To cite this version:**

Laure Marie Bernadette Martinelli. Étude de la biosynthèse des terpènes et de leur régulation chez *Pelargonium x hybridum*. Biologie végétale. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LY-SES010 . tel-03205681

HAL Id: tel-03205681

<https://theses.hal.science/tel-03205681v1>

Submitted on 22 Apr 2021

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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSES010

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein du
**Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes
aromatiques et médicinales (LBVpam)**

**École Doctorale N° 488
Sciences Ingénierie Santé (SIS)**

Spécialité / discipline de doctorat :
Biologie et Physiologie Végétale

Soutenue publiquement le 27/11/2020, par :
Laure Marie Bernadette Martinelli

**Étude de la biosynthèse des terpènes et
de leur régulation chez *Pelargonium x
hybridum***

Devant le jury composé de :

GIGLIOLI-GUIVARC'H, Nathalie, Professeure, Université de Tours (BBV), **Présidente**

GIGLIOLI-GUIVARC'H, Nathalie, Professeure, Université de Tours (BBV), **Rapporteure**
HACHEZ, Charles, Professeur, Université catholique de Louvain la Neuve (LIBST), **Rapporteur**
Giorgiana CHIETERA, Docteure, R&D Vegetal scientist Project Leader (IFF-LMR Naturals),
Examinatrice

LEGRAND, Sylvain, Maître de conférence, Université de Lille (EEP), **Examinateur**

JULLIEN, Frédéric, Maître de conférence (HDR), Université de Lyon-Saint-Étienne (LBVpam),
Directeur de thèse

BAUDINO, Sylvie, Professeure, Université de Lyon-Saint-Étienne (LBVpam), **Directrice du
laboratoire**

BLEROT, Bernard, Docteur, R&D Manager Naturals (IFF-LMR Naturals), **Invité**

Étude de la biosynthèse des terpènes et de leur régulation chez *Pelargonium x hybridum*

*Thèse de doctorat de l'Université de Lyon-Saint-Étienne
préparée au Laboratoire de Biotechnologies Végétales
appliquées aux plantes aromatiques et médicinales*

*École doctorale n°488, Sciences Ingénierie Santé (SIS)
Discipline : Biologie et Physiologie Végétale*

Thèse présentée et soutenue à Saint-Étienne, le 27 novembre 2020, par

Laure Martinelli

Composition du jury :

Nathalie GIGLIOLI-GUIVARC'H, Professeure, Université de Tours (BBV)	Rapporteuse
Charles HACHEZ, Professeur, Université catholique de Louvain la Neuve (LIBST)	Rapporteur
Giorgiana CHIETERA, Docteure, R&D Vegetal scientist Project Leader (IFF-LMR Naturals)	Examinatrice
Sylvain LEGRAND, Maître de conférence, Université de Lille (EEP)	Examineur
Bernard BLEROT, Docteur, R&D Manager Naturals (IFF-LMR Naturals)	Invité
Frédéric JULLIEN, Maître de conférence (HDR), Université de Lyon-Saint-Étienne (LBVpam)	Directeur de thèse
Sylvie BAUDINO, Professeure, Université de Lyon-Saint-Étienne (LBVpam)	Directrice du laboratoire

"We can not adequately express, define, or explain our taste and smell sensations. We can record the sounds we hear, we can photograph the sights we see, but we cannot store and retrieve the flavor of a food or the scent of a flower except in and from our mind. We can transmit sounds and sights across continents, but we cannot perceive an odor beyond the range of our nose. We can accurately define and characterize light and sound by physical measurements, but we cannot adequately define flavor either qualitatively or quantitatively."

[Hornstein and Teranishi, 1967]

Sommaire

Sommaire.....	7
Remerciements.....	10
Liste des abréviations.....	11
Listes des figures.....	13
Liste des tableaux.....	16
Liste des données supplémentaires.....	16
Introduction.....	19
1 Diversité et origine des terpènes.....	21
1.1 Historique.....	21
1.2 L'origine des substrats, une source de diversité.....	21
1.3 Les mécanismes de biosynthèse des terpènes.....	24
2 Structure et évolution des terpène synthases.....	30
2.1 Des motifs conservés.....	30
2.2 Cristallisation, mutagenèse dirigée.....	32
2.3 Sous-familles et phylogénie.....	33
2.4 Un scénario d'évolution moléculaire.....	37
3 Synthèse de dérivés du géraniol, cas du citronellol.....	39
3.1 Du géraniol au citronellol.....	39
3.2 Biosynthèse des cardénolides et iridoïdes et rôle des P5βR.....	42
3.3 Les progestérone-5β-réductases, une famille de réductases à large spectre de substrats.....	46
4 Les terpènes chez les pélargoniums.....	48
4.1 Taxonomie du genre <i>Pelargonium</i>	48
4.2 L'histoire des pélargoniums odorants.....	54
4.3 L'importance des terpènes de l'HE de pélargonium.....	57
4.4 Les trichomes, usines cellulaires, à l'origine de la production des terpènes.....	60
5 Objectifs de thèse.....	63
Chapitre 1 Analyse multi-omique chez dix pélargoniums.....	67
1 Pélargoniums odorants et approche multi-omique.....	69
2 Analyse biochimique de l'huile essentielle.....	72
2.1 Contexte et objectifs.....	72
2.2 Composition globale et terpénique.....	72
2.3 Discrimination des odeurs par les composés.....	73
3 Apport de la transcriptomique.....	79
3.1 Contexte et objectifs.....	79
3.2 Séquençage et assemblage des transcriptomes.....	79
3.3 Amélioration des transcriptomes après assemblage.....	84
4 Approches multi-omiques.....	85
4.1 Mise en place d'une approche multi-omique.....	85
4.2 Étude phylogénétique des <i>TPS-a</i> des dix accessions de pélargoniums.....	86
4.3 Étude de la corrélation métabolomique - transcriptomique.....	89
5 Conclusion.....	91
Supplemental data.....	92
Chapitre 2 Analyse fonctionnelle de quatre terpène synthases chez le pélargonium à odeur de rose et évolution du parfum au sein du genre <i>Pelargonium</i>.....	95
Chapitre 3 Recherche et caractérisation de sesquiterpène synthases.....	115
1 Introduction.....	117

2	Material and methods.....	120
2.1	Plant Material.....	120
2.2	454 pyrosequencing library and reads analysis.....	120
2.3	RNA Extraction.....	120
2.4	Genome Walking.....	121
2.5	Expression of Recombinant proteins in heterologous system.....	121
2.6	Expression of recombinant proteins in <i>Nicotiana benthamiana</i>	122
2.7	RT-PCR Analysis.....	123
2.8	GC-MS Analysis.....	123
2.9	Protein modelling.....	124
3	Results.....	124
3.1	Functional characterisation of three sTPS from <i>P. rosat</i> 'Grasse'.....	124
3.2	Correlation of <i>PhCOPS</i> and <i>PhGeAS</i> expression levels with sesquiterpene content.....	126
3.3	Sequence and structural analysis of four sesquiterpene synthases from pelargonium.....	127
4	Discussion.....	130
4.1	Transcriptional activity and sesquiterpene production.....	130
4.2	Structure-function analysis in pelargonium sesquiterpene synthases.....	131
5	Conclusions.....	133
	Supplemental data.....	135
	Chapitre 4 Étude de la voie du citronellol.....	137
1	Introduction.....	139
2	Material and methods.....	142
2.1	Plant Material.....	142
2.2	RNA Extraction.....	142
2.3	High throughput RNA sequencing (RNAseq) and reads analysis.....	142
2.4	Transcriptome assembly and annotation.....	143
2.5	Phylogenetic analysis.....	143
2.6	Expression of recombinant in <i>E. coli</i>	144
2.7	Enzymatic assays.....	144
2.8	Expression of recombinant in <i>Nicotiana benthamiana</i>	145
2.9	RT-PCR Analysis.....	146
2.10	GC-MS Analysis.....	146
2.11	Protein modelling.....	147
3	Results.....	147
3.1	Multi-omique screening for candidates.....	147
3.2	Biochemical characterisation of five P5 β Rs.....	150
3.3	<i>In planta</i> characterisation of PhCIR1.....	153
3.4	Sequence and structural analysis of pelargonium P5 β Rs.....	155
4	Discussion.....	158
4.1	Citronellol biosynthesis is a multi-step process in pelargonium, driven by a P5 β R family enzyme.....	158
4.2	Evolution and specificity of PhCIR1.....	159
4.3	Stereospecificity of PhCIR1.....	161
5	Conclusion.....	162
	Supplemental data.....	163
	Chapitre 5 Pélargoniums rosat et variations du terpénome.....	169
1	Introduction.....	171
2	Étude de facteurs écologiques en conditions contrôlées.....	174
2.1	Plan d'expérience.....	174
2.2	Variations quantitatives selon les conditions expérimentales.....	175
2.3	Variations qualitatives selon les conditions expérimentales.....	176
2.4	Influence de la défoliation sur la biosynthèse des composés terpéniques.....	178
2.5	Influence d'un climat chaud et sec sur la composition des terpénomes.....	179
3	Effet d'un stress climatique plus prononcé sur la composition de l'huile essentielle.....	181
3.1	Plan d'expérience.....	181

3.2 Impact de la température sur la quantité de terpènes produits.....	181
3.3 Évaluation de l'effet climat sur la composition de l'huile essentielle.....	182
3.4 Effet différentiel du stress climatique sur des composés terpéniques d'une même voie de biosynthèse.....	184
3.5 Effets du climat sur la voie des <i>p</i> -menthanes.....	185
3.6 Effets du climat sur la voie du citronellol.....	186
4 Discussion.....	188
4.1 Réponse au stress chez les pélargoniums.....	188
4.2 Stress climatique modéré vs stress climatique sévère.....	189
4.3 Variations intrinsèques aux voies de biosynthèse des terpènes.....	190
5 Conclusion.....	191
Supplemental data.....	192
Chapitre 6 Matériel et méthodes.....	199
1 Matériel.....	201
1.1 Matériel végétal.....	201
1.2 Souches.....	201
1.3 Vecteurs.....	202
2 Biologie moléculaire.....	206
2.1 Extraction d'acides nucléiques.....	206
2.2 Vérification de la qualité des ARN et obtention d'ADN complémentaires.....	207
2.3 Amplification de l'ADN.....	208
2.4 Techniques de clonage et recombinaison.....	210
2.5 Transformation de bactéries et levures compétentes.....	211
3 Biotechnologies végétales.....	214
3.1 Culture de pélargoniums.....	214
3.2 Transformation transitoire de feuilles de <i>N. benthamiana</i>	214
4 Biochimie.....	215
4.1 Production d'enzymes recombinantes en système bactérien.....	215
4.2 Études enzymatiques.....	217
4.3 Analyses des composés organiques volatils (COV).....	219
4.4 Analyse en GC-MS.....	220
5 Technique de Bio-informatique.....	220
5.1 Séquençage.....	220
5.2 Analyses transcriptomiques.....	221
5.3 Analyses phylogénétiques.....	223
5.4 Analyses statistiques.....	223
5.5 Modélisation protéique.....	223
6 Tableaux annexes.....	224
Conclusions & Perspectives.....	229
1 Conclusions du projet.....	231
2 Deux P5βR pour deux énantiomères de citronellol.....	231
3 Du citronellol aux oxydes de roses.....	233
4 L'isomenthone chez les pélargoniums, une voie de biosynthèse originale ?.....	234
5 Stress climatique et données transcriptomiques pour aborder les mécanismes de régulation.....	235
6 La purification de trichomes, un outil pour répondre à des questions biologiques.....	237
7 De la génomique pour compléter la transcriptomique.....	239
Références Bibliographiques.....	243
Résumé.....	274

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Charles Hachez, Giorgiana Chietera, Sylvain Legrand et Bernard Blerot, d'avoir bien voulu évaluer ce travail, d'avoir patienter pour la réception de ce tapuscrit et pour le temps consacré à sa lecture.

Je tiens à remercier Sylvie Baudino de m'avoir accueillie dans son laboratoire et au sein de son équipe. Un grand merci à mes encadrants, Frédéric Jullien, Denis Saint-Marcoux et Jean-Louis Magnard, qui m'ont appris énormément, aussi bien scientifiquement, pédagogiquement, humainement que personnellement. Merci pour votre expertise et surtout pour votre patience tout au long de cette thèse. Merci Fred, de m'avoir soutenue et encadrée jusqu'au bout, malgré les difficultés rencontrées et la rédaction longue mais très formatrice.

Ma thèse n'aurait pas été possible sans la collaboration avec IFF-LMR-Naturals, que je tiens à remercier. Merci en particulier à Giorgiana et Bernard. Vraiment merci Bernard, de m'avoir fait découvrir le pélargonium aussi bien au travers de tes travaux (et des cahiers de manip si bien tenus de Cécile) qu'au travers des champs de Regwa ; merci encore pour cette immersion dans le monde du pélargonium. Merci aux Hashem Borthers pour leur accueil et à Lucie pour sa compagnie au cours de ce voyage unique.

Je remercie l'ensemble des membres du LBVpam, pour leurs conseils, leur compagnie, leur disponibilité et les échanges divers et variés que j'ai pu avoir avec chacun d'eux tout au long de ma thèse. C'est au travers de ces nombreuses interactions que j'ai pu m'épanouir dans la recherche mais aussi dans l'enseignement. Merci Denis, pour la programmation, la bioinformatique (et l'informatique), la transcriptomique, les analyses, les brainstormings, les discussions et pour ton temps et ton soutien. Merci à Florence pour les statistiques, les cours de R et les échanges : merci de prendre le temps de partager ton expertise professionnelle comme personnelle pour que nous, petits doctorants, puissions apprendre et avancer. Merci Aurélie pour les nombreuses manip' que tu as faites pour moi, pour faire avancer cette thèse et la 'team pélarço' : même si le pélargonium t'a souvent donné du fil à retordre, tu finis toujours par y arriver et c'est toujours un plaisir de travailler avec toi (et je ne dis pas ça uniquement pour les kinder bueno). Merci à Benoît de m'avoir accueillie dans son bureau, pour l'ambiance là-bas et surtout un grand merci pour TERPNET et tout ce que ça m'a apporté (et m'apportera j'espère). Merci également à Loïc pour la formation à la culture *in vitro*, l'aide sur les manips et l'entretien des pélargoniums et merci à Ludvine de perpétuer ce travail pour la suite du projet. Merci Odile, Marie et les filles des TP, vous avez rendu les journées d'enseignements et l'enseignement en général encore plus chouettes.

Merci bien évidemment aux Bioactifs, Saretta, Charlotte et Corentin, développer tout ce pour quoi je vous suis reconnaissante serait trop long. Tenons-nous en à dire que cette thèse et ces quatre années à Saint-Étienne n'auraient pas été les mêmes sans vous et je préfère que vous ayez été là.

Évidemment, merci à Laurence Meslet-Cladière, sans qui je n'aurais pas développé cette passion pour la recherche, sans qui je n'aurais pas fait de thèse et qui m'a supportée, soutenue et a pris soin de moi. Merci à toi, tes marmottes et toute votre jolie famille pour les vacances en bords de mer, la force que vous m'avez donnée et plus anecdotiquement, pour m'avoir fait découvrir Pymol ! Merci le fillot-Charles-Antoine et Blandine, pour les conversations interminables, les visites et les vacances, ça fait toujours du bien de vous voir ; je n'aurais pas pu tomber mieux comme fillot et binôme.

Pour terminer en beauté, merci à ma famille, à la fois trop grande pour citer tout le monde et à la fois, avec vous, on n'est jamais trop. JCTDHCME et les trois générations qui vous composent m'avez soutenue, de plus ou moins près, mais toujours là. À mes grandes sœurs, chacune à votre façon (parce que c'est comme ça que vous êtes si fortes), vous m'avez apporté bien plus que vous ne l'imaginez.

Enfin, merci aux auteurs des travaux que je cite, qui m'ont aidée à mieux connaître mon sujet, à mieux appréhender le monde des terpènes et m'ont préparé le travail (et merci Matthieu pour l'inspiration).

Liste des abréviations

aa	acide aminé (<i>amino acid</i>)
ABC	(transporteur) de l'anglais, <i>ATP Binding Cassette</i>
ACP	analyse en composante principale
ADH	alcool-déhydrogénase (<i>alcohol dehydrogenase</i>)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN-T	ADN de transfert
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADNse	désoxyribonucléase
AKR	de l'anglais <i>aldo-keto reductase</i>
AP2/ERF	<i>APETALA2 / ethylene-responsive element binding factor</i>
APS	<i>ammonium persulfate</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ATPase	ATP synthase
BET	bromure d'éthidium
bHLH	de l'anglais <i>basic helix-loop-helix</i>
bp	paire de base, de l'anglais <i>base pair</i>
BSA	albumine sérique bovine, de l'anglais <i>bovine serum albumin</i>
C-OPP	(liaison) carbone-diphosphate
C-ter	(extrémité) carboxy-terminale
C ₁₀	(molécule à) 10 carbones
C ₅	(molécule à) 5 carbones
CaMV	de l'anglais <i>cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	de l'anglais <i>coding DNA sequence</i>
COV	composé organique volatil
CPP	copalyl diphosphate
CTAB	bromure de cétrimonium, de l'anglais <i>cetyltrimethylammonium bromide</i>
diTPS	diterpène synthase
DMAPP	diméthylallyl-pyrophosphate
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	<i>deoxyribonuclease</i>
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate (<i>deoxyribonucleoside triphosphate</i>)
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
DW	<i>dry weight</i>
DXS	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate réducto-isomérase
EDTA	éthylène-diamine-tétra-acétique
EO	<i>essential oil</i>
EST	marqueur de séquence exprimée, de l'anglais <i>expressed sequence tag</i>
FHP	farnésyl hydroxphosphonate
FT	facteurs de transcription
GC-MS	chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse, de l'anglais <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
GES	géraniol synthase
GFP	de l'anglais <i>green fluorescent protein</i>
GGPP	géranyl-géranyl diphosphate
GPP	géranyl diphosphate (<i>geranyl diphosphate</i> en anglais)
HE	huile essentielle
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
His	histidine
HMGR	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase
HR	humidité relative
IPP	isopentenyl-diphosphate
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
ISY	iridoïde synthase (<i>iridoid synthase</i>)
K _{cat}	constante catalytique (<i>turnover number</i>)
K _m	constante de Michaelis

Liste des abréviations

LB	(milieu) Luria-Bertoni
LPP	labda-15-en-8-ol diphosphate
LTP	transfert de lipides
M	mol.L ⁻¹
MCS	de l'anglais <i>membrane contact-site</i>
MDR	de l'anglais <i>medium-chain dehydrogenase/reductase</i>
MEP	methylerythritol 4-phosphate
MES	acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
MIA	alcaloïdes indolo-monoterpéniques, de l'anglais <i>monoterpeneoid indole alkaloid</i>
ML	<i>maximum likelihood</i>
mRNA	de l'anglais <i>messenger RNA</i>
MTPLS	de l'anglais <i>microbial TPS-like</i>
mTPS	monoterpène synthase (<i>monoterpene synthase</i>)
MVA	mevalonate
N-ter	extrémité N-terminale (terminaison aminé)
NADH	cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ND	non détecté (<i>not detectable</i>)
NPP	néryl diphosphate
NUDX	nudix hydroxylase
OPP	groupement diphosphate
OPR	12-oxophytodienolate réductase
ORF	de l'anglais <i>open reading frame</i>
OT	orthogroup(e)
OYE	de l'anglais <i>old yellow enzyme</i>
P5βR	progestérone-5β-réductase
PCR	réaction de polymérisation en chaîne, de l'anglais <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	<i>paired-end</i> (type de séquençage)
pls-da	analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels, de l'anglais <i>partial least squares discriminant analysis</i>
PPi	diphosphate inorganique
PRISE	progestérone-5β-réductase et/ou iridoïde synthase, 1,4-énone réductase
PVP	polyvinylpyrrolidone
qPCR	PCR quantitative
R&D	recherche et développement
RAPD	amplification aléatoire d'ADN polymorphe, de l'anglais <i>random amplified polymorphic DNA</i>
RDA	de l'anglais <i>redundancy analysis</i>
RE	réticulum endoplasmique
RIN	de l'anglais <i>RNA integrity number</i>
RNase	<i>ribonuclease</i>
RT	temps de rétention, de l'anglais <i>retention time</i>
RT-PCR	PCR quantitative en temps réel, de l'anglais <i>real-time PCR</i>
SDR	de l'anglais <i>short-chain dehydrogenase/reductase</i>
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	de l'anglais <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRA	de l'anglais <i>sequence read archive</i>
sTPS	sesquiterpène synthase (<i>sesquiterpene synthase</i>)
TAE	Tris-acétate-EDTA
TB	(milieu) de l'anglais <i>terrific buffer</i>
TEMED	tétraméthyléthylènediamine
TG	trichome glandulaire
Tm	température de fusion moléculaire, de l'anglais <i>melting temperature</i>
TPM	transcrits par million
TPS	terpène synthase (<i>terpene synthase</i>)
TT	trichomes tecteurs, non-glandulaires
VEP(1)	de l'anglais <i>vein patterning</i>
V _{max}	vitesse initiale maximale
VOC	<i>volatile organic compound</i>

Listes des figures

Figure 1 Origine structurale des terpènes.....	22
Figure 2 Différents mécanismes d'élongation des isoprénoïdes (A) réguliers et (B) irréguliers.....	23
Figure 3 Les différents isomères d'isoprénoïdes à l'origine des mono- et sesqui-terpènes.....	24
Figure 4 Mécanismes de formation des monoterpènes (A) cycliques et (B) acycliques.....	26
Figure 5 Mécanismes de formation des sesquiterpènes avec (A) différents carbocations initiaux et (B) un exemple détaillé des réactions subséquentes responsables de la formation de plusieurs sesquiterpènes.....	27
Figure 6 Mécanismes de formations des diterpènes.....	29
Figure 7 Observation des motifs conservés chez les TPS : (A) Alignement protéique de deux TPS et (B) représentation tri-dimensionnelle d'une sTPS. (C) Détail du site actif d'une sTPS et des acides aminés impliqués dans la liaison au substrat et aux ions Mg ²⁺	31
Figure 8 Illustration de la compétition inter-acides aminés dans la déprotonation du cation pinyl chez la pinène synthase du sapin géant.....	33
Figure 9 Arbre phylogénétique des TPS de plantes, Bohlmann <i>et al.</i> (1998).....	35
Figure 10 Schéma de l'évolution des TPS de plantes telle que proposée par Trapp & Croteau (2001).....	35
Figure 11 Classification des TPS de plantes selon Chen <i>et al.</i> (2011).....	36
Figure 12 Architecture et domaines des TPS de plantes, illustré avec une diTPS bifonctionnelle (Zhou & Pichersly, 2020).....	37
Figure 13 Scénario évolutif des TPS tel que proposé par Karunanithi & Zerbe (2019).....	38
Figure 14 Résumé bibliographique des voies de biosynthèse putatives du géraniol et du citronellool	41
Figure 15 Résumé de la voie de biosynthèse des cardénolides chez les plantes.....	43
Figure 16 Résumé de la biosynthèse des iridoïdes et alcaloïdes indolo-monoterpéniques (MIA)	45
Figure 17 Mécanisme d'une ISY et d'une épi-ISY dans la production de différents stéréoisomères de népétalactols et iridodials.....	46
Figure 18 Représentation de la structure des P5βR : (A) architecture des domaines et structures secondaires et (B) observations des motifs conservés.....	47
Figure 19 Exemples de différents substrats de PRISE et leur produit correspondant.....	48
Figure 20 Exemples de la diversité morphologique retrouvée au sein du genre <i>Pelargonium</i>	50
Figure 21 Phénogramme de la taxonomie des pélagoniums.....	52
Figure 22 Structure des terpènes majoritaires de l'huile essentielle de pélagonium.....	60
Figure 23 (A) Structure d'un trichome glandulaire capité. (B) Trichomes de pélagoniums odorants observés au microscope électronique à balayage, d'après Blerot <i>et al.</i> (2016).....	61
Figure 1.1 Composition en composés organiques volatils par accession.....	73
Figure 1.2 Analyse discriminante (pls-da) des profils biochimiques des dix accessions de pélagoniums.....	75
Figure 1.3 Représentation graphique de la matrice de corrélation (corrélogramme) des profils biochimiques pour les composés les plus discriminants.....	78
Figure 1.4 Quantité de reads obtenus pour les dix accessions.....	80
Figure 1.5 Statistiques des reads bruts (réplicat 1 de <i>P. citronellum</i>). (A) Boxplots de la qualité du basecalling en fonction de la position le long des reads. (B) Proportion de chacune des quatre bases en fonction de la position le long des reads. (C) Nombre de séquences en fonction de leur proportion en GC. (D) Niveau de duplication des séquences.....	81

Figure 1.6 Caractéristiques des assemblages des dix accessions. (A) Nombre total de séquences obtenues dans chaque transcriptome. (B) Longueur moyenne des séquences. (C) N50 et (D) L50 des assemblages. (E) Proportions de reads alignés sur les transcriptomes, différenciées par type d'alignement.....	83
Figure 1.7 Modification des transcriptomes après assemblage. (A) Nombre de transcrits contenant des chimères et nouvelles séquences créées à partir de ces transcrits. (B) Nombre de séquences de <i>TPS-a</i> , <i>P5βR</i> et <i>OPR</i> avant et après contigage et nettoyage manuel dans l'ensemble des dix transcriptomes.....	84
Figure 1.8 Arbre phylogénétique des séquences codantes de <i>sTPS</i> de la famille de gène <i>TPS-a</i> et les profils d'expression de chaque <i>OT</i> (z-score des TPM moyens).....	88
Figure 1.9 Corrélogramme de l'expression des <i>TPS-a</i> et de la concentration en sesquiterpènes, dans les dix accessions de pélargoniums.....	90
Figure 3.1 Overview of the putative reaction mechanism of sesquiterpene production: possible cyclisation and cation rearrangement to form sesquiterpenes.....	119
Figure 3.2 GC-MS analysis of hexane extracts obtained from enzymatic activities of PhGeAS, PhGeDS and PhCOPS, and PhEDS in a heterologous system.....	125
Figure 3.3 Confocal fluorescence microscopy of <i>N. benthamiana</i> leaf cells with GFP fused protein, PhCOPS here.....	126
Figure 3.4 Comparison of (A) <i>PhCOPS</i> and <i>PhGEAS</i> transcriptional activity and (B) <i>in vivo</i> production of the formed sesquiterpenes for five pelargonium accessions.....	127
Figure 3.5 Protein sequence alignment of the four <i>sTPS</i> s isolated from <i>P. rosat</i> 'Grasse' and TEAS from <i>N. tabacum</i> as reference.....	128
Figure 3.6 Stereo representation of characterised <i>sTPS</i> s from <i>P. rosat</i> 'Grasse' modelled on TEAS presented as reference. Detailed representation of amino acids involved in (A) the Mg ²⁺ stabilisation, (B) the substrate binding and (C) interaction of intermediates.....	130
Figure 4.1 Proposed citronellol biosynthetic pathways.....	140
Figure 4.2 Accumulation profiles of compounds of the citronellol pathway in ten scented pelargoniums.....	148
Figure 4.3 Maximum likelihood phylogenetic tree of <i>P5βR</i> family in pelargoniums.....	149
Figure 4.4 (A) GC-MS spectrum of hexane extracts obtained after incubation of recombinant P5βR4, with NADPH. (B) Relative activity of each recombinant P5βRs with citral or progesterone, in presence of NADH or NADPH.....	151
Figure 4.5 Kinetic assessment of enzymatic activity of five P5βRs from pelargonium.....	152
Figure 4.6 <i>PhGES</i> and <i>PhCIR1</i> (<i>P5βR4</i>) transcriptional expression profiles in pelargonium.....	153
Figure 4.7 GC-MS spectrum of hexane extracts obtained after incubation of <i>N. benthamiana</i> leaf disks transformed with <i>PhCIR1</i> , in buffer supplemented with citral.....	154
Figure 4.8 Confocal fluorescence microscopy of <i>N. benthamiana</i> leaf cells expressing GFP-fused proteins.....	155
Figure 4.9 Protein sequence alignment of five cloned P5βRs from pelargonium using mutant V150M of <i>Plantago major</i> citral reducing multi-product reductase (PmMOR ^{V150M}) as reference.....	156
Figure 4.10 Superimposition of P5βRs modelled on reference PmMOR ^{V150M} . (A) Comparison of PhCIR1 overall structure with PmMOR ^{V150M} and (B) detailed view of the substrate cavity. (C) Comparison of PhCIR1 substrate cavity with the four others characterised P5βRs.....	157
Figure 4.11 Stereo representation of PmMOR ^{V150M} (left) and PhCIR1 (right) binding sites and substrate positioning.....	158
Figure 5.1 Plan d'expérience (Exp 1) utilisé pour valider notre protocole et évaluer l'influence du climat sur les profils biochimiques de pélargoniums rosat.....	174
Figure 5.2 Histogrammes empilés indiquant la quantité et la composition de l'HE de pélargoniums rosat selon les conditions expérimentales (Exp 1).....	176
Figure 5.3 ACP sur les échantillons après deux mois de culture lors de l'Exp 1. (A) Analyse de l'ensemble des données (B) analyse des données par cultivar.....	177

Figure 5.4 Graphique en violon des composés majeurs de l'HE de pélargoniums 'Égypte' cultivés dans différentes conditions (Exp 1).....	179
Figure 5.5 Analyse discriminante (pls-da) des profils biochimiques de l'Exp 1 pour <i>P. rosat</i> 'Chine' (A) et <i>P. rosat</i> 'Égypte' (C) selon le climat de culture. Diagrammes en violon des composés discriminants de <i>P. rosat</i> 'Chine' (B) et <i>P. rosat</i> 'Égypte' (D) en climat tempéré ou chaud et sec. .	180
Figure 5.6 Plan d'expérience (Exp 2) utilisé pour valider notre protocole et évaluer l'influence d'un climat plus prononcé sur les profils biochimiques de pélargoniums rosat.....	181
Figure 5.7 Histogrammes empilés indiquant la quantité et la composition de l'huile essentielle de pélargoniums rosat selon les conditions de culture (Exp 2).....	182
Figure 5.8 ACP sur l'ensemble des échantillons analysés après deux mois de culture lors de l'Exp 2.....	183
Figure 5.9 Analyse discriminante (pls-da) des profils biochimiques de l'Exp 2 pour <i>P. rosat</i> 'Chine' (A) et <i>P. rosat</i> 'Égypte' (C) selon le climat de culture. Diagrammes en violon des composés discriminants de <i>P. rosat</i> 'Chine' (B) et <i>P. rosat</i> 'Égypte' (D) en climat tempéré ou chaud et sec. .	184
Figure 5.10 Variations des concentrations des composés de la voie des <i>p</i> -menthanes selon les conditions de culture.....	186
Figure 5.11 Variations des concentrations des composés de la voie du citronellole selon les conditions de culture.....	187
Figure 6.1 (A) Carte du vecteur de clonage pGEM®-T Easy ; (B) Carte du vecteur de clonage pCR® Blunt.....	203
Figure 6.2 Carte du vecteur d'entrée pENTR™ /D-TOPO®.....	203
Figure 6.3 Vecteur de destination pGWA et dérivés (d'après Busso <i>et al.</i> , 2005).....	204
Figure 6.4 Carte du vecteur pYEDP60, d'après Masimirembwa <i>et al.</i> (1999).....	204
Figure 6.5 Carte de la cassette d'ADN-T du vecteur d'expression <i>in planta</i> pK7WG2D (d'après Karimi <i>et al.</i> , 2002).....	205
Figure 6.6 Carte de la cassette d'ADN-T des vecteurs d'expression <i>in planta</i> pMDC32 et pMDC83 (d'après Curtis et Grossniklaus, 2003).....	206
Figure 6.7 Schéma d'un clonage par excision uracil-spécifique de la technique USER™ (New England Labs, Cat. #M5505).....	211
Figure 1 Stéréoconfiguration des oxydes de roses.....	234
Figure 2 Voies de <i>p</i> -menthanes chez (A) la menthe et (B) le pélargonium.....	235

Liste des tableaux

Tableau 1 Caractéristiques d'espèces botaniques de pélargoniums odorants retrouvées dans les différentes sections, d'après Blerot <i>et al.</i> (2016).....	54
Tableau 2 Compositions détaillées des HE commerciales de <i>P. rosat</i> , d'après Blerot (2016).....	58
Tableau 1.1 Récapitulatif des dix accessions de pélargoniums étudiées.....	71
Tableau 4.1 Relative activity of P5 β R with different substrates.....	153
Tableau 6.1 Description des souches bactériennes utilisées.....	202

Liste des données supplémentaires

Supplemental_data 1.1 Détails des profils biochimiques de l'ensemble des composés, pour les dix accessions de pélargoniums.....	92
Supplemental_data 1.2 Détails des profils biochimiques des composés discriminants d'après la pls-da.....	93
Supplemental_data 3.1 Sequences of primers used for sTPS caracterisation.....	135
Supplemental_data 4.1 Sequences of primers used for P5 β R caracterisation.....	163
Supplemental_data 4.2 Number of retrieved <i>OPR</i> and <i>P5βR</i> sequences from transcriptomes for each accession.....	164
Supplemental_data 4.3 Maximum likelihood phylogenetic tree of <i>OPR</i> family in pelargoniums. ...	165
Supplemental_data 4.4 Accumulation profiles of compounds of the <i>p</i> -menthanes pathway in ten scented pelargoniums.....	166
Supplemental_data 4.5 Sequence signature motifs in P5 β Rs and their structural and functional roles.....	166
Supplemental_data 5.1 Analyse de l'effet de la défoliation (Exp 1) : diagrammes en violon pour chaque composés identifiés dans l'HE de <i>P. rosat</i> 'Égypte'.....	192
Supplemental_data 5.2 Analyse de l'effet de la défoliation (Exp 1) : diagrammes en violon pour chaque composés identifiés dans l'HE de <i>P. rosat</i> 'Chine'.....	193
Supplemental_data 5.3 Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de <i>P. rosat</i> 'Chine', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 1.....	194
Supplemental_data 5.4 Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de <i>P. rosat</i> 'Égypte', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 1.....	195
Supplemental_data 5.5 Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de <i>P. rosat</i> 'Chine', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 2.....	196
Supplemental_data 5.6 Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de <i>P. rosat</i> 'Égypte', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 2.....	197
Supplemental_data 6.1 Milieux et solutions pour la préparation et la culture de <i>S. cerevisiea</i>	224
Supplemental_data 6.2 Milieux de culture bactérienne et solutions pour la surexpression et purification de protéines.....	225
Supplemental_data 6.3 Solutions pour l'analyse des protéines par SDS-page.....	227

Introduction |

1 Diversité et origine des terpènes

1.1 Historique

De nombreuses plantes produisant des terpènes ont été utilisées depuis des milliers d'années comme aromates, plantes médicinales ou plantes à parfum. Les pétales de rose par exemple, étaient utilisés dès l'Antiquité pour parfumer les bains. De même, l'encens extrait des canaux résinifères des arbres du genre *Boswellia* était utilisé dans des rites religieux depuis les romains. Les plantes évoquées dans ces deux exemples étaient particulièrement prisées pour leurs odeurs principalement dues à la présence de monoterpènes (géraniol et citronellol chez la rose, α -thujène et pinènes chez l'encens). De nos jours, les terpènes du houblon (*Humulus lupulus*) sont responsables de l'amertume de la bière, les monoterpènes de menthe (*Mentha* spp.) parfument nos chewing-gums et nos lessives tandis que les sesquiterpènes de l'armoise annuelle (*Artemisa annua*) sont utilisés comme antipaludiques. Ces trois exemples ne constituent qu'une infime illustration de l'intérêt des terpènes en parfumerie, en agroalimentaire et en médecine au sens large.

Un très grand nombre de plantes synthétisent une large diversité de terpènes et il n'est pas rare qu'une analyse chromatographique d'extraits de leur parfum démontre l'identification, comme chez le pélargonium, de plus de 100 terpènes différents. Il en est de même chez des plantes moins odorantes comme *Arabidopsis thaliana* (Tholl *et al.*, 2005). Le nombre de terpènes caractérisés n'a cessé de croître ces 50 dernières années, passant de 4 000 structures en 1972 (Kellogg et Poulter, 1997) à plus de 80 000 en 2018 (Pichersky et Raguso, 2018 ; Tholl, 2015). Ce résultat découle à la fois de l'augmentation du nombre d'espèces analysées mais aussi des améliorations de sensibilité des techniques analytiques. Ainsi, le nombre de composés aromatiques caractérisés chez la rose était de 20 en 1953, puis de 50 en 1961 et enfin de 400 en 1990 (Flament, Debonneville et Furrer, 1993).

1.2 L'origine des substrats, une source de diversité

Les terpènes sont le résultat de l'association d'unités hydrocarbonées composées de cinq carbones (C_5) et sont classés en fonction du nombre d'unités formant la molécule finale. Ainsi, la déphosphorylation d'un isopentényl-diphosphate (IPP) conduira à l'isoprène qui appartient à la sous-classe des hémiterpènes. La liaison entre deux unités C_5 donne du géranyl diphosphate (GPP) à l'origine de la sous-classe des monoterpènes. La condensation de trois unités C_5 conduit à la formation de farnésyl diphosphate (FPP), substrat de la formation des sesquiterpènes et enfin la polymérisation de quatre unités C_5 est à l'origine des diterpènes. Les substrats des triterpènes et tétraterpènes sont respectivement formés par la condensation de deux FPP et de deux géranyl-géranyl diphosphate (GGPP) (Figure 1).

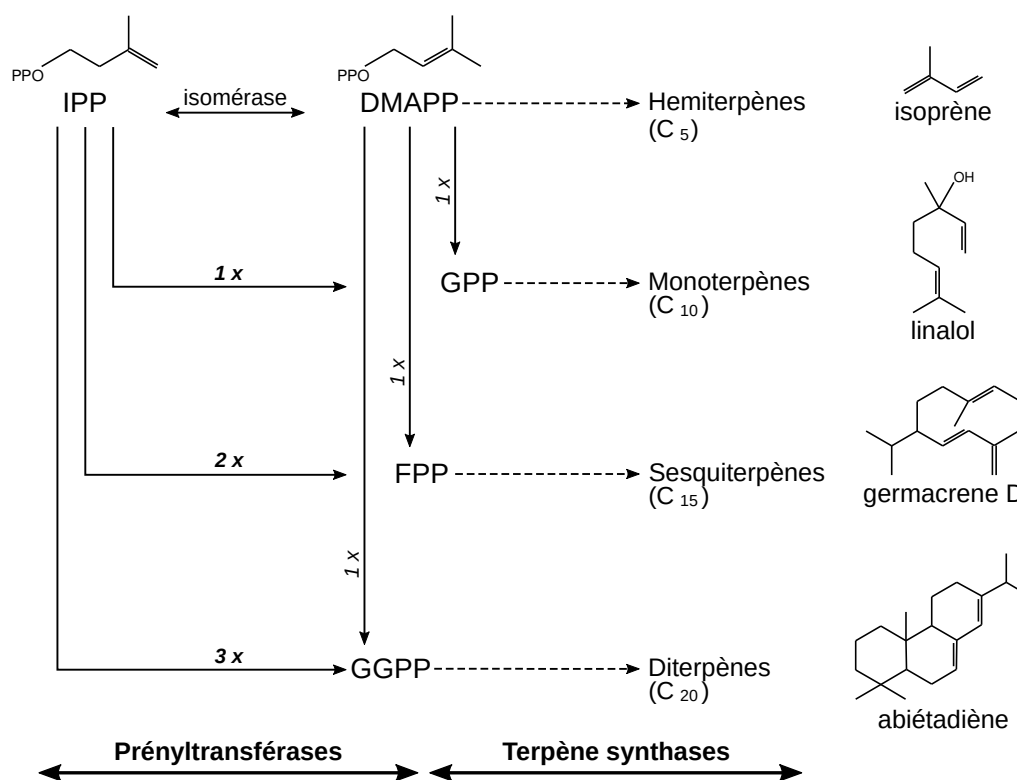


Figure 1 | Origine structurale des terpènes

OPP : groupement diphosphate ; IPP : isopentényl-diphosphate ; DMAPP : diméthylallyl-pyrophosphate ; GPP : géranyl-diphosphate ; FPP : farnésyl-diphosphate ; GGPP : géranyl-géranyl-diphosphate. Les flèches en pointillés indiquent les réactions catalysées par des terpène synthases (TPS) discutées dans le sous-chapitre suivant.

Un premier facteur explicatif de la diversité des terpènes a donc été la mise en évidence de l'élongation de la chaîne hydrocarbonée, par addition d'unités isoprène, à l'origine de leur structure. Ce travail, réalisé par un chimiste allemand, Otto Wallach, a conduit en 1914 au concept de l'*Isoprene rule* (Wallach, 1914). Ce travail a été repris par le chimiste Lavoslav Ružička qui, en 1953, posa le concept de *Biogenetic isoprene rule* (Ruzicka, 1953). Cette théorie repose sur le fait que la plupart des terpènes sont construits par une liaison tête-queue (*head-to-tail*) de deux isomères phosphorylés de l'isoprène, l'IPP d'une part et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) d'autre part (Figure 1). Cette réaction s'effectue en trois étapes (Figure 2A) : i) rupture de la liaison carbone-diphosphate (C-OPP) avec libération du groupement diphosphate (PPi) ; ii) alkylation de l'IPP avec le carbocation DMAPP en 1'-4 ; iii) élimination d'un proton (Epstein, Klobus et Edison, 1991). La formation de ces molécules phosphorylées est catalysée par des enzymes très étudiées, appelées prényltransférases (Kellogg et Poulter, 1997 ; Poulter et Rilling, 1981 ; Takahashi et Koyama, 2006). Ce mécanisme a été validé par des expériences de marquage et par la caractérisation d'une IPP isomérase, responsable de l'équilibre entre IPP et DMAPP (Anderson et al., 1989 ; Blanc et Pichersky, 1995 ; Christensen et Poulter, 1994).

L'addition en 1'-4 *head-to-tail* n'est cependant pas le seul processus d'addition d'unités C₅ que peuvent catalyser les prényltransférases. L'IPP et le DMAPP peuvent notamment se lier en 1'-2, ou en 1'-2-3 par cyclopropanation, ou en 1'-2-3-2' par cyclobutanation (Figure 2B). La formation de ces molécules phosphorylées en C₁₀ conduit à des monoterpènes dit irréguliers. Deux exemples sont le

chrysanthémyle diphosphate dans le genre *Artemisia* et le lavandulyle diphosphate (Epstein et Poulter, 1973) qui conduisent respectivement au chrysanthémol et au lavandulol après l'action d'une phosphatase. Le mécanisme de cyclopropanation est également impliqué dans la formation des précurseurs de triterpènes, à partir de deux FPP (Liu *et al.*, 2008).

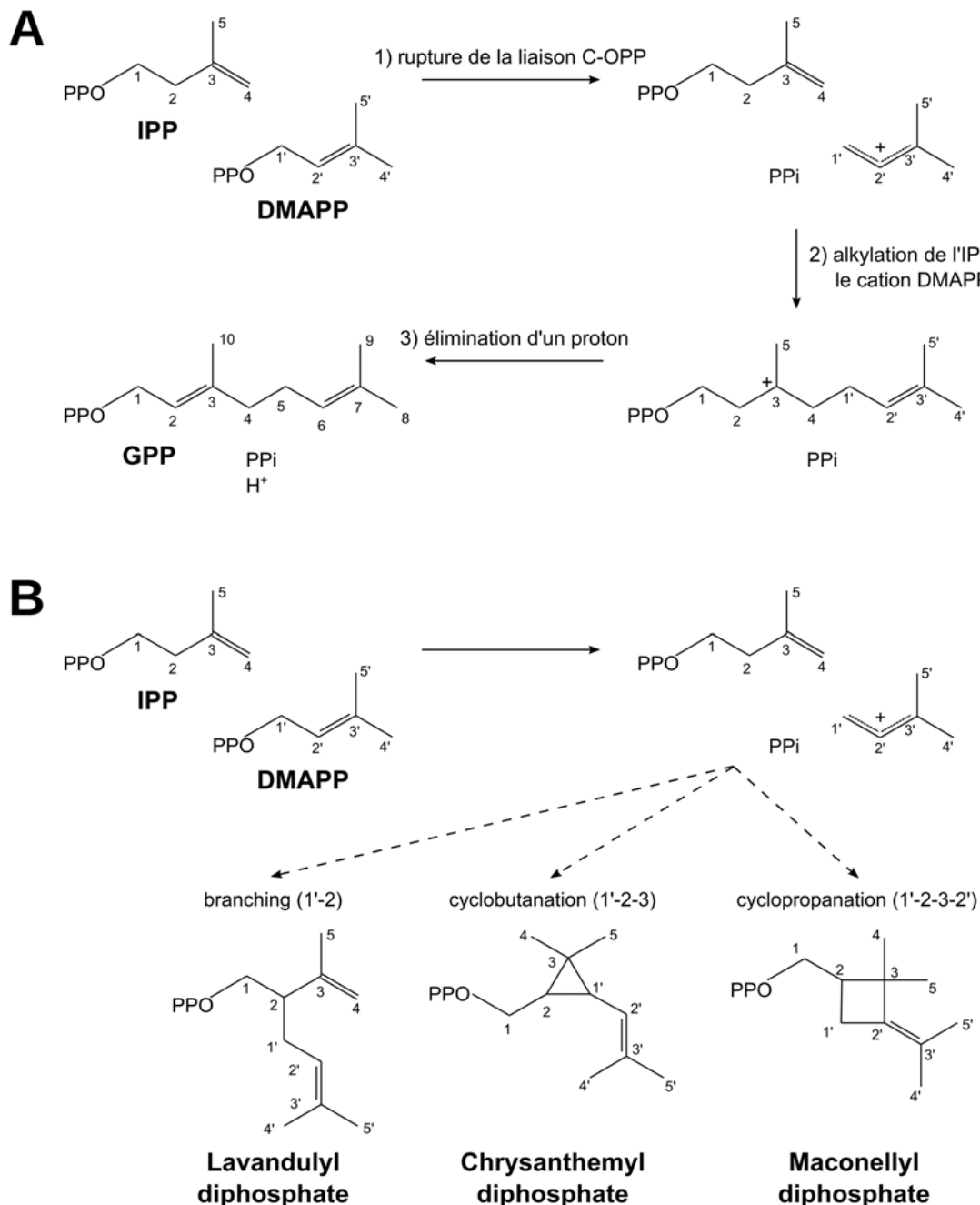


Figure 2 | Différents mécanismes d'élongation des isoprénoides (A) réguliers et (B) irréguliers

IPP : isopentényl-diphosphate ; DMAPP : diméthylallyl-pyrophosphate ; PPI : diphosphate inorganique ; GPP : géranyl-diphosphate ; H⁺ : proton. Les flèches en pointillés indiquent une succession d'étapes de la réaction.

Une autre source de diversité des terpènes en lien avec la biosynthèse de leur substrat provient des deux stéréoisomères de l'IPP : le groupement diphosphate de la molécule et le C1 auquel il est rattaché peuvent tourner autour du C2. Par conséquent, selon l'isomère d'IPP, la condensation d'une molécule d'IPP avec une molécule de DMAPP conduit soit au GPP, soit au néryl diphosphate

(NPP), tous deux des substrats potentiels à l'origine des monoterpènes (Schillmiller *et al.*, 2009). Similairement, la condensation de deux de ces isomères d'IPP avec une molécule de DMAPP forme du (Z,Z)-FPP, à la place du (E,E)-FPP couramment retrouvé (Figure 3). La structure initiale du FPP détermine la nature des sesquiterpènes formés à partir de ce précurseur (Adams et Heinstein, 1973 ; Sallaud *et al.*, 2009).

En somme, il existe une grande diversité de structures phosphorylées qui constituent les substrats de la biosynthèse des terpènes. La diversité de ces structures contribue grandement à la diversité des terpènes retrouvés dans la nature (Zhou et Pichersky, 2020).

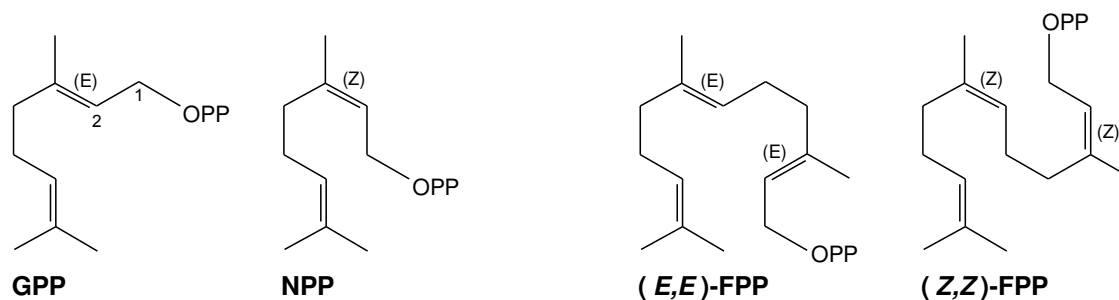


Figure 3 | Les différents isomères d'isoprénoïdes à l'origine des mono- et sesqui-terpènes

OPP : groupement diphosphate ; GPP : géranyl-diphosphate ; FPP : farnésyl-diphosphate. Les carbones C1 et C2 à l'origine des deux conformations sont indiquées sur le GPP.

Parmi les nombreux travaux sur la biosynthèse des terpènes, il a longtemps été débattu de l'origine des précurseurs isopréniques IPP et DMAPP à l'origine des mono- et sesqui-terpènes chez les plantes. Les travaux de Bloch, Lynen et Cornforth réalisés dans les années 1950 (Bloch *et al.*, 1959 ; Lynen, 1967 ; Modi et Patwa, 1961) ont mis en évidence une voie cytoplasmique, permettant la production des précurseurs isopréniques à partir du mévalonate et donc appelée voie du MVA (pour *mevalonic acid*). Par la suite, une autre voie prenant place dans les plastes, à partir du méthylérythritol 4-phosphate, anciennement appelée voie de Rohmer et aujourd'hui dénommée voie du MEP, a été démontrée (Flesh et Rohmer, 1988 ; Rohmer *et al.*, 1996). Ces deux grandes voies de biosynthèse se sont finalement avérées être toutes deux à l'origine des terpènes (Bach, 1995 ; Hemmerlin, Harwood et Bach, 2012). Bien que des exceptions et « cross-talks » entre les deux voies aient été démontrés (Mendoza-Poudereux *et al.*, 2015 ; Opitz, Nes et Gershenson, 2014). Aujourd'hui et de manière générale, il est considéré que l'IPP et le DMAPP produits par la voie plastidiale du MEP sont à l'origine de la synthèse du GPP et donc des monoterpènes, tandis que ceux produits par la voie cytosolique du MVA sont à l'origine du FPP et donc de la synthèse des sesquiterpènes.

1.3 Les mécanismes de biosynthèse des terpènes

La biosynthèse des terpènes *in vivo* est prise en charge par un ensemble d'enzymes appelées terpène synthases (TPS) qui seront présentées en détail dans le sous-chapitre suivant. Dans le site actif des TPS, une succession de réactions permet la formation de terpènes. Selon les réactions qui ont lieu, les terpènes formés varient. Les mécanismes de biosynthèse des mono- et sesqui-terpènes ont été majoritairement décryptés par les nombreux travaux du groupe de Rodney

Croteau et David Cane (Barton, 1999 ; Davis et Croteau, 2000) et de nombreuses études ont démontré des étapes réactionnelles communes entre ces mécanismes de biosynthèse (Christianson, 2017 ; Christianson, 2006 ; Degenhardt, Köllner et Gershenzon, 2009).

La biosynthèse des monoterpènes par une TPS commence par une rupture de la liaison C-OPP qui génère un carbocation (Figure 4). Dans le cas le plus simple des monoterpènes cycliques, indiqué en gris sur la Figure 4A (i), ceci entraîne secondairement une délocalisation de la double liaison puis une re-phosphorylation qui conduit à la formation d'un linalyl diphosphate. Il s'ensuit une étape d'isomérisation puis une seconde rupture de la liaison C-OPP. Le cation linalyl généré retrouvera un état stable par cyclisation intramoléculaire et perte d'un proton. Pour ce qui est de la formation des monoterpènes alcools, la perte d'un proton est remplacée par l'apport d'une molécule d'eau (ii). Plusieurs carbocations et cyclisations peuvent se succéder dans le site actif, avant la déprotonation finale (iii). Selon les réactions intermédiaires et la déprotonation finale (avec ou sans molécule d'eau), plusieurs carbocations peuvent induire la formation de plusieurs monoterpènes (iv). Parmi les réactions possibles, une nouvelle phosphorylation du carbocation, comme lors de la formation du linalyl diphosphate, peut être observée. C'est le cas dans le mécanisme de la bornyl-diphosphate synthase, qui en plus de produire des monoterpènes comme des pinènes ou du camphène, est capable de re-phosphoryler le bornyl carbocation et de libérer un hydrocarbure phosphorylé (v), comme une prényltransférase (Major et Weitman, 2012). En ce qui concerne les monoterpènes acycliques, leur formation résulte d'une réaction « inachevée » de TPS (Figure 4B) ; une déprotonation finale du cation géranyl, avant toute cyclisation, induit la formation de géraniol en présence d'eau (vi). De la même manière, la synthèse du linalol peut avoir deux origines distinctes, à partir du cation géranyl ou du cation linalyl (vii) et une déprotonation sans molécule d'eau de ces cations peut entraîner la production de monoterpènes hydrocarbonés comme le myrcène ou les ocimènes (viii).

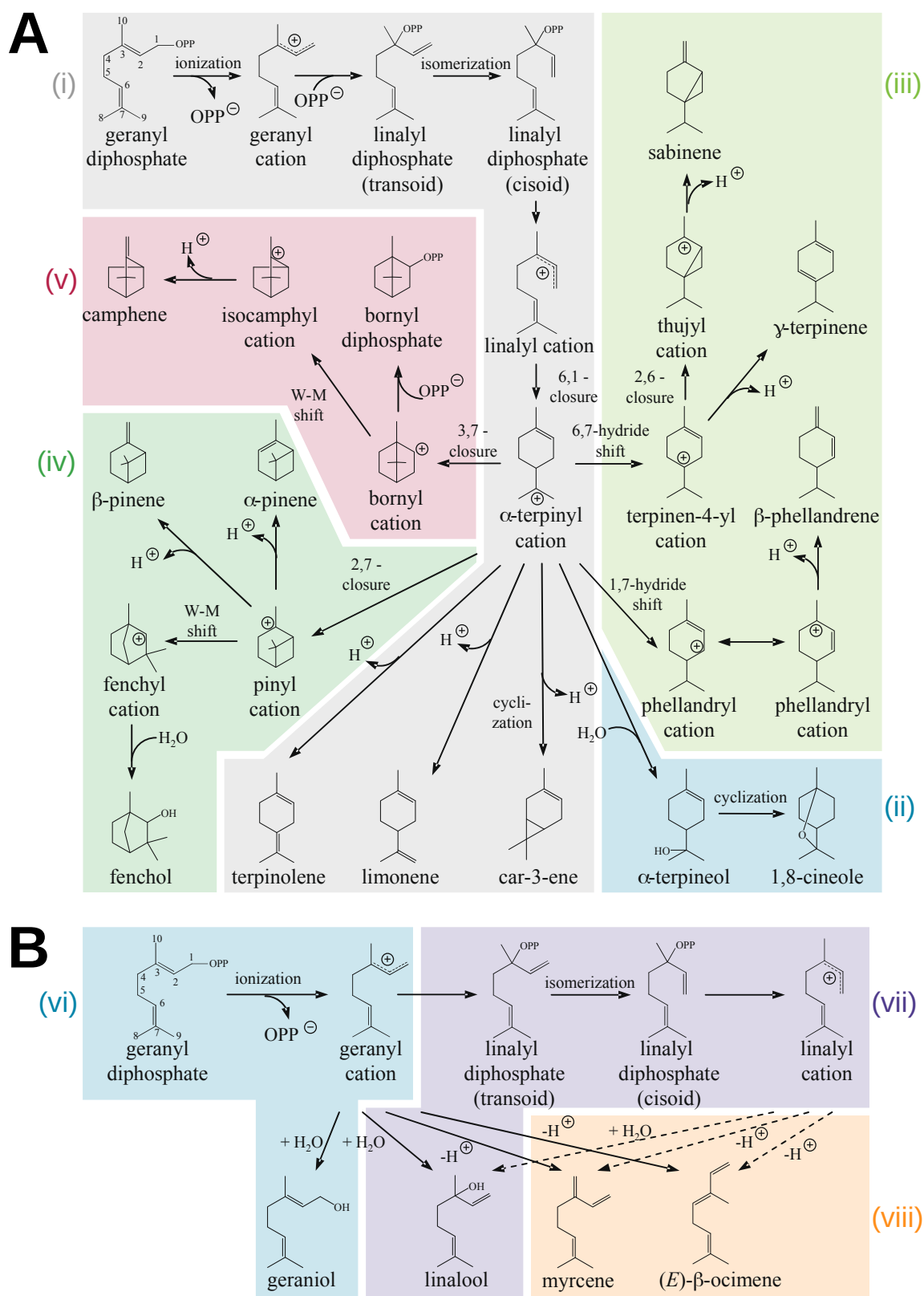


Figure 4 | Mécanismes de formation des monoterpènes (A) cycliques et (B) acycliques

Le schéma a été adapté de Degenhardt *et al.* (2009). Les réactions responsables de la formation de plusieurs monoterpènes sont présentées à titre d'exemple. La formation de l'ensemble des monoterpènes débute par la rupture de la liaison C-OPP du GPP. Le carbocation obtenu est sujet à diverses modifications, réarrangements et/ou cyclisations avant déprotonation finale, par la perte d'un proton ou réaction avec une molécule d'eau. Les numéros d'atomes de carbone utilisés font référence à la numérotation du GPP initial. Les encadrements de couleurs distinguent la stabilisation de différents carbocations ainsi que les produits formés. *W-M shift* : réarrangement de Wagner–Meerwein.

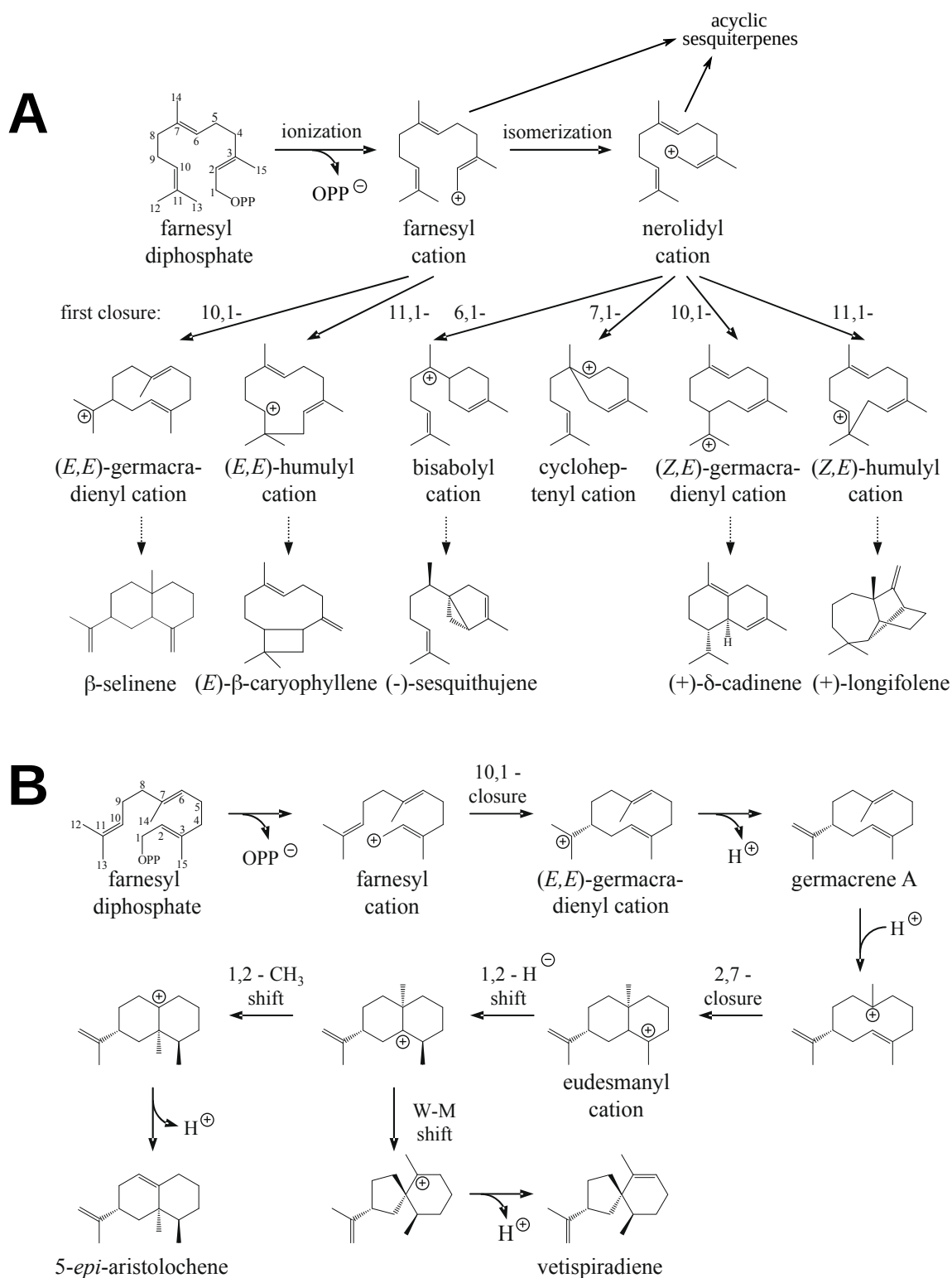


Figure 5 | Mécanismes de formation des sesquiterpènes avec (A) différents carbocations initiaux et (B) un exemple détaillé des réactions subséquentes responsables de la formation de plusieurs sesquiterpènes

Le schéma a été adapté de Degenhardt *et al.* (2009). Les réactions responsables de la formation de plusieurs sesquiterpènes sont présentées à titre d'exemple. La formation de l'ensemble des sesquiterpènes débute par la rupture de la liaison C-OPP du FPP. Le carbocation obtenu est sujet à diverses modifications, réarrangements et/ou cyclisations avant déprotonation finale, par la perte d'un proton ou réaction avec une molécule d'eau. Les numéros d'atomes de carbone utilisés font référence à la numérotation du FPP initial. Les flèches en pointillés indiquent une succession d'étapes de la réaction. *W-M shift* : réarrangement de Wagner–Meerwein.

La biosynthèse des sesquiterpènes débute, de la même manière que celle des monoterpènes, par une rupture de la liaison C-OPP qui génère un carbocation (Figure 5). Le carbocation peut directement s'isomériser (sans re-phosphorylation), donnant deux carbocations à l'origine des sesquiterpènes : le carbocation farnésyl (E,E) et le carbocation nérolidyl (Z,E). Plus rarement, un troisième type de carbocation, (Z,Z) est formé (Figure 3) (Christianson, 2017). Comme les monoterpènes, les sesquiterpènes sont ensuite formés par une succession de réactions intramoléculaires, qui se termine par une déprotonation. Une déprotonation directe du cation farnésyl ou nérolidyl par perte d'un proton simple ou par une réaction avec une molécule d'eau donne respectivement des sesquiterpènes acycliques hydrocarbonées ou alcools. Pour ce qui est des sesquiterpènes cycliques, différents carbocations peuvent être formés suite à une première cyclisation des cations farnésyl et nérolidyl. Sept carbocations sont retrouvés et chacun est à l'origine de différents sesquiterpènes (Figure 5A). La production de la plupart des sesquiterpènes à partir de ces carbocations implique une succession de modifications, de réarrangements et/ou de cyclisations secondaires ou tertiaires. Dans certains cas, une reprotonation d'un intermédiaire stable peut être observé et conduit à la biosynthèse de nouveaux sesquiterpènes. Par exemple, le germacrene A, comme détaillé en Figure 5, peut-être reprotoné puis soumis à de nouvelles réactions permettant la formation de sesquiterpènes comme les aristolochènes ou le vétispiradiène.

Pour ce qui est de la biosynthèse des diterpènes, trois modes d'action peuvent être distingués (Figure 6) selon les diterpène synthases (diTSP) impliquées (MacMillan et Beale, 1999 ; Zerbe et Bohlmann, 2015 ; Zi, Mafu et Peters, 2014). Chez les diTSP dites de classe I (*class I*), le mécanisme est identique à celui décrit chez les sesquiterpènes : le GGPP est déphosphorylé par ionisation et suite à différents réarrangements intramoléculaires la réaction est terminée par une déprotonation, formant ainsi des composés tel que le taxadiène ou le géranylinalol. Les diTSP de classe II (*class II*) entraîne par contre une protonation du GGPP conduisant à une première cyclisation du GGPP et la formation d'un composé phosphorylé : le plus souvent il s'agit du copalyl diphosphate (CPP) mais cela peut être par exemple le labda-15-en-8-ol diphosphate (LPP), lorsque la réaction est terminée par une oxygénation et non un déprotonation (Karunanithi et Zerbe, 2019 ; Zhou et Pichersky, 2020). Le CPP constitue un intermédiaire phosphorylé de la biosynthèse des diterpènes puisqu'il est un substrat des diTSP de classe I : les diTSP de classe I peuvent catalyser la formation de diterpènes à partir du GGPP comme du CPP. Comme avec le GGPP, la réaction est initiée par ionisation du CPP et permet la production d'autres diterpènes, comme le kaurène, qui par la suite sont impliqués dans la production de phytohormones, telles que les gibbérellines (Hedden et Thomas, 2012 ; Sakamoto *et al.*, 2004). Un troisième mécanisme de formation des diterpènes correspond au mécanisme des diTSP bifonctionnelles. Contrairement au diTSP de classe I ou de classe II, les diTSP de classe II/I possèdent deux sites actifs, ce qui permet la formation de CPP et sa déphosphorylation en une seule étape enzymatique (mécanisme indiqué en gris en Figure 6). Ces enzymes conduisent notamment à la formation de diterpènes comme l'abiétadiène, précurseur de l'acide abiétique retrouvé dans les résine de conifères (Lewinsohn *et al.*, 1993 ; Peters *et al.*, 2000).

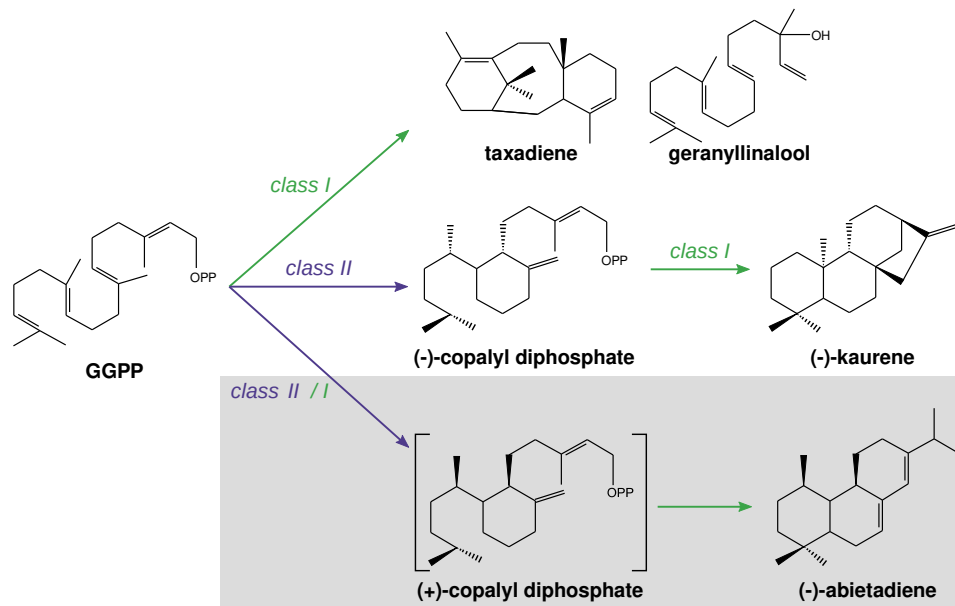


Figure 6 | Mécanismes de formations des diterpènes

Le schéma a été adapté de Tholl *et al.* (2006) et Davis et Croteau (2000). GGPP : géranyl-géranyl diphosphate ; OPP : groupement diphosphate. La classe de diterpène synthèses impliquées dans les différentes étapes est indiquées en vert pour les classe I et en violet pour les classe II. Les diterpènes peuvent être produits à partir du GGPP ou à partir du copalyl diphosphate (CPP), lui-même produit par une diterpène synthase (CPP synthase). La voie indiquée en gris correspond au mécanisme d'une diterpène synthase bifonctionnelle (de classe II/I).

Les mécanismes de biosynthèse des mono-, sesqui- et di-terpènes mettent en exergue la diversité des mécanismes possibles pour la production de terpènes chez les plantes. La synthèse de ces différents terpènes dépend de la longueur de la chaîne isoprénique initiale mais également de l'instabilité des carbocations, qui sont sujets à de nombreuses réactions intramoléculaires se succédant dans un même site actif. La diversité des mécanismes que les mono- et sesqui-terpène synthases (mTPS et sTPS) sont capables de réaliser est en grande partie responsable de la diversité de composés produits à partir d'un même substrat (GPP ou FPP).

Par ailleurs, les terpènes sont sujets à des modifications secondaires (réduction, oxydation, hydroxylation, déshydrogénation, méthylation, époxydation, estérification, glycosylation) qui viennent accroître la diversité des composés terpéniques. Les terpènes et leurs dérivés sont souvent regroupés sous le terme de terpénoïdes et peuvent présenter des groupes fonctionnels variés. Bien que cela ne soit pas le cœur de sujet de ce tapuscrit, les terpénoïdes ont de nombreuses fonctions chez la plante (Dudareva, Pichersky et Gershenzon, 2004 ; Gershenzon et Dudareva, 2007 ; Pichersky, Noel et Dudareva, 2006). Leur diversité offre un grand intérêt en écologie chimique : pour l'attraction plus ou moins sélective de pollinisateurs ou à l'inverse la répulsion de nuisibles (Abbas *et al.*, 2017 ; Cheng *et al.*, 2007 ; Das *et al.*, 2013 ; Pichersky et Gershenzon, 2002). Les terpénoïdes sont impliqués dans des mécanismes de défense directe et indirecte. Ces molécules ont des propriétés thermotolérantes et antioxydante face aux stress biotiques et abiotiques (Copolovici *et al.*, 2005 ; Delfine *et al.*, 2000 ; Loreto *et al.*, 1998 ; Munné-Bosch et Alegre, 2003) et constituent également des molécules de signal, responsables de l'induction de cascades réactionnelles en réponse au stress (Cheng *et al.*, 2007 ; Das *et al.*, 2013 ; Fürstenberg-Hägg, Zagrobelny et Bak, 2013).

Dans la suite de l'introduction nous nous restreindrons aux voies conduisant aux terpénoïdes volatils, les mono- et sesqui-terpénoïdes, qui constituent la majorité des odeurs produites par le pélargonium. Par ailleurs, nous nous focaliserons sur les enzymes de la famille des *TPS* impliquées dans leur production. Il est néanmoins important d'évoquer l'existence de voies alternatives et notamment la formation de terpènes par déphosphorylation du GPP par une nudix hydrolase (NUDX) conduisant au géranyl phosphate (GP) qui serait secondairement déphosphorylé pour donner du géraniol (Magnard *et al.*, 2015). Cette voie alternative à la formation d'un terpène alcool comme le géraniol chez la rose semble être en fait plus répandue. Récemment, l'implication d'une NUDX dans la formation du chrysanthémol a été mentionné chez *Tannacetum cinerarifolium* (Li *et al.*, 2020).

2 Structure et évolution des terpène synthases

2.1 Des motifs conservés

L'analyse comparative des premières séquences de *TPS* a rapidement montré qu'aucune règle de corrélation ne peut être établie entre la structure primaire et la fonction catalytique. Des *TPS* de la même espèce peuvent partager 70 à 90 % d'identité de séquence, tout en ayant des fonctions distinctes alors que des *TPS* d'espèces différentes, ne partageant que 30 % de similarité, peuvent catalyser une même réaction (Trapp et Croteau, 2001). Il existe cependant un certain nombre de motifs conservés (séquences courtes d'acides aminés) caractéristiques des *TPS* (Gao, Honzatko et Peters, 2012). Ces motifs correspondent à des séquences d'acides aminés dont l'importance a pu être démontrée notamment suite à la cristallisation de protéines en interaction avec leur substrat. Parmi les différents motifs définis, le motif le plus caractéristique des *TPS* est le motif DDxxD (indiqué en bleu en Figure 7). Il se situe à l'entrée du site actif et sa présence est déterminante pour le positionnement du substrat dans la poche catalytique. Plusieurs expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que la modification de ce motif et notamment des deux premiers aspartates (D) conduit à une perte de l'activité enzymatique (Cane, Xue et Fitzsimons, 1996). La modification du dernier aspartate semble moins déterminante. Chez certaines enzymes il est d'ailleurs remplacé par un acide glutamique (E) donnant ainsi un motif DDxxE (Crocoll *et al.*, 2010 ; Jullien *et al.*, 2014). Localisé au fond du site actif, un autre motif Rxx(N,D)Dxx(S,T,G)xxxE (désigné NSE/DTE) regroupe trois acides aminés (Figure 7A&C) qui sont impliqués, comme les aspartates du premier motif, dans des liaisons avec une triade d'ions magnésium (Mg^{2+}) (Christianson, 2006 ; Durairaj *et al.*, 2019). Ces ions Mg^{2+} sont des cofacteurs qui se lient avec le groupement diphosphate du substrat et induisent l'ionisation du substrat (rupture de la liaison C-OPP) (Tarshis *et al.*, 1996 ; Tarshis *et al.*, 1994). Une trentaine d'acides aminés en amont du motif DDxxD, le motif RxR fait également parti des motifs hautement conservés et est impliqué dans la complexation du groupement diphosphate après ionisation (Starks *et al.*, 1997). Enfin, un motif RR(x)₈W situé environ 60 acides aminés après la méthionine de départ, fait partie des motifs caractéristiques des *TPS* pour son rôle dans la cyclisation des monoterpènes. Ce motif semble indispensable pour isomériser le GPP en linalyl diphosphate (Figure 4, Williams *et al.*, 1998) et est donc particulièrement retrouvé chez les mTPS catalysant la biosynthèse d'un carbocation cyclique. Son

absence conduit donc uniquement à la production de monoterpènes acycliques (myrcène, linalol, géraniol, Figure 4B). En amont de ce motif, peut se trouver un peptide signal, c'est-à-dire une courte séquence d'acides aminés destinée à diriger les protéines vers leur lieu d'action. Notamment chez les mTPS, un peptide d'adressage platisdial est couramment retrouvé (Bohlmann, Meyer-Gauen et Croteau, 1998 ; Williams *et al.*, 1998) et permet de diriger ces enzymes dans le plaste, où est produit le GPP. Tandis que les sTPS, dépourvues de peptide d'adressage, sont actives dans le cytosol où est produit le FPP.

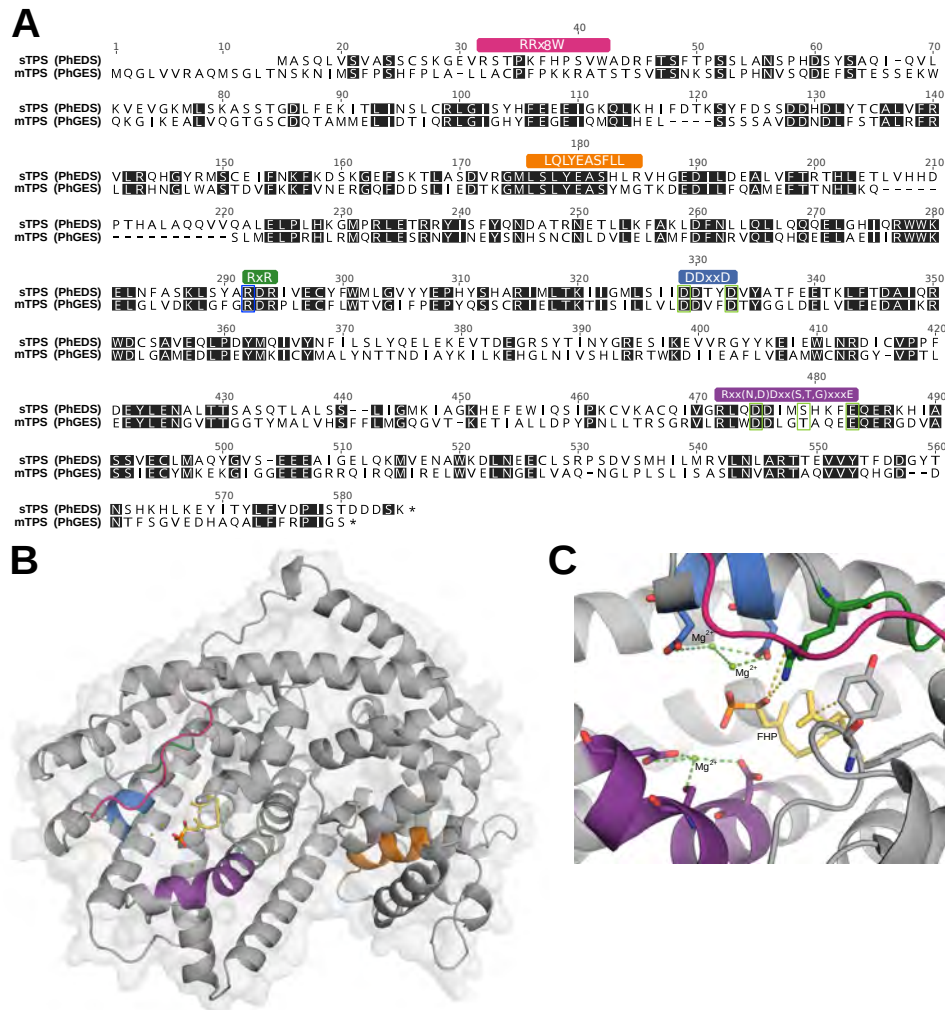


Figure 7 | Observation des motifs conservés chez les TPS : (A) Alignement protéique de deux TPS et (B) représentation tri-dimensionnelle d'une sTPS. (C) Détail du site actif d'une sTPS et des acides aminés impliqués dans la liaison au substrat et aux ions Mg^{2+}

(A) L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel Geneious®. Pour illustrer les motifs conservés chez les TPS, deux TPS caractérisées au cours de nos travaux chez le pélagonium (Blerot *et al.*, 2018) ont été alignées : une mTPS, la géraniol synthase (PhGES) et une sTPS, l'eudesmol synthase (PhEDS). Les motifs caractéristiques des TPS sont identifiés. Les acides aminés des motifs impliqués dans les liaisons avec le substrat (bleu) et les ions Mg^{2+} (vert) sont encadrés. (B,C) Les représentations tri-dimensionnelles ont été réalisées à l'aide du logiciel Pymol™. La protéine présentée correspond à la PhEDS modélisée en utilisant comme référence le modèle [SEAT](#) de la 5-épi-aristolochène synthase de *Nicotiana tabacum* (TEAS), cristallisée en présence de FHP (farnésyl hydroxyphosphonate, analogue au FPP) (Starks *et al.*, 1997). La surface de la protéine est visible en gris pâle (B) et la structure tertiaire est représentée en 'cartoon'. Les motifs caractéristiques de l'alignement (A) sont indiqués. Le FHP et les acides aminés impliqués dans les liaisons au substrat ou aux ions Mg^{2+} (sphères vertes) sont représentés en bâton : les atomes de carbones sont en gris pour la protéine (ou de la couleur du motif correspondant) et en jaune pour le FHP. Les atomes d'oxygène sont en rouge, les atomes de nitrogène en bleu et les atomes de phosphore en orange.

2.2 Cristallisation, mutagenèse dirigée

De nombreuses TPS de plantes ont été cristallisées, la première étant une sTPS, la 5-épi-aristolochène (TEAS) de tabac (Starks *et al.*, 1997). La cristallisation de mTPS comme la bornyl diphosphate synthase de sauge (Whittington *et al.*, 2002) et la limonène synthase de menthe (Hyatt *et al.*, 2007) ainsi que celle de diTPS telle que la taxadiène synthase de l'if (Köksal *et al.*, 2011) ont suivi. La cristallisation de ces enzymes a permis de mieux comprendre les mécanismes réactionnels en jeu dans le site actif. Chez les mTPS et sTPS d'angiospermes, ces mécanismes se déroulent en trois étapes : i) positionnement du substrat dans le site actif et déphosphorylation, ii) stabilisation du carbocation formé, iii) déprotonation et formation du ou des produit(s).

Grâce à la représentation tri-dimensionnelle des protéines cristallisées et ensuite la modélisation protéique en les utilisant comme référence, l'organisation des acides aminés des motifs conservés et du site catalytique peut être étudiée. Cela permet d'identifier les acides aminés impliqués dans l'environnement catalytique du carbocation, de sa formation à sa déprotonation finale. Sur la base de ces observations, la mutagenèse dirigée a permis de mettre en relation l'importance de ces acides aminés dans la fonction des TPS : les mutations induisant des modifications fonctionnelles voire la perte de fonction ont mis en évidence le rôle d'acides aminés clés (Figure 7) (Gennadios *et al.*, 2009 ; Vedula *et al.*, 2008).

Les études par cristallographie de la TEAS, une des TPS les plus étudiées aujourd'hui, a permis d'appréhender l'ensemble du mécanisme enzymatique à l'origine de la production d'aristolochène et sur cette base, les acides aminés impliqués dans les différentes étapes réactionnelles ont été identifiés (Starks *et al.*, 1997). Par exemple, un acide aminé aromatique, un tryptophane (W) proche du site actif et très conservé chez les TPS (Srividya *et al.*, 2015), semble jouer un rôle prédominant dans le positionnement du substrat. Cet acide aminé participerait au maintien du carbocation à l'écart du PPI libéré, évitant ainsi que la réaction ne se termine de manière prématurée. Sa mutation chez la limonène synthase de *Mentha spicata* (W324) empêche en effet la stabilisation du carbocation et conduit à la production de terpènes acycliques. Le rôle des acides aminés polaires dans la stabilisation du carbocation a été également démontré dans l'étude du fonctionnement de la limonène synthase chez la menthe verte (J. Xu *et al.*, 2017a). La substitution de seulement trois acides aminés du site actif (dont une sérine et une asparagine) par des alanines, induit une modification de l'environnement électronique autour du cation α -terpinyll et cette instabilité électronique conduit à la cyclisation en pinyl cation (Figure 4A). Le changement de trois acides aminés dans le site actif suffit donc pour transformer une limonène synthase en pinène synthase. De la même manière, chez la pinène synthase du sapin géant, deux acides aminés, une sérine (S485) et une cystéine (C480), sont responsables de la déprotonation du cation pinyl (Hyatt et Croteau, 2005). Des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que, selon l'accepteur de proton, de l' α -pinène ou du β -pinène sera produit (Figure 8). La compétition entre ces deux acides aminés est déterminante pour le ratio final de pinènes.

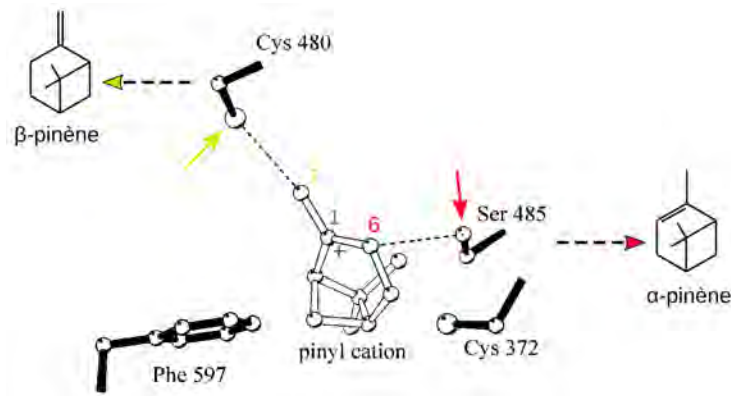


Figure 8 | Illustration de la compétition inter-acides aminés dans la déprotonation du cation pinyl chez la pinène synthase du sapin géant

La figure a été adaptée de Hyatt & Croteau (2005) et correspond à une représentation modélisée du site actif de la pinène synthase du sapin géant, afin d'observer la position du cation pinyl par rapport à des acides aminés du site catalytique. Les flèches de couleur indiquent les acides aminés capables de déprotoner le cation pinyl et plus précisément leurs groupements

responsables de leur électronégativité. La flèche jaune indique donc l'atome de soufre de la cystéine (Cys480 ou C480) aligné avec le carbone 7 (C7) du carbocation, responsable de la formation de β -pinène. La flèche rouge indique l'atome d'oxygène de la sérine (Ser485 ou S485) aligné avec le C6 du carbocation, responsable de la formation d' α -pinène. Les flèches en pointillés indiquent le produit formé selon l'accepteur final de proton.

Cependant, malgré l'élucidation de la relation structure-fonction de certains mécanismes, certaines relations restent difficiles à décrypter. En effet, l'identification de ces relations requiert l'analyse de nombreux acides aminés ainsi que de leur effets synergiques et celles-ci n'expliquent pas nécessairement l'intégralité du fonctionnement de l'enzyme. En reprenant l'exemple des travaux sur la pinène synthase du sapin géant (Hyatt et Croteau, 2005), bien que les segments de séquences impliqués dans le mécanisme catalytique soit connus, des permutations de ces segments entre la pinène synthase et une camphène synthase ne permettent pas d'obtenir la pinène synthase avec la fonction de la camphène synthase. Chez la TEAS, des mutations effectuées sur des acides aminés en dehors du site actif mais altérant son architecture, conduisent à des modifications des propriétés catalytiques (Greenhagen *et al.*, 2006) tandis qu'une analyse combinatoire de mutagenèse dirigée sur neuf acides aminés du site actif a montré qu'aucun n'était plus important qu'un autre pour déterminer le produit formé (O'Maille *et al.*, 2008).

Une phylogénie des mTPS et sTPS basée uniquement sur la séquence protéique du site actif n'a pas permis de séparation selon leur fonction. Seul les mTPS catalysant la synthèse de monoterpènes acycliques appartiennent à la même sous-famille, celle des TPS-g et présentent des similarités de séquences fortes (Chen *et al.*, 2011). À défaut d'une prédiction de la fonction par analyses phylogéniques, une analyse de 200 sites des séquences protéiques de plus de 250 sTPS de plantes a récemment mis en avant un regroupement des sTPS en fonction de leur mécanisme enzymatique (Durairaj *et al.*, 2019). Bien que la séparation obtenue soit imparfaite, les enzymes tendent à se regrouper selon le carbocation obtenu à l'issue de la première cyclisation du substrat (Figure 5A). Par ailleurs, une séparation phylogénétique similaire a été retrouvée dans l'analyse ciblée des TPS de Poacées (Luck *et al.*, 2020).

2.3 Sous-familles et phylogénie

Les premières études sur les TPS ont mis en évidence la présence de motifs caractéristiques conservés au sein de la séquence protéique, des réactions catalytiques analogues ainsi qu'une organisation génétique similaire avec notamment un nombre identique d'introns, suggérant une

origine évolutive commune à cette famille (Cseke, Dudareva et Pichersky, 1998 ; Mau et West, 1994). Par la suite, une analyse de 33 TPS de gymnospermes et d'angiospermes a permis de définir différents clades (ou sous-familles) rassemblant des mTPS (TPS-b), des sTPS et diTPS d'angiospermes (TPS-a) et des TPS de conifères (TPS-d) (Bohlmann, Meyer-Gauen et Croteau, 1998) (Figure 9).

En ce qui concerne les diTPS, elles sont regroupées dans différents clades : les diTPS de classe I sont retrouvées dans les sous-familles TPS-a, TPS-d et TPS-e tandis que les diTPS de classe II forment la sous-famille des TPS-c.

Les TPS du métabolisme primaire sont regroupées dans les sous-famille de TPS-c et TPS-e comprenant respectivement les copalyl diphosphate synthases et la kaurène synthase qui sont impliquées dans les premières étapes de la biosynthèse de phytohormones de la famille des gibbérellines (Hedden et Thomas, 2012). Les TPS d'angiospermes et de gymnospermes impliquées dans le métabolisme spécialisé se regroupent dans les autres sous-familles. Cette distinction a initié l'hypothèse d'une séparation évolutive entre métabolisme primaire et métabolisme spécialisé, apparue avant la divergence évolutive entre les embranchements des gymnospermes et des angiospermes. Quelques années plus tard, cette structuration des TPS a été confirmée par les travaux de S. Trapp et R. Croteau (2001). Une comparaison de l'organisation génomique de différentes TPS a montré qu'une duplication du gène d'une TPS ancestrale, proche des diTPS de gymnospermes actuelles, a probablement conduit à une évolution divergente entre les TPS impliquées dans le métabolisme primaire et le métabolisme spécialisé. L'évolution des TPS du métabolisme spécialisé s'étant caractérisée par la perte successive d'introns et d'exons (Figure 10) et la profusion de duplications et mutations fonctionnelles (Bohlmann, Meyer-Gauen et Croteau, 1998 ; Trapp et Croteau, 2001). Ce principe évolutif a rapidement été corroboré et étayé par l'observation de duplication en tandem générant des clusters de gènes de TPS (Aubourg, Lecharny et Bohlmann, 2002). Ces mécanismes de duplication, accompagnés de mutations, ont favorisé une évolution rapide ainsi que l'apparition de nombreuses TPS et de nombreux pseudogènes. Enfin, parmi les analyses de séquence de TPS, les similarités observées entre des TPS exprimées dans le cytosol ou le plaste suggèrent que certaines duplications ont été accompagnées par la perte du peptide d'adressage. Chez la lavande, une limonène synthase (LaLIMS) et une bergamotène synthase (LaBERS) présentent des séquences hautement similaires et les deux TPS appartiennent à la sous-famille des TPS-b. Pour autant, chez LaBERS le peptide d'adressage au plaste est absent (Landmann *et al.*, 2007). *In vivo*, LaBERS catalyse la production de sesquiterpènes alors que LaLIMS catalyse la production de monoterpènes. Étant donné la production plastidiale du GPP et cytosolique du FPP, la perte du peptide d'adressage par duplication constitue une autre source de diversité fonctionnelle des TPS.

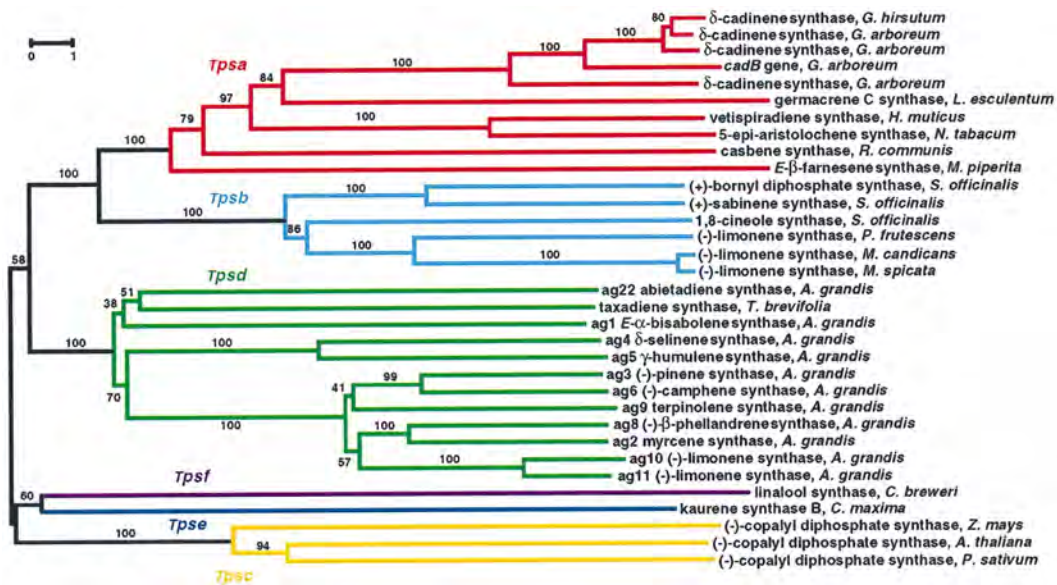


Figure 9 | Arbre phylogénétique des TPS de plantes, Bohlmann et al. (1998)

L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide des distances protéiques de Dayhoff et la méthode *neighbour joining*. Les couleurs font référence aux sous-familles de gènes *tps-a* à *tps-f* définies. L'échelle indiquée correspond à 1 % de divergence de séquences. Les valeurs de bootstrap sont indiquées sur les branches.

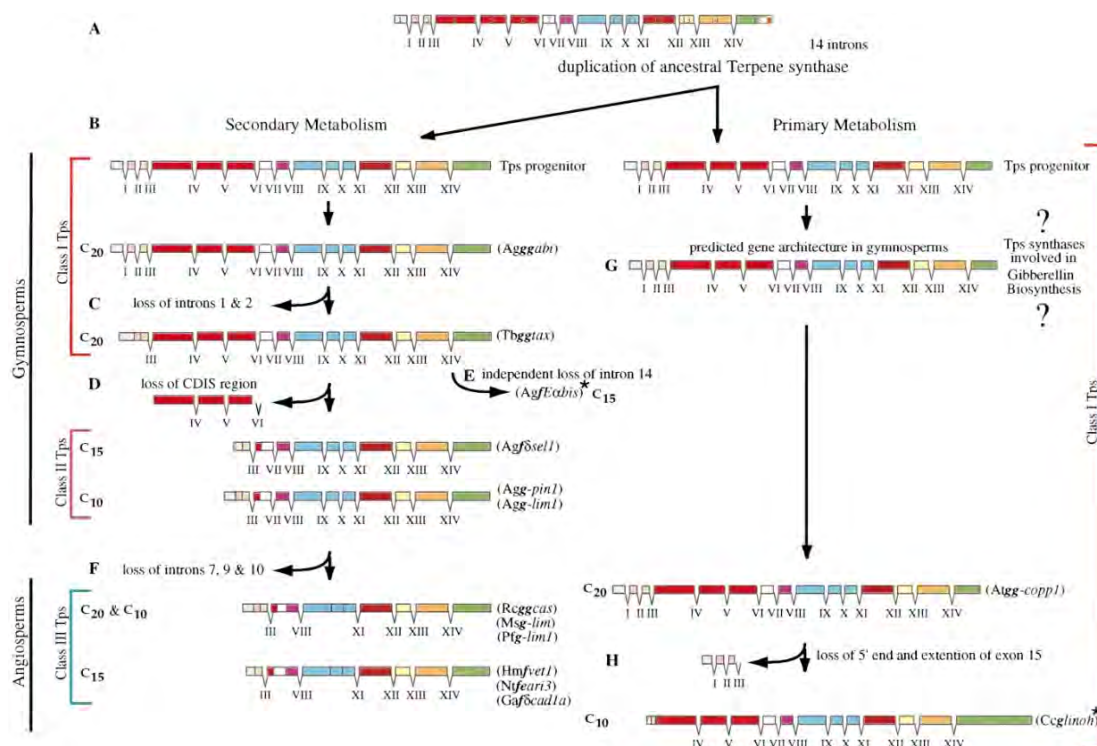


Figure 10 | Schéma de l'évolution des TPS de plantes telle que proposée par Trapp & Croteau (2001)

Le schéma évolutif indique qu'une TPS ancestrale serait à l'origine des TPS des métabolismes primaire et spécialisé. L'architecture présumée de ce gène ancestral (A) se constitue de 12-14 introns (bloc de couleurs) et de 13-15 exons (chiffres romains), soit une structure proche de celles des *diTPS* de gymnospermes actuelles. Après duplication du gène ancestral, les TPS impliquées dans le métabolisme primaire et celles impliquées dans le métabolisme spécialisé auraient évolué séparément (étapes hypothétiques B-H), au travers de duplications successives. Dans le métabolisme spécialisé (*Secondary Metabolism*), l'évolution des TPS aurait conduit aux *diTPS* de gymnospermes (*Class I TPS* sur la figure) puis aux *mTPS* et *sTPS* de gymnospermes (*Class II TPS*, sur la figure) suite à la perte d'introns et notamment du domaine CDIS (*conifer diterpene internal sequence*, constitué de 3 introns et 3 exons), retrouvés uniquement chez les *diTPS* de conifères. Enfin, celles-ci auraient conduit aux *mTPS* et *sTPS* d'angiospermes (*Class III TPS*, sur la figure), suite à la perte de 3 introns supplémentaires. La divergence entre les TPS de gymnospermes et d'angiospermes ayant eu lieu deux fois : lors de l'évolution des TPS du métabolisme primaire et de l'évolution des TPS du métabolisme spécialisé.

L'étude de la phylogénie des TPS a fait régulièrement l'objet d'articles de mise au point au fil des nouvelles découvertes (Chen *et al.*, 2011 ; Dudareva *et al.*, 2003 ; Karunanithi et Zerbe, 2019 ; Martin, Fäldt et Bohlmann, 2004 ; Tholl, 2006). La famille des TPS, qui au départ comportait quatre sous-familles bien définies, s'est enrichie au fil de la caractérisation de nouvelles enzymes. Ainsi, trois autres sous-familles, les TPS-e/f TPS-g et TPS-h ont été identifiées (Figure 11). Le groupe des TPS-g est assez caractéristique puisqu'il est constitué de mTPS qui ne catalysent que la production de terpènes acycliques comme le myrcène, le linalol ou le nerolidol. Toutes ces enzymes ont perdu le motif protéique RR(x)₆W qui semble être nécessaire pour la re-phosphorylation du cation géranyl en linalyl-diphosphate (Figure 4). Cette sous-famille a notamment été abondée par la caractérisation de la myrcène synthase chez le muflier (Dudareva *et al.*, 2003). Par la suite, d'autres mTPS, sTPS ou diTPS produisant des composés acycliques comme le linalol, le géraniol, le nérolidol et le géranyl-linalol ont rejoint cette sous-famille (Martin *et al.*, 2010). Les TPS-e/f regroupent majoritairement des diTPS de classe I, catalysant la formation de diterpènes à partir du GGPP ou du CPP. Cette sous-famille est très proche des TPS-c qui regroupent essentiellement des diTPS de classe II et des diTPS bi-fonctionnelles. Enfin les TPS-h correspondent à des diTPS bi-fonctionnelles putatives, caractérisées chez une sélaginelle (Chen *et al.*, 2011 ; Karunanithi et Zerbe, 2019).

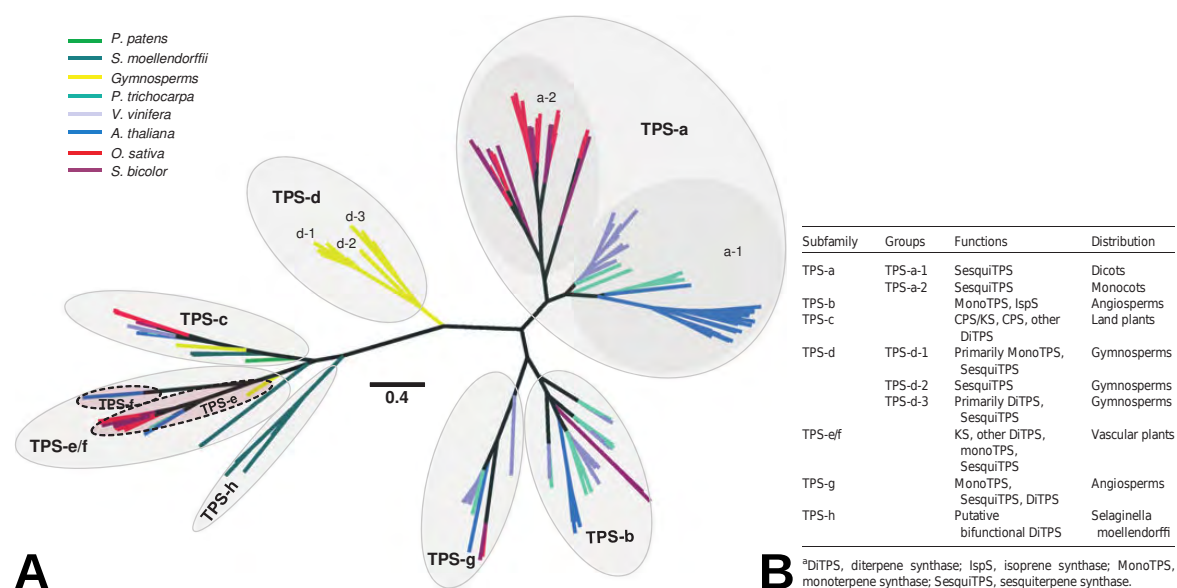


Figure 11 | Classification des TPS de plantes selon Chen *et al.* (2011)

(A,B) Illustrations de Chen *et al.* (2011). L'arbre phylogénétique (A) a été réalisé à partir des séquences codantes de TPS putatives issues des génomes séquencés de sept plantes et des séquences représentatives de TPS caractérisées chez différents gymnospermes. L'identification des sous-familles repose sur les clades observés et les fonctions des différentes TPS de chaque clade. Les caractéristiques de chaque clade sont récapitulées dans le tableau (B).

En conclusion, l'arbre des TPS comprend des sous-familles qui se distinguent par grands groupes de végétaux – comme la sous-famille des TPS-d caractéristiques des gymnospermes – mais aussi par des mécanismes catalytiques particuliers – comme la sous-famille des TPS-g spécifique de la formation de terpènes acycliques chez les angiospermes. Ces deux facteurs évolutifs peuvent être couplés, comme chez les TPS-a qui codent majoritairement des sTPS d'angiospermes et qui ont été secondairement séparés en deux sous-clades, TPS-a1 et TPS-a2,

distinguant les TPS de dicotylédones et de monocotylédones (Figure 11). À ce jour, la famille des TPS a été étudiée dans son ensemble chez de nombreuses espèces dont l'arabette des dames (Chen *et al.*, 2011), le sorgho commun (Paterson *et al.*, 2009), la vigne (Martin *et al.*, 2010), la tomate (Falara *et al.*, 2011), la pomme (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013), le peuplier de l'Ouest (Irmisch *et al.*, 2014), l'eucalyptus (Külheim *et al.*, 2015), l'oranger (Alquézar *et al.*, 2017), la carotte (Ibdah *et al.*, 2019 ; Keilwagen *et al.*, 2017), le cannabis (Allen *et al.*, 2019) et le théier (Zhou *et al.*, 2020).

2.4 Un scénario d'évolution moléculaire

Les analyses par cristallographie des TPS ont démontré deux types d'architecture chez les TPS de plantes : en deux ($\alpha\beta$) ou trois domaines ($\alpha\beta\gamma$) protéiques, avec un ou deux site(s) actif(s) (α et/ou β) (Figure 12, Figure 13) (Christianson, 2017). Le domaine α contient le motif DDxxD, permettant la coordination des ions Mg^{2+} et la déphosphorylation du substrat (GPP, FPP ou GGPP notamment) par ionisation (Cane, Xue et Fitzsimons, 1996) qui définit les TPS de classe I (Wendt et Schulz, 1998). Le domaine β contient lui le motif DxDD, permettant une protonation du substrat (Davis et Croteau, 2000 ; Köksal *et al.*, 2014 ; Peters, 2010) qui définit les TPS de classe II (Wendt et Schulz, 1998). Le site actif du domaine β contenant ce motif se trouve plus exactement à l'interface des domaines β et γ (Köksal *et al.*, 2011) et le domaine γ ne possède pas de site actif (Figure 12).

Lorsque seul le domaine α est fonctionnelle, les TPS sont dites de classe I, *a contrario* des TPS de classe II, possédant un site actif uniquement dans le domaine β (Cao *et al.*, 2010 ; Oldfield et Lin, 2012). Il existe des TPS bi-fonctionnelles (Figure 6), des diTPS de classe II/I, constituées des trois domaines avec les deux domaines (α et β) fonctionnels (Zhou *et al.*, 2012). Elles correspondent aux sous-familles des TPS-h et des TPS-d (Figure 13). La majorité des TPS sont des TPS monofonctionnelles de classe I ou II. Les TPS de classe II (site actif du domaine α inactif) correspondent à des diTPS également constituées de trois domaines ($\alpha\beta\gamma$) qui constituent la sous-famille des TPS-c, responsables de la synthèse d'intermédiaires phosphorylés tel que le copalyl diphosphate. Chez les plantes, les TPS de classe I (site actif du domaine β inactif) peuvent être constituées de deux ($\alpha\beta$) ou trois domaines ($\alpha\beta\gamma$). Les mTPS et sTPS de plantes étant des TPS de classe I, constituées de deux domaines ($\alpha\beta$).

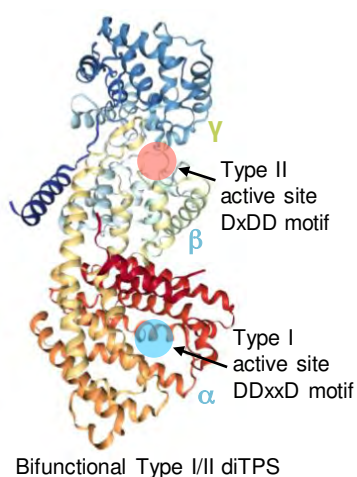


Figure 12 | Architecture et domaines des TPS de plantes, illustré avec une diTPS bifonctionnelle (Zhou & Pichersly, 2020)

L'enzyme représentée correspond à une diTPS bifonctionnelle, l'abiétadiène synthase d'*Abies grandis* (PDB : 369V ; Zhou *et al.*, 2012). Les trois domaines α , β et γ des TPS de plantes sont indiqués. Le domaine conservé DDxxD du site catalytique du domaine α , caractéristique des TPS de classe I (Type I), est indiqué en bleu. Le domaine conservé DxDD du site actif du domaine β , caractéristique des TPS de classe II (Type II), est indiqué en rouge. Seules les TPS bi-fonctionnelles possèdent les deux sites actifs et certaines TPS de classe I sont dépourvues du domaine γ .

Chez les bactéries, la caractérisation de TPS a montré des architectures différentes (Liu *et al.*, 2014 ; Rudolph *et al.*, 2016 ; Yamada *et al.*, 2015) : les mêmes domaines α , β et γ sont retrouvés, avec des TPS de classe I constituées d'un unique domaine α (actif) ainsi que des TPS de classe II constituées d'un domaine β (actif) et d'un domaine γ . Un scénario d'évolution moléculaire a donc été proposé, expliquant la diversification des TPS chez les plantes à partir de deux types de TPS bactériennes (Figure 13) (Cao *et al.*, 2010 ; Karunanithi et Zerbe, 2019 ; Zhou et Pichersky, 2020). Comme suggéré par les analyses de phylogénie et d'architecture génomique des TPS, ce scénario repose sur la diversification des TPS après l'émergence de TPS bi-fonctionnelles. Celles-ci seraient apparues suite à une fusion de TPS bactériennes de différentes classes, à l'origine de l'architecture en trois domaines ($\alpha\beta\gamma$) avec deux sites actifs (indiqués par les motifs DDxxD et DxDD, Figure 13). De là, une évolution divergente après duplication aurait conduit à la perte d'activité d'un des deux domaines, entraînant selon le domaine affecté, l'apparition de TPS de classe I et de classe II. Par la suite, l'évolution rapide des mTPS et sTPS se serait accompagnée de la perte du domaine γ chez une TPS de classe I suivi de multiple événements de néo-fonctionnalisation et spécialisation à l'origine de leur diversité.

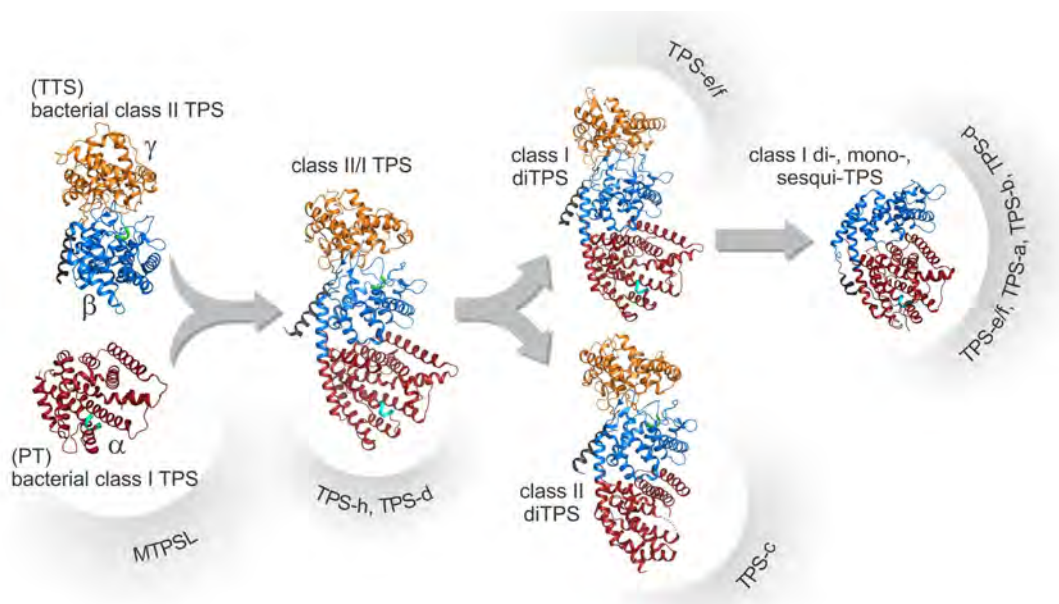


Figure 13 | Scénario évolutif des TPS tel que proposé par Karunanithi & Zerbe (2019)

Le scénario illustre les relations structurales et évolutives proposées chez les TPS de plantes. Les ancêtres des TPS de plantes proposés sont : une TPS de classe I constituée d'un unique domaine α (rouge), possédant un site actif, avec le motif DDxxD (cyan) et une TPS de classe II constituée des deux domaines β (bleu) et γ (orange), possédant un site actif avec le motif DxDD (vert), à l'interface des deux domaines. Le modèle protéique présenté pour la TPS bactérienne de classe I correspond à la kaurène synthase de *Bradyrhizobium japonicum* (PDB : 4W4R ; Liu *et al.*, 2014), proche de la prényltransférase ancestral (PT) et le modèle présenté pour la TPS bactérienne de classe II correspond à la CPP synthase de *Streptomyces platensis* (PDB : 5BP8 ; Rudolf *et al.*, 2016), proche des triterpène synthases ancestral (TTS). La fusion des ces deux gènes ancestraux aurait conduit à l'émergence de diTPS bi-fonctionnelles à trois domaines ($\alpha\beta\gamma$) représentées ici avec le modèle protéique de l'abiétadiène synthase d'*Abies grandis* (PDB : 369V ; Zhou *et al.*, 2012). Un événement de duplication et la perte d'activité subséquente dans le domaine α ou dans le domaine $\beta\gamma$ aurait entraîné l'apparition respectivement des diTPS de classe I représentées ici par le modèle protéique de la taxadiène synthase de *Taxus brevifolia* (PDB : 3P5P ; Köksal *et al.*, 2011) et des diTPS de classe II, représentées ici par le modèle protéique de la CPP synthase d'*Arabidopsis thaliana* (PDB : 4LIX ; Köksal *et al.*, 2014). L'évolution d'une diTPS de classe I et la perte du domaine γ auraient ensuite permis l'apparition des mTPS et sTPS.

L'histoire évolutive des *TPS* reste incomplète et encore récemment, des *TPS* de plantes ont démontré une proximité avec les *TPS* bactériennes supérieure à celle observée avec d'autres *TPS* de plantes (Jia *et al.*, 2016). Leur séquence et leur structure étant très proches de celles des *TPS* de classe I des bactéries, ces enzymes ont été regroupées dans un nouveau clade, les *MTPSL* (pour *Microbial TPS-Like*) (Jia *et al.*, 2018). Chez les bryophytes et les fougères, des *TPS* et des *MTPSL* sont retrouvées (Hayashi *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2012). En revanche, chez les algues vertes, (où les *TPS* semblent absentes (Jiang *et al.*, 2019)) et chez les plantes à graines (gymnospermes et angiospermes), les *MTPSL* sont absentes. L'évolution des *TPS* chez les plantes impliqueraient donc également une perte de ces *MTPSL* avec l'émergence des plantes à graines.

3 Synthèse de dérivés du géraniol, cas du citronellol

3.1 Du géraniol au citronellol

Après la formation de terpènes par les *TPS*, ces composés peuvent subir de nombreuses modifications secondaires (Dudareva, Pichersky et Gershenzon, 2004 ; Little et Croteau, 1999) telles que des réductions, époxydations, oxydations, hydroxylations et estérifications. Chez la menthe par exemple, l'isomenthone et la menthone sont des terpénoïdes dérivés d'un même monoterpène : le limonène (Davis *et al.*, 2005 ; Ringer, Davis et Croteau, 2005). Dans le cadre de notre étude, l'intérêt s'est focalisé sur la production de dérivés du géraniol et plus particulièrement la production de citronellol.

Le citronellol est un composé très prisé en parfumerie pour son odeur proche du parfum de rose. Chez l'orchidée *Caladenia plicata*, le citronellol produit participe à l'attraction des pollinisateurs. Chez d'autres espèces, ce même composé semble pouvoir jouer un rôle dans la défense contre des champignons (De Oliveira Pereira *et al.*, 2015) et des insectes (A. Ali *et al.*, 2013 ; M. Ben Ali *et al.*, 2013). Plus récemment, cette molécule a démontré un rôle potentiel comme agent anti-viral (Senthil Kumar *et al.*, 2020). Pour autant, chez la plupart des plantes productrices de citronellol, la voie de biosynthèse reste encore méconnue.

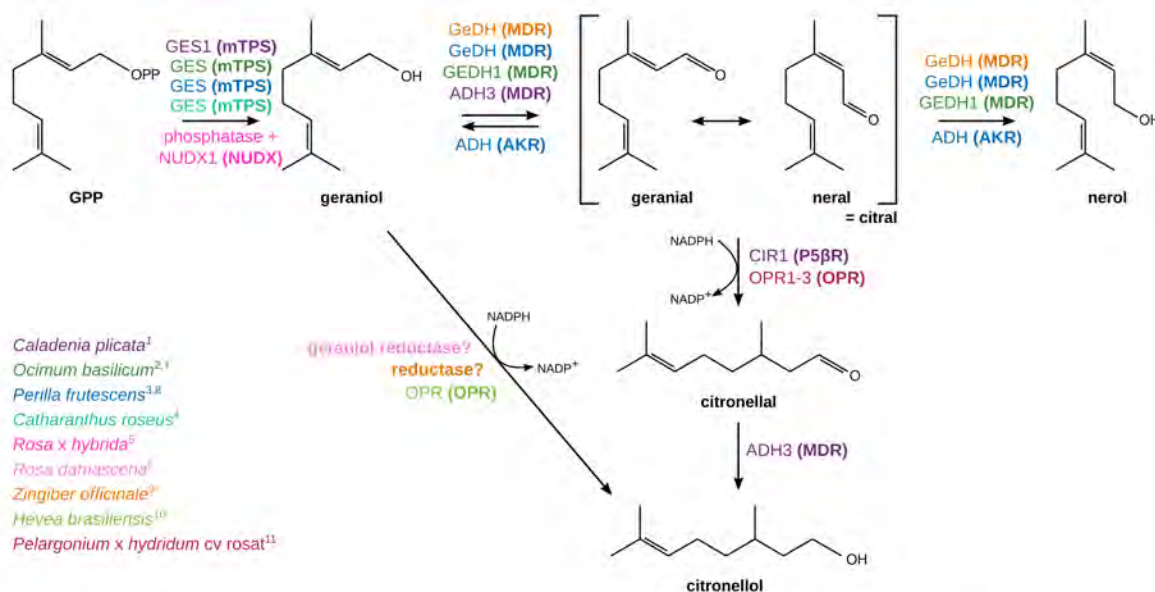
L'étude de la voie de biosynthèse du géraniol, a été conduite initialement avec des marqueurs radioactifs et des analyses de purifications partielles d'enzymes aussi bien pour valider l'origine des substrats conduisant au géraniol (IPP et DMAPP) que pour analyser les produits formés en aval du géraniol (Banthorpe & Le Patourel, 1972 ; Banthorpe et Poots, 1979 ; Potty et Bruemmer, 1970). Ces travaux ont montré que chez diverses plantes, tels que l'orange, la rose ou le pélargonium, la production de géraniol est liée à celle de nérol, de citral (mélange isomérique de géraniol et néral) et de citronellol. Un marquage de l'IPP chez le pélargonium conduisait à la fois à du géraniol et à du citronellol marqués (Suga et Shishibori, 1973). Une expérience similaire sur des purifications partielles d'enzymes a montré la présence d'alcool-déshydrogénases capables d'inter-converter géraniol et géraniol et a également suggéré la présence d'une géraniol réductase, transformant le géraniol directement en citronellol (Banthorpe, Long et Pink, 1983). Sur la base de ces premières observations, plusieurs hypothèses expliquant la production du citronellol à partir du géraniol ont été proposées et sont schématisées en Figure 14.

Concernant la synthèse du géraniol, sa conversion à partir du GPP se fait le plus souvent par une mTPS et de nombreuses géraniol synthases (GES)¹ ont été caractérisées chez différentes plantes (Dong *et al.*, 2013 ; Iijima *et al.*, 2004a ; Ito et Honda, 2007 ; Simkin *et al.*, 2013 ; H. Xu *et al.*, 2017b ; Yang *et al.*, 2005). Il est néanmoins à noter que chez certains organismes le géraniol peut être produit par une enzyme d'une autre famille, comme démontré chez la rose où une NUDX (RhNUDX1) est impliquée dans la formation du géraniol (Magnard *et al.*, 2015).

L'hypothèse d'une réduction du géraniol en citronellol en une seule étape enzymatique a été cautionnée par plusieurs travaux : chez la rose et l'orange, la présence d'une monoterpène réductase réduisant le nérol et le géraniol en citronellol a été rapidement présumée (Dunphy et Allcock, 1972 ; Potty et Bruemmer, 1970). Cette hypothèse a été confortée par la détection de géraniol et de citronellol produits chez des tomates transgéniques surexprimant une géraniol synthase (GES) (Davidovich-Rikanati *et al.*, 2007). Plus récemment un gène codant pour une réductase a été isolé chez l'hévéa (Yuan *et al.*, 2011). L'enzyme recombinante a été purifiée et son activité *in vitro* a montré qu'en présence de géraniol, cette enzyme catalyse la réduction du substrat en citronellol. Cette enzyme appartient à la famille des OPR (*12-OxoPhytodienolate Reductase*), des réductases homologues aux OYE (*Old Yellow Enzyme*) retrouvées chez les bactéries et les levures (Williams et Bruce, 2002). Les OPR sont des réductases NAD(P)H-dépendantes (nécessitant la présence du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) ou nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)) présentant une faible spécificité de substrat et ayant démontré une capacité à réduire le citral en citronellal (Figure 14, Durchschein *et al.*, 2012 ; Geu-Flores *et al.*, 2012 ; Hall *et al.*, 2008). Chez le pélagonium, plusieurs OPR ont été clonées mais leur activité *in vitro* n'a pas montré de production de citronellol à partir de géraniol. En revanche, elles ont démontré une activité de réduction du citral en (S)-citronellal en présence de NADPH (Iijima *et al.*, 2016).

Les deux grandes voies putatives pour la biosynthèse du citronellol sont donc : une voie en une seule étape par réduction directe du géraniol ou une voie en trois étapes impliquant la formation de deux intermédiaires : le citral et le citronellal. La seconde voie a été étudiée notamment chez le gingembre (Iijima *et al.*, 2014) et une orchidée (*C. plicata*, Xu *et al.*, 2017b). Cette voie implique une oxydation du géraniol en géraniol puis une réduction d'une double liaison C=C, transformant le géraniol en citronellal et enfin une réduction de ce dernier en citronellol (Figure 14). En revanche, chez le gingembre, les études de marquage suggèrent une cohabitation des deux voies (Iijima *et al.*, 2014).

¹ La liste présentée des enzymes impliquées dans la production de géraniol n'est pas une liste exhaustive.



1. Xu et al. (2017) ; 2. Iijima et al. (2004) ; 3. Ito & Honda (2007) ; 4. Simkin et al. (2013) ; 5. Magnard et al. (2015) ; 6. Dunphy & Allock (1972) ; 7. Iijima et al. (2006) ; 8. Sato-masumoto & Ito (2014) ; 9. Iijima et al. (2014) ; 10. Yuan et al. (2011) ; 11. Iijima et al. (2016)

Figure 14 | Résumé bibliographique des voies de biosynthèse putatives du géranol et du citronellol

Les deux grandes voies proposées débutent par la formation du géranol à partir du GPP. Une voie en une seule étape aurait lieu *via* une géranol réductase ou bien, la voie se ferait en trois étapes : une première oxydation du géranol *via* une ADH, suivi d'une réduction de la double liaison du citral (après équilibre de tautomérisation entre le géranial et le néral) et enfin une troisième et dernière étape de réduction du citronellal en citronellol également *via* une ADH. Différentes enzymes de chaque étape sont indiquées sur le schéma. Les références bibliographiques correspondantes sont données. Les familles enzymatiques sont indiquées entre parenthèses. GPP : géranol diphosphate ; GES : géranol synthase ; ADH : alcool déshydrogénase ; GeDH : géranol déshydrogénase ; AKR : *aldo-keto reductase* ; MDR : *medium-chain dehydrogenase/reductase* ; NAD(P)H : cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) ; OPR : 12-oxophytodienolate réductase ; P5βR : progestérone-5β-réductase. Les points d'interrogations indiquent que les enzymes évoquées n'ont pas été caractérisées, ou seulement partiellement.

Concernant la première étape d'oxydation du géranol en géranial, plusieurs alcool-déshydrogénases (ADH, souvent dénommées GeDH pour géranol déshydrogénase) ont été caractérisées, notamment chez *Zingiber officinale* (Iijima et al., 2014), *Ocimum basilicum* (Iijima et al., 2006) et *Perilla* sp. (Sato-Masumoto et Ito, 2014). Ces alcools déshydrogénases fonctionnent majoritairement avec du NADP⁺ et appartiennent à deux grandes familles de gènes : les MDR (de l'anglais *Medium-chain Dehydrogenase/Reductase*) et les AKR (de l'anglais *Aldo-Keto Reductase*). Ces enzymes peuvent également fonctionner comme réductase, en utilisant le géranial et le néral pour former respectivement du géranol et du nérol. La plupart de ces enzymes ont été caractérisées dans le cadre d'études focalisées sur la biosynthèse du citral ou du nérol et non du citronellol. Bien qu'il soit tout à fait possible que ces ADH soient également capables de réduire le citronellal en citronellol, cette activité n'a pas été testée. À ce jour, seul l'ADH caractérisée chez *C. plicata* a montré cette fonction (H. Xu et al., 2017b). Concernant la seconde étape de réduction du citral en citronellal, elle est réalisée chez *C. plicata* par une géranial réductase (CpGER1) de la famille des Progestérone-5β-Reductases (P5βR) et non par une OPR comme suggéré par la caractérisation *in vitro* de 3 OPR chez le pélagonium (Iijima et al., 2016).

Dans la suite de cet exposé, seul le cas des P5βR sera développé ; pour leur rôle putatif dans la biosynthèse du citronellol et plus largement pour leur rôle déjà connu dans les modifications secondaires de composés terpéniques.

3.2 Biosynthèse des cardénolides et iridoïdes et rôle des P5 β R

La famille des P5 β R a été initialement étudiée chez des plantes synthétisant des cardénolides (Gärtner, Keilholz et Seitz, 1994 ; Herl *et al.*, 2006 ; Munkert *et al.*, 2011). Ces composés font partie de la famille des glycosides cardiaques, connus pour leur rôle d'inhibiteur des pompes sodium-potassium (Na⁺-K⁺ ATPase) altérant la transmission nerveuse et affectant le rythme cardiaque chez les animaux (Schoner et Scheiner-Bobis, 2007). Certains cardénolides sont retrouvés chez les mammifères en tant qu'hormones de régulation de la pression artérielle et du rythme cardiaque. Chez les plantes (et certains animaux) ce sont des composés de défense, qui agissent comme des analogues d'hormones animales (Agrawal *et al.*, 2012 ; Dobler, Petschenka et Pankoke, 2011 ; Schoner et Scheiner-Bobis, 2007). Bien qu'ils soient retrouvés chez de nombreux organismes, les cardénolides sont principalement retrouvés chez les plantes et en particulier chez de nombreux membres de la famille des Apocynacées, comme le laurier rose.

Les cardénolides sont composés d'un aglycone dérivé de la voie des triterpènes (plus précisément du squalène), qui peut être ou non glycosylé (Figure 15). La structure de l'aglycone est stéroïdique, constitué d'un système cyclique à quatre cycles sur lequel est lié un lactone (groupement buténolide) (Agrawal *et al.*, 2012 ; Pan *et al.*, 2015). De la même façon que chez les iridoïdes, l'étape enzymatique initiale de la voie de biosynthèse des cardénolides est réalisée par une P5 β R, qui comme leur nom l'indique, réduit la progestérone en 5 β -pregane-3,20-dione en présence de NAD(P)H (Figure 15) (Gärtner et Seitz, 1993 ; Kreis, Hensel et Stuhlemmer, 1998). Cette réduction est également la première étape stéréospécifique de la voie, à l'origine de la configuration en 5 β retrouvée chez l'ensemble des cardénolides (Agrawal *et al.*, 2012 ; Bauer *et al.*, 2010 ; Herl *et al.*, 2006 ; Schönfeld *et al.*, 1985 ; Tschesche *et al.*, 1970). Les premières P5 β R impliquées dans la biosynthèse des cardénolides ont été caractérisées chez deux espèces de la famille des Scrofulariacées : *Digitalis lanata* et *D. purpurea* (Gärtner, Keilholz et Seitz, 1994 ; Herl *et al.*, 2006 ; Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010), deux digitales très étudiées pour leur production de digoxine et digitoxine utilisées dans le traitement d'insuffisances cardiaques (Kreis, Hensel et Stuhlemmer, 1998 ; Newman *et al.*, 2008 ; Sales *et al.*, 2011 ; Yang, Shah et Criley, 2012).

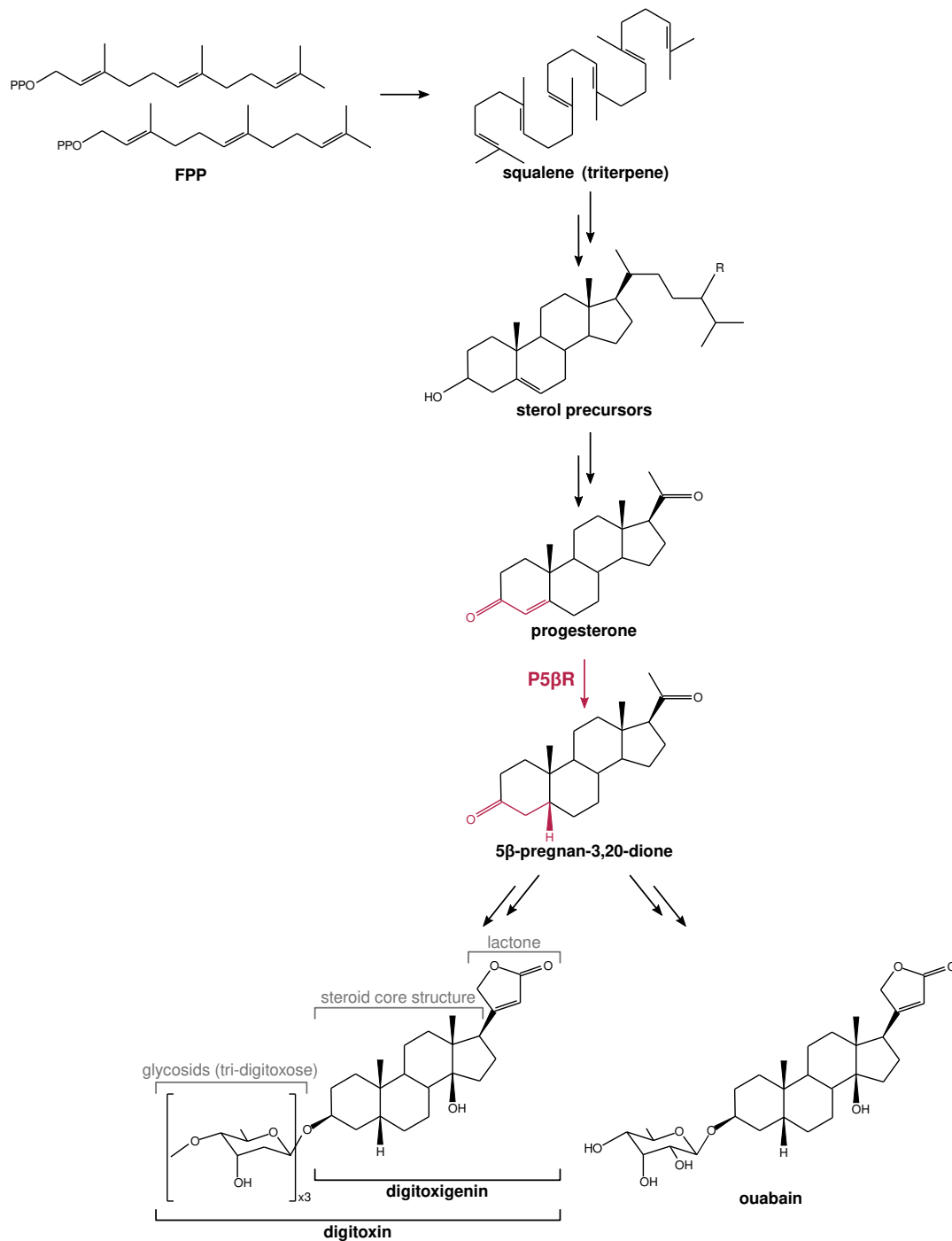


Figure 15 | Résumé de la voie de biosynthèse des cardénolides chez les plantes

Les cardénolides sont dérivés de la voie des triterpènes. Le squalène est produit par la condensation de deux molécules de FPP et est à l'origine des phytostérols et leurs dérivés, telle que la progestérone. La réduction de la progestérone par une P5βR (indiquée en rouge) correspond à une étape cruciale de la biosynthèse des cardénolides : c'est l'étape initiale de la voie des cardénolides *per se* et la réduction de la double liaison par une 5β-réductase est la première étape stéréospécifique à l'origine de la configuration 5β des cardénolides. Les cardénolides sont donc des dérivés du 5β-pregnan-3,20-dione, lié à un groupement lactone à cinq carbones (groupement buténolide). Certains cardénolides sont aglycones, tel que la digitoxigénine et d'autres sont glycosylés, tel que l'ouabaïne liée à un rhamnose. La glycosylation de la digitoxigénine par trois digitoxoses forme la digitoxine. FPP : farnésyl diphosphate ; R : radical variable ; P5βR : progestérone-5-β-réductase. Une double flèche indique une succession d'étapes.

Par la suite, des P5βR ont été caractérisées pour leur rôle dans une autre voie de biosynthèse : la voie des iridoïdes. Ces composés sont des monoterpénoïdes constitués de deux cycles : un hétérocycle comportant un oxygène (pyrane) et un cycle formé de cinq carbones (penta) et sont

donc qualifiés de cyclopenta[c]pyrane (Figure 16) (Franzyk, 2000). Le terme générique « iridoïde » leur a été attribué suite à la caractérisation des premiers iridoïdes ; l'iridomyrmécine, l'iridolactone et des composés iridodiales, qui ont été isolés chez des fourmis du genre *Iridomyrmex* (Roth et Eisner, 1962). Selon leur structure, plusieurs catégories d'iridoïdes sont distinguées : les iridoïdes, souvent désignés iridoïdes aglycones, avec un ou deux cycles (cyclopenta[c]pyrane ou cyclopentane seul après clivage du pyrane), les séco-iridoïdes (un seul cycle, le pyrane, suite au clivage du cyclopentane) et les bis-iridoïdes (dimère d'iridoïdes ou de séco-iridoïdes). Par ailleurs, la majorité des iridoïdes (simple, seco- ou bis-) correspondent à des iridoïdes glycosylés, d'où la distinction entre iridoïdes aglycones et glycosylés (Jensen, Nielsen et Dahlgren, 1975).

Très retrouvés dans de nombreuses angiospermes et en particulier chez les Astéridées (Jensen, 1991 ; Jensen, Nielsen et Dahlgren, 1975 ; Wink, 2003), nombreux iridoïdes ont un rôle dans les interactions plante-insecte comme stimulants alimentaires ou d'ovoposition, ou comme composés de défense contre les herbivores et pathogènes (Baden *et al.*, 2011 ; Bowers, 1988 ; Bowers, 1983 ; Marak, Biere et Van Damme, 2002 ; Pereyra et Bowers, 1988). La glycosylation des iridoïdes a un rôle majeur dans leur mode d'action de défense contre les insectes et microorganismes : après ingestion d'iridoïdes, leur déglycosylation par des β -glucosidases est responsable de l'activation de leur toxicité. Certains iridoïdes, tels que le catalpol ou l'aucubine (Figure 16), sont toxiques pour certains insectes, champignons ou bactéries tandis qu'ils constituent une source de carbone pour d'autres microorganismes et une source de composés de défense pour certains insectes capables de les séquestrer (Dobler, Petschenka et Pankoke, 2011 ; Petschenka et Agrawal, 2016). Au delà de leur rôles écologiques, les iridoïdes sont aussi très étudiés pour leurs nombreuses propriétés biologiques (Dinda, 2019 ; Dinda, Debnath et Banik, 2011 ; Dinda, Debnath et Harigaya, 2007a ; Dinda, Debnath et Harigaya, 2007b ; Dinda, Roy Chowdhury et Mohanta, 2009 ; Hussain *et al.*, 2019 ; Tundis *et al.*, 2008). Par exemple, en parallèle de leurs rôles écologiques, le catalpol et l'aucubine ont démontré des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoire, anti-cancéreuses, neuroprotectrices et hépatoprotectrices. Certains dérivés d'iridoïdes et en particulier les alcaloïdes indolo-monoterpéniques (MIA) dérivés de séco-iridoïdes, regroupent également de nombreux composés prisés pour leur utilisation en pharmacologie et en médecine comme agents anti-tumoraux (vinblastine, vincristine, camptothécine), anti-malaria (quinine) ou encore anti-arythmique (ajmaline) (Brade, 1981 ; O'Connor et Maresh, 2006).

Les premières études visant à décrypter la voie de biosynthèse des iridoïdes ont mis en évidence qu'il s'agit de monoterpènes produits à partir du GPP (Cordell, 1974 ; Inouye et Inouye, 1971). Par la suite, des études, notamment de marquage chez *Catharanthus roseus* et *Lonicera morrowii*, ont identifié le 8-oxogéranial comme l'intermédiaire précurseur des iridoïdes et deux autres intermédiaires, le népétalactol et l'iridodial, qui sont formés à partir du 8-oxogéranial en présence du cofacteur NADH ou NADPH (Uesato *et al.*, 1987 ; Uesato, Matsuda et Inouye, 1984). Après caractérisation des multiples étapes en amont du 8-oxogéranial (Collu *et al.*, 2001 ; Contin *et al.*, 1998 ; Geu-Flores *et al.*, 2012 ; Hong *et al.*, 2003 ; Miettinen *et al.*, 2014 ; Oudin *et al.*, 2007), il a été établi que la biosynthèse des iridoïdes débute par la production de géraniol à partir de GPP via une mTPS (Figure 16). Le 8-oxogéranial est synthétisé après plusieurs étapes dont

l'hydroxylation du géraniol et l'oxydation des deux fonctions alcools formées. Geu-Flores *et al.* (2012) ont caractérisé une iridoïde synthase (ISY) permettant, en présence de NAD(P)H, de catalyser à partir du 8-oxogéraniol la biosynthèse des premiers iridoïdes : le népétalactol et l'iridodial. L'iridodial correspond à la forme ouverte de l'hétérocycle, comportant deux fonctions aldéhydes, comme le 8-oxogéraniol et non un pyrane. En solution aqueuse, ces deux iridoïdes s'équilibrent (Figure 16). Suite à la formation de népétalactol et d'iridodial, diverses modifications secondaires sont à l'origine de la grande diversité d'iridoïdes retrouvés chez les plantes et tous dérivés de ces deux iridoïdes initiaux. Par ailleurs, parmi les iridoïdes formés, la sécologanine est un séco-iridoïde qui, par condensation avec une molécule de tryptamine, produit la strictosidine : le précurseur universel des MIA (Stöckigt et Ruppert, 1999).

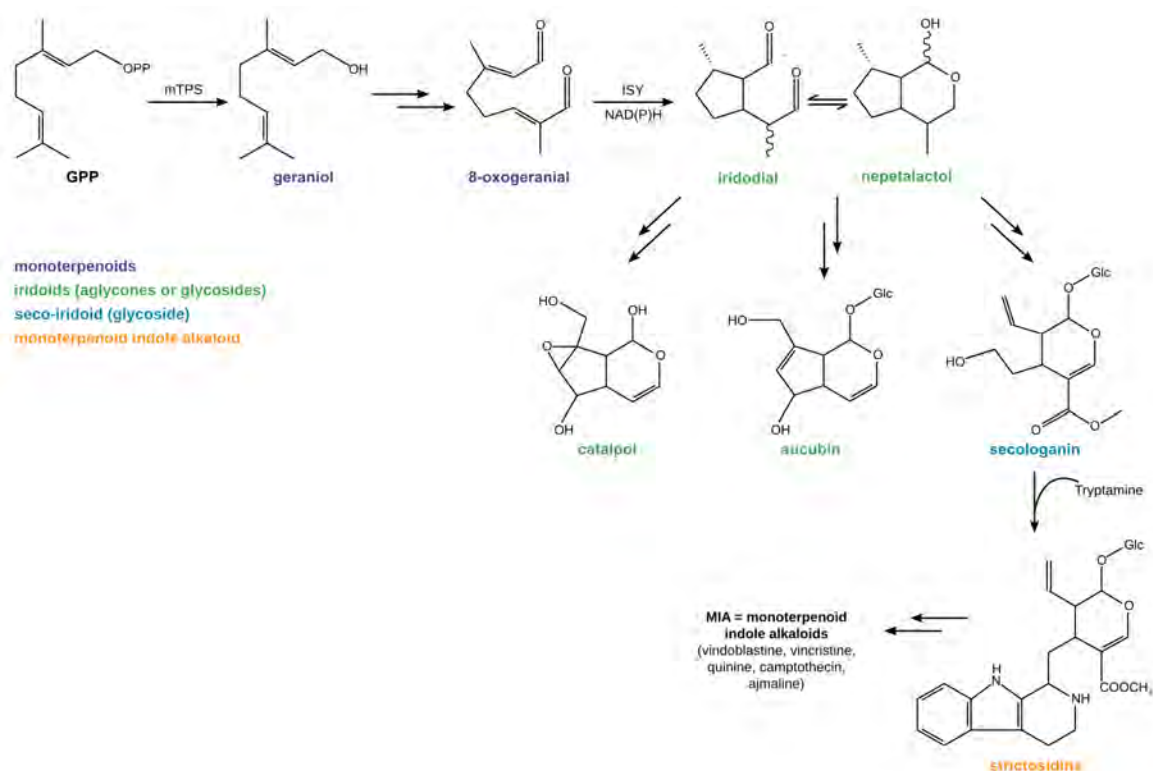


Figure 16 | Résumé de la biosynthèse des iridoïdes et alcaloïdes indolo-monoterpéniques (MIA)

La synthèse des iridoïdes débute avec la production du 8-oxogéraniol. Ce monoterpénoïde est un dérivé du géraniol et constitue le substrat pour la formation des premiers iridoïdes : les isomères de népétalactol et d'iridodial. Ceux-ci sont à l'origine de nombreux iridoïdes et iridoïdes glycosylés d'intérêt, tel que le catalpol et l'aucubine mais également de la sécologanine, un séco-iridoïde à l'origine de la production de strictosidine. Le strictosidine est le précurseur universel des alcaloïdes indolo-monoterpéniques (MIA). Le catalpol est présenté sous forme aglycone tandis que l'aucubine est présentée sous forme glycosylée, mais les deux composés existent sous les deux formes. GPP : géranyl diphosphate ; mTPS : monoterpène synthase ; ISY : iridoïde synthase ; NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) ; Glc : glucose. Une double flèche indique une succession d'étapes.

Depuis la caractérisation de la première ISY chez *C. roseus* (CrISY ; Geu-Flores *et al.*, 2012), d'autres ISY ont été caractérisées chez le muflier (Kries *et al.*, 2017), l'olivier (Alagna *et al.*, 2016) et l'herbe à chat (Duplais, Papon et Courdavault, 2020 ; Sherden *et al.*, 2018). L'étape de réduction-cyclisation du 8-oxogéraniol étant la première étape enzymatique de la voie de biosynthèse des iridoïdes, comprendre le mécanisme de ces enzymes constitue une avancée cruciale dans l'étude des iridoïdes et des MIA.

Bien qu'elles soient capables de cycliser des terpénoïdes, les ISY ne sont pas des terpènes cyclases (TPS capables de cyclisation) et font partie de la famille des P5 β R (Geu-Flores *et al.*, 2012 ; Schmidt *et al.*, 2018). Au-delà de la forte similitude de séquences qui permet de les classer parmi les P5 β R, les ISY présentent un mécanisme proche des P5 β R : ces enzymes NAD(P)H-dépendantes permettent la réduction de double liaison C=C *via* un mécanisme d'addition de Michael (Gärtner, Wendroth et Seitz, 1990 ; Thorn *et al.*, 2008) qui dans le cas du 8-oxogéranial, induit une cyclisation après formation d'un enolate (Figure 17) (Geu-Flores *et al.*, 2012 ; Kries *et al.*, 2016 ; Lindner *et al.*, 2014 ; Petersen *et al.*, 2016). Par ailleurs, des analyses chirales à l'issue d'une activité enzymatique *in vitro* de l'ISY de muflier (*Anthirrhinum majus*) ont montré que les produits obtenus avaient une chiralité inverse de ceux obtenus avec CrISY (Kries *et al.*, 2017). La protonation initiale du carbone méthylé ne se fait pas du même côté du carbone chez les deux enzymes : au lieu de former du népétalactol et de l'iridodial de stéréoisomérisation *cis-trans*, les iridoïdes sont *cis-cis* (Figure 17). L'ISY du muflier a donc été définie comme une épi-ISY (Am épi-ISY), responsable de la production d'épi-iridoïdes. En particulier Am épi-ISY initie la production d'antirrhinoside, un épi-iridoïde glycosylé qui joue un rôle dans la défense contre les herbivores et peut représenter jusqu'à 20 % du poids sec dans les jeunes feuilles de muflier (Beninger, Cloutier et Grodzinski, 2008).

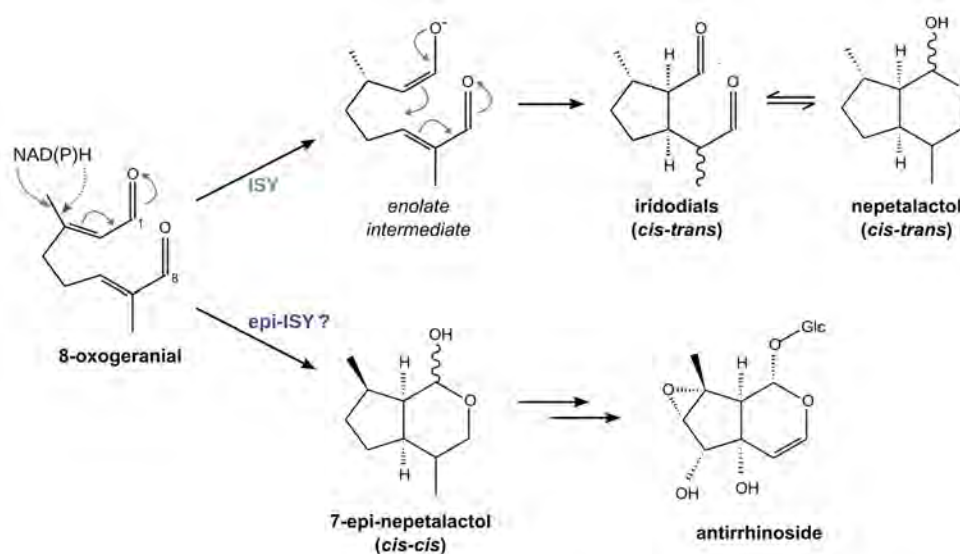


Figure 17 | Mécanisme d'une ISY et d'une épi-ISY dans la production de différents stéréoisomères de népétalactols et iridodials

Schéma adapté de Kries *et al.* (2017). Le mécanisme en deux étapes présumé des ISY est détaillé : une réduction du 8-oxogéranial permet la formation d'un intermédiaire énolate ensuite cyclisé *via* une addition de Michael. Chez une épi-ISY, il est présumé que la protonation assistée par le NAD(P)H ait lieu du côté opposé du carbone méthylé, donnant lieu à des iridoïdes (*cis-cis*) et non (*cis-trans*). Ce mécanisme est supporté par la production chez le muflier d'antirrhinoside, de configuration corroborant un synthèse à partir de (*cis-cis*) 7-épi-népétalactol. Une double flèche indique une succession d'étapes.

3.3 Les progestérone-5 β -réductases, une famille de réductases à large spectre de substrats

Les premières études de ces P5 β R ont mis en évidence qu'il s'agit de protéines codées par des gènes *VEP1* (de l'anglais *VEin Patterning*), initialement impliqués dans le développement des nervures chez des plantes vasculaires (Herl *et al.*, 2009 ; Jun, Ha et Nam, 2002) et codant ici des

réductases impliquées dans le métabolisme spécialisé. Contrairement aux P5 β R d'animaux qui appartiennent à la super-famille des AKR (de l'anglais *Aldo-Keto Reductase*), les P5 β R de plantes appartiennent à la super-famille des SDR (de l'anglais *Short-chain Dehydrogenase/Reductase*) (Egerer-Sieber *et al.*, 2006 ; Gavidia *et al.*, 2007 ; Herl *et al.*, 2006). Chez les plantes, les P5 β R codent un domaine structural en pli de Rossmann (*Rossmann fold*) et les différents motifs caractéristiques des SDR sont retrouvés dans leurs séquences (Kavanagh *et al.*, 2008 ; Persson *et al.*, 2003 ; Thorn *et al.*, 2008) (Figure 18). En revanche, les P5 β R de plantes présentent une architecture du site actif distincte des SDR classiques et elles ont donc été classées dans une nouvelle famille. Grâce à la caractérisation d'autres P5 β R chez plus d'une dizaine d'espèces différentes (Bauer *et al.*, 2010 ; Herl *et al.*, 2009), des motifs caractéristiques de cette nouvelle famille de réductases ont été identifiés (Gavidia *et al.*, 2007 ; Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010 ; Thorn *et al.*, 2008) (Figure 18). Également retrouvés chez les ISY (Geu-Flores *et al.*, 2012 ; Herl *et al.*, 2006 ; Munkert *et al.*, 2011 ; Munkert *et al.*, 2015a ; Munkert *et al.*, 2015b), les études par cristallographie de ces motifs ont permis de démontrer leur rôle dans la stabilisation du substrat et l'organisation du site actif (Fellows *et al.*, 2018 ; Schmidt *et al.*, 2018).

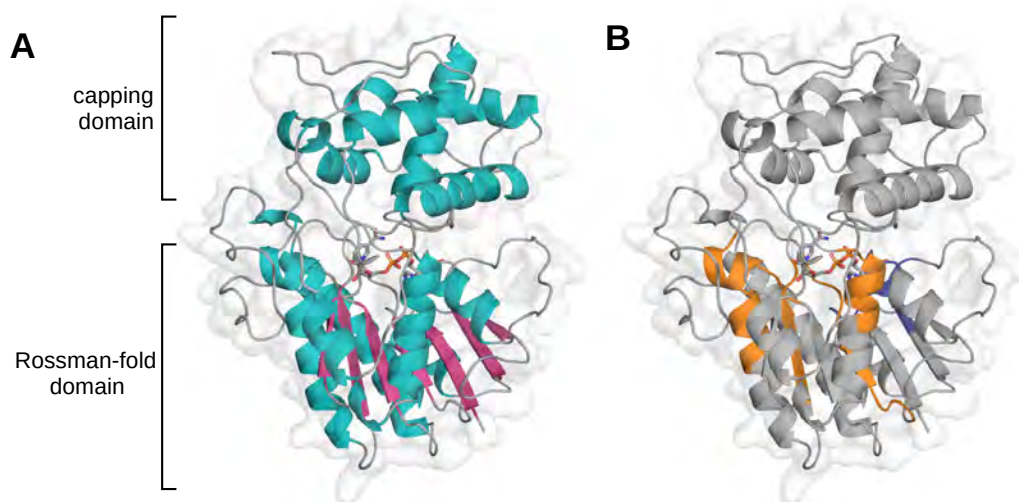


Figure 18 | Représentation de la structure des P5 β R : (A) architecture des domaines et structures secondaires et (B) observations des motifs conservés

Les représentations tri-dimensionnelles ont été réalisées à l'aide du logiciel Pymol™. La protéine présentée correspond à la structure de la P5 β R de *Digitalis lanata* (DIP5 β R) cristallisée en présence de NADH (PDB : [2V6G](#), Thorn *et al.*, 2008). (A) Les structures secondaires en hélices α sont indiquées en bleu et les feuillets β en rose. Les P5 β R sont constituées de deux domaines : un domaine (le *capping domain*) coiffant le domaine contenant le pli de Rossmann (*Rossman-fold domain*), caractéristique des SDR. Le pli de Rossmann est composé de six feuillets β en parallèle liés à deux paires d'hélices α selon la structure β - α - β . (B) Les motifs conservés caractéristiques des SDR sont indiqués en bleu foncé et les motifs conservés spécifiques des P5 β R sont indiqués en orange. La surface de la protéine est visible en gris pâle. Le NADH est représenté en bâton. Les atomes de carbone sont en gris. En rouge sont indiqués les atomes d'oxygène, en bleu les atomes de nitrogène et en orange les atomes de phosphore.

Les P5 β R regroupent donc des réductases caractérisées chez des plantes productrices de cardénolides pour leur rôle dans la réduction de la progestérone, chez des plantes productrices d'iridoïdes pour leur activité d'ISY mais également chez des espèces ne produisant ni iridoïdes ni cardénolides comme la 3-oxo- $\Delta^{4,5}$ -steroid 5 β -reductase d'*Arabidopsis thaliana* (At5 β -StR) (Herl *et al.*, 2009). De nombreux composés peuvent être acceptés comme substrat par les P5 β R,

notamment des énones² (Figure 19) (Burda *et al.*, 2009 ; Durchschein *et al.*, 2012 ; Munkert *et al.*, 2011 ; Schmidt *et al.*, 2018). Une même P5βR peut être active envers différents composés, sans présenter une affinité significativement supérieure pour un substrat en particulier, ce qui rend leur rôle métabolique difficile à établir. Du fait de leurs nombreuses activités, les P5βR sont parfois regroupées sous le nom de **PRISE** pour **P**rogestérone-5β-**R**éductase et/ou **I**ridoïde **S**ynthase, 1,4-**É**none réductase (Petersen *et al.*, 2016 ; Schmidt *et al.*, 2018). Aujourd'hui, les P5βR sont retrouvées chez de nombreuses plantes, y compris chez les bryophytes, lycophytes et algues vertes. Initialement, elles proviendraient des α-protéobactéries et auraient évolué chez les plantes à la suite d'un transfert latéral de gène (Gavidia *et al.*, 2007 ; Nguyen et O'Connor, 2020 ; Tarrío, Ayala et Rodríguez-Trelles, 2011). Leur large spectre de substrat est interprété comme une promiscuité enzymatique ancestrale qui a évolué vers des fonctions présentant un avantage évolutif pour la plante. Les P5βR sont des gènes impliqués dans la défense de la plante : i) elles participent notamment à la production d'iridoïdes et de cardénolides, ii) dans certains cas comme chez la digitale, leur activité est induite par des molécules de signal, en réponse au stress (méthyljasmonate, l'éthylène ou H₂O₂) (Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010), iii) et de manière plus générale, les produits des P5βR sont impliqués dans une réponse au stress, en désactivant les cétones insaturés qui peuvent se transformer en radicaux libres (Schmidt *et al.*, 2018).

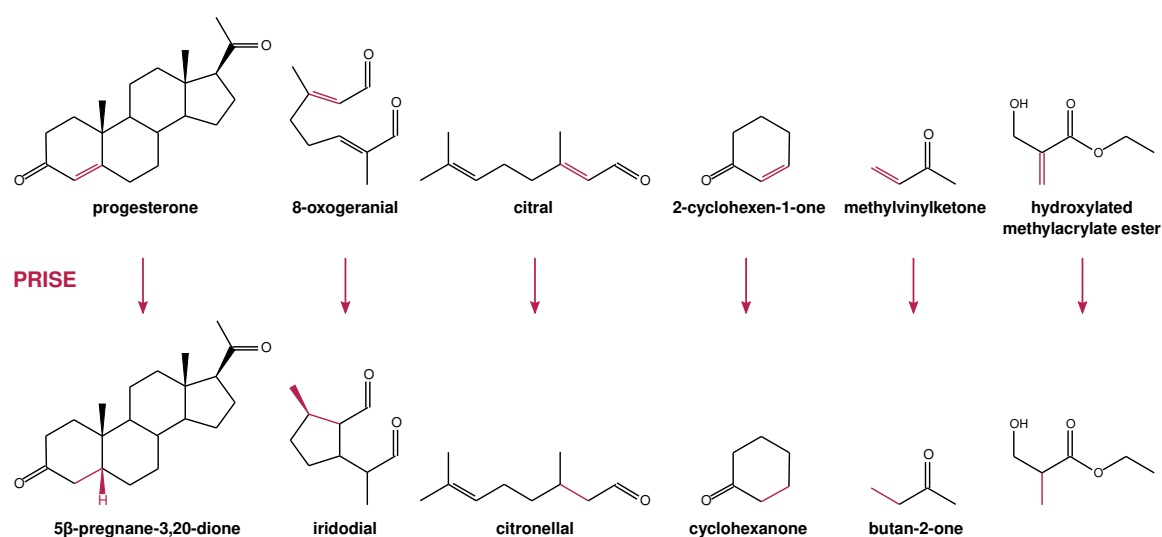


Figure 19 | Exemples de différents substrats de PRISE et leur produit correspondant

Les liaisons réduites par les PRISE sont indiquées en rouge. PRISE : progestérone- 5β-reductase et/ou iridoïde synthase, 1,4-énone réductase.

4 Les terpènes chez les pélagoniums

4.1 Taxonomie du genre *Pelargonium*

À l'état sauvage, les pélagoniums sont très présents en Afrique du Sud (Bakker *et al.*, 2005 ; Goldblatt et Manning, 2000 ; Miller, 2002) et quelques espèces sont également retrouvées en Australie, Nouvelle-Zélande, Moyen-Orient ainsi que sur les îles de Madagascar, Saint-Hélène (océan Indien) et Tristan da Cunha (océan Atlantique Sud) (van der Walt et Ward-Hilhorst, 1977).

² Une énone est une molécule comportant une fonction cétone et une double liaison C=C. La double liaison est le plus souvent conjuguée avec la fonction cétone et la cétone est alors dite « α,β-insaturée ».

La plupart des espèces du genre *Pelargonium* viennent essentiellement de la Province du Cap où elles poussent naturellement (Bakker *et al.*, 2005 ; Goldblatt et Manning, 2000 ; Miller, 2002). La Province du Cap se trouve au sud de l'Afrique du Sud et comporte un point chaud de biodiversité appelée « région floristique du Cap » qui regroupe une flore diversifiée et endémique similairement à celles retrouvées généralement sur les îles. Cette région du Cap est connue pour avoir subi de nombreux changements climatiques au cours du Cénozoïque (ère actuelle ayant débuté il y a 66 millions d'années). Cela a conduit à l'apparition de zones biogéographiques distinctes, avec des microclimats variés. L'isolement géographique et écologique de la flore a fortement favorisé la spéciation et la diversification des espèces présentes. Le genre *Pelargonium* constitue le troisième genre le plus retrouvé dans la Province du Cap. Les pélargoniums sont présents majoritairement dans des régions à basse pluviométrie ou dans des régions caractérisées par des pluies saisonnières, hivernales ou estivales, où ils occupent aussi bien des habitats désertiques que des prairies, à basses ou hautes altitudes et sous des climats variés (Goldblatt et Manning, 2000 ; Miller, 2002). L'évolution des pélargoniums dans cette Province se caractérise par une grande diversité écologique et morphologique : il s'agit de radiation évolutive, voire de radiation adaptative (Bakker *et al.*, 2005 ; Linder, 2003) dont la richesse a très rapidement passionné les botanistes.

De nos jours, le genre *Pelargonium* regroupe plus de 280 espèces et de très nombreux hybrides et cultivars d'une grande diversité morphologique. Il est constitué de plantes herbacées ou géophytes, d'arbustes ou d'arbrisseaux. Les tiges peuvent être herbacées ou bien subsucculentes, succulentes ou ligneuses (Miller, 2002 ; Röschenbleck *et al.*, 2014 ; Swain, 1974 ; van der Walt et Ward-Hilhorst, 1977). Leur fleurs sont asymétriques à cinq pétales, dont la taille et les couleurs sont variables, avec des pétales plus ou moins larges et plus ou moins pigmentés. Par exemple, *Pelargonium* 'Aurore Unique' possède de larges fleurs rouges alors que chez *P. tomentosum* il s'agit de fleurs blanches à petits pétales séparés (Figure 20). Néanmoins, le plus souvent les deux plus grands pétales se distinguent avec des motifs violacées, qui ont probablement un rôle de guide visuel vers l'intérieur de la fleur pour les pollinisateurs, tandis que les trois autres sont plus petits et sans motifs, comme *Pelargonium x hybridum* cv rosat 'Égypte' ou *P.* 'Candy Dancer'.

Les feuilles de pélargonium sont à limbes palmés qui se distinguent selon leur taille, leur niveau de dentelure, leur texture et leur pigmentation. Certaines espèces possèdent même des feuilles collantes ou duveteuses. Des niveaux de dentelure croissants peuvent être observés entre les feuilles de *P.* 'Toronto', *P. tomentosum*, *P. x hybridum* cv rosat et *P.* 'Candy Dancer'. *P.* 'Pepper' illustre les pigmentations zonées retrouvées chez de nombreuses espèces et hybrides (Figure 20).

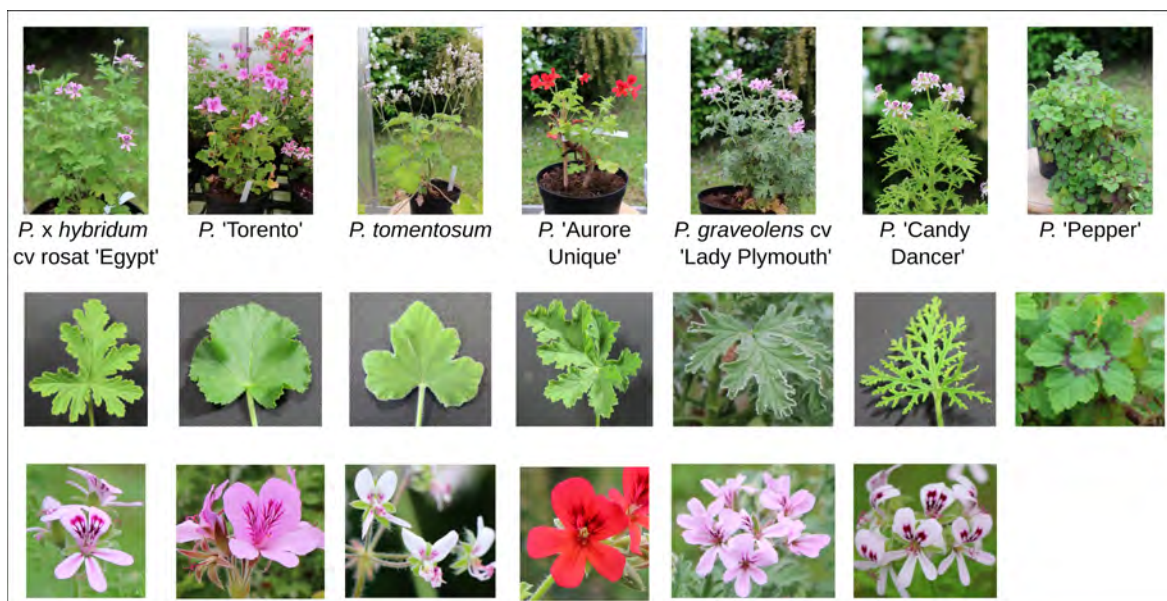


Figure 20 | Exemples de la diversité morphologique retrouvée au sein du genre *Pelargonium*

Les pélarгонiums présentés correspondent à des hybrides de pélarгонiums odorants, avec un détail de la morphologie de leurs feuilles et de leurs fleurs.

Les pélarгонiums sont très commercialisés en tant que plantes ornementales et très souvent incorrectement retrouvés sous le nom vernaculaire « géranium ». Initialement, les pélarгонiums et les géraniums étaient regroupés au sein du genre *Geranium*, de la famille des Géraniacées. Les genres *Pelargonium* et *Geranium* sont séparés depuis 1820 (Sweet, 1820). Ces deux genres font toujours partie de la famille des Géraniacées, qui regroupe également les genres *Erodium*, *Monsonia*, *Hypseocharis*, *Rhynchotheca* et *Sarcocaulon*³. Morphologiquement, la présence de fleurs asymétriques avec un hypanthium⁴ chez les pélarгонiums fait partie des critères discriminants des deux genres (Albers et van der Walt, 2007). Avant cette séparation reconnue, l'herbier (non publié) de Charles-Louis L'Héritier (1746-1800) proposait déjà une distinction entre *Geranium*, *Pelargonium* et *Erodium*. Ces travaux pionniers se retrouvent encore aujourd'hui dans l'utilisation du suffixe « L'Hér. » ou « L'Hérit. » dans la dénomination de nombreuses Géraniacées (Miller, 2002).

Dès 1824, les travaux d'Augustin Pyrame de Candolle (de Candolle, 1824) ont conduit à la classification des espèces du genre *Pelargonium* en différentes sections. Cette taxonomie initiale était basée sur leur diversité morphologique. Par la suite, de nombreuses études taxonomiques sont venues incrémenter la classification en s'appuyant sur des données de morphologie (p. ex. Albers et van der Walt, 1992 ; Dreyer *et al.*, 1992 ; Maggs, Vorster et van der Walt, 1995 ; van der Walt et Boucher, 1986 ; van der Walt et van Zyl, 1988), de palynologie (Stafford et Gibby, 1992), de phytochimie (Williams, Newman et Gibby, 2000) et de caryologie (p. ex. Albers et van der Walt, 1992 ; Daker, 1969 ; Gibby, Albers et Prinsloo, 1990). Les sections ont été réarrangées et redéfinies à de multiples reprises (p. ex. Albers et van der Walt, 1984 ; Albers *et al.*, 1995 ; Stafford et Gibby, 1992 ; Williams, Newman et Gibby, 2000) et depuis, le genre se compose de 16 sections (Miller,

³ Liste des genres de la famille des Géraniacées d'après le système de classification des Angiospermes APG III.

⁴ L'hypanthium (ou hypanthe) est le nom donné au réceptacle floral lorsque celui-ci est fusionné avec la base des verticilles floraux (calice, corolle et androcée) et prend la forme d'une urne enveloppant les ovaires.

2002). Une distinction a également été proposée sur la base des données caryotypiques et séparant ainsi les espèces à petits chromosomes (< 1.5 μm) de celles à larges chromosomes (1.5-3 μm) (Albers et van der Walt, 1984 ; Gibby, Albers et Prinsloo, 1990 ; Gibby *et al.*, 1996 ; Gibby et Westfold, 1986). En l'absence de caractère morphologique distinct entre les deux groupes proposés, cette séparation n'a pas été reconnue comme une division taxonomique en tant que telle.

Les analyses moléculaires basées sur des marqueurs génétiques mitochondriaux, plastidiaux et nucléaires ont néanmoins confirmé cette séparation en deux groupes et ont conduit à la formation de cinq clades : A1, A2, B, C1 et C2, avec les clades A et B combinés correspondant aux groupes à petits chromosomes et les clades C correspondant au groupe à larges chromosomes (Bakker *et al.*, 1999 ; Bakker *et al.*, 2004 ; Bakker *et al.*, 2000 ; Price et Jeffrey D. Palmer, 1993 ; Weng *et al.*, 2012). Par la suite, au fil des études, la taxonomie des pélargoniums a maintenu les trois niveaux de classification : une séparation en deux groupes informellement dénommés « sous-genre » (selon la taille des chromosomes), une séparation en clades et une sous-catégorisation de ces clades en sections (Figure 21). En parallèle, la corrélation entre les données moléculaires et d'autres caractères (non moléculaires) a été évaluée. Par exemple, les différentes formes de croissances des pélargoniums, leurs tiges, leurs racines et la longueur de leur hypanthium (Bakker *et al.*, 2005) ainsi que les différences morphologiques de leur limbe foliaire (nervation, dentelure, bords) (Jones *et al.*, 2009) ont été cataloguées pour chaque espèce de la taxonomie. Cependant, la distribution de ces traits ne recouvrait pas complètement les délimitations des clades et ceux-ci n'ont donc pas été intégrés aux paramètres taxonomiques. Par ailleurs des approches chémotaxonomiques basées sur la composition chimique des pélargoniums en phénols (Williams, Newman et Gibby, 2000), alcaloïdes (Houghton et Lis-Balchin, 2002) ou terpénoïdes (Lalli *et al.*, 2006 ; Lis-Balchin, 1997) ont également été mises en avant mais n'apportaient pas la même précision que les approches moléculaires.

Les études les plus récentes de la phylogénie du genre *Pelargonium* sont venues confirmer les clades et sections définis et affiner la classification des espèces (van de Kerke *et al.*, 2019 ; Röschenbleck *et al.*, 2014). Les études de Röschenbleck *et al.* (2014) ont combiné des analyses morphologiques des fleurs, des analyses chimiques de la composition phénolique et des analyses moléculaires de divers marqueurs génétiques. Leur réévaluation de la classification suggère un regroupement des clades A1 et A2 pour former un grand clade correspondant au « sous-genre » *Pelargonium*. Les travaux de van de Kerke *et al.* (2019) s'appuient quant à eux essentiellement sur des analyses moléculaires qui incluent 74 gènes chloroplastiques en plus d'un marqueur génétique nucléaire chez 120 espèces de *Pelargonium*.

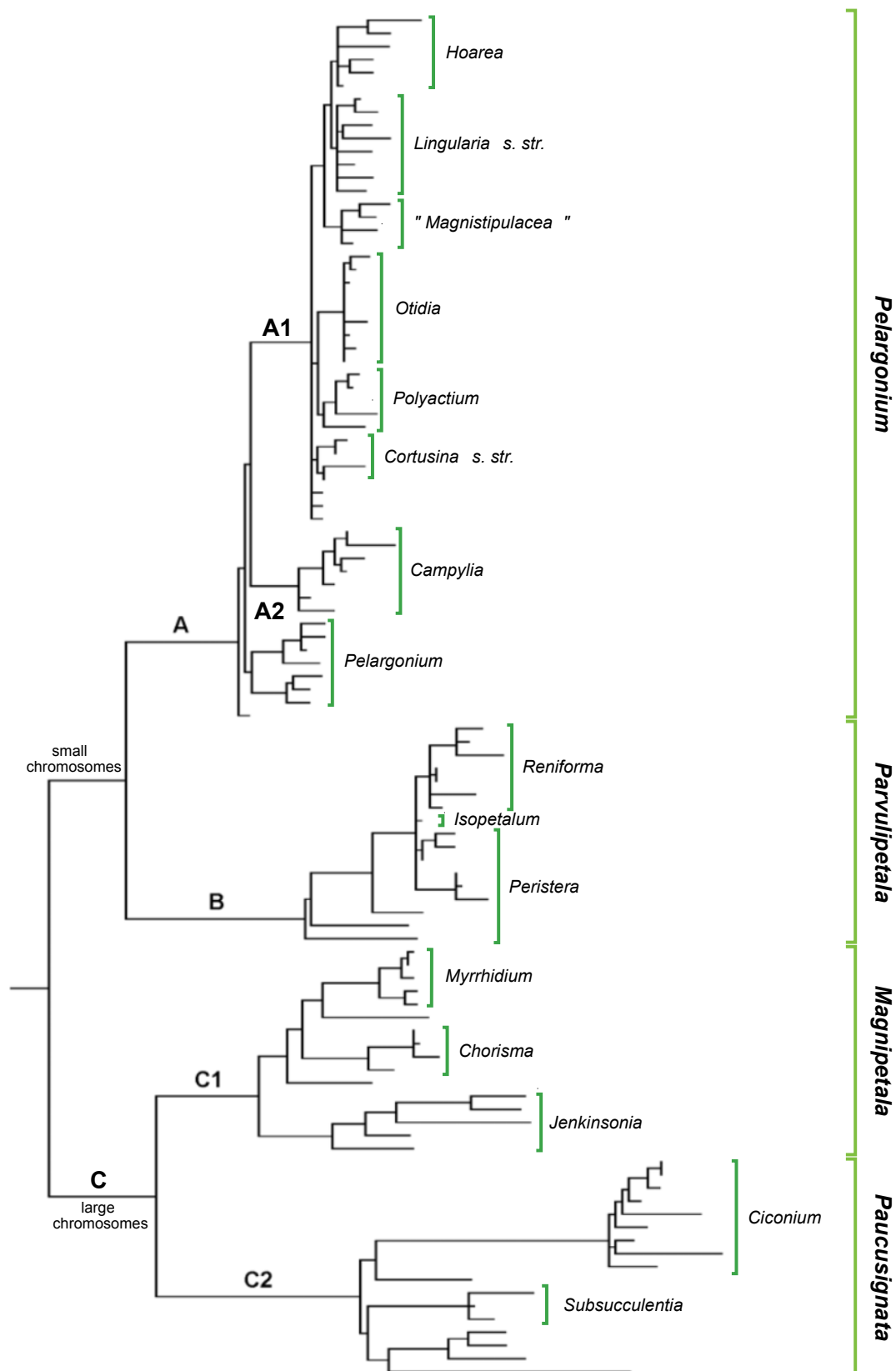


Figure 21 | Phénogramme de la taxonomie des pélagoniums

Le schéma a été adapté de Röschenbleck *et al.* (2014). Les groupes définis selon la taille des chromosomes et les clades sont indiqués au niveau des branches initiales. En vert foncé sont indiqués les sections des différents clades et en vert clair sont indiqués les « sous-genres » souvent utilisés et tels que définis par Röschenbleck *et al.* (2014). *s. str.* : *sensu stricto*.

Au cours des diverses études de la phylogénie des Géraniacées, cette famille s'est démarquée en raison du génome de leurs organites qui sont très réarrangés, avec un nombre d'inversions répétées particulièrement élevées (Chumley *et al.*, 2006 ; Guisinger *et al.*, 2011 ; Guisinger *et al.*, 2008 ; Ruhlman et Jansen, 2018). Au sein du genre *Pelargonium* et des genres apparentés, l'ordre et le contenu des gènes chloroplastiques et mitochondriaux sont très hétérogènes : les taux de substitutions nucléotidiques retrouvés sont très inhabituels (Bakker, Breman et Merckx, 2006 ; Guisinger *et al.*, 2008 ; Mower *et al.*, 2007 ; Parkinson *et al.*, 2005 ; Weng *et al.*, 2013 ; Weng *et al.*, 2012). Le genre *Pelargonium* se caractérise également par une grande variabilité génomique, avec une hétérogénéité du nombre de chromosomes ($x = 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 17$ ou 19) (Bakker *et al.*, 2005) (Tableau 1), des variations de la taille du génome (van de Kerke *et al.*, 2019 ; Weng *et al.*, 2012) et des polyploïdies différentes au sein du genre (Mower *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2015 ; Parkinson *et al.*, 2005 ; Weng *et al.*, 2013).

D'un point de vue commercial, les pélargoniums sont généralement différenciés en quatre groupes : le groupe regal, le groupe zonal, le groupe lierre et le groupe odorant. Le groupe des « géraniums zonal » correspond à des cultivars d'hybrides *Pelargonium x hortorum*, issus de *P. zonale* et *P. inquinans* et principalement retrouvés dans la section *Ciconium*. Le groupe des « géraniums regal » correspond à des cultivars d'hybrides *P. x domesticum*, issus d'hybridation de nombreuses espèces botaniques et retrouvés dans plusieurs sections dont *Pelargonium* et *Ligularia*. Les « géraniums-lierre » sont des pélargoniums dérivés de l'espèce *P. peltatum* de la section *Ciconium* qui ont obtenu leur nom en raison de leurs feuilles avec une forme et une odeur proche de celle du lierre (Miller, 2002 ; Röschenbleck *et al.*, 2014 ; Weng *et al.*, 2012). Ces trois groupes correspondent à des pélargoniums commercialisés comme plantes ornementales, couramment retrouvées dans les jardins et balconnières (James, 2002). Le groupe des pélargoniums odorants se compose quant à lui d'environ 25 espèces et de nombreux hybrides et cultivars dont les feuilles sont odorantes. Ils appartiennent principalement à la section *Pelargonium* (clade A1) mais certaines espèces sont retrouvées dans les sections *Renifornia* et *Peristera* (clade B), la section *Jenkinsonia* (clade C1) ou encore les sections *Ciconium* et *Subsucculentia* (clade C2) (Tableau 1). Dans la suite de cet exposé, nous nous focaliserons sur les pélargoniums odorants et le terme d'accession sera utilisé pour faire référence aussi bien à une espèce botanique qu'un hybride, un cultivar ou une variété.

Tableau 1 | Caractéristiques d'espèces botaniques de pélagoniums odorants retrouvées dans les différentes sections, d'après Blerot et al. (2016)

Sections	Karyotype	Odorant species	Ploidy (X)	Odor
<i>Hoarea</i>	A1	— ^a	11 and 19	—
<i>Ligularia</i> s.str.		—	11 and 19	—
<i>Magnistipulaceae</i>		—	11	—
<i>Otidia</i>		—	11	—
<i>Polyactium</i>		—	11	—
<i>Cortusina</i> s. str.		—	11	—
<i>Campylia</i>	A2	—	11	—
<i>Pelargonium</i>		<i>betulinum</i>	11	Camphoreous
		<i>capitatum</i>	11	Rose
		<i>citronellum</i>	11	Lemon
		<i>crispum</i>	11	Lemon, lime
		<i>cucullatum</i>	11	Spices
		<i>denticulatum</i>	11	Lemongrass
		<i>glutinosum</i>	11	Balsamic
		<i>graveolens</i>	11	Mint
		<i>hispidum</i>	11	Fruity
		<i>papilionaceum</i>	11	Lemon
		<i>quercifolium</i>	11	Nutmeg, spices
		<i>pseudoglutinosum</i>	11	Balsamic
		<i>radens</i>	11	Mint
		<i>scabrum</i>	11	Apricot, lemon
		<i>scabroide</i>	11	Soap
	<i>tomentosum</i>	11	Peppermint	
	<i>vitifolium</i>	11	Lemon balm, lemongrass	
<i>Reniformia</i>	B	<i>extipulatum</i>	8	Cedarwood, camphoreous
		<i>odoratissimum</i>	8	Green apple, clove
<i>Isopetalum</i>		—	11	—
<i>Peristera</i>		<i>grossularioides</i>	19	Coconut, pear
<i>Myrrhidium</i>	C1	—	11	—
<i>Chorisma</i>		—	11	—
<i>Jenkinsonia</i>		<i>trifidum</i>	9	Lemon, green
		<i>praemorsum</i>	9	Patchouli, moss
		<i>mutans</i>	11	Pepper
<i>Ciconium</i>	C2	<i>peltatum</i>	9	Green
<i>Subsucculentia</i>		<i>otaviense</i>	10	Fruity

^a No odorant species or no odor

4.2 L'histoire des pélagoniums odorants

Les premiers pélagoniums découverts ont été rapportés d'Afrique du Sud et ont été introduits en Europe au cours du 17^e siècle. Les premières archives évoquant la culture de pélagoniums remontent à 1633, en Hollande (Swain, 1974). Les collections nouvellement créées ont rapidement été incrémentées au fur et à mesure des explorations (en Afrique du Sud ainsi qu'en Inde et en Australie) et par les échanges de nouvelles espèces entre la Hollande et l'Angleterre. En 1724, huit nouvelles espèces ont été cultivées pour la première fois au Jardin Botanique de Chelsea (Londres, Angleterre). Parmi ces nouvelles espèces, *Pelargonium odoratissimum* à odeur de pomme et de clou de girofle et *P. vitifolium* à odeur de citronnelle sont les premiers pélagoniums odorants recensés. En revanche, aucune archive n'indique comment et quand ils ont été obtenus. En 1772, un collectionneur de Kew (Londres, Angleterre), Francis Masson, a été envoyé en Afrique du Sud et a fortement participé à l'introduction de nouvelles espèces au cours des vingt années qui suivirent. Il a notamment rapporté de nombreux pélagoniums odorants tels que *P. radula* à odeur de rose, *P. quercifolium* aux notes épicées, *P. graveolens* à odeur de menthe et *P. crispum* à odeur de citron (Tableau 1). Il est probable qu'au cours de ces voyages, il ait également rapporté l'espèce *P. tomentosum* à odeur de menthe poivrée (Miller, 2002 ; Swain, 1974).

Entre 1750 et 1850, à partir des collections disponibles, une multitude de croisements a été réalisée, d'abord accidentellement puis délibérément par les botanistes. Dans les conservatoires et

jardins botaniques d'Europe, de nombreux hybrides ont été créés (Swain, 1974). Durant cette période, des pélargoniums présentant des odeurs diverses ont attiré l'attention : des espèces à odeur de rose, de citron, d'orange, de menthe, d'eucalyptus, de noix de coco, de muscade, de gingembre ou encore de poivre ont été collectionnées (Tableau 1) et de nombreux cultivars en dérivant ont été sélectionnés. En revanche, la traçabilité de ces nouveaux pélargoniums n'a pas été conservée. Les hybrides ont souvent été nommés de la même façon que les espèces parentes ou alors différentes dénominations ont été données à un même génotype, voire une même dénomination a été donnée à des hybrides différents. Les échanges et délocalisations des accessions ont par ailleurs fortement contribué à une perte de leurs origines génétiques. Ainsi, *P. capitatum* pouvait alors faire référence aussi bien à l'espèce botanique à odeur de rose qu'à un hybride issu du croisement de *P. radens* et *P. graveolens* (en réalité appelé *P. x asperum*). De la même façon, *P. capitatum*, *P. radens* et *P. graveolens* sont des dénominations utilisées pour des cultivars issus de ces espèces botaniques (Lis-Balchin, 2002a ; Swain, 1974). Les analyses supervisées par J.J.A van der Walt (van der Walt, 1985) basées sur l'odeur, le nombre de chromosomes et la ploïdie des différentes accessions ont établi que les espèces botaniques *P. radens* H.E. Moore et *P. graveolens* L'Hérit. ont une odeur de menthe et sont octoploïdes ($2n = 8x = 88$, avec 11 chromosomes) tandis que l'espèce botanique *P. capitatum* (L.) L'Hérit. a une légère odeur de rose et est hexaploïde ($2n = 6x = 66$) (Tableau 1) (Albers et van der Walt, 1984 ; Demarne et van der Walt, 1993 ; Viljoen *et al.*, 1995). Encore aujourd'hui, *P. graveolens* L'Hérit. fait parfois référence à l'espèce botanique à odeur de menthe et parfois à des cultivars à odeur de rose⁵.

En 1819, les premiers essais de distillation ont été réalisés à Lyon (France), marquant ainsi le début de l'intérêt pour les pélargoniums odorants par l'industrie de la parfumerie. Dès 1844, les premières cultures de pélargoniums odorants ont vu le jour à Grasse (France) (Gildemeister et Hoffmann, 1900 ; Knuth, 1912). Par la suite, de nombreuses exploitations de pélargoniums pour leur huile essentielle (HE) ont vu le jour en Algérie et à l'île de la Réunion. D'autres essais ont été réalisés en Corse, en Italie, en Tunisie, en Égypte, au Congo, au Kenya, à Madagascar, en Espagne, au Portugal, au Brésil et en Chine. Les pélargoniums alors cultivés étaient des variétés de *P. capitatum*, *P. odoratissimum* et *P. radula* (Charlwood et Charlwood, 1991). À l'heure actuelle, la culture de pélargoniums odorants a principalement lieu en Chine dans la région du Yunnan et en Égypte dans les régions de Beni Suef et de Fayoum. Ces deux pays sont les producteurs majeurs d'HE de pélargonium. Des quantités plus faibles sont également produites à la Réunion (France), à Madagascar, en Afrique du Sud et Israël ou encore en Russie et au Brésil (Blerot *et al.*, 2016).

La production d'HE est principalement réalisée à partir de quatre hybrides, communément appelés pélargoniums rosat 'Bourbon', 'Chine', 'Égypte' et 'Grasse'. Ce sont des *Pelargonium x hybridum* cv rosat (*P. rosat*) dénommés d'après leur région de production (Blerot *et al.*, 2016 ; Demarne, 2002). Par exemple, *P. rosat* 'Égypte' est le cultivar retrouvé en Égypte tandis que *P. rosat* 'Bourbon' tient son nom du label géographique Bourbon, initialement créé pour la production de vanille et indiquant une production dans les îles de l'océan Indien. Ces cultivars

⁵ Dans ce tapuscrit, *P. graveolens* fera toujours référence à l'espèce botanique à odeur de menthe.

auraient été créés à Grasse (France) et ré-exportés dans différents pays. À cette période, différents croisements ont été réalisés entre *P. graveolens*, *P. radens* et *P. capitatum* ainsi qu'entre *P. graveolens*, *P. radens* et *P. vitifolium* et auraient respectivement participé à l'obtention des nombreux hybrides à odeur de rose et à odeur de menthe citronnée (Daker, 1969 ; Guenther, 1977). Les différents hybrides ont été sélectionnés sur la base de leur rendement en HE et leur odeur de rose peu, voire pas, mentholée. En revanche, le détail des croisements et l'origine exacte des *P. rosat* restent ambiguës (Demarne, 2002). Il a été établi que les hybrides *P. rosat* ont pour parents *P. capitatum* d'une part et *P. graveolens* ou *P. radens* d'autre part (Demarne, 2002 ; Demarne et van der Walt, 1989). L'analyse de marqueurs moléculaires par RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) et chimiques par GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) sur différents pélargoniums rosat a mis en évidence qu'il s'agit de génotypes distincts, potentiellement issus de croisements différents (Gupta *et al.*, 2002 ; Ochocka, Bogdan et Bogdan, 2002 ; Tembe et Deodhar, 2010).

P. capitatum est un arbrisseau à tiges dressées atteignant jusqu'à 1 m de hauteur et 1,6 m de large et ses feuilles présentent un faible niveau de dentelure (Figure 20). Il produit une HE à odeur de rose mais avec un faible rendement. Bien que *P. capitatum* soit un parent certain de ces hybrides, jusqu'à huit chémotypes de cette espèce botanique ont été identifiés (Demarne, Viljoen et van der Walt, 1993 ; Viljoen *et al.*, 1995) et là aussi, il n'existe aucune traçabilité permettant de savoir lequel ou lesquels ont servi aux croisements. *P. graveolens* et *P. radens* à l'inverse ont un rendement en HE élevé et une odeur de menthe. *P. graveolens* est un arbuste à port droit mesurant jusqu'à 1,3 m de haut et 1 m de large. Ses feuilles ont une dentelure beaucoup plus prononcée et sont duveteuses. *P. radens* est également un arbuste à port droit, pouvant mesurer jusqu'à 1,5 m de haut et 1 m de large avec des feuilles très dentelées mais plutôt rugueuses. Les principales caractéristiques des hybrides (morphologie globale des feuilles et des fleurs, niveau de dentelure des feuilles, taille et couleurs des fleurs) ainsi que la composition de l'HE sont à l'interface des parents. Ils ont également hérité du même nombre de chromosomes et d'une ploïdie intermédiaire puisqu'ils sont heptaploïdes ($2n = 7x = 77$). De *P. capitatum*, les hybrides ont hérité la capacité à produire une HE à odeur de rose, tandis que de *P. radens* ou *P. graveolens* ils ont hérité du rendement élevé en HE (Blerot *et al.*, 2016 ; Demarne, 2002 ; Demarne et van der Walt, 1989 ; Swain, 1974). En revanche, les *P. rosat* sont malgré tout différenciables ; il existe une diversité morphologique et chimique qui permet de les reconnaître et notamment de distinguer leur HE (Blerot *et al.*, 2016 ; Fraisse *et al.*, 1983 ; Juliani *et al.*, 2006 ; Rajeswara Rao *et al.*, 2000).

Dans la littérature actuelle, les cultivars producteurs d'HE à odeur de rose sont retrouvés sous la dénomination pélargoniums rosat, géraniums rosat, *Pelargonium x hybridum* cv rosat ou *P. graveolens*. Dans la suite de ce tapuscrit, nous utiliserons la dénomination générale pélargonium rosat (*pelargonium rosat* ou *rose-scented pelargonium* en anglais) ou l'abréviation *P. rosat* de leur nom complet suivie de leur nom respectif quand nécessaire (p. ex. *P. rosat* 'Grasse' pour indiquer *Pelargonium x hybridum* cv rosat 'Grasse').

4.3 L'importance des terpènes de l'HE de pélagonium

Traditionnellement, l'HE de pélagonium est utilisée pour ses propriétés pharmacologiques et thérapeutiques dans le traitement de troubles inflammatoires (maux de tête, troubles gastro-intestinaux, infections des voies respiratoires) et nerveux (insomnie, anxiété, troubles de l'humeur) (Hart, Lis-Balchin et Lis-Balchin, 2002 ; Saraswathi *et al.*, 2011 ; Verma, Chandra Padalia et Chauhan, 2016). Cette HE possède une activité antioxydante (Asgarpanah et Ramezanloo, 2015 ; Boukhris *et al.*, 2012 ; Chen et Viljoen, 2010), antifongique et antibactérienne (Asgarpanah et Ramezanloo, 2015 ; Dorman *et al.*, 1995 ; Lis-Balchin, Deans et Hart, 1996 ; Reichling *et al.*, 2009). En agroalimentaire, l'HE des pélagoniums rosat est utilisée en tant qu'arôme mais également en tant que conservateur, pour ses propriétés anti-acariennes (Jeon, Lee et Lee, 2009 ; Lis-Balchin, 2002b). Par ailleurs, elle posséderait des propriétés anti-tumorales *via* un rôle immunomodulateur, sur les lymphocytes cytotoxiques naturels (lymphocytes NK, pour *natural killer*, aux propriétés anti-tumorales) (Fayed, 2009 ; Saraswathi *et al.*, 2011 ; Standen, Connellan et Leach, 2006). Encore aujourd'hui, ses propriétés font l'objet de nouvelles études et de nouvelles découvertes, comme l'ont montré Senthil Kumar *et al.* (2020) avec les effets antiviraux de l'HE contre le SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*).

Du reste, la production de l'HE de pélagonium rosat est principalement utilisée en parfumerie, en cosmétique et en agroalimentaire (Demarne, 2002 ; Lis-Balchin, 2002c ; Wells et Lis-Balchin, 2002). Dans ces domaines, l'HE à odeur de rose obtenue à partir de *P. rosat* a souvent été utilisée pour remplacer l'HE de rose (*Rosa x damascena*) qui est beaucoup plus rare et chère. Par exemple, en 2014, le prix au kilogramme de l'HE de rose était de 7500 \$ contre environ 120 \$ pour l'HE de pélagonium. Le prix compétitif de l'HE de pélagonium a permis son utilisation en parfumerie « fonctionnelle » (détergents, lessives, savons). En parfumerie fine, l'HE de pélagonium ne constitue pas *per se* un substituant de l'HE de rose car elle apporte une odeur plus complexe qu'une odeur de rose pure, appelée « note géranium » (Ghozlan et Fernandez, 2010). Son utilisation dans les parfums s'est intensifiée en partie grâce au succès de l'accord « fougère » (lavande, géranium, fève Tonka), très en vogue pour les parfums masculins à la fin du 19^e siècle et qui fait partie des sept grandes familles olfactives en parfumerie. Des parfums tels que Miss Dior de Dior (1947), Brut de Fabergé (1964), Ivoire de Balmain (1980), Paris de Yves Saint Laurent ou plus récemment Géranium Odorata de Dypitique (2014) et Équipage Géranium de Hermès (2015) renferment de l'HE de pélagonium rosat (Wells et Lis-Balchin, 2002). Selon les compositions et le parfum souhaité, l'origine de l'HE utilisée n'est pas la même : l'HE de type 'Bourbon' (produite à partir de *P. rosat* 'Bourbon') est la plus prisée de par son odeur de rose plus fine, accompagnée de notes florales et peu mentholées⁶ et elle peut être utilisée pour les parfums féminins comme masculins. L'HE d'origine 'Égypte' a une odeur plus verte, épicée et plus fruitée et est souvent utilisée pour relever le caractère d'autres notes du parfum. L'HE de type 'Chine' a une odeur de rose citronnée, prononcée et florale qui s'accompagne de notes plus mentholées, souvent destinée à des parfums masculins. L'HE de *P. rosat* 'Grasse' a une odeur plus proche de l'HE type 'Bourbon' mais avec une odeur de rose plus citronnée et légèrement épicée.

⁶ <https://www.iff.com/en/scent/lmr-naturals/online-compendium>

Plus de 240 composés ont été identifiés dans l'HE de pélagoniums d'origines différentes (Rajeswara Rao, 2013). L'HE de *P. rosat* est un mélange complexe de nombreux composés qui sont majoritairement des mono- et sesqui-terpènes (Lis-Balchin, 2002d) et dont la composition va déterminer l'odeur de l'HE. Les compositions détaillées des HE des différents *P. rosat* ont été extensivement étudiées et comparées (Blerot *et al.*, 2016 ; Jain *et al.*, 2001 ; Kulkarni, 1998 ; Lis-Balchin, 1991 ; Rajeswara Rao *et al.*, 2000 ; Shellie et Marriott, 2003 ; Verma, Chandra Padalia et Chauhan, 2016 ; Wang *et al.*, 2014). Étant donné que les HE n'ont pas la même composition selon le cultivar, l'analyse qualitative et quantitative des composés de l'HE permet d'identifier son origine et de vérifier sa qualité (Tableau 2).

Tableau 2 | Compositions détaillées des HE commerciales de *P. rosat*, d'après Blerot (2016)⁷

Les valeurs correspondent au pourcentage de l'aire du composé par rapport à l'aire totale des composés identifiés. Il s'agit des pourcentages moyens calculés après analyse par GC-MS et GC-FID. Les composés majoritaires (Figure 22) sont indiqués en gras. nd : non déterminé ; nq = non quantifié.

Composés	HE 'Bourbon'	HE 'Chine'	HE 'Égypte'	HE 'Grasse'
cis-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	0,02	nd	nd	nd
para-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
cis- β -ocimène	0,25	0,07	0,05	0,17
trans- β -ocimène	0,26	0,04	0,07	0,16
linalol oxyde I	0,37	0,10	0,17	0,12
linalol oxyde II	0,21	0,04	0,1	0,08
terpinolène	0,09	0,02	0,03	nd
linalol	9,24	2,3	4,73	8,72
cis-oxyde de rose	0,72	1,21	0,81	0,27
trans-oxyde de rose	0,27	0,48	0,32	0,10
menthone	0,54	1,79	0,80	0,21
isomenthone	8,02	3,88	4,95	5,33
menthol	0,17	0,10	0,11	0,13
α -terpinéol	1,17	0,21	0,36	0,67
citronellol	18,22	34,66	28,37	26,19
pipéritone	0,11	0,13	0,06	nd
géraniol	14,11	6,77	15,06	29,43
géraniol	0,87	0,46	0,90	1,58
citronellyl formate	9,40	12,15	7,32	5,47
nérylyl formate	0,27	0,12	0,10	nd
géranyl formate	6,10	2,07	3,39	3,61
phénéthyl propionate	0,12	0,03	0,03	0,05
citronellyl acétate	0,26	0,44	0,25	0,11
nérylyl acétate	0,02	0,01	nd	nd
α -cubébène	0,07	0,11	0,17	0,05
géranyl acétate	0,51	0,16	0,47	0,36
phényléthyl 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	0,3	0,08
α -trans-bergamotène	0,22	0,01	0,01	nd
guaia-1(5),11-diène	0,47	0,53	0,01	nd
6,9-guaiadiène	5,95	7,68	0,37	0,12
aromadendrène	0,5	0,66	0,52	nd
géranyl propionate	1,49	0,61	0,80	0,48
alloaromadendrène	0,12	0,38	0,24	0,18
germacrène D	0,97	1,14	1,56	1,84
β -selinène	0,15	0,37	0,16	nd
viridiflorène	0,16	1,200	0,73	0,88
géranyl isobutyrate	0,43	0,44	0,32	nd

⁷ Le tableau est issu des résultats de la thèse de Bernard Blerot (2013-2016), partiellement publié (Blerot *et al.*, 2016)

Composés	HE 'Bourbon'	HE 'Chine'	HE 'Égypte'	HE 'Grasse'
γ-cadinène	0,15	0,25	0,31	0,10
calamène	0,16	0,72	0,52	nd
citronellyl butyrate	0,49	0,72	0,41	0,14
δ-cadinène	0,51	0,92	1,03	0,34
géranyl butyrate	1,49	0,83	1,47	0,30
phényléthyl tiglate	0,69	0,72	1,01	0,63
furopélargone	0,63	0,62	nq	nd
β-caryophyllène oxyde	0,14	0,17	0,14	0,05
géranyl valérate	0,10	0,26	0,18	nd
citronellyl caproate	0,05	0,13	0,08	nd
10-γ-épi eudesmol	nd	0,11	6,75	4,33
γ-eudesmol	nd	nd	0,14	0,26
citronellyl tiglate	0,27	1,00	0,35	nd
géranyl tiglate	1,65	1,65	1,50	0,89
géranyl caproate	0,08	0,05	0,12	nd
TOTAL	93,13	92,93	91,46	96,28

Chez les différents *P. rosat*, les mêmes composés majoritaires sont retrouvés : le géraniol et le citronellol constituent à eux seuls 30 à 60 % de l'HE, avec un ratio différent selon le cultivar. Ces deux composés sont des alcools monoterpéniques à l'odeur de rose et également retrouvés dans l'HE de rose (*R. x damascena*) et chez *P. capitatum*. Le ratio citronellol:géraniol est un critère majeur de la qualité qui explique, en partie, les différences olfactives entre les HE (Blerot *et al.*, 2016 ; Doimo *et al.*, 1999). D'autres monoterpènes, tel que le géranyl formate, le citronellyl formate, l'isomenthone, la menthone et le linalol, font partie des composés prépondérants de l'HE. Le géranyl et le citronellyl formate sont des dérivés estérifiés du géraniol et du citronellol respectivement mais leur rôle exact dans le parfum des pélargoniums est mal connu. L'isomenthone et la menthone sont les composés majoritaires (plus de 70 %) de l'HE de *P. radens* et *P. graveolens* et sont à l'origine de leur odeur de menthe. Enfin, le linalol est un composé très présent dans les HE et notamment chez la lavande, où il apporte une note florale et fraîche. En ce qui concerne les sesquiterpènes, certains sont relativement présents chez les quatre cultivars, tel que le germacrène D et le β-caryophyllène. Mais les deux plus importants sont le 6,9-guaiadiène et le 10-épi-γ-eudesmol car leurs proportions très variables selon le cultivar peuvent servir de marqueur de la qualité et de l'origine de l'HE.

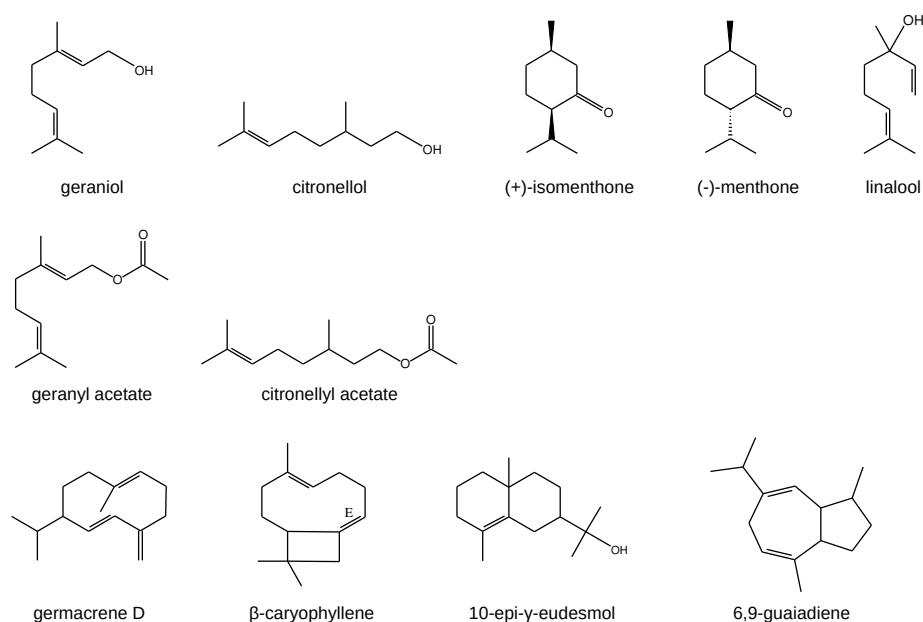


Figure 22 | Structure des terpènes majoritaires de l'huile essentielle de pélagonium

4.4 Les trichomes, usines cellulaires, à l'origine de la production des terpènes

L'HE de pélagonium est obtenue à partir de ses feuilles. Celles-ci sont recouvertes de structures glandulaires, des trichomes glandulaires (TG), dans lesquels les composés organiques volatils (COV) sont stockés. Les terpènes, comme de nombreux COV, peuvent devenir toxiques pour les cellules végétales lorsqu'ils sont présents en trop grande concentration. Lorsque ces composés ne sont pas directement émis, ils sont donc stockés dans des structures spécialisées (Wagner, 1991). L'émission constitutive des terpènes est souvent impliquée dans l'attraction des pollinisateurs, comme pour de nombreuses fleurs dont la rose, où les cellules épidermiques des pétales permettent une émission en continu (Baudino *et al.*, 2007). *A contrario*, le stockage des terpènes fait partie des mécanismes de défense constitutive contre les nuisibles et les attaques d'herbivores. Les TG sont les structures de stockage les plus connues, retrouvées chez plus de 30 % des espèces de plantes vasculaires (Fahn, 2000) : ils correspondent à des protubérances différenciées de l'épiderme sur les parties aériennes de la plante (feuilles, tiges, calices) et sont spécialisés dans la production de grandes quantités de COV (Gang *et al.*, 2001 ; Gershenzon et Dudareva, 2007 ; Gershenzon *et al.*, 1992 ; Huchelmann, Boutry et Hachez, 2017 ; Tissier, 2018). D'autres types de structures de stockage existent, comme les canaux résinifères mais ceux-ci sont notamment présents chez les conifères et les plantes lactifères (Schilmiller, Pichersky et Last, 2012).

Il existe deux catégories de trichomes : les trichomes tecteurs (TT, aussi appelés trichomes non-glandulaires) servant à la défense physique de la plante, notamment contre la dessiccation et les TG servant à la défense chimique de la plante *via* la production de COV (Wagner, Wang et Shepherd, 2004). Les TT sont composés de une à cinq cellules entourées d'une cuticule épaisse. Ils peuvent être plus ou moins longs et plus ou moins fins, ressemblant souvent à de longs poils (Figure 23B(g) à (l)). En ce qui concerne les TG, ils sont souvent constitués d'une ou plusieurs cellules de pied

(basales), de cellules intermédiaires (aussi appelées cellules de cou) et une ou plusieurs cellules de tête. Lorsque la tête glandulaire est portée au sommet d'une « tige » (cellules intermédiaires), les TG sont dits capités tandis que lorsque les TG possèdent des têtes glandulaires larges et un pied bas, ils sont dits peltés. Typiquement, les cellules de pieds ancrent le trichome dans l'épiderme tandis que les cellules de tête sécrètent les COV, directement ou vers une cavité de stockage sous-cuticulaire où l'HE est maintenue sous pression (Figure 23A&B(a) à (f)) (Fahn, 2000 ; Turner, Gershenzon et Croteau, 2000). Contrairement au TT, la cuticule des TG (capités comme peltés) est fine. Une pression trop forte ou un choc mécanique violent, entraîne la rupture de la cuticule et la libération de l'HE, par exemple sur le ravageur. Une partie de l'HE peut néanmoins diffuser lentement au travers de la cuticule et ce, particulièrement lors de stress biotique comme de fortes températures qui affectent la pression de vapeur des COV.

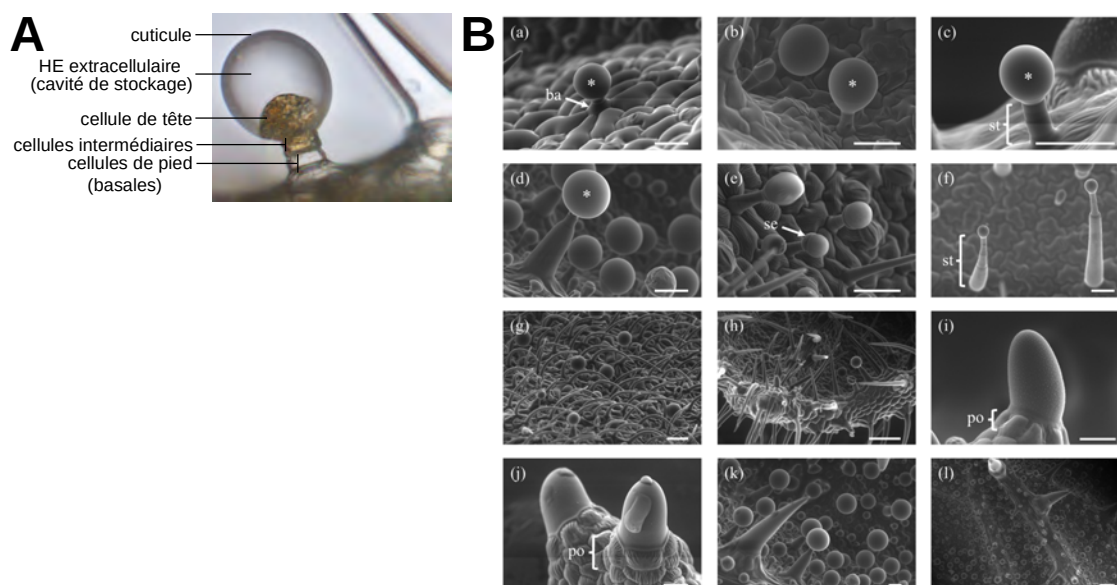


Figure 23 | (A) Structure d'un trichome glandulaire capitée. (B) Trichomes de pélagoniums odorants observés au microscope électronique à balayage, d'après Blerot *et al.* (2016)

(A) Le trichome présenté correspond à un trichome de *P. rosat* 'Grasse' observé au microscope optique. (B) (a) *P. graveolens* (glandular type I) ; (b) *P. x 'Toussaint'* (c) *P. 'Toronto'* ; (d) *P. citronellum* ; (e) *P. 'Clorinda'* ; (f) *P. capitatum* ; (g) *P. fragrans* ; (h) *P. tomentosum* ; (i) *P. x 'Toussaint'* ; (j) *P. glutinosum* ; (k) & (l) *P. citronellum*. ba : cellule de pied (basale), po : pied, se : cellule de tête (sécretive), st : cellules de cou, * : cavité de stockage de l'HE. La barre d'échelle correspond à 50 μm sauf pour (h) & (k) où elle correspond à 200 μm .

Les TG sont retrouvés chez de nombreuses Lamiacées et Solanacées ainsi que certaines Cannabacées (Huang, Kirchoff et Liao, 2008 ; Schillmiller *et al.*, 2009 ; Simmons et Gurr, 2005). Ils ont été étudiés chez nombre d'entre elles dont la menthe (Rios-Esteva *et al.*, 2008 ; Turner, Gershenzon et Croteau, 2000), la sauge (Caissard *et al.*, 2012 ; Schmiderer *et al.*, 2008), la lavande (Huang, Kirchoff et Liao, 2008), le patchouli (Deguerry *et al.*, 2006), la tomate (McDowell *et al.*, 2011), le houblon (Wang *et al.*, 2008) et le cannabis (Livingston *et al.*, 2020). Leur taille, leur densité, leur répartition et leur morphologie sont très variables d'une espèce à l'autre. Le recensement des différents trichomes de pélagoniums de plusieurs sections ont mis en évidence une grande diversité de trichomes au sein même du genre, avec six à sept types de TT et entre cinq et onze types de TG selon les espèces étudiées (Foucq de Cambiaire, 1986 ; Oosthuizen, 1983a). Plus récemment, l'étude de vingt pélagoniums odorants de la section *Pelargonium* a

identifié cinq types de TG et cinq types de TT qui se distinguent selon leur taille et leur morphologie (Figure 23). En ce qui concerne les TG de pélargonium, seuls des TG capités ont été observés et les différents types se différencient par le nombre de cellules intermédiaires et la forme de leur tête globulaire formée par la cellule sécrétrice et la cavité de stockage (Figure 23(a) à (f), (Blerot *et al.*, 2016)). Les TG sont retrouvés sur l'ensemble de la surface foliaire, ils sont plus abondants sur l'épiderme inférieur (Oosthuizen et Coetzee, 1984 ; Oosthuizen et Coetzee, 1983) et les types et densités retrouvés varient selon les accessions de pélargoniums (Blerot *et al.*, 2016).

La présence de TG chez les pélargoniums est en grande partie responsable du prix compétitif de son HE. Contrairement à la rose, la production de terpènes n'est pas dépendante de la floraison, l'HE est stockée par la plante et la quantité de biomasse productrice est beaucoup plus importante. La densité des TG influence évidemment le rendement en HE (Yoshida et Tamai, 1958). Chez d'autres espèces, comme la tomate, il a même été démontré que la quantité et la composition en COV peuvent varier selon le type de TG et leur stade de développement (McDowell *et al.*, 2011 ; Schillmiller *et al.*, 2010 ; Turner, Gershenzon et Croteau, 2000 ; Voirin et Bayet, 1996). Certaines phytohormones, comme le jasmonate et l'acide gibbérellique agissent sur le développement de TG via l'activation de facteurs de transcription trichome-spécifiques et l'induction de cascades de signalisation propres au TG (Bosch *et al.*, 2014 ; Bose *et al.*, 2013 ; Huchelmann, Boutry et Hachez, 2017 ; Ishida *et al.*, 2008 ; Koo et Howe, 2009 ; Li *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2017 ; Tian *et al.*, 2014 ; Yan *et al.*, 2017). Le métabolisme des TG est régulé par le biais de divers signaux intrinsèques à la plante et à son environnement : la distribution et la densité des TG varient selon la température, la photopériode (Gianfagna, Carter et Sacalis, 1992 ; Kennedy *et al.*, 1981), l'âge et l'état nutritionnel de la plante (Barbour, Farrar et Kennedy, 1991) et évidemment les stress biotiques et abiotiques (Kazama *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004 ; Wilkens *et al.*, 1996).

Dans le cas des pélargoniums, étant donné qu'ils sont cultivés dans des régions différentes, il est raisonnable d'estimer que les TG ne se développent pas de manière uniforme selon le cultivar et le lieu de culture. En effet, la culture de *P. rosat* a lieu dans des régions aux conditions environnementales très variées : en Inde, les pélargoniums sont cultivés dans des régions montagneuses sous un climat tempéré. En Égypte, la culture se fait près du Nil ou dans les régions désertiques au climat chaud et sec proche du climat saharien. À la Réunion, le climat est tropical et la culture peut être réalisée dans des régions d'altitude trop élevée pour la culture de vanille et de canne à sucre. Par conséquent, les pélargoniums croissent sous des températures, des niveaux d'hygrométrie, des compositions du sol et des photopériodes différentes. Bien que l'influence de ces paramètres n'ait pas été étudiée précisément chez les TG de pélargonium, il est connu qu'ils ont une influence sur la quantité et la qualité de leur HE (Bhattacharya *et al.*, 1993 ; Chauhan et Verma, 2010 ; Motsa *et al.*, 2006 ; Rajeswara Rao *et al.*, 1990 ; Singh *et al.*, 2013).

Au-delà du climat, les conditions de développement de la plante et des TG incluent également les modalités de culture. Or, pour le pélargonium, les pratiques culturales sont très variables et propres aux producteurs. Les boutures peuvent être préparées en pépinière ou serre, comme à l'île de la Réunion, ou directement plantées en champ, comme en Égypte (Motsa *et al.*, 2006 ;

Thimmappa et Bhattacharjee, 1990 ; Verma *et al.*, 2010). La culture est le plus souvent une monoculture (pélargonium seul) mais ils peuvent être intégrés à des cultures multiples avec des aulx, des oignons ou de la menthe (Rajeswara Rao, 2002a ; Singh *et al.*, 2013 ; R. K. Verma *et al.*, 2013a ; Verma *et al.*, 2011). La récolte peut se faire une seule fois par an, comme en Égypte, ou deux à quatre fois par an, comme en Chine, à la Réunion et en Inde (Michellon, 1978 ; Singh *et al.*, 2007). De la même façon que le climat, chacun de ces paramètres va influencer l'HE retrouvée dans les TG.

Finalement, l'HE produite dans les trichomes de pélargonium est le résultat d'une combinaison multi-paramétrique subtile et complexe qui dépend de la génétique de la plante, des TG et de l'ensemble des conditions de développement. En revanche, dans notre contexte, il est important de prendre en compte les paramètres qui vont impacter la quantité et la qualité de l'HE après la récolte des pélargoniums. En effet, les plantes entières sont récoltées puis distillées et là encore différents traitements post-récoltes existent : les plantes peuvent être stockées en champ ou en sac (Kaul *et al.*, 1997 ; Ram *et al.*, 2005 ; R. S. Verma *et al.*, 2013b) avant d'être amenées jusqu'à la zone de distillation, qui peut se trouver sur site ou non (Babu, Kaul et Ahuja, 2002 ; Kaul *et al.*, 2001). L'HE est obtenue par hydrodistillation ou distillation à la vapeur, la durée de distillation est variable (Kaul *et al.*, 2001 ; Kaul *et al.*, 1995) et elle peut être suivie d'une extraction secondaire par stripping⁸ ou en utilisant des polymères absorbants (Amin, Pangarkar et Beenackers, 2001). Beaucoup des pratiques culturales et post-récoltes sont basées sur la culture empirique et traditionnelle du pélargonium. Leur influence sur l'HE est mal connue et pour autant, ces paramètres sont aussi déterminants que le climat. C'est pourquoi il est important d'étudier aussi bien les mécanismes de régulation génétique et l'influence des facteurs abiotiques pour comprendre et optimiser la production de l'HE de pélargonium.

5 Objectifs de thèse

La thématique du pélargonium a été initiée au LBVpam⁹ avec la thèse de Bernard Blerot (2013-2016), responsable recherche et développement (R&D) du groupe IFF-LMR-Naturals¹⁰. Cette entreprise est spécialisée dans la production d'extraits naturels à destination de la parfumerie. Au travers d'un vaste programme de recherche fondamentale, IFF-LMR-Naturals cherche à étudier les gènes responsables du parfum des pélargoniums et à mieux comprendre le métabolisme terpénique du pélargonium. Le groupe travaille également en collaboration avec la société Hashem Brothers¹¹, producteur majeur d'HE de pélargonium en Égypte, afin de poursuivre la R&D directement en champs et ainsi déterminer les conditions optimales de culture. Mieux comprendre la biologie moléculaire de cette plante permet d'aider à la sélection variétale et à la production stable et à moindre coût d'une HE de qualité.

⁸ Le stripping correspond à une distillation de l'eau de décantation (obtenue après distillation) avec une plus faible quantité de vapeur, visant à extraire un maximum de l'HE non extraite lors de la première distillation

⁹ LBVpam pour Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales

¹⁰ IFF-LMR-Naturals pour International Flavors and Fragrances – Laboratoire Monique Rémy. La société LMR, fondée en 1983 à Grasse, (FR) a été rachetée en 2000 par IFF

¹¹ Hashem Brothers for Essential Oils & Aromatic Products, fondée en 1974 par Alaa Hashem, est une société familiale et un des producteurs majeurs d'huiles essentielles et produits aromatiques naturels en Égypte

Dans le cadre de ce programme de recherche, la collaboration entre le LBVpam et IFF-LMR-Naturals s'intéresse aux voies de biosynthèse des COV et à l'influence de facteurs abiotiques sur la qualité de l'HE et sur les proportions des mono- et sesqui-terpènes majeurs de l'HE. Notamment, un intérêt particulier est porté sur le géraniol et le citronellol à l'origine du parfum de rose ainsi que l'eudesmol et le guaiadiène utilisés comme marqueurs de qualité. La thèse de Bernard Blerot a permis d'établir la diversité des COV de 64 accessions de pélargoniums odorants, de caractériser pour la première fois des TPS impliquées dans leur biosynthèse et d'optimiser la production en Égypte.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, trois objectifs dans la continuité du projet étaient visés :

- étudier la diversité des sesquiterpènes et sTPS et notamment caractériser l'eudesmol synthase et la guaiadiène synthase
- élucider la voie du citronellol en aval du géraniol afin d'identifier les étapes enzymatiques et de mieux comprendre les ratios de géraniol:citronellol dans les HE
- étudier en conditions contrôlées l'effet du climat (température et humidité) sur la composition de l'HE de différents *P. rosat*.

Dans le chapitre 1, une approche originale multi-omique réalisée au cours de cette thèse est présentée. Cette approche nous a permis de constituer une base de données regroupant les profils biochimique et transcriptomique de dix accessions de pélargoniums odorants. Pour cela, un séquençage haut débit des ARN (RNA-seq) a été réalisé et j'ai participé au traitement des données transcriptomiques qui a été principalement effectué par Dr Denis Saint-Marcoux. J'ai également réalisé la préparation des échantillons et l'analyse des données. Cette approche nous a servi par la suite dans la caractérisation de la voie de biosynthèse du citronellol et ouvre de nouvelles portes pour la poursuite des recherches chez le pélargonium.

Le chapitre 2 est un article publié dans *Frontiers in Plant Science* intitulé « Functional analysis of four terpene synthases in rose-scented pelargonium cultivars (*Pelargonium x hybridum*) and evolution of scent in the *Pelargonium* genus ». Il regroupe les travaux de caractérisation de trois mTPS et d'une sTPS qui correspondent en partie aux travaux de Bernard Blerot. Pour cet article, j'ai finalisé la localisation de la cinéole synthase et la caractérisation de l'eudesmol synthase, j'ai participé à l'interprétation des résultats et à la rédaction.

Le chapitre 3 correspond à la poursuite de l'étude des sTPS initiée par la caractérisation de l'eudesmol synthase et visant à caractériser la guaiadiène synthase. J'ai caractérisé trois nouvelles sTPS. Leur fonction, leur mécanisme enzymatique et leur structure tri-dimensionnelle ont été étudiés afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la diversité sesquiterpéniques de l'HE de pélargonium. Ce chapitre est voué à faire l'objet d'une publication et a donc été rédigé sous forme d'un article et en anglais.

Le chapitre 4 présente l'étude de la voie du citronellol. Suite à la caractérisation de la géraniol synthase lors des travaux antérieurs (Bernard Blerot), le but de cette étude était de caractériser la voie de biosynthèse permettant la production du citronellol à partir de géraniol. À l'aide de l'approche multi-omique mise en place au laboratoire, nous avons pu caractériser cinq réductases de la famille des P5βR. Des analyses fonctionnelles et structurales ont été réalisées afin de mieux

comprendre le rôle de ces réductases vis-à-vis de la biosynthèse de citronellol chez le pélargonium. Ce chapitre est voué à faire l'objet d'une publication et a donc été rédigé sous forme d'un article et en anglais.

Dans le chapitre 5, l'influence de stress abiotiques sur la production d'HE a été étudiée en conditions contrôlées. Cette expérimentation avait pour but i) de réitérer et confirmer les analyses réalisées par Bernard Blerot, ii) d'étudier l'influence d'un climat de culture chaud et sec sur la composition et la quantité d'HE et iii) de comparer les effets d'un tel climat sur deux cultivars de *P. rosat* différents.

Un sixième chapitre a été consacré à la présentation détaillée du matériel et des méthodes utilisés au cours de ma thèse.

Chapitre 1
**Analyse multi-omique
chez dix
pélargoniums**

1 Pélargoniums odorants et approche multi-omique

Depuis leur découverte et rapide introduction en Europe au cours du 17^e siècle, la diversité des pélargoniums s'est rapidement accrue. Les nombreux croisements réalisés à partir des collections mises en place ont généré un grand nombre de parfums et d'odeurs différents (Swain, 1974). En revanche, la traçabilité de ces nouveaux pélargoniums a été très peu conservée et complexifiée par les dénominations arbitraires et redondantes. À titre d'exemple, les hybrides cultivés aujourd'hui pour leur huile essentielle (HE) à odeur de rose, les *Pelargonium x hybridum* cv rosat, plus communément appelés pélargoniums rosat (*P. rosat*), font partie des nombreux hybrides dont l'origine n'est pas claire. Il a été établi que ces *P. rosat* sont issus d'un croisement entre l'espèce botanique *Pelargonium capitatum* à odeur de rose et une espèce botanique à odeur de menthe. Néanmoins, il existe huit chémotypes de *P. capitatum* (Viljoen *et al.*, 1995) et deux espèces possibles comme second parent : *P. radens* ou *P. graveolens* (Demarne et van der Walt, 1989). L'origine des différents profils olfactifs retrouvés chez ces hybrides et chez les pélargoniums odorants en général, est mal connue. Combinée à la polyploïdie de ces plantes, cette diversité rend l'étude de leur parfum aussi complexe qu'intéressante.

L'analyse de la composition de l'HE de pélargoniums odorants constitue la première étape pour déterminer l'origine et la qualité de leurs parfums. Ainsi, les analyses chromatographiques d'HE de nombreuses espèces botaniques et d'hybrides de pélargoniums ont été réalisées (Demarne, Viljoen et van der Walt, 1993 ; Kulkarni, 1998 ; Lalli *et al.*, 2006 ; Lis-Balchin, 1991 ; Tembe et Deodhar, 2010). Depuis 2013, le laboratoire BVpam a constitué une collection de pélargoniums et l'analyse des composés organiques volatils (COV) de 64 accessions a été réalisée par Bernard Blerot (Thèse 2013-2016). Notre stratégie de travail, dans le cadre de ma thèse, comporte une approche multi-omique qui veut associer l'analyse métabolique des COV et l'analyse transcriptomique des ARNm codant les enzymes responsables de la production de ces composés. Ces analyses conjointes devraient permettre d'associer l'abondance de certains composés parfumés à l'expression différentielle de certains transcrits, proposant ainsi des gènes candidats pour la caractérisation d'enzymes impliquées dans une voie de biosynthèse spécifique. En effet, si l'analyse des HE de pélargonium est à ce jour très documentée, les gènes et enzymes impliqués dans ces voies de biosynthèse sont peu connus chez les pélargoniums (Blerot *et al.*, 2016). Une meilleure connaissance des bases génétiques de la biosynthèse du parfum est un prérequis pour mieux comprendre la transmission de ce caractère et les mécanismes de régulation.

Pour cette étude multi-omique, dix accessions de pélargoniums ont été sélectionnées parmi les 64 disponibles dans la collection du laboratoire (Tableau 1.1). La sélection a été réalisée de sorte qu'elle recouvre la plus grande diversité biochimique possible des COV synthétisés chez le genre *Pelargonium*.











Ainsi, quatre espèces botaniques ont été sélectionnées, incluant les parents supposés des pélargoniums rosat actuellement cultivés pour leur HE : *P. capitatum* (odeur de rose) et *P. radens* et *P. graveolens* (odeur de menthe). Au-delà de leur odeur, les trois accessions se démarquent par

leur phénotype. Bien que toutes les accessions présentent des limbes palmées, *P. capitatum* présente des feuilles lobées et lisses tandis que *P. graveolens* et *P. radens* présentent des feuilles très dentelées, ainsi que duveteuses chez *P. graveolens* (Tableau 1.1). La quatrième espèce botanique sélectionnée, *P. citronellum*, se différencie des autres sur de nombreux critères morphologiques, biochimiques et génétiques. Les feuilles sont rugueuses du fait de la densité en trichomes. Cette espèce dégage une odeur de citron (citronnelle). Et enfin, *P. citronellum* à une ploïdie moins élevée que les autres espèces botaniques étudiées, ce qui facilite les analyses transcriptomiques en diminuant la complexité des transcriptomes obtenus.

Hormis ces quatre espèces, six hybrides ont été sélectionnés. Parmi ces hybrides, *P. rosat* 'Grasse', 'Bourbon', 'Égypte' et 'Chine' ont été choisis pour leur intérêt agronomique, ainsi que pour étudier des variations subtiles de l'HE dans un contexte génétique semblable. Ainsi, les quatre hybrides ont une odeur de rose, des phénotypes proches et une même ploïdie résultant de leurs parents putatifs communs. Néanmoins, leur HE, comme leur phénotype, sont distinctifs (Tableau 1.1). Tous possèdent des fleurs très semblables et des feuilles à limbes palmés et rugueux, mais avec des niveaux de dentelure et de pigmentation différents. De plus, ces quatre pélargoniums sont connus pour être cultivés dans des conditions environnementales différentes (Rajeswara Rao, 2002b ; Rajeswara Rao *et al.*, 1990 ; Verma, Chandra Padalia et Chauhan, 2016 ; Verma *et al.*, 2013c). Pour ce qui est de l'hybride *P. x* 'Toussaint', bien que son origine soit controversée et peu documentée, celui-ci présente un phénotype très proche de *P. radens* et une HE ayant à la fois une odeur de menthe et une odeur de rose ; assimilable à un hybride de l'HE de pélargonium rosat et de pélargoniums à odeur de menthe. Enfin, de manière similaire à *P. citronellum*, l'hybride *P.* 'Prince of Orange', dont les parents sont inconnus, se distingue avec une HE à odeur d'agrume, voire d'orange, très éloignée des autres accessions. Par ailleurs, les feuilles de cette accession sont proches de celles de *P. capitatum*. Celles-ci sont lobées et lisses, mais aux rebords plus incisés et de plus petite taille. Les feuilles lisses sont souvent corrélées à des rendements en HE plus faible, de par la faible densité de trichomes (Boukhris *et al.*, 2013 ; Krstic, Malencic et Anackov, 2006 ; Yoshida et Tamai, 1958). Les deux accessions *P. citronellum* et *P.* 'Prince of Orange' nous ont permis d'accroître la diversité des profils olfactifs et biochimiques de notre sélection, notamment en fournissant des profils plus tranchés pouvant faciliter la mise en évidence de voies de biosynthèse par comparaison avec les autres accessions.

Afin de pouvoir corrélérer au mieux les profils biochimiques et transcriptomiques dans le cadre de l'approche multi-omique, les analyses ont été réalisées sur les mêmes échantillons. Ainsi, pour chacune des dix accessions, trois boutures ont été réalisées et cultivées dans les mêmes conditions (détails en chapitre 6). Des échantillons de jeunes feuilles (< 2,5 cm) ont été prélevés pour chaque plant, soit trois échantillons par accession. Le matériel de chaque échantillon a été divisé en deux : une partie a été extraite à l'hexane pour analyse chromatographique de la composition en COV et l'autre partie a été utilisée pour extraire les ARN totaux et les séquencer (détails des protocoles en chapitre 6). De ce fait, les échantillons métaboliques correspondent parfaitement aux transcriptomes. L'analyse en triplicats a permis de pondérer la variabilité intraspécifique et inter-accessions des dix accessions étudiées.

Tableau 1.1 | Récapitulatif des dix accessions de pélargoniums étudiées

Accessions	Catégorie d'accession	Odeur	Phénotype foliaire	Nombre de chromosomes
<i>P. capitatum</i>	espèce botanique	rose		2n = 66
<i>P. graveolens</i>	espèce botanique	menthe		2n = 88
<i>P. radens</i>	espèce botanique	menthe		2n = 88
<i>P. citronellum</i>	espèce botanique	citron		2n = 22
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'Bourbon'	hybride	rose		2n = 77
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'Chine'	hybride	rose		2n = 77
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'Égypte'	hybride	rose		2n = 77
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'Grasse'	hybride	rose		2n = 77
<i>P. x 'Toussaint'</i>	hybride	rose-menthe		2n = 77
<i>P. 'Prince of Orange'</i>	hybride	orange		2n = 22*

* : Pour *P. 'Prince of Orange'*, la ploïdie est incertaine

2 Analyse biochimique de l'huile essentielle

2.1 Contexte et objectifs

L'extraction à l'hexane permet d'extraire les COV présents dans les feuilles dont la composition est assimilable à la composition de l'HE. L'extrait hexanique de chaque échantillon a été analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (GC-MS, de l'anglais *gas chromatography-mass spectrometry*) afin d'obtenir les profils biochimiques de l'HE. Les identifications et les quantifications ont toutes été réalisées avec les mêmes conditions d'analyse et paramètres d'intégration et à l'aide d'un standard interne.

2.2 Composition globale et terpénique

Pour avoir une vue d'ensemble de la diversité de composition de l'HE de pélargonium, une première analyse générale de chaque accession a été réalisée. Au sein des dix accessions, 123 composés ont été identifiés, chaque HE présentant une diversité plus ou moins grande de COV. Ainsi, le nombre de composés par accession varie de 35 (chez *P.* 'Prince of Orange') à 69 composés (*P.* rosat 'Grasse') avec une moyenne de 50 composés. Les quatre *P.* rosat présentaient le plus de composés différents (plus de 60) (Figure 1.1A).

Toutes les accessions présentaient une HE quasi-exclusivement composée de terpénoïdes (terpènes et dérivés), représentant 87 à 99 % de la composition totale. Par la suite, le terme de « terpénome » sera donc utilisé pour parler de la composition biochimique en COV des différentes accessions. Parmi les composés minoritaires, des phénylpropanoïdes et certains dérivés du phényléthyl éthanol (p. ex. phényléthyl tiglate) étaient souvent retrouvés. Par ailleurs *P. citronellum* et *P.* 'Prince of Orange', se sont caractérisés par la présence de dérivés d'acides gras (p. ex. octanal). Pour toutes les accessions, le terpénome contient une diversité équivalente en mono- et sesqui-terpénoïdes. Au sein des monoterpénoïdes et des sesquiterpénoïdes identifiés, plusieurs classes de composés se distinguaient. En effet, les composés ont été répertoriés selon les carbocations dont ils sont issus, donnant lieu à une classification des terpénoïdes en molécules acycliques, monocycliques, bicycliques, voire tricycliques. Des monoterpénoïdes acycliques et monocycliques étaient principalement retrouvés, tandis que les sesquiterpénoïdes majoritaires étaient bicycliques et tricycliques.

En ce qui concerne la teneur en composés dans les extraits, les variations inter-accessions étaient plus marquées. La teneur en COV la plus faible étant celle de *P.* 'Prince of Orange' avec 5,7 mg de composés par gramme de matière sèche. *P. citronellum* à l'inverse avait la teneur la plus élevée avec 48,4 mg.g⁻¹ de matière sèche. Les *P.* rosat présentaient une teneur entre 33,0 mg.g⁻¹ et 41,6 mg.g⁻¹ alors que deux de leurs parents putatifs – *P. capitatum* et *P. graveolens* – présentaient des teneurs d'environ 20-23 mg.g⁻¹ de matière sèche (Figure 1.1B).

Contrairement aux analyses qualitatives, la composition quantitative de l'HE a montré une prédominance des monoterpénoïdes. Hormis chez *P.* 'Prince of Orange', ceux-ci constituaient plus de 70 % de l'HE et jusqu'à 92 % de l'HE chez *P. graveolens*. Chez les deux espèces botaniques à

odeur de menthe, *P. graveolens* et *P. radens*, les monoterpénoïdes étaient principalement monocycliques, les plus abondants étant ceux de la voie des *p*-menthanes (p. ex. isomenthone, menthone, menthol, pipéritone). Ces composés, connus pour leur rôle majeur dans l'odeur de menthe, représentaient à eux seuls 70 % de l'HE de ces deux accessions. *A contrario*, les autres accessions avaient des HE composées majoritairement de monoterpénoïdes acycliques, représentés majoritairement par le géraniol et ses dérivés (géraniol, néral, citronellol et divers esters). En effet, le citronellol chez *P. capitatum* et *P. rosat* 'Chine' ainsi que le citronellol et le géraniol chez les trois autres *P. rosat* représentaient 40 % de l'HE. Chez *P. citronellum*, c'est le mélange isomérique des monoterpénoïdes acycliques géraniol et néral (aussi nommé citral) qui représente 60 % de l'HE. Il est à noter que le géraniol et le citronellol sont associés à l'odeur de rose, tandis que le citral est associé à une forte odeur de citron. Finalement, pour toutes les accessions, les composés principaux étaient les monoterpénoïdes caractéristiques de leur parfum principal. De manière générale, les monoterpénoïdes bicycliques et tricycliques étaient présents en teneurs négligeables. *P. x* 'Toussaint' est une accession particulière car elle possède à la fois un parfum de menthe et de rose et présentait donc une composition majoritaire en monoterpénoïdes acycliques (dérivés du géraniol à odeur de rose) et monocycliques. *P.* 'Prince of Orange', déjà démarqué par sa faible teneur en COV, s'est également caractérisé par sa composition originale. Bien que son HE renferme quasiment autant de composés que d'autres accessions, la quantité d'HE est beaucoup plus faible que toutes les autres accessions. De plus, contrairement aux autres accessions évoquées précédemment, l'HE de *P.* 'Prince of Orange' était composée d'autant de monoterpénoïdes que de sesquiterpénoïdes. Proportionnellement, il s'agit de la plus grande fraction de sesquiterpénoïdes. Il est d'ailleurs également à noter que les sesquiterpénoïdes étaient très peu produits chez *P. radens* et *P. graveolens* (Figure 1.1B), hormis quelques sesquiterpènes acycliques, absents des *P. rosat*. Finalement, cette étude souligne la diversité et la variabilité inter-accessions de la production des terpènes chez les pélagoniums odorants.

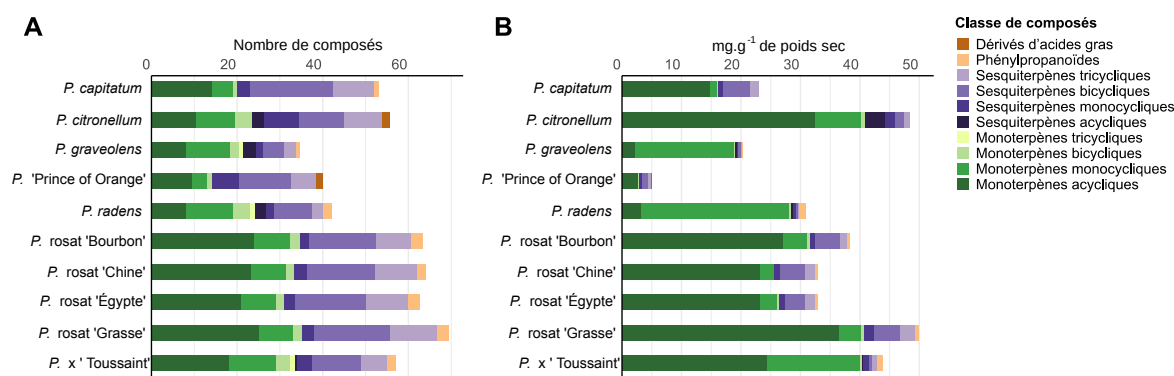


Figure 1.1 | Composition en composés organiques volatils par accession

(A) Composition en nombre de composés. (B) Composition en teneur de composés, en mg par g de poids sec de matière végétale. Les valeurs correspondent aux moyennes des triplicats par accession.

2.3 Discrimination des odeurs par les composés

Au-delà d'une analyse qualitative et quantitative des différentes classes de COV, chaque composé a été identifié et quantifié (Supplemental_data 1.1). Des analyses de données ont été réalisées afin de mettre en évidence les composés discriminants des accessions. Ainsi, une

analyse par régression des moindres carrés partiels (pls-da, de l'anglais *partial least squares discriminant analysis*) (Figure 1.2) a permis d'identifier les variables – ici les composés – les plus explicatifs des différences entre accessions. Une pls-da permet d'identifier aussi bien les composés discriminants qualitativement que quantitativement. Ici, afin de ne pas perdre des informations sur le pouvoir discriminant de composés retrouvés en teneur faible, l'analyse s'est focalisée sur les données qualitatives des profils : les composés caractéristiques à certaines accessions ont été mis en évidence, qu'ils aient été initialement présents en teneurs majoritaires ou minoritaires. Les composés qui en sont ressortis sont ceux présentés sur le graphique.

De cette analyse, trois groupes distinguent les accessions ayant des parfums proches : à odeur de rose, de menthe ou d'agrumes. Cette analyse privilégiant la présence/absence de chaque composé, les trois groupes sont définis par des composés présents uniquement dans les accessions qui les constituent (Supplemental_data 1.2).

Le groupe à odeur d'agrumes, composé de *P. citronellum* et *P. 'Prince of Orange'*, s'est distingué par une corrélation positive avec des sesquiterpènes monocycliques issus du cation bisabolyll ainsi que des sesquiterpènes acycliques (farnesène, nérolidol). Par ailleurs, chez ces deux accessions une corrélation négative est également observée avec le citronellol et les dérivés mentholés. *P. citronellum* s'est d'autant plus distingué par la présence de géraniol : bien que ce composé soit retrouvé à l'interface avec les pélargoniums à odeur de rose sur la pls-da, il est nettement majoritaire chez *P. citronellum* que chez les autres accessions (Supplemental_data 1.2).

Dans le groupe à odeur de menthe, *P. graveolens* et *P. radens* ont été caractérisés essentiellement par des monoterpénoïdes monocycliques de la voie des *p*-menthanes, très nettement majoritaires chez ces accessions (Supplemental_data 1.2). En revanche, ce groupe ne présentait aucun sesquiterpène discriminant et une corrélation positive uniquement avec les sesquiterpènes acycliques également présent chez *P. citronellum* et *P. 'Prince of Orange'*.

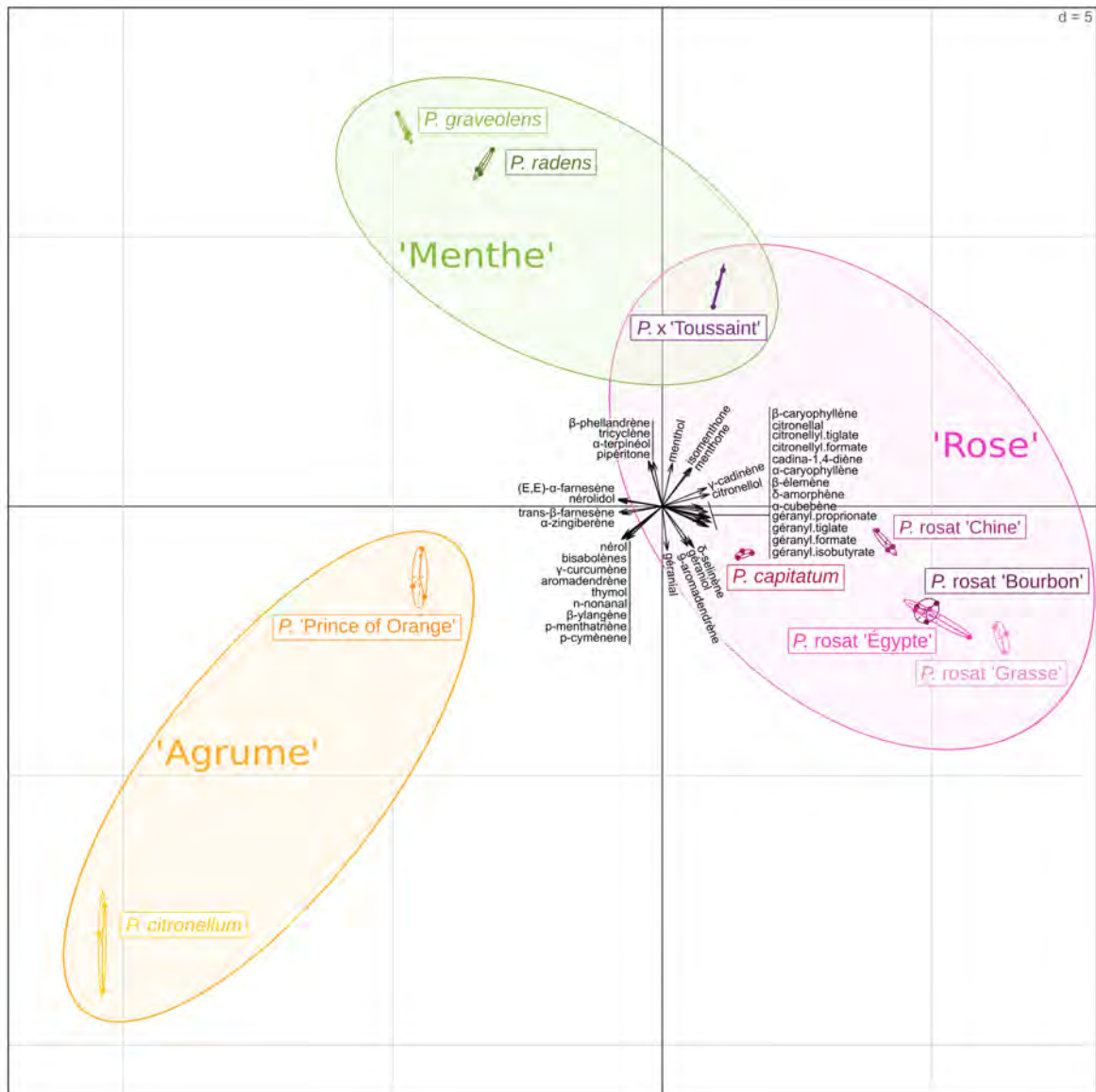


Figure 1.2 | Analyse discriminante (pls-da) des profils biochimiques des dix accessions de pélagoniums

Les composés présents sur le graphique correspondent aux composés discriminants et les flèches indiquent les corrélations existantes et leur intensité. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel R et à partir des données quantitatives absolues.

Les *P. rosat* et *P. capitatum* formaient un dernier groupe, ayant une corrélation positive avec de nombreux terpénoïdes. Malgré la proximité des cinq accessions, chacune était distincte au sein du groupe. *P. capitatum* et l'hybride 'Chine' se démarquaient plus particulièrement des trois autres *P. rosat*. Néanmoins, aucun composé ne semblait être spécifiquement discriminant de *P. capitatum* ou de *P. rosat* 'Chine'. La discrimination semblerait être le résultat de multiples variations mineures, qui concerneraient plusieurs composés caractéristiques des pélagoniums à odeur de rose. Cette distinction s'est avérée valable pour l'ensemble des accessions du groupe et reflète celle qui existe entre les profils olfactifs des pélagoniums à odeur de rose : tous les composés discriminants étaient présents dans les cinq accessions, mais en proportions différentes. Il en résulte une base florale commune à l'odeur de rose avec des nuances plus ou moins citronnées. Les composés caractéristiques de ce groupe 'rose' étaient majoritairement des monoterpénoïdes acycliques tels que le géraniol, le citronellol et leurs dérivés estérifiés. Les profils de ces monoterpénoïdes ont

permis d'illustrer certaines différences quantitatives marquantes entre les accessions. Par exemple, les teneurs en géraniol et esters dérivés semblaient plus discriminantes des hybrides rosat, puisque ces composés étaient peu ou pas retrouvés chez *P. capitatum* mais présentaient des teneurs variables selon les hybrides (Supplemental_data 1.1). Les terpénoïdes issus de la voie du géraniol et du citronellol semblaient donc bien être les composés les plus discriminants de l'odeur de rose. Les sesquiterpénoïdes discriminants les accessions à odeur de rose étaient présents au même nombre que les monoterpénoïdes. De la même manière, aucun ne semblait spécifiquement discriminant d'une accession ou l'autre. Cela suggère que les variations de parfum observées entre les *pélargoniums* rosat résultent de variations non seulement des terpénoïdes de la voie du citronellol mais également de certains sesquiterpénoïdes.

En ce qui concerne *P. x 'Toussaint'*, sa position sur la pls-da (Figure 1.2) reflétait bien la composition et le parfum de son HE. En effet, son HE contenait en proportion équivalente des monoterpénoïdes acycliques de la voie du citronellol et des monoterpénoïdes monocycliques de la voie des *p*-menthanes. Par conséquent, son profil biochimique a été retrouvé à l'interface entre les accessions à odeur de rose et celles à odeur de menthe. Étant donné que la pls-da a privilégié les différences qualitatives, le pouvoir discriminant du citronellal était minoré. En effet, le citronellal présentait un profil biochimique marqué, avec une teneur notablement plus élevée chez *P. x 'Toussaint'*. Pour autant, ce caractère de l'HE de *P. x 'Toussaint'* n'apparaissait pas comme discriminant dans la pls-da, car il était également présent, bien qu'en plus faible quantité, chez les *P. rosat* et *P. capitatum*.

Afin d'effectuer une analyse complète des données métabolomiques recueillies, une deuxième analyse des composés discriminants a été réalisée. Cette analyse correspond à une mesure de la corrélation des profils de chaque composé et a été représentée à l'aide d'un corrélogramme (ou heatmap de corrélation, Figure 1.3). À l'inverse de la pls-da, l'analyse de corrélation s'est focalisée sur les données quantitatives et est donc complémentaire : la pls-da indique les corrélations des composés avec les accessions tandis que le corrélogramme indique l'intensité de la corrélation (à l'aide d'un spectre de couleurs). Ainsi, les composés fortement corrélés, ayant des profils similaires, voire liés, ont pu être identifiés.

Sur le corrélogramme (Figure 1.3), les trois groupes discriminants observés sur la pls-da ont été retrouvés : le carré rose met en évidence la corrélation entre les composés discriminants des accessions à odeur de rose. Le carré vert souligne la corrélation des terpénoïdes caractérisant l'odeur de menthe et le carré orange souligne la corrélation des composés corrélés à *P. citronellum* et *P. 'Prince of Orange'*. Avec cette analyse, les composés présentant une corrélation avec des accessions de différents groupes étaient plus distinguables. Par exemple, le géraniol était corrélé positivement à différents terpénoïdes de l'odeur de rose mais possédait surtout une corrélation positive et significative avec le thymol, le nérol, ou encore le *p*-cymène, qui sont des composés spécifiques de l'HE de *P. citronellum*. En ce qui concerne le citronellal, il était corrélé significativement aux composés principaux de *P. x 'Toussaint'*, tels que le citronellol, le citronellyl tiglate, l'isomenthone et le menthol. Néanmoins, la corrélation était beaucoup plus importante avec

le citronellol et le citronellyl tiglate, deux composés majeurs de l'HE des pélargoniums à odeur de rose. Ce supplément d'analyse a permis d'expliquer et compléter certaines observations faites grâce à la pls-da (Figure 1.2).

Un des apports majeurs du corrélogramme est la visualisation détaillée des corrélations. La possibilité de voir efficacement quels composés étaient corrélés entre eux, permettant notamment d'observer les profils de corrélation mettant en évidence des composés potentiellement issus d'une même voie de biosynthèse. Par exemple, la pipéritone, la menthone, l'isomenthone et le menthol étaient corrélés positivement, ce qui est cohérent avec les diverses études sur leur biosynthèse notamment chez la menthe (Croteau *et al.*, 2005 ; Davis *et al.*, 2005 ; Ringer *et al.*, 2003). En effet, les voies de biosynthèse des *p*-menthanes connues débutent avec la production de limonène, à partir du géranyl diphosphate (GPP) grâce à une monoterpène synthase (mTPS). La pipériténone, la pulégone, la menthone, l'isomenthone et le menthol sont les dérivés successifs du limonène, obtenus par l'action d'enzymes en cascade (couramment des hydrolases et réductases), dont le produit devient le substrat de l'enzyme suivante. La corrélation observée entre la présence d'isomenthone et de pipéritone supporte l'hypothèse que la voie des *p*-menthanes chez le pélargonium serait différente de celle de la menthe. La menthone et l'isomenthone seraient obtenues par réduction de (+)- et (-)-pipéritone (Bergman *et al.*, 2020).

En ce qui concerne les composés impliqués dans l'odeur de rose, les fortes corrélations entre le géraniol et ses esters et entre le citronellol et ses esters, corroboraient une biosynthèse des esters à partir du géraniol et du citronellol respectivement. Plus intéressant, la forte corrélation entre le citronellal et le citronellol laisse supposer que ces deux molécules font partie de la même voie de biosynthèse. Le citronellal est retrouvé dans toutes les accessions présentant du citronellol, comme le confirment les profils détaillés (Supplemental_data 1.2). Cette corrélation, déjà mise en évidence chez le pélargonium à odeur de rose (Bergman *et al.*, 2020), corrobore l'hypothèse que le citronellol ne serait pas issu d'une réduction directe du géraniol mais serait plutôt le résultat d'une biosynthèse en trois étapes, dont les intermédiaires seraient le géraniol (ainsi que son isomère le néral) et le citronellal. Le géraniol, produit par une mTPS à partir du GPP, serait donc le substrat initial du citral, du citronellal, du citronellol et des esters dérivés. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation significative entre le géraniol et citronellol – puisque certaines accessions possèdent du géraniol mais pas de citronellol –, les corrélations entre les composés de la voie putative étaient présentes sur nos analyses (Figure 1.3) et supportent cette hypothèse. Enfin, le nérol est un composé dont la biosynthèse est méconnue et qui serait lié à la production de l'odeur de rose. En effet, sa synthèse pourrait être le résultat d'une réduction du néral, d'une isomérisation du géraniol, ou bien le nérol pourrait être issu d'une synthèse directe à partir du néryl diphosphate (NPP) *via* l'activité d'une mTPS comme chez le soja (Zhang *et al.*, 2013) ou encore d'une phosphatase ou d'une nudix hydrolase comme chez la rose (Magnard *et al.*, 2015). Bien que le néral ait été absent des composés présentés sur le corrélogramme, la corrélation de son isomère, le géraniol, avec le nérol, suggère que le nérol est produit à partir du géraniol (ou plutôt du citral) et donc vraisemblablement à partir du géraniol. L'absence de corrélation entre le nérol et le géraniol semble écarter l'hypothèse d'une biosynthèse par isomérisation de ce dernier.



Figure 1.3 | Représentation graphique de la matrice de corrélation (corrélogramme) des profils biochimiques pour les composés les plus discriminants

Les valeurs représentées sont les coefficients de corrélation de Spearman calculés à partir des concentrations absolues des profils biochimiques des dix accessions de pélagoniums. Les corrélations significatives sont indiquées par un astérisque (*) et correspondent aux valeurs de p-value < 0,05 calculées à l'aide d'un test t. Les carrés indiqués correspondent aux groupes de composés observés sur la pls-da (Figure 1.2). L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel R.

De multiple mono- et sesqui-terpène synthases (mTPS et sTPS, respectivement) ont la capacité de synthétiser plusieurs produits (Degenhardt, Köllner et Gershenzon, 2009 ; Tholl, 2006 ; Vattekkatte et Boland, 2020). Une corrélation entre divers composés peut donc être l'indication de l'expression d'une enzyme multiproduit ou la coordination du fonctionnement d'enzymes distinctes. C'est plus particulièrement visible chez les sesquiterpènes qui, contrairement aux monoterpènes, sont rarement engagés dans des modifications secondaires et sont donc rarement regroupés dans une même voie de biosynthèse (Cane, 1999).

Quoiqu'il en soit, une analyse des données biochimiques, bien qu'informatrice et nécessaire, est insuffisante pour comprendre l'origine enzymatique de chaque produit. C'est pourquoi des données transcriptomiques sur les mêmes accessions ont été générées.

3 Apport de la transcriptomique

3.1 Contexte et objectifs

La mise en place d'une analyse transcriptomique se trouvait au cœur de la stratégie d'identification des voies métaboliques contrôlant l'odeur chez le pélargonium. En effet, cette approche avait un double objectif :

- Générer des ressources génomiques pour aider à l'identification de gènes. À l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de génome séquencé du pélargonium. Ceci peut sans doute s'expliquer par la difficulté afférente à la polyploïdie rencontrée chez un grand nombre d'espèces. Le nombre de chromosomes chez les espèces diploïdes s'élève généralement à 22. Cependant, la majorité des espèces cultivées pour leur HE sont polyploïdes. Par exemple, les hybrides rosat possèdent 77 chromosomes, issus du mélange des deux parents, dotés respectivement de 88 et 66 chromosomes. Plusieurs projets de RNA-Seq de pélargonium ont été publiés dans le *sequence read archive* (SRA). Cependant, ces ressources concernent des pélargoniums non odorants (bioproject SRP013265), ou bien sont insuffisamment représentatives (séquençage de *P. rosat* 'Bourbon', bioproject SRP078041 ; Narnoliya *et al.*, 2017). De plus, les assemblages associés à ces transcriptomes ne sont pas disponibles. Au début du projet, nous disposions d'un séquençage RNA-Seq 454 assemblé de *P. rosat* 'Grasse' au laboratoire.
- Mettre en place une stratégie d'analyse différentielle de l'expression entre des accessions judicieusement choisies par rapport à leurs profils métaboliques (Supplemental_data 1.2). Cette approche repose sur l'existence d'une relative corrélation entre le niveau d'accumulation des transcrits des enzymes et la quantité de produits. Ainsi, l'enzyme responsable de la biosynthèse d'un produit présent dans une accession A devrait présenter un transcrit assez fortement exprimé dans cette accession, tandis que son expression sera faible ou nulle dans une accession B n'accumulant pas le produit. Cette approche peut être mise en œuvre à petite échelle, en se focalisant sur quelques gènes candidats. Ceci nous a notamment permis de caractériser la voie du citronellol (*cf.* chapitre 4). Il est également possible de corréler l'expression du transcriptome avec le métabolome sans *a priori* et d'utiliser des approches statistiques multivariées pour identifier de manière globale des gènes candidats impliqués dans les différentes voies métaboliques de biosynthèse. Cette approche a commencé à être mise en œuvre et sera présentée dans ce chapitre.

3.2 Séquençage et assemblage des transcriptomes

3.2.1 Matériel et séquençage

Pour les analyses transcriptomiques, les ARN totaux ont été extraits selon une version modifiée du protocole proposé par Chang *et al.* (1993) et Cock *et al.* (1997), détaillée dans le chapitre 6.

Après validation des ARN (cf. chapitre 6), le séquençage a été assuré par le BGI¹² sur une plateforme illumina Hi-Seq X ten à partir des ARN traités à l'ADNase et amorcés avec des polyT. Des reads¹³ appairés de 150 pb et contenant un insert d'environ 300 pb ont été obtenus pour chaque réplicat de chaque accession (30 au total). Les reads délivrés par le BGI présentait une qualité moyenne minimale du basecalling d'au moins 20. Cet indicateur est défini comme étant égal à $-10 \times \log_{10}(p)$ où p correspond à la probabilité d'erreur. Ainsi, une qualité minimale de 20 équivaut à une probabilité d'1 base fautive sur 100. Entre 60 millions et 130 millions de reads ont été obtenus par séquençage (Figure 1.4). Pour une raison inconnue, l'un des réplicats de *P. rosat* 'Chine' présente pratiquement deux fois moins de reads que les autres échantillons.

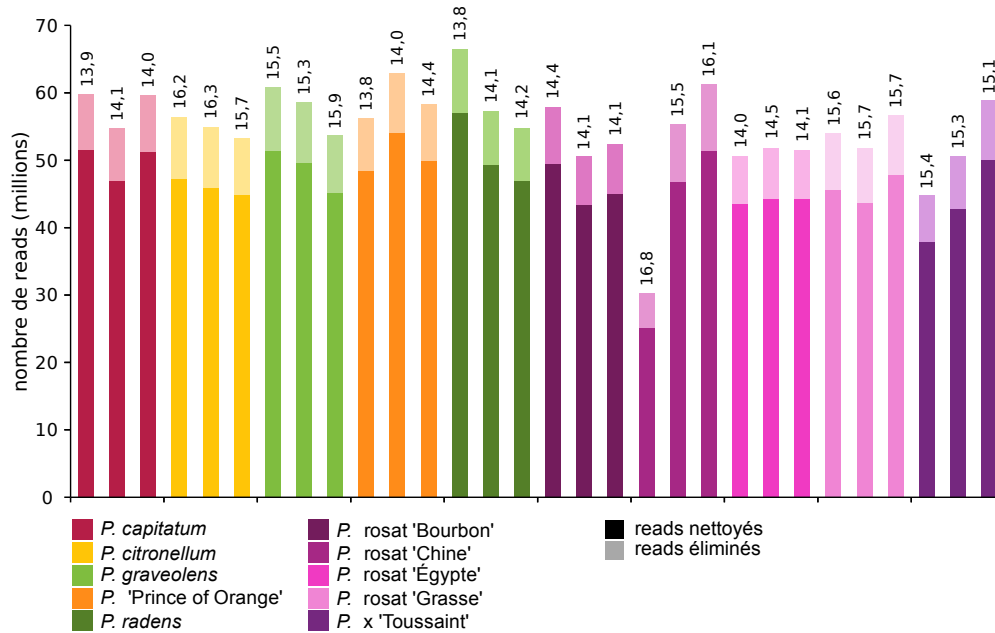


Figure 1.4 | Quantité de reads obtenus pour les dix accessions

La quantité totale de reads pour chaque réplicat correspond à l'empilement des reads nettoyés et éliminés. La proportion de reads éliminés au cours de l'étape de nettoyage est indiquée en pourcentage au dessus de chaque colonne.

3.2.2 Analyse initiale des reads

Les reads bruts ont été analysés grâce au programme fastQC (Andrews, 2010) qui fournit un ensemble d'indicateurs statistiques permettant de juger globalement de la qualité des reads. Cette analyse a montré que les reads étaient de bonne qualité quelle que soit la position (Figure 1.5A) et présentaient une proportion de GC (guanine-cytosine) en accord avec la distribution théorique attendue (Figure 1.5C), indiquant donc une absence de contaminant dans les reads. Un biais de la proportion de chaque nucléotide était visible sur les 12 premières positions des reads (la proportion de nucléotide ne correspondant pas à la proportion attendu en cas de tirage aléatoire d'une des quatre bases) montrant qu'il y a dans cette zone une anomalie de séquençage (Figure 1.5B). Ce biais est caractéristique du séquençage RNA-Seq Illumina et provient de l'amorçage de la transcription inverse des fragments d'ARN créés au cours de la préparation de la banque de

¹² Beijing Genome Institute est un centre de séquençage à Honk-kong, en Chine

¹³ Le terme *reads* de l'anglais (lecture) fait référence aux séquences nucléotidiques brutes générées suite à un séquençage

séquençage (Hansen, Brenner et Dudoit, 2010). Les reads présentait un niveau élevé de duplication (Figure 1.5D), ce qui est attendu pour un séquençage RNA-Seq. Enfin, une séquence (5'-AGATCGGA-3') se trouvait en sur-abondance à la toute fin des reads. Ce biais de séquence est difficilement explicable mais provient probablement de la préparation de la banque.

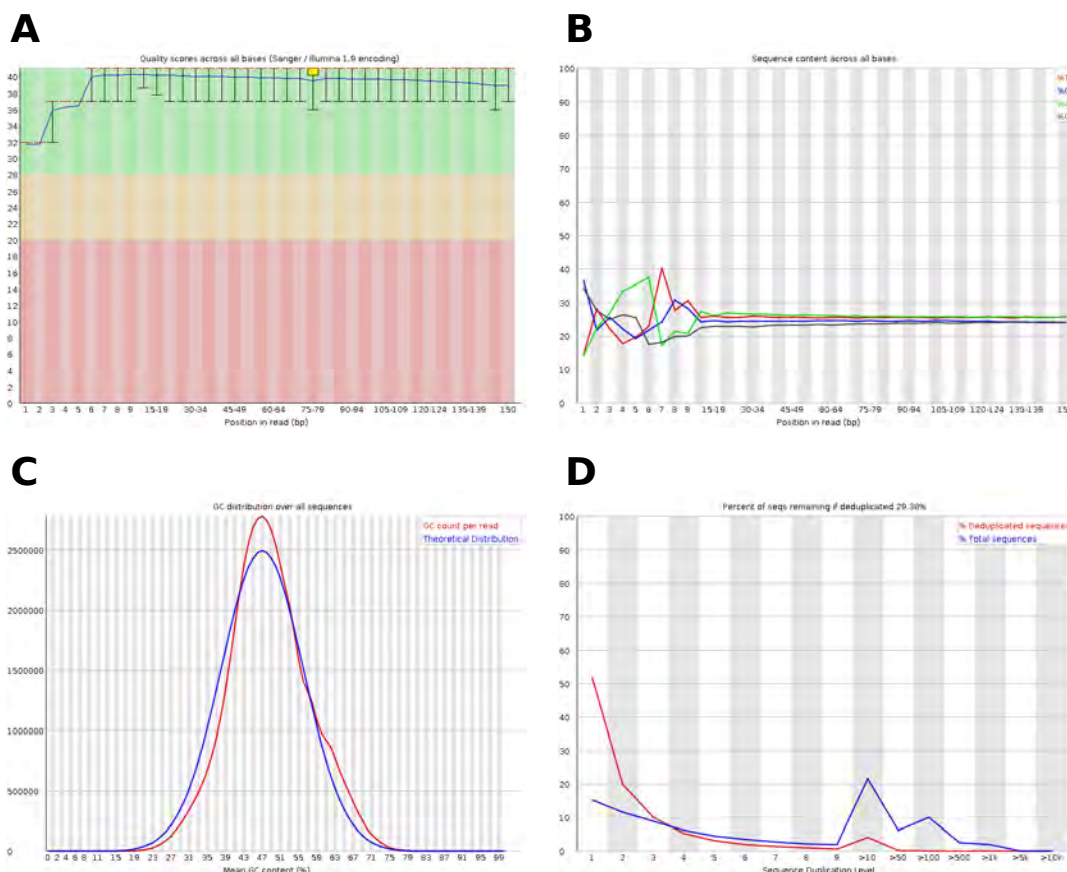


Figure 1.5 | Statistiques des reads bruts (réplicat 1 de *P. citronellum*). (A) Boxplots de la qualité du basecalling en fonction de la position le long des reads. (B) Proportion de chacune des quatre bases en fonction de la position le long des reads. (C) Nombre de séquences en fonction de leur proportion en GC. (D) Niveau de duplication des séquences

Pour chaque position (1 à 9 puis moyenné sur 5 jusqu'à 150), (A) un boxplot de la qualité observée à ces positions est obtenu ou bien (B) la proportion des quatre nucléotides à ces positions est calculée. (C) La courbe rouge représente la distribution réelle des données, la courbe bleue représente la distribution théorique d'après la moyenne et la variance des données. (D) La courbe bleue indique le niveau de duplication des séquences dans les données réelles, la courbe rouge indique la proportion de séquences restantes après déduplication provenant d'un niveau de duplication donné.

3.2.3 Nettoyage des reads avant assemblage

Bien que la qualité globale des reads est été bonne, un nettoyage des reads avant assemblage s'avérait nécessaire pour assurer une qualité optimale des transcriptomes obtenus. Les reads ont donc subi plusieurs étapes successives de nettoyage : i) retrait des 13 premiers nucléotides en 5' pour chaque read, permettant d'éliminer le biais de fréquence nucléotidique dû à la préparation de la banque de séquençage ; ii) retrait de la séquence 5'-AGATCGGA-3' sur les reads concernés ; iii) retrait des répétitions d'un même nucléotide situées à la fin ou au début de chaque read afin d'améliorer l'assemblage en évitant de contiguer¹⁴ des reads sur des portions de faible complexité ;

¹⁴ « Contiguer » correspond à regrouper des *contig*, soit des séquences obtenues après assemblages de reads contigus

iv) élimination des reads provenant potentiellement des ARN ribosomiques (en moyenne, 0.6 % des reads) ; v) élimination des reads ou parties de reads présentant une qualité moyenne inférieure à 30 (1 erreur du basecalling¹⁵ sur 1000 bases) avec conservation si possible de la partie du read satisfaisant ce critère ; vi) élimination des reads présentant une longueur inférieure à 50 nucléotides après le processus de nettoyage. Les étapes de nettoyage des ARN ribosomiques et de sélection sur la qualité du basecalling ont été réalisées respectivement par les logiciels sortmerna v2.1 (Kopylova, Noé et Touzet, 2012) et Trimmomatic v0.36 (Bolger, Lohse et Usadel, 2014). Les autres étapes ont été réalisées *via* des scripts Perl.

Ces différentes étapes de nettoyage ont permis d'éliminer l'ensemble des biais constatés dans les reads des dix accessions (non montré). Entre 14 et 17 % des reads selon les réplicats ont été perdus au cours du nettoyage (Figure 1.4).

3.2.4 Assemblage et annotation des transcriptomes

Aucun génome de *pélagonium* n'étant disponible, une stratégie d'assemblage *de novo* a été choisie pour créer les transcriptomes de chaque accession. Ces assemblages ont été réalisés à partir des reads nettoyés. Les pipelines d'assemblage et d'annotation sont décrits dans le matériel et méthodes de ce tapuscrit. Le pipeline d'annotation basé sur des recherches d'homologie de séquences a permis également d'obtenir les CDS (de l'anglais *Coding DNA Sequence*) et les séquences peptidiques putatives associées aux transcrits.

Plusieurs transcrits peuvent être produits par un locus donné du génome : un gène principal avec plusieurs isoformes, un autre gène sur le brin inverse, plusieurs gènes de petits ARN etc. (Morris et Mattick, 2014). Le nombre total de séquences d'un transcriptome est donc généralement important et dépend également du nombre de gènes exprimés dans les tissus examinés. Les assemblages ont donc été analysés d'après plusieurs indicateurs quantitatifs permettant d'avoir une vue de la complétude et de la fragmentation des transcriptomes. Le nombre total de séquences renseigne sur le nombre de gènes transcrits dans les tissus et devrait être à peu près équivalent entre les accessions de ploïdie identique. La Figure 1.6A montre que le nombre de séquences obtenues était très variable d'une accession à l'autre et les transcriptomes des accessions diploïdes (*P. 'Prince of Orange'* et *P. citronellum*, Demarne et van der Walt, 1993) parmi les assemblages comportant le plus petit nombre de séquences. Cependant, un assemblage de petite taille a été obtenu avec les reads de *P. radens* qui contient pourtant 88 chromosomes. Les accessions polyploïdes présentaient des transcriptomes comportant plus de séquences, jusqu'à 390 000 transcrits pour *P. rosat 'Grasse'*, ce qui était attendu. En effet, un génome polyploïde exprimera potentiellement plusieurs homéologues du même gène, chacun de ces homéologues étant éventuellement suffisamment différent les uns des autres pour être assemblé indépendamment. La longueur moyenne des séquences devrait être équivalente entre chaque accession et idéalement égale à la longueur moyenne des transcrits physiques produits par le génome. Cependant la Figure 1.6B montre une certaine variation entre les différentes accessions, qui semble relativement

¹⁵ Le terme « basecalling » fait référence à l'assignation des noms de bases aux pics de chromatogramme obtenus après séquençage

corrélait à la quantité de transcrits dans chaque transcriptome (Figure 1.6A). Le transcriptome de *P. 'Prince of Orange'* présentait les transcrits les plus longs en moyenne (environ 750 pb, Figure 1.6B). Cependant cette valeur très inférieure à la longueur moyenne d'un transcrit de plante (1481 pb chez *Arabidopsis* ; primary transcripts, phytozome v12) indique une fragmentation importante dans l'ensemble des transcriptomes. La valeur de N50 correspond à la taille de la séquence la plus courte située à la moitié de la longueur totale du transcriptome tandis que la valeur de L50 correspond au plus petit nombre de séquences dont la somme de la longueur correspond à la moitié de la taille totale du transcriptome. Les meilleures valeurs de N50 et L50 (Figure 1.6C et D) étaient associées là encore aux transcriptomes des deux accessions diploïdes et de *P. radens*. Finalement, le pourcentage d'alignement des reads initiaux sur les transcriptomes a été calculé (Figure 1.6E).

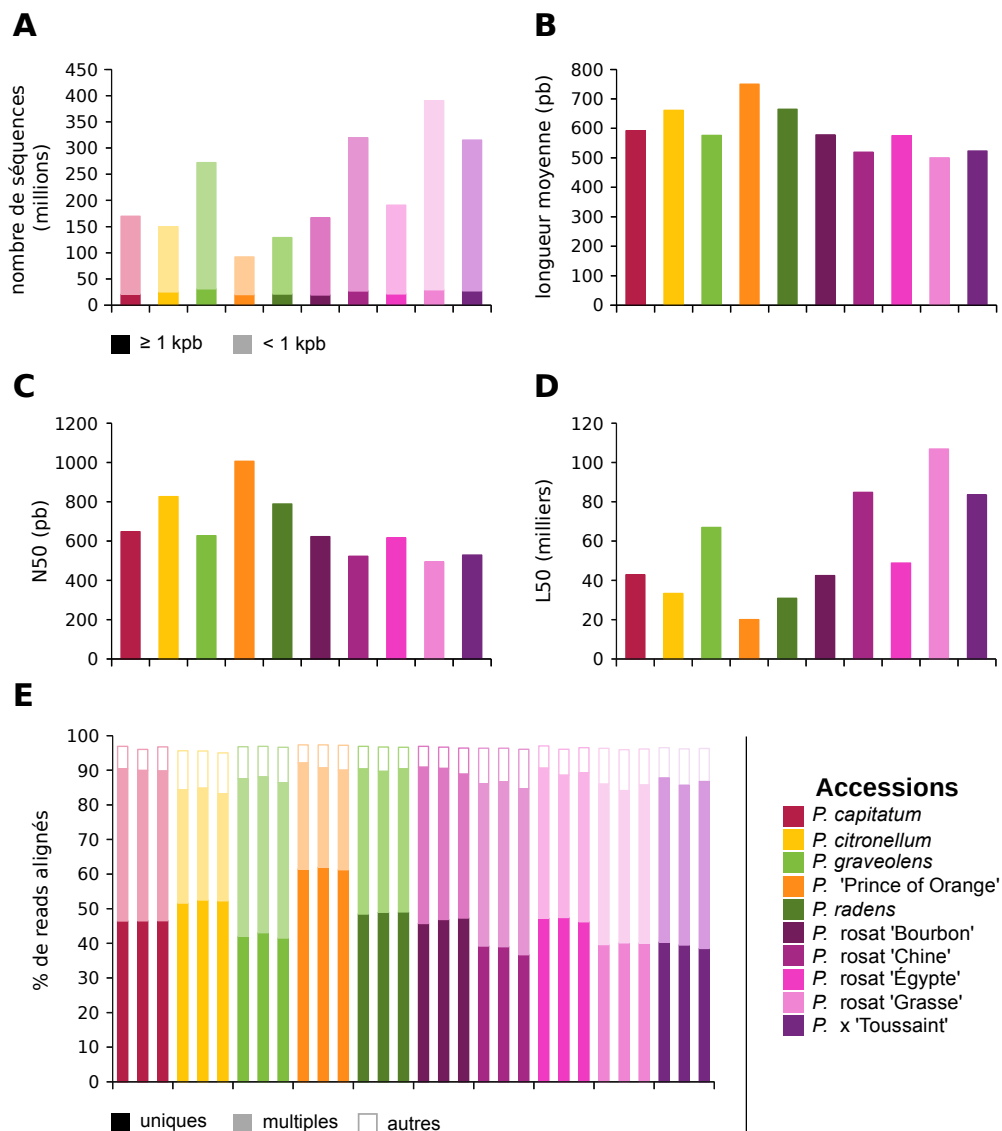


Figure 1.6 | Caractéristiques des assemblages des dix accessions. (A) Nombre total de séquences obtenues dans chaque transcriptome. (B) Longueur moyenne des séquences. (C) N50 et (D) L50 des assemblages. (E) Proportions de reads alignés sur les transcriptomes, différenciées par type d'alignement

Un read aligné de manière unique sera aligné sur un seul site du transcriptome, tandis qu'un read aligné de manière multiple a une probabilité d'alignement identique à au moins deux sites du transcriptome. Les reads autres correspondent aux reads pour lesquels un seul read de la paire n'est aligné (le séquençage paired-end utilisé consiste à séquençer les lectures par paires, générant deux reads appariés).

Globalement, les dix transcriptomes correspondaient parfaitement aux reads initiaux, avec un pourcentage global d'alignement des reads d'environ 95 %. Des différences notables étaient cependant observables entre les accessions avec un bien meilleur taux de reads alignés de manière unique pour *P. 'Prince of Orange'* et *P. citronellum* et une proportion d'alignements multiples plus élevée pour les hybrides rosat. Ce résultat était attendu dans le sens où le nombre de sites potentiels sur lesquels les reads peuvent s'aligner augmente avec la polyploïdie du génome. L'ensemble de ces résultats (Figure 1.6) indiquait donc une assez forte fragmentation des transcriptomes. Celle-ci est grandement liée à la polyploïdie de certains génomes au sein des dix accessions qui complexifie l'assemblage des transcriptomes à partir de reads courts de type Illumina. En effet, il est difficile, voire impossible, pour le programme d'assemblage de correctement distinguer les reads provenant de transcrits homéologues ou de proches paralogues à partir de reads courts. Une solution qui sera mise en œuvre pour améliorer ces assemblages sera d'utiliser des reads longs issus des dernières technologies de séquençage. Pour ce faire, le laboratoire a acquis un séquenceur MinION (Oxford Nanopore Technologies). Les transcriptomes seront donc ré-assemblés prochainement en utilisant ces nouvelles données de séquençage.

3.3 Amélioration des transcriptomes après assemblage

Il a rapidement été noté la présence de transcrits chimériques dans les transcriptomes. Ainsi, au sein d'une même séquence, au moins deux ORF (de l'anglais *Open Reading Frame*) ont pu être détectées, codant pour des protéines parfois de la même famille, parfois totalement différentes. Pour pallier à ce problème, les transcrits ont été criblés pour la présence de plusieurs ORF ayant des homologues dans la base de données UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Dans un tel cas, la séquence a été coupée en fragments correspondant à chaque ORF identifiée. Cette étape a entraîné la création d'un nombre non négligeable de transcrits supplémentaires à partir des séquences chimériques (Figure 1.7A).

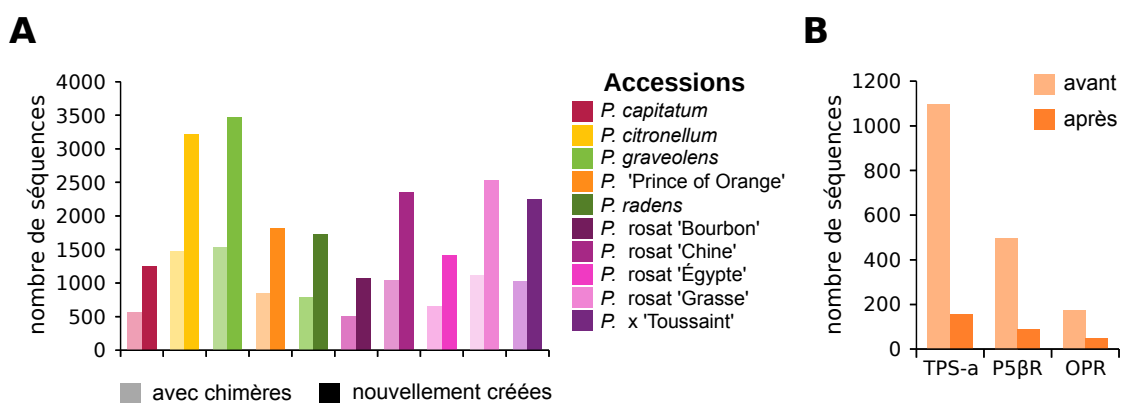


Figure 1.7 | Modification des transcriptomes après assemblage. (A) Nombre de transcrits contenant des chimères et nouvelles séquences créées à partir de ces transcrits. (B) Nombre de séquences de TPS-a, P5βR et OPR avant et après contigage et nettoyage manuel dans l'ensemble des dix transcriptomes

P5βR : progesterone 5β-réductase ; OPR : 12-oxophytodienoate réductase ; TPS-a : sous famille a des terpène synthases (TPS).

Pour les familles de gènes ciblées lors de nos recherches (cf. chapitres 3 & chapitre 4), un nettoyage et un contigage manuel des séquences ont été effectués. En effet, ces gènes présentant

un intérêt particulier pour les études réalisées au cours de cette thèse, il était primordial d'avoir accès à des séquences prédites les plus longues possibles. De plus, la fragmentation des séquences entraînait la répartition des reads et de l'expression sur plusieurs transcrits pour une même séquence, faussant l'expression des transcrits d'intérêt et la rendant illisible. Cette étape de nettoyage a été réalisée selon un processus stéréotypé : i) recherche de séquences homologues dans les transcriptomes à partir d'un ensemble de séquences de référence (généralement tirées d'*Arabidopsis*) ; ii) regroupement des transcrits, alignement et examen manuel de chaque groupe avec sélection d'une ou plusieurs séquences selon leur degré de divergence ; iii) alignement de l'ensemble des séquences restantes pour chaque accession, sélection et fusion des séquences en fonction de leur degré de divergence. Globalement il a été cherché à maximiser les séquences pleine longueur et éliminer tous les petits fragments. Au cours de ce processus, la distinction entre paralogues et homéologues a été respectée autant que possible. Cependant, en l'absence de toutes données génomiques et phylogénétiques, cette distinction ne reposait que sur le degré de similarité entre les séquences : les séquences les plus proches (potentiellement des homéologues) ont généralement été fusionnées au sein d'une séquence consensus ou simplement éliminées. Durant ce processus, le nombre de séquences appartenant aux trois familles de gènes dans l'ensemble des dix transcriptomes a été considérablement réduit (Figure 1.7B).

4 Approches multi-omiques

4.1 Mise en place d'une approche multi-omique

En l'absence d'une référence génomique commune aux dix accessions de pélagonium (génomome ou transcriptome), la phylogénie des familles de gènes ciblées doit être inférée de façon à définir les transcrits orthologues, provenant de gènes issus de la spéciation et ayant potentiellement conservés leur fonction entre les dix accessions, et les transcrits paralogues, issus d'événements de duplication et ayant potentiellement divergés en termes de fonction. Le regroupement des orthologues en orthogroupes (OT) permet alors la comparaison de leur expression sans une référence commune aux différentes accessions. Cette analyse peut se faire de manière exhaustive sur l'ensemble de plusieurs génomes ou transcriptomes *via* des logiciels comme OrthoFinder (Emms et Kelly, 2015) ou bien manuellement sur une famille ciblée. Les profils d'expression des différents OT permettent alors de différencier les séquences d'intérêt et celles étant les plus exprimées dans les accessions cibles. C'est particulièrement le cas dans le cadre d'une approche multi-omique, où les données biochimiques et transcriptomiques sont combinées afin de pouvoir trouver les candidats dont le profil d'expression de l'OT est corrélé aux profils de teneur des métabolites.

Afin d'étudier les enzymes impliquées dans la production de l'HE, nos analyses se sont focalisées sur quelques familles de gènes spécifiques. La composition de l'HE de pélagonium étant principalement terpénique, les séquences codantes de *TPS* ont été tout particulièrement recherchées. Les séquences de gènes impliqués dans certaines modifications secondaires de terpènes ont également été recherchées. Notamment, afin d'identifier et caractériser les enzymes impliquées dans la transformation du géraniol en citronellol, les familles des progestérone 5 β -

réductases (P5 β R) et des 12-oxophytodienoate réductases (OPR) ont été ciblées. Une partie de cette analyse a déjà été réalisée et est présentée dans le chapitre 4.

À titre d'exemple une analyse multi-omique réalisée sur les *sTPS*, de la sous-famille des *TPS-a*, est présentée ici. Cette même approche multi-omique a été utilisée pour nos analyses présentées dans le chapitre 4.

4.2 Étude phylogénétique des *TPS-a* des dix accessions de *pélargoniums*

Au sein du genre *Pelargonium* (Blerot *et al.*, 2018), comme chez d'autres genres et espèces (Külheim *et al.*, 2015 ; Martin *et al.*, 2010 ; Martin, Fäldt et Bohlmann, 2004) assigner une fonction à une TPS ne peut se faire sur la seule base d'identité de séquences et d'analyses phylogénétiques (Chen *et al.*, 2011 ; Karunanithi et Zerbe, 2019). En effet, étant donné la plasticité fonctionnelle et évolutive des TPS, celles-ci se regroupent préférentiellement par genre et non par fonction lors d'analyses phylogénétiques. Afin de déterminer la fonction des TPS, une approche gène par gène peut être utilisée : les enzymes sont caractérisées à partir de séquences pleine longueur disponibles. Cette approche a permis la caractérisation de trois *mTPS* et quatre *sTPS* chez *P. rosat* 'Grasse' (Blerot *et al.*, 2018, chapitre 2 & chapitre 3). En revanche, cette approche reste fastidieuse et limitée. D'une part, la caractérisation de ces premières enzymes a mis en exergue la diversité des TPS impliquées dans la production du terpénome retrouvé dans l'HE de *pélargonium* : en se basant sur la quantité de terpènes présents dans l'HE, ces enzymes ne sont responsables que d'une faible proportion de la production terpénique et de nombreuses caractérisations supplémentaires seraient nécessaires pour élucider la production de l'intégralité des terpènes observés. D'autre part, cette approche est tout particulièrement limitée lorsque la caractérisation d'une enzyme à la fonction spécifique est recherchée.

L'utilisation d'une approche multi-omique et corrélative permet d'avoir une vision globale et complète des gènes d'une même famille, exprimés dans la plante (plus précisément dans la feuille de *pélargonium* dans notre cas), et de pouvoir comparer leurs niveaux et profils d'expression. La corrélation des profils d'expression avec les profils biochimiques permet ensuite de cibler certaines fonctions putatives et de pouvoir réduire les candidats à caractériser. Grâce aux transcriptomes recueillis, l'ensemble des séquences de *TPS* exprimées dans les feuilles, ainsi que leur niveau d'expression sont disponibles. La sous-famille des *TPS-a*, qui regroupe la grande majorité des gènes codant les *sTPS* d'angiospermes (Bohlmann, Meyer-Gauen et Croteau, 1998 ; Martin *et al.*, 2010) et dont font partie les quatre *sTPS* étudiées (*cf.* chapitre 3), a été prioritairement ciblée.

Après contigage manuel (*cf.* Chapitre 1.3.3), un total de 177 séquences de *TPS-a* appartenant aux dix accessions a été utilisé pour créer un arbre phylogénétique (méthodologie disponible en chapitre 6) par maximum de vraisemblance (Figure 1.8), incorporant également les quatre *sTPS* déjà caractérisées (*cf.* chapitre 3). L'étude manuelle de la phylogénie obtenue a permis de définir 21 OT selon la distance phylogénétique entre les séquences, le support statistique des clades obtenus (valeurs de bootstrap) et la représentativité au sein des clades de chaque accession (un

orthologue par groupe dans la mesure du possible, avec la possibilité d'inclure des paralogues). La visualisation de l'expression en regard des transcrits a montré que certains OT présentaient une expression dans chaque accession, tandis que d'autres étaient plus spécifiques. Par exemple, dans OT01 toutes les accessions sauf *P. citronellum* et *P. rosat* 'Bourbon' étaient représentées, mais avec des niveaux d'expression relativement faibles. OT02 ne regroupaient que quatre accessions (*P. citronellum*, *P. x* 'Toussaint', *P. rosat* 'Grasse' et *P. capitatum*) avec des niveaux d'expression nettement plus marqués alors que OT03 correspondait à une seule séquence de *P. citronellum*, très peu exprimée.

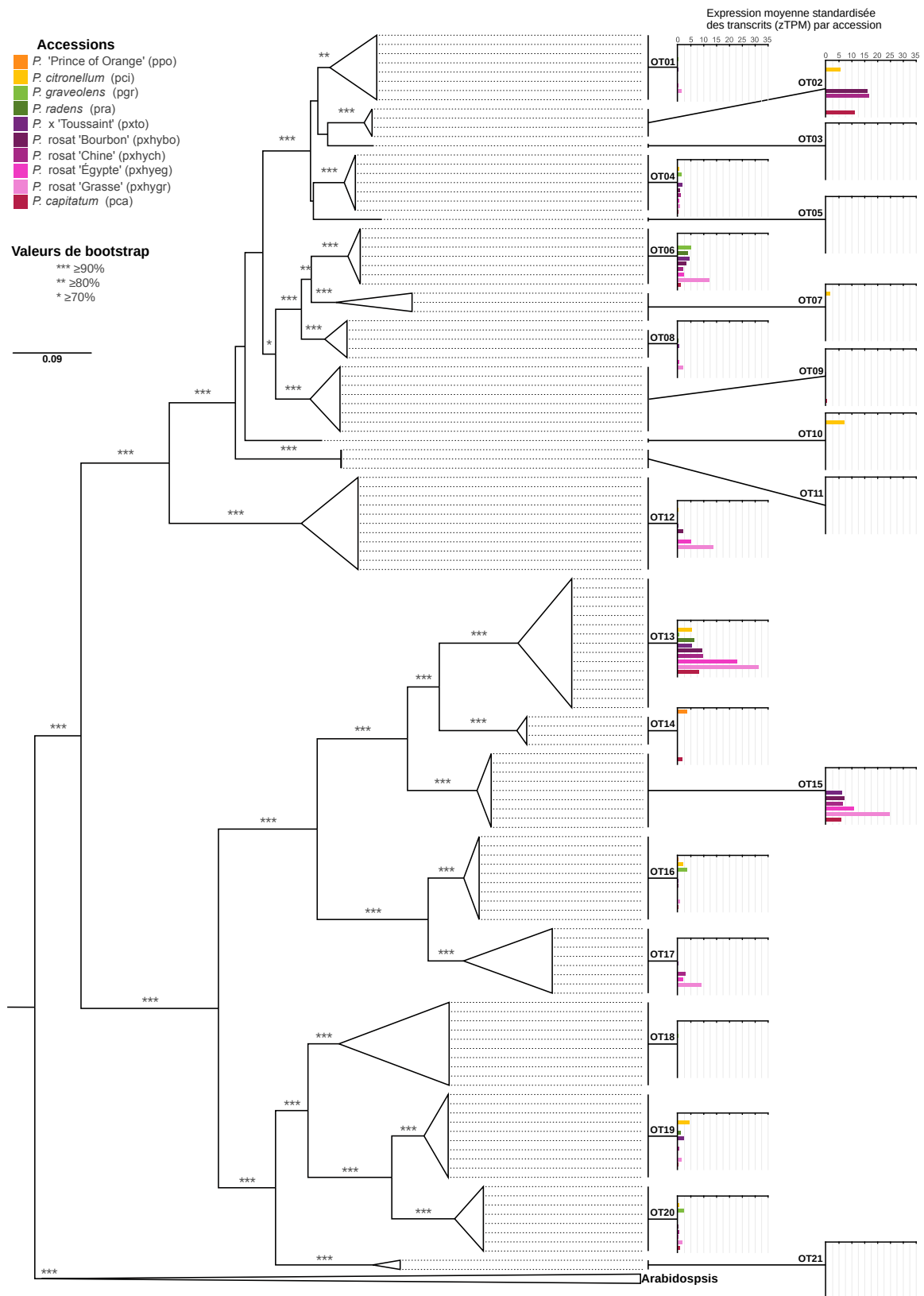


Figure 1.8 | Arbre phylogénétique des séquences codantes de *sTPS* de la famille de gène *TPS-a* et les profils d'expression de chaque OT (z-score des TPM moyens)

L'arbre a été inféré à partir de séquences nucléotidiques en utilisant le modèle évolutif JTTGTRGAMMAIX optimisé par RAxML et selon le maximum de vraisemblance. Les séquences de *sTPS* d'*Arabidopsis thaliana* ont été incluses à l'alignement et utilisées pour enraciner l'arbre. Les orthogroupes (OT) ont été définis sur la base des clades observés et des valeurs de bootstrap. L'expression par accession (OT) correspond à la moyenne standardisée (z-score) du nombre de transcrits par million (TPM).

4.3 Étude de la corrélation métabolomique - transcriptomique

Une observation directe des profils d'expression des différents *OT* a permis de visualiser les plus exprimés dans les différentes accessions. Dans le cadre de l'approche multi-omique, les profils d'expression (Figure 1.8) ont été comparés aux profils biochimiques (Supplemental_data 1.1) afin d'identifier les *OT* et les composés présentant des profils similaires et étant potentiellement liés. Pour mieux visualiser l'ensemble de ces corrélations et estimer leur intensité, la matrice de corrélation correspondante à l'ensemble des données a été calculée et un corrélogramme a été obtenu. Contrairement au corrélogramme réalisé sur les données biochimiques seules, le corrélogramme en Figure 1.9 illustre l'intensité de corrélation existant entre chaque sesquiterpénoïde et chaque *OT*. Grâce à cette analyse, il est possible d'identifier l'intégralité des sesquiterpénoïdes dont le profil est corrélé à celui d'un *OT* spécifique.

En première analyse, il était remarquable que tous les *OT* n'avaient pas le même profil mais que la plupart sont corrélés avec de nombreux composés (Figure 1.8). Ceci signifie que pour l'*OT* considéré, le niveau d'expression dans les différentes accessions était associé à une plus ou moins grande abondance de plusieurs composés, ces deux facteurs variant dans le même sens. Ces corrélations multiples, si évidente, notamment chez *OT13* et *OT15* dont l'expression était corrélée avec plus de vingt composés, peuvent être expliquées au travers de plusieurs précisions. Tout d'abord il est fréquent qu'une sTPS catalyse la biosynthèse de plusieurs produits (Degenhardt, Köllner et Gershenzon, 2009 ; Köllner *et al.*, 2004 ; Steele *et al.*, 1998). Ensuite, il est connu que un même sesquiterpène peut être produit par deux ou plusieurs sTPS différentes, parfois en produit majeur et parfois en produit mineur (Kumeta et Ito, 2010 ; Kumeta et Ito, 2016 ; Nieuwenhuizen *et al.*, 2013). Enfin, l'expression d'un transcrit peut être corrélée à l'abondance relative d'une molécule sans qu'il n'y ait de lien de causalité fonctionnelle (corrélation n'est pas causalité), simplement parce que le niveau d'expression d'un transcrit suit le niveau d'accumulation de certains composés du fait du hasard, de leur régulation ou du nombre restreint de profils distinctifs. Ce type de corrélation devrait donc diminuer avec une augmentation du nombre d'accessions étudiées, mais met en exergue des considérations importantes lors de l'exploitation des résultats de ce type d'approche.

Malgré cela, ce travail a montré que l'approche multi-omique est novatrice et intéressante et qu'elle peut faciliter la caractérisation fonctionnelle de TPS-a. Par exemple, le 6,9-guaiadiène est un sesquiterpène qui a une valeur particulière puisqu'il est un des terpènes majoritaires de certains pélargoniums et qu'il est par ailleurs utilisé comme marqueur : son abondance permet de caractériser et différencier certains pélargoniums à odeur de rose (Blerot *et al.*, 2016 ; Viljoen *et al.*, 1995). Pour autant, la voie de biosynthèse de ce composé n'est connue que chez un champignon phytopathogène (Burkhardt *et al.*, 2016), où la caractérisation *in vitro* d'une sTPS a démontré la production de 6,9-guaiadiène et d' α -guaïène. Parmi les 21 *OT*, l'*OT02* et de moindre manière l'*OT09*, étaient les deux seuls *OT* présentant une corrélation positive significative avec ces deux composés (Figure 1.9). Ils étaient d'ailleurs également corrélés au germacrène C (δ -élémente¹⁶),

¹⁶ Lors des analyses en GC-MS, les températures élevées de l'injecteur induisent une dégradation des germacrènes en éléments et en particulier du germacrène C en δ -élémente. Un composé identifié comme élément, fait référence au germacrène présent dans l'HE correspondante

supposé être un intermédiaire dans la production du 6,9-guaiadiène (Burkhardt *et al.*, 2016 ; Schwab et Wüst, 2015). Ces deux OT constituent par conséquent de bons candidats pour la caractérisation fonctionnelle d'une guaiadiène synthase chez le pélargonium.

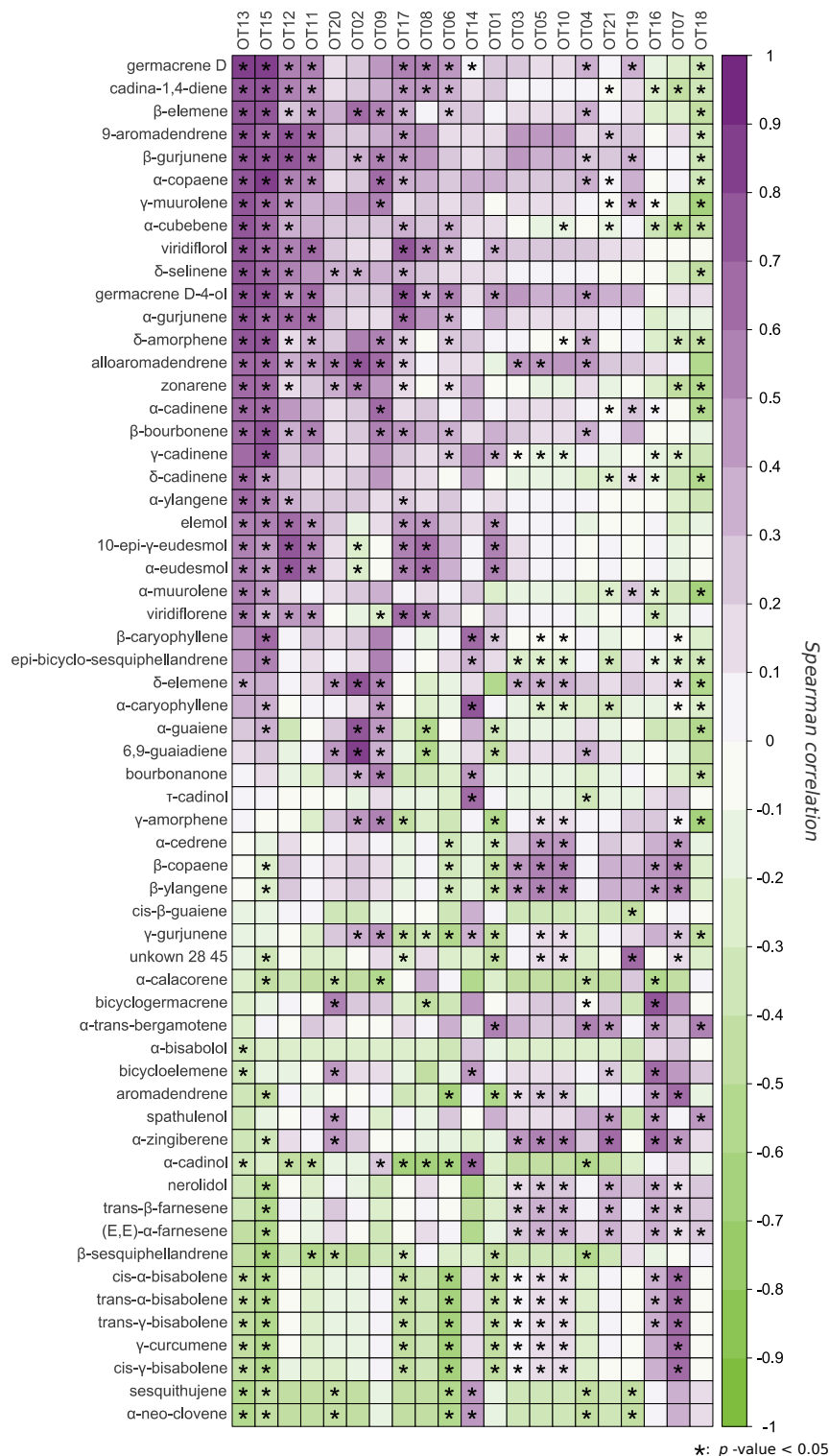


Figure 1.9 | Corrélogramme de l'expression des TPS-a et de la concentration en sesquiterpènes, dans les dix accessions de pélargoniums

Les valeurs représentées sont les coefficients de corrélation de Spearman calculés à partir des profils de concentrations absolues et d'expressions moyennes standardisées des dix accessions de pélargoniums. Les corrélations significatives sont indiquées par un astérisque (*) et correspondent aux valeurs de p -value < 0,05 calculées à l'aide d'un test t. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel R.

De la même manière, l'étude des TPS catalysant la biosynthèse des sesquiterpènes acycliques, comme les farnésènes ou encore le nérolidol, peut être facilitée par l'analyse de ce corrélogramme. En effet, ces molécules ne sont corrélées qu'avec six OT (*OT03*, *OT05*, *OT10*, *OT21* et *OT16*) ce qui restreint donc une recherche sans *a priori* de 177 séquences à six gènes candidats (par accession). Le niveau d'expression des transcrits et les accessions où ils sont les plus exprimés limite le choix en priorité à une recherche chez *P. citronellum* et dans une moindre mesure chez *P. graveolens*, en utilisant les séquences des *OT10* et *OT16*. Ainsi malgré l'analyse d'un petit nombre d'accessions, cette analyse multi-omique apparaît comme une approche pertinente pour orienter des recherches plus ciblées dans une analyse fonctionnelle des sTPS chez le *pélargonium*.

5 Conclusion

Une analyse complète et détaillée des données a permis de structurer les profils terpéniques de dix accessions, afin d'appréhender les liens entre les composés et le lien entre un composé et une accession donnée. Par ailleurs, l'obtention des relations phylogénétiques entre les *TPS-a* a permis de conduire une analyse multi-omique. Une approche similaire peut être réalisée sur de nombreuses autres familles d'enzymes, comme cela a été fait pour la caractérisation d'enzymes potentiellement impliquées dans la voie du citronellol, développée dans le chapitre 4.

L'analyse multi-omique de données métabolomiques et transcriptomiques constitue une approche permettant de guider le chercheur pour proposer des gènes candidats dans le cadre d'une caractérisation fonctionnelle de gènes d'une voie de biosynthèse étudiée. Cette analyse requiert cependant une grande quantité de données pour être efficace. La caractérisation analytique des COV de *pélargonium* pourra être poursuivie par l'analyse de nouvelles accessions possédant des arômes très typiques comme l'odeur de poivre, de carotte ou de chocolat et dont les voies de biosynthèses ne sont pas connues. Ces analyses permettront d'identifier éventuellement une corrélation forte de la présence de ces composés avec l'expression de *TPS* et d'autres enzymes impliquées dans les modifications secondaires de ces terpènes, dans le but de caractériser de nouvelles voies de biosynthèse de ces composés.

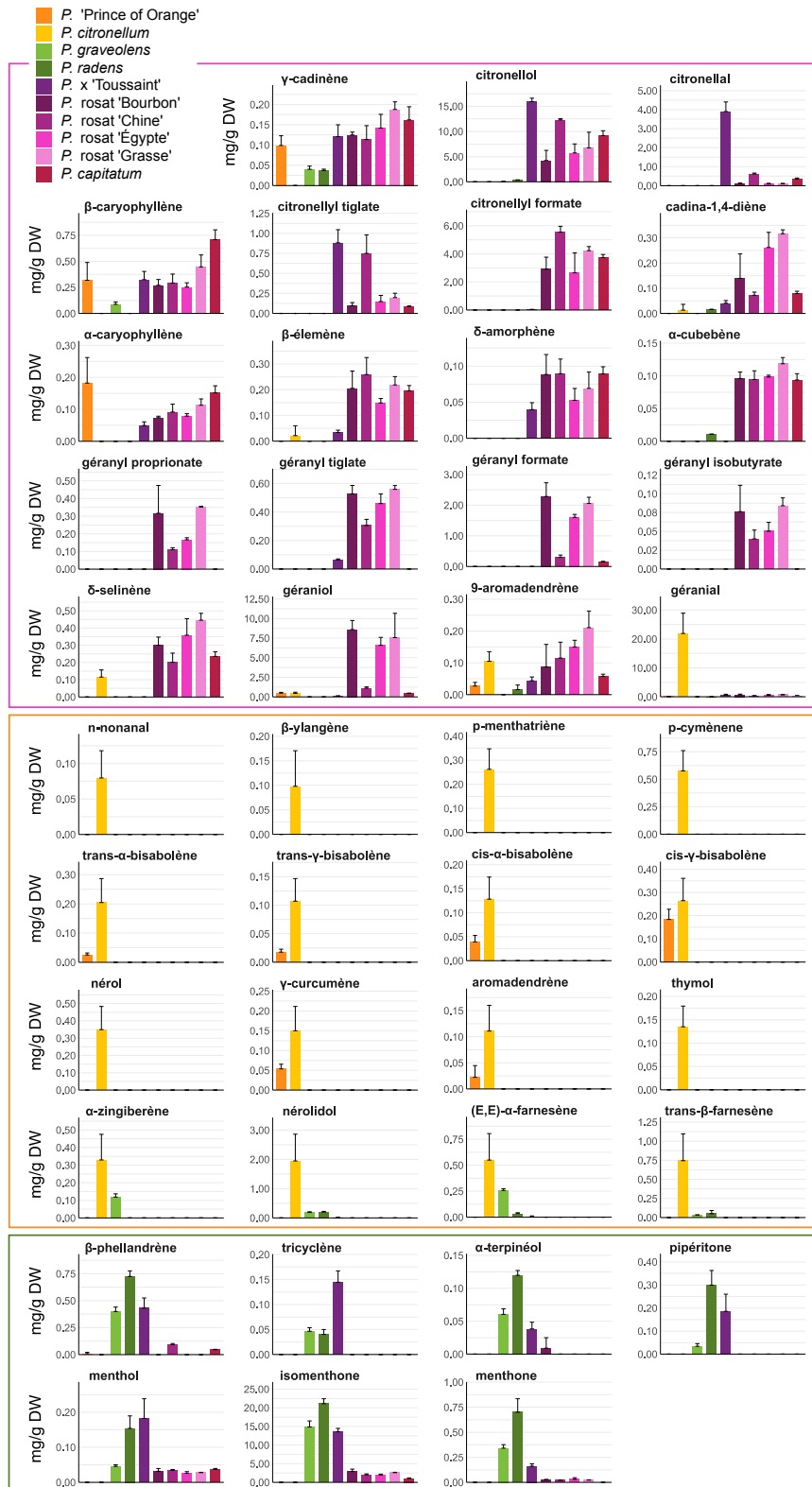
De manière encore plus intéressante, il est nécessaire de ré-analyser les accessions de notre échantillonnage en utilisant différentes colonnes chirales afin de quantifier les énantiomères de certaines molécules. Bergman *et al.* (2020) ont montré qu'il existait deux énantiomères du limonène dans l'HE de *pélargonium*. Est-ce que le (+)-limonène ne corrèle qu'avec un OT des *TPS-b* ou bien le (+)- et le (-)-limonène sont-ils synthétisés par plusieurs enzymes ? Comment expliquer le fait que le ratio menthone/isomenthone n'est pas le même chez *P. radens*, *P. graveolens* et *P. x. 'Toussaint'* ? Menthone et isomenthone sont-ils le résultat d'une réduction de la pulégone comme chez la menthe ou de la pipéritone comme suggéré chez le *pélargonium* ? Autant de questions pour lesquelles une approche multi-omique peut être utilisée.

Supplemental data



Supplemental_data 1.1 | Détails des profils biochimiques de l'ensemble des composés, pour les dix accessions de pélagoniums

Pour chaque composé, l'accumulation mesurée dans chaque accession est indiquée par des histogrammes de couleur différente. Le code couleur du nom du composé indique sa classe chimique. Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW, de l'anglais *dry weight*). Elles correspondent aux moyennes des trois réplicats réalisés. Les écart-types des données en réplicats sont indiqués par une barre supérieure.



Supplemental_data 1.2 | Détails des profils biochimiques des composés discriminants d'après la pls-da

Pour chaque composé, l'accumulation mesurée dans chaque accession est indiquée par des histogrammes de couleur différente. Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW, de l'anglais *dry weight*). Elles correspondent aux moyennes des trois réplicats réalisés. Les écart-types des données en réplicats sont indiqués par une barre supérieure.

Chapitre 2

Analyse fonctionnelle de quatre terpène synthases chez le pélargonium à odeur de rose et évolution du parfum au sein du genre *Pelargonium*



Functional Analysis of Four Terpene Synthases in Rose-Scented *Pelargonium* Cultivars (*Pelargonium* × *hybridum*) and Evolution of Scent in the *Pelargonium* Genus

Bernard Blerot^{1,2}, Laure Martinelli¹, Cécile Prunier¹, Denis Saint-Marcoux¹, Sylvain Legrand³, Aurélie Bony¹, Loïc Sarrabère¹, Florence Gros¹, Nicolas Boyer¹, Jean-Claude Caissard¹, Sylvie Baudino¹ and Frédéric Jullien^{1*}

¹ Université de Lyon, UJM-Saint-Etienne, CNRS, Laboratoire BVparn - FRE 3727, Saint-Etienne, France, ² IFF-LMR Naturals, Grasse, France, ³ Université de Lille, CNRS, UMR 8198, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Danièle Werck,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

Reviewed by:

Eric Duchêne,
Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA), France
Ai-Xia Cheng,
Shandong University, China

*Correspondence:

Frédéric Jullien
jullien@univ-st-etienne.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Metabolism
and Chemodiversity,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 23 May 2018

Accepted: 10 September 2018

Published: 02 November 2018

Citation:

Blerot B, Martinelli L, Prunier C,
Saint-Marcoux D, Legrand S,
Bony A, Sarrabère L, Gros F,
Boyer N, Caissard J-C, Baudino S
and Jullien F (2018) Functional
Analysis of Four Terpene Synthases
in Rose-Scented *Pelargonium*
Cultivars (*Pelargonium* × *hybridum*)
and Evolution of Scent
in the *Pelargonium* Genus.
Front. Plant Sci. 9:1435.
doi: 10.3389/fpls.2018.01435

Pelargonium genus contains about 280 species among which at least 30 species are odorant. Aromas produced by scented species are remarkably diverse such as rose, mint, lemon, nutmeg, ginger and many others scents. Amongst odorant species, rose-scented pelargoniums, also named pelargonium rosat, are the most famous hybrids for their production of essential oil (EO), widely used by perfume and cosmetic industries. Although EO composition has been extensively studied, the underlying biosynthetic pathways and their regulation, most notably of terpenes, are largely unknown. To gain a better understanding of the terpene metabolic pathways in pelargonium rosat, we generated a transcriptome dataset of pelargonium leaf and used a candidate gene approach to functionally characterise four terpene synthases (TPSs), including a geraniol synthase, a key enzyme responsible for the biosynthesis of the main rose-scented terpenes. We also report for the first time the characterisation of a novel sesquiterpene synthase catalysing the biosynthesis of 10-epi- γ -eudesmol. We found a strong correlation between expression of the four genes encoding the respective TPSs and accumulation of the corresponding products in several pelargonium cultivars and species. Finally, using publically available RNA-Seq data and *de novo* transcriptome assemblies, we inferred a maximum likelihood phylogeny from 270 pelargonium TPSs, including the four newly discovered enzymes, providing clues about TPS evolution in the *Pelargonium* genus. Notably, we show that, by contrast to other TPSs, geraniol synthases from the TPS-g subfamily conserved their molecular function throughout evolution.

Keywords: pelargonium, terpene synthase, essential oil, geraniol synthase, transcriptome

INTRODUCTION

The *Pelargonium* genus belongs to the *Geraniaceae* family and contains about 280 species exhibiting a wild range of variation in leaf and floral morphology, as well as body plan organisation (Bakker et al., 2004; Jones et al., 2009; Roeschenbleck et al., 2014; Blerot et al., 2015). Phylogenetic analyses based on nuclear, plastidial and mitochondrial DNA led to a structuration of the

Pelargonium genus into five main clades comprising 16 sections (Bakker et al., 2005). Although most of the odorant pelargoniums belong to clade A1 (section *Pelargonium*), some species of clade B (sections *Reniformia* and *Peristera*), clade C1 (section *Jenkinsonia*) and clade C2 (sections *Ciconium* and *Subsucculentia*) are scented (Blerot et al., 2015).

Most *Pelargonium* species are indigenous of South Africa and nearby countries. Aromas of odorant species are remarkably diverse such as rose, mint, lemon, nutmeg, ginger and many other scents, underlying a richness of scented compounds produced in *Pelargonium* (Demarne and Van der Walt, 1992; Lis-Balchin, 2003; Lalli et al., 2006). As such, several species were introduced and used in hybrids creation during the 17th century in Europe, most notably to obtain cultivars with refined fragrance notes. Among the scented *Pelargonium* hybrids, the rose scented *P. × hybridum* cultivars, also named pelargonium rosat, are the most emblematic cultivars and are often used to replace the expensive *Rosa damascena* essential oil (EO). These hybrids descend from several crossings between *P. graveolens* or *P. radens* in one hand and *P. capitatum* in the other hand. Cultivars used in EO production are somatically multiplied from cuttings in their production area, but the knowledge of their exact botanical origin has been lost over time (Demarne, 2003). Because of the economic importance of scented pelargoniums, agronomical research was undertaken to improve EO production and to investigate pharmaceutical and antimicrobial potentialities (Saraswathi et al., 2011; Boukhatem et al., 2013). In addition, characterisation of flavones and antioxidants in the hydrolate phase obtained during EO extraction opened new areas for valorisation of by-products (Rao et al., 2002; Sangwan and Singh, 2015).

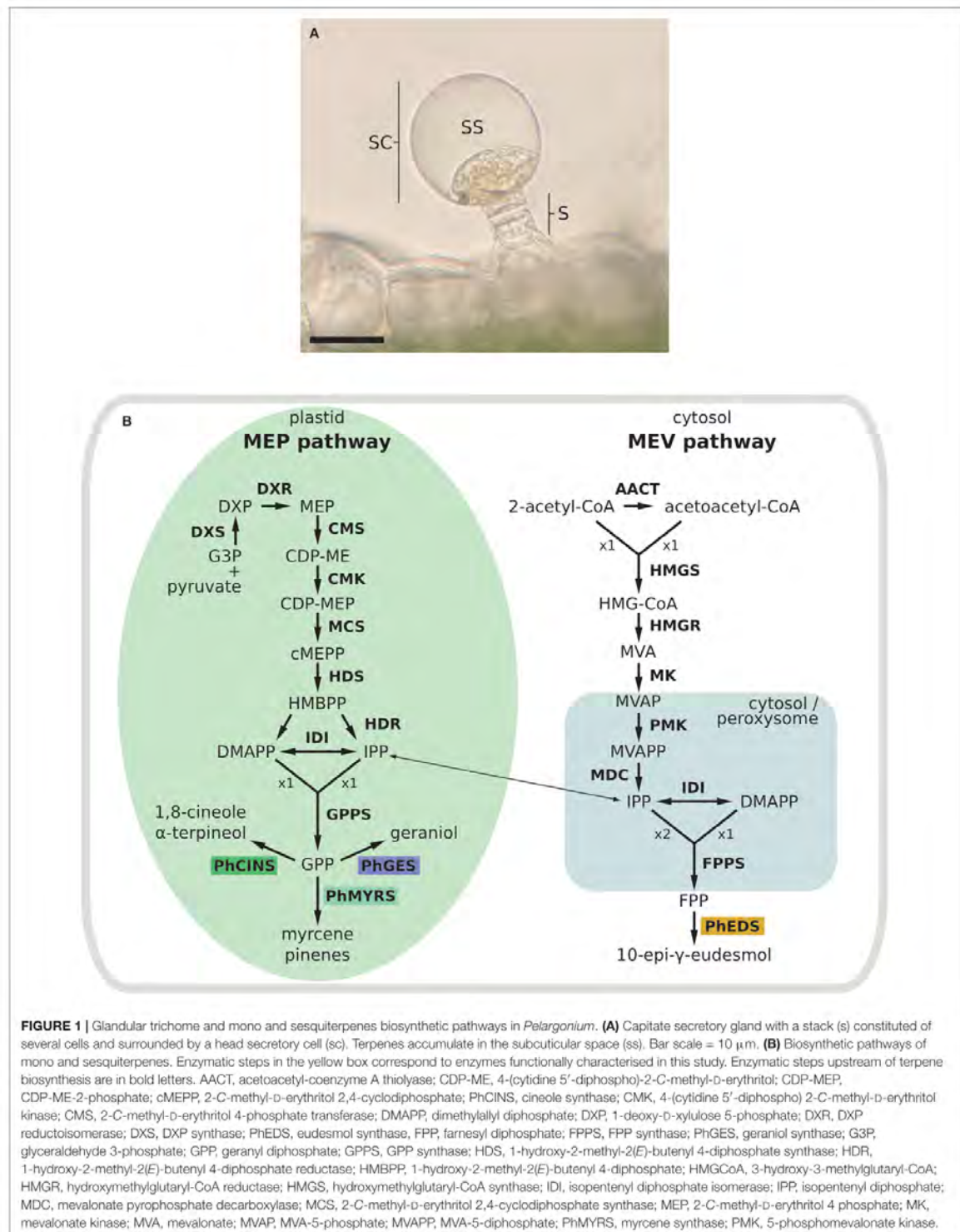
Composition of EOs extracted from the main *P. × hybridum* cultivars (cv. rosat 'Bourbon', cv. rosat 'China', cv. rosat 'Egypt' and cv. rosat 'Grasse') has been extensively studied (Gauvin et al., 2004; Juliani et al., 2006; Blerot, 2016). Geraniol, citronellol, and derivatives, all acyclic monoterpenes, form the main part of EOs and give their stereotypical rose scent to these cultivars. In a lesser extent, limonene, a cyclic monoterpene, and its derivatives with a mint scent, as well as sesquiterpenes like 6,9-guaiadiene or 10-epi- γ -eudesmol with a rose scent and a wood scent, respectively, contribute to EOs fragrances. For a detailed composition of pelargonium rosat EOs, see Blerot (2016). Balance between these main terpenes is of crucial importance for EO quality and fragrance, with variable rosy, minty and woody top notes. As such, use and commercial value of pelargonium rosat EO depend on its composition and fragrance characteristics. For example, EO obtained from pelargonium rosat 'Bourbon' is much appreciated for its pure rosy fragrance.

In pelargonium, biosynthesis of terpenes takes place in leaves in specialised structures known as glandular trichomes, or oil glands (Figure 1A), that are composed of a secretory cell producing EO in a subcuticular storage cavity (Boukhris et al., 2013). Within the secretory cell, prenyl phosphate like isopentenyl diphosphate (IPP) and its allylic isomer, dimethylallyl diphosphate (DMAPP) are biosynthesised through both the cytosolic mevalonate (MVA) and the plastidial methyl

erythritol phosphate (MEP) pathways (Figure 1B). It is generally accepted that IPP/DMAPP provided by MEP and MVA pathways are used, respectively, for the biosynthesis of monoterpenes and sesquiterpenes, but several works have pointed out cross-talks between these two metabolic routes (Opitz et al., 2014; Mendoza-Poudereux et al., 2015). IPP/DMAPP are substrates of prenyltransferases, enzymes involved in hydrocarbon chain elongation of prenylated compounds. The head-to-tail condensation of one DMAPP molecule with one IPP molecule produces geranyl diphosphate (GPP). Adding another IPP unit to GPP produces farnesyl diphosphate (FPP). Longer prenyl diphosphates can be synthesised but are not used to produce volatile compounds.

Prenyl diphosphates are substrates of terpene synthases (TPSs), a class of enzymes found in bacteria, fungi, plants, as well as some organisms from *Excavata* and *Amoebozoa* eukaryotic supergroups (Bohlmann et al., 1998; Wawrzyn et al., 2012; Yamada et al., 2015; Chen et al., 2016). In plants, TPSs likely evolved from the duplication of a gene encoding for an enzyme catalysing the formation of *ent*-kaurene, a precursor in the gibberellin pathway (Hayashi et al., 2006). TPSs including both monoterpene synthases (mTPSs), sesquiterpene synthases (sTPSs), and diterpene synthases (diTPSs) can be divided in seven subfamilies, of which five are represented in angiosperms: TPS-a contains sTPSs, TPS-b mTPSs, TPS-c diTPSs, TPS-e/f and TPS-g mTPSs, sTPSs and diTPSs (Chen et al., 2011). Conversion of GPP and FPP in terpenes is ensured by mTPSs and sTPSs, respectively, although some enzymes are able to accept both substrates when the reaction occurs *in vitro* (Nagegowda et al., 2008). The catalytic step mediated by TPSs consists in the dephosphorylation of a prenyl diphosphate molecule, thus forming an instable intermediary carbocation, followed by molecular rearrangements of the carbocation until loss of a proton or addition of water ends the reaction. A magnesium ion is needed for the dephosphorylation step and two conserved motifs, DDxxD and NSE/DTE are known to help for Mg²⁺ ion stabilisation (Degenhardt et al., 2009). A third conserved motif, RR(x₈)W, facilitates the cyclisation of carbocations (Williams et al., 1998). Many TPSs are promiscuous enzymes forming a large number of terpene products owing to their catalytic mechanism (Tholl et al., 2005).

Primary products of TPSs can undergo several rounds of subsequent modifications, thus producing the huge terpene diversity observed in plants. For example, in pelargonium, geraniol can be transformed by a multistep enzymatic pathway in a series of odorant compounds like geranial, geranyl acetate, and geranyl formate in one hand, and citronellol and derivatives in another hand. Compared to the full range of terpene secondary modifications known so far, only a few genes encoding enzymes involved in these reactions have been characterised. For example, oxidation of geraniol in geranial is mediated by an alcohol dehydrogenase (ADH) in basil (Iijima et al., 2006), ginger (Iijima et al., 2014), perilla (Sato-Masumoto and Ito, 2014), the orchid *Caladenia* (Xu et al., 2017) and *Polygonum* (Hassan et al., 2012). Gene encoding for the enzyme mediating acetylation of geraniol and citronellol has only been characterised once



in rose (Shalit et al., 2003). Complicating the identification of enzymes involved in terpene secondary modifications, the same molecule can be obtained by different molecular routes. For example, citronellol biosynthesis occurs either by a direct reduction of geraniol or through a multistep pathway involving both ADH and reductase enzymes (Iijima et al., 2014; Xu et al., 2017).

Balance between primary terpenes and their secondary derivatives largely influences the fragrance produced by aromatic plants. Regulation of TPS and other enzymes involved in terpene biosynthesis is both controlled transcriptionally (Nagegowda, 2010) and by IPP/DMAPP supply (Muñoz-Bertomeu et al., 2006). In pelargonium, a gene encoding for 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS), the first step providing IPP/DMAPP by the MEP pathway, has been characterised. Overexpression of the DXS gene led to a slight increase in EO content (Jadaun et al., 2017).

In aromatic non-model plants, the first EST library was derived from isolated secretory trichomes of peppermint (Lange et al., 2000). This strategic resource allowed the characterisation of reductases (Davis et al., 2005; Ringer et al., 2003), dehydrogenases (Ringer et al., 2005) and cytochrome P450 monooxygenases (Bertea et al., 2001), all involved in the menthol biosynthetic pathway. Several other libraries were obtained from purified glands of basil (Gang et al., 2001), oregano (Crocchi et al., 2010) and lavender (Lane et al., 2010) resulting in gene characterisation in both isoprenoid and phenylpropanoid biosynthetic pathways. Transcriptome investigation using high throughput sequencing technologies (RNA-Seq) has opened an entire new era in biology, allowing for large scale studies of gene expression, even in non-model organisms for which no genome has been sequenced. In the specialised metabolism field of research, RNA-Seq not only allowed to decipher entire metabolic pathways (Dugé de Bernonville et al., 2015), but also their regulators like transcription factors (Wang et al., 2016). However, pelargonium sequence data are yet scarce. Illumina reads for two dozen accessions of *Geraniales*, of which half are *Pelargonium* species, are publically available. Although this dataset encompasses several odorant pelargoniums, TPSs were not investigated. Recently, the first transcriptome analysis of a pelargonium rosat (cv. 'Bourbon') was reported (Narnoliya et al., 2017) and 13 mTPSs, 5 sTPSs, and 10 dTPSs sequences were identified solely by sequence homology.

In this study, we report the identification and functional characterisation of a geraniol synthase (PhGES) and an eudesmol synthase (PhEDS), two major TPSs controlling EO composition in pelargonium rosat cultivars, as well as a cineole and a myrcene synthase (PhCINS and PhMYRS, respectively) using a 454 transcriptome of *P. × hybridum* cv. rosat 'Grasse.' We show a strong correlation between expression of the genes encoding these enzymes and presence of their respective products in several pelargonium cultivars and species. Finally, using publically available RNA-Seq data and *de novo* transcriptome assemblies, we place the four enzymes in an evolutionary perspective of the TPSs in the *Pelargonium* genus.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

P. × hybridum cv. rosat 'Grasse,' *P. × hybridum* cv. rosat 'Egypt,' *P. × hybridum* cv. rosat 'Bourbon,' *P. × hybridum* cv. rosat 'China' and *P. cv.* 'Toussaint,' were collected in their country of origin by IFF/LMR Naturals. *P. cv.* 'Clorinda,' *P. tomentosum*, *P. radens*, *P. graveolens*, *P. capitatum*, *P. quercifolium*, were supplied by 'Le Conservatoire National du Pelargonium, Bourges' and 'Le Jardin Botanique de la tête d'Or, Lyon.' All plants were cultivated in a green house in the laboratory BVPam in Saint-Étienne under a photoperiod of 16 h of light versus 8 h of dark. Temperature was 22.5°C in the light and 18°C in the dark. Hygrometry was 50% and stable all over the day. *P. citronellum*, *P. australe*, *P. cotyledonis*, *P. echinatum*, *P. exstipulatum*, *P. fulgidum*, *P. hortorum*, *P. tetragonum*, and *P. transvaalense* leaves were collected from 'Le jardin botanique de la tête d'Or, Lyon.'

RNA Extraction

Total RNA extraction was performed using a modified version from Chang et al. (1993) and Cock et al. (1997). Therefore, 1 g of young leaves were ground to powder in liquid nitrogen before addition of 5 mL of extraction buffer [2% (w/v) PVP; 2% (w/v) CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8; 25 mM EDTA pH 8; 2 M NaCl] and 100 µL of β-mercaptoethanol. Homogenised sample was incubated 15 min at 65°C followed by 1 min at room temperature and then extracted twice with an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Supernatant (aqueous phase) was collected by centrifugation at 9,000 × g for 20 min at 4°C. RNA was precipitated by the addition of lithium chloride (2 M) and incubated for 24 h at 4°C. After centrifugation at 14,000 rpm for 1 h at 4°C, pellet was washed twice with ice cold ethanol 70% and air dried. Pellet was dissolved with 25 µL of water and 500 µL of SSE buffer [1 M NaCl; 0.5% (w/v) SDS; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8]. Aqueous phase was collected by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4°C and RNA was precipitated by the addition of 1 mL of ethanol 100% and 150 µL of sodium acetate 3 M (pH 5.7). RNA pellet was harvested after overnight incubation at -20°C and centrifugation at 14,000 rpm for 30 min at 4°C. Pellet was then washed twice with ice cold ethanol 70%, air dried and solubilised in pure water.

Genome Walking

One region of the *PhGES* gene, the promoter and the ATG start site, were amplified using the GenomeWalker™ kit (Clontech, cat. # 638904) according to manufacturer's instructions. DNA samples were extracted from leaves using NucleoSpin® Plant II Genomic DNA (Macherey-Nagel, cat. # 740770) according to manufacturer's instructions. As recommended by the GenomeWalker™ kit, PCR and nested-PCR were performed using Advantage 2 PCR kit (Clontech, cat. # 639207). Primers were designed following the guidelines from the kit and are listed in Supplementary Table 1.

454 Pyrosequencing Library and Reads Analysis

Total RNA from *P. × hybridum* rosat 'Grasse' was extracted from young leaves using the Tri reagent kit according to the manufacturer's instructions and 75 µg was sent to Eurofins MWG GmbH. A normalised random-primed cDNA library was prepared from the RNA, an emulsion-based PCR was performed and one segment of a sequencing plate was sequenced on a GS FLX+ (454/Roche) to yield more than 698,000 reads delivered as assembled reads in FASTA format with quality scoring files of all clusters. Reads were deposited in the SRA under the number SRP144736. Cleaned reads were checked using fastQC¹ and assembled using CAP3 (Huang and Madan, 1999) with a minimum similarity threshold of 90% and a minimum overlap of 40 bases. Assembled sequences were annotated using Blastx searches performed against the *Arabidopsis* translated coding sequences [The Arabidopsis Information Resource (TAIR), V10²]. Several Perl scripts were designed for data processing and analysis in assembling, annotation and functional classification of the sequences.

De novo Transcriptome Assembly From Publicly Available Illumina Reads

Illumina paired-end reads were downloaded from the SRA database³. *P. × hybridum* cv. rosat 'Bourbon' (SRR3747647) reads were obtained from the project SRP078041 (Narnoliya et al., 2017), *P. exstipulatum* (SRR1856381), *P. echinatum* (SRR1856382), *P. myrrhifolium* (SRR1856383), *P. citronellum* (SRR1862850), *P. cotyledonis* (SRR1863089), *P. incrassatum* (SRR1864553), *P. fulgidum* (SRR1864810), *P. dichondrifolium* (SRR1864811), *P. nanum* (SRR1865090), *P. australe* (SRR1865110), *P. transvaalense* (SRR1865111), *P. tetragonum* (SRR1865385) reads were obtained from the project SRP055845, *P. × hortorum* reads (SRR1072946 and SRR498624) were obtained from the project SRP013265. Reads were quality checked using fastQC and cleaned using Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) and a collection of custom Perl scripts. Clean reads were assembled using a pipeline based on SGA assembler (Simpson and Durbin, 2011) as described in Bonnot et al. (2017). Coding sequences were predicted from transcripts using a pipeline based on interproscan 5.24–63.0, Blast v2.6.0 and TransDecoder v3.0.1⁴ softwares.

Phylogenetic Analyses

Terpene synthases sequences were fetched in pelargonium assembled transcriptomes using hmmer v3.1b2 (Eddy, 2011) and the HMM profile Terpene_synth_C (PF03936) from PFAM database corresponding to the α domain found in the C-terminal part of plant enzymes. Short peptides and sequences devoid of the DDxxD conserved motif typical of class I TPSs were removed. Sequences were aligned with clustalw v1.2.4 (Sievers

et al., 2011) using the Terpene_synth_C hmm profile as a guide and 10 iterations. Some sequences obviously belonging to the same gene were manually joined together. During exploratory work, FasttreeMP v2.1.10 (Price et al., 2010) was used to generate phylogenies. Sequences of functionally characterised enzymes from neighbour families of *Pelargonium* genus and from *Arabidopsis* were added to the tree in order to tentatively assigned functions to groups of *Pelargonium* TPSs (Supplementary Table 2); nearly identical sequences with the same biochemical function were omitted. Sequences not belonging to TPS clades -a, -b, -g or -e/f (Chen et al., 2011) were removed from the phylogeny. Final alignment was manually edited to remove non-homologous sites and obvious misalignments (Supplementary File 1). The final tree was obtained using RAxML pthreads v8.2.11 (Stamatakis, 2014), the JTT evolutionary model, four gamma categories and amino acids frequencies deduced from the alignment as determined with the help of Prottest v3.4.2 (Darriba et al., 2011). Bootstrap values were obtained during the RAxML run until convergence (300 bootstraps). *Pelargonium* TPSs were blasted against NCBI nr database and results were compiled from the first 50 hits to obtain a functional annotation of the sequences.

Expression of Recombinant PhGES, PhEDS, PhCINS, and PhMYRS in *E. coli*

Full length TPSs genes amplified using primers listed in Supplementary Table 1 were inserted into the vector pENTR/D-TOPO and transferred by homologous recombination in Busso expressing vectors (Busso et al., 2005). Primers used for these steps are described in Supplementary Table 1. *E. coli* strain Rosetta (DE3) pLysS cells (Novagen, Darmstadt, Germany) were then transformed with the expression vector by heat shock. Production of the heterologous protein was performed during 14–16 h at 16°C under constant shaking at 180 rpm in terrific broth supplemented with 0.5% glycerol, 0.25 M D-sorbitol, 2.5 mM betaine after induction with 0.2 mM IPTG. The cells recovered by centrifugation were disrupted by sonication in native binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, 5% glycerol, 5 mM DTT, pH 8) supplemented with 0.5 mg.mL⁻¹ lysozyme. After clarification of the lysate by centrifugation, the recombinant protein was purified by binding to the Talon[®] metal affinity resin (Clontech, cat. # 635515) according to the manufacturer's instruction. The resin-bound protein was incubated overnight at 4°C in 200 µL of native binding buffer supplemented with 10 units of thrombin. The next day the TPS was recovered from the mixture by filtration. Protein concentration was measured using the Bio-Rad reagent (cat. # 500-0006) with bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

Enzymatic assays were performed at least in three replicates in a final volume of 500 µL containing 15–50 µg of purified recombinant protein, buffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mg.mL⁻¹ BSA) and cofactors (10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). The reaction was initiated by addition of 50 µM geranyl or FPP and the mixture was overlaid with 500 µL of hexane. After 2 h incubation at 30°C,

¹<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

²<http://www.arabidopsis.org/>

³<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>

⁴<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>

the mixture was vigorously mixed and the upper hexane phase was collected, concentrated under nitrogen stream and analysed by GC/MS. Negative controls were performed using the purified product from Rosetta (DE3) pLys without expression vector.

Subcellular Localisation

In silico predictions of proteins subcellular localisation were made with TargetP (Emanuelsson et al., 2007) and Predotar (Small et al., 2004) web services. PhGES, PhCINS, PhMYRS and PhEDS full length coding sequences were amplified using primers reported in **Supplementary Table 1**. Following cloning in the pENTR/D-TOPO entry vector, sequences were transferred into the expression vector pMDC83 under the control of a double 35S promoter (Curtis and Grossniklaus, 2003), to generate a fusion protein with GFP fused to the C-terminal part of the TPS protein. This construct was transformed into the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 (pMP90). *Agrobacterium* cultures expressing independently the four TPSs were co-infiltrated in *Nicotiana benthamiana* leaves

according to Batoko et al. (2000) together with *agrobacteria* expressing the P19 viral suppressor of silencing (Voinnet et al., 2003). After 5 days, infiltrated leaf sectors were observed under a confocal microscope as reported in Magnard et al. (2015).

RT-PCR Analysis

Quantitative PCR was performed with CFX96™ real-time detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) using the SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, cat. # 172-5270). All reactions were carried out in 20 μL using 2 μL of reverse transcribed cDNA as template and 500 nM of each of the primers according to the manufacturer's protocol. Gene primers were designed using the Primer3 software. Two biological replicates were analysed for each accession then cDNA was amplified twice in two independent qPCR runs with each primer combination. Therefore, data yielded four replicates per original sample. The following thermal profile was used for all PCR reactions: 95°C for 30 s, followed by 40 quantification cycles [95°C for 5 s, T_m (**Supplementary Table 1**) for 30 s]. After 40

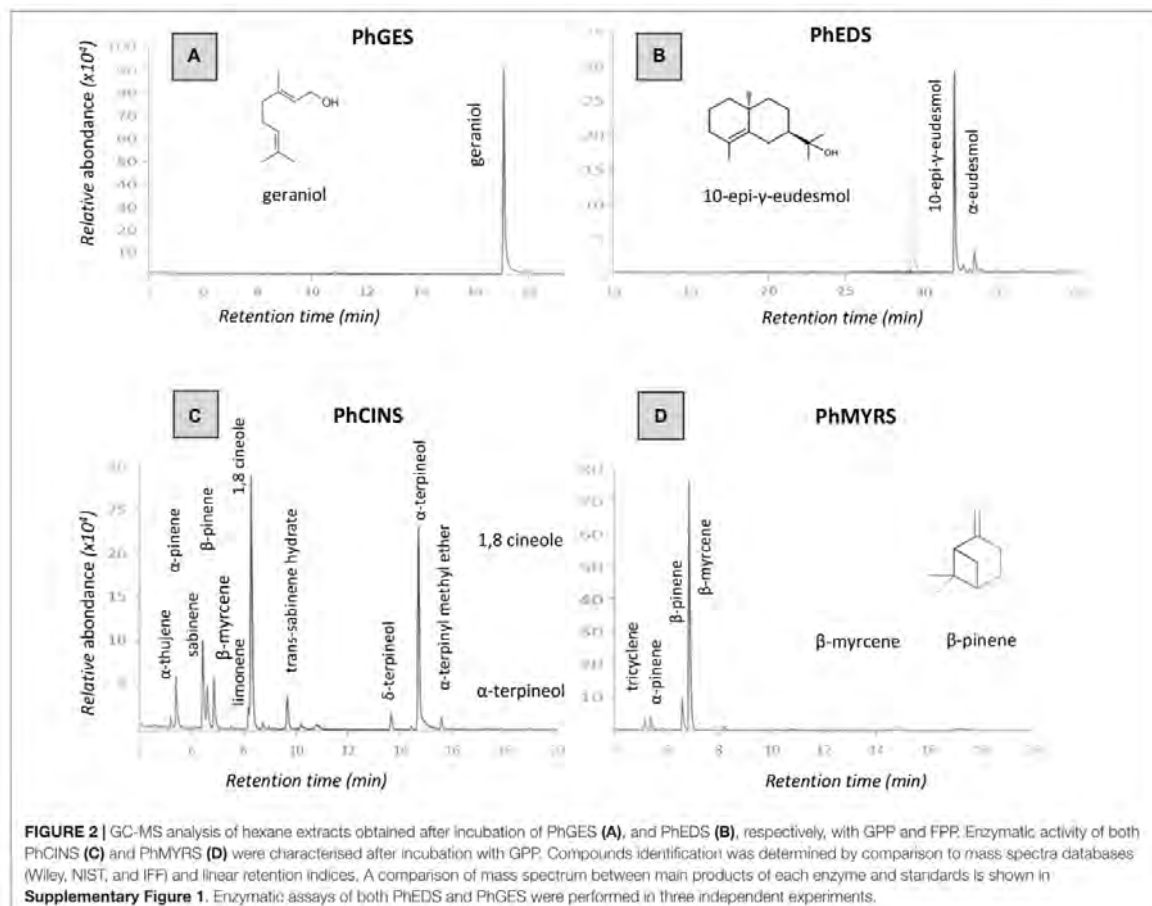




FIGURE 3 | Protein sequence alignment of the three mTPSs isolated from *P. x hybridum* cv. rosat 'Grasse,' PhCINS (MF503881), PhGES (MF503883) and PhMYRS (MF503884). Conserved amino acid regions typical of terpene synthases are overlaid: motif RR(x)_nW in black, motif LSLYEASLY in red and motif DDxxD in blue.

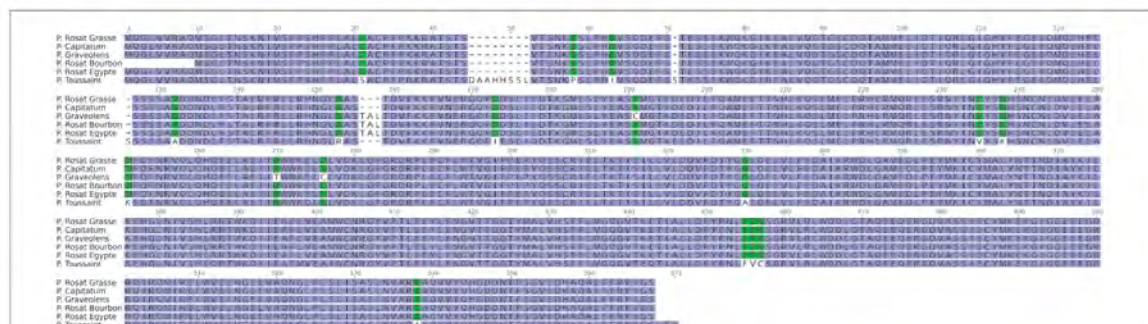


FIGURE 4 | Protein sequence alignment of GESS from different pelargonium rosat cultivars, *P. cv.* 'Toussaint' and two pelargonium rosat parents: *P. capitatum* and *P. graveolens*.

cycles, a melting-curve analysis (65°C to 95°C, one fluorescence read every 0.5°C) was performed to check the specificity of the amplification.

Normalised expression values ($2^{-\Delta\Delta C_q}$ method, Livak and Schmittgen, 2001) of *PhGES* and *PhEDS* were calculated by the CFX96TM data manager (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) using β -ACTIN, *TUBULIN* and *GAPDH* as reference genes (Supplementary Table 1). The stability of expression of these reference genes was evaluated using Best-Keeper (Pfaffl et al., 2004), geNorm v. 3.5 (Vandesompele et al., 2002), and NormFinder (Andersen et al., 2004). We used REST 2009 (Pfaffl et al., 2002) to compare the expression level of a gene in a 'sample' group using a 'control' group as a reference by implementing a pairwise fixed reallocation randomization test (10,000 iterations). Differences in expression between 'sample' and 'control' cDNAs were considered significant for p -values < 0.05.

Semi-quantitative RT-PCR was performed using primers listed in Supplementary Table 1 and samples were normalised using *ACTIN* gene. After 25 amplification cycles, amplification levels were estimated following in-gel staining and visual comparison against *ACTIN* gene amplification.

GC-MS Analysis

Terpenes were extracted independently from fresh leaves of three plants after overnight incubation in hexane (2 mL per gram), supplemented with camphor as internal standard to allow for quantification, or by hydro-distillation. An Agilent GC 6850 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 ion trap mass detector was used for GC-MS analyses of enzymatic activities and transiently transformed tobacco leaf extracts. The instrument was equipped with a 30 m × 0.25 mm apolar capillary column DB5. Temperatures of injector and detector were 250°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. A volume of 2 μL of extract was injected with a split ratio of 1:2. Oven temperature settings were: 4 min at 60°C after injection followed by a 4°C.min⁻¹ temperature ramp from 60°C to 240°C. Temperature was then kept on hold at 240°C for 5 min. Molecule identification was performed using Wiley, NIST 05 and IFF-LMR mass spectra databases. GC-MS analyses in IFF analytic laboratory (Grasse) were performed on a GC-MS 6890-MS Agilent 5973. Most of the parameters were common with those applied in LBVpam except for the temperature ramp that was 60°C during 10 min, then 2°C.min⁻¹ from 60°C to 300°C. Temperature was then kept on hold at 300°C for 3 min. A volume of 2 μL of extract was injected with a split ratio of 1:110.

RESULTS

Functional Characterisation of a Geraniol Synthase and an Eudesmol Synthase, as Well as Two mTPSs From *P. × hybridum* Rosat 'Grasse'

Geraniol, limonene, eudesmol and their derivatives make up to 75% of EO composition in pelargonium rosat cultivars. As such, characterising TPSs responsible for their synthesis is an important step to better understand how these terpenes are produced in pelargonium. To this aim, a transcriptome of *P. × hybridum* rosat 'Grasse' was *de novo* assembled from 454 reads obtained from leaf RNA. Known sequences of GES, limonene synthase and EDS were used to search for homologous sequences in the transcriptome and four TPSs were identified as good candidates based on their percentage of similarity. The four sequences were cloned and recombinant proteins were produced in the *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS strain using Busso's expression vectors (Busso et al., 2005). Incubation of the four recombinant proteins with GPP or FPP led to the identification of three mTPSs and one sTPS. PhGES (MF503883) produced uniquely geraniol in presence of GPP as a substrate (Figure 2A). PhEDS (MF503882) produced 10-*epi*- γ -eudesmol and α -eudesmol as major and minor products, respectively, after incubation with FPP (Figure 2B). The two remaining enzymes were multiproduct mTPSs: PhCINS (MF503881) catalysed the *in vitro* production of more than 10 monoterpenes from GPP, with 1,8-cineole and α -terpineol as major products (Figure 2C); PhMYRS (MF503884) used GPP to produce β -myrcene as major compound and both α - and β -pinene in lower amounts (Figure 2D). Unfortunately, none of the enzymes catalysed the formation of limonene. No sesquiterpene could be detected when PhGES, PhCINS or PhMYRS were incubated with FPP; similarly, PhEDS was unable to catalyse the production of any monoterpene in presence of GPP. Retention times of all enzymatic products were similar to standards (data not shown) and a comparison of mass spectrum between enzymatic products and standards was also performed (Supplementary Figure 1).

Sequence Analysis of PhGES, PhEDS, PhCINS, and PhMYRS

Alignment of the protein sequences of the three mTPS showed a strong similarity between PhCINS and PhMYRS (identity: 63%; similarity: 77%) compared to PhGES (Figure 3). The three enzymes contained conserved motifs of TPSs: LSLYEASYL and DDxxD; RR(x)₈W, was absent from the PhGES sequence, as expected for a mTPS catalysing the synthesis of acyclic products like geraniol. Because geraniol and derivatives are the main terpenes responsible for the rose scent of pelargonium rosat, orthologs of PhGES in several rosat cultivars as well as in their parents were examined (Figure 4). PhGES sequence was highly conserved between the different pelargonium rosat as compared to *P. cv.* 'Toussaint.' A sequence of three amino acids (TAL) was only found in 'Bourbon' and 'Egypt' cultivars but not in 'Grasse' cultivar. *PhGES* and *PhEDS* gene structures were investigated by

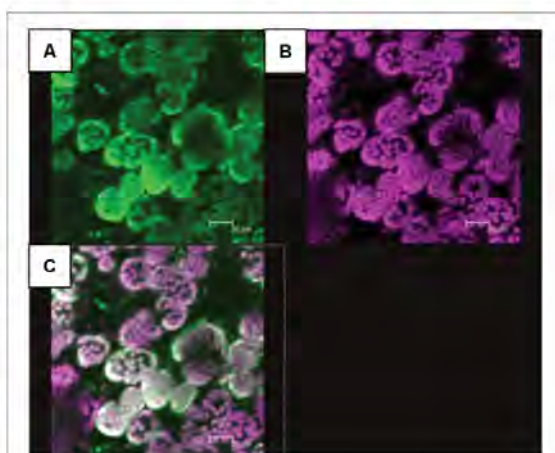


FIGURE 5 | *In vivo* localisation of PhGES by transient transformation of *N. benthamiana* with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a pMDC32 expression vector where PhGES coding sequence, was fused with the GFP coding sequence. PhGES was localised in chloroplasts. Two independent experiments were performed and chloroplastic localisation was found at least in several plants in both assays. Picture shows the green fluorescence of GFP (A), auto fluorescence of chlorophyll in purple (B), and their co-localisation (C).

amplifying genomic DNA: *PhGES* was composed of seven exons and had a gene length of 3,640 bp whereas *PhEDS* was composed of eight exons for a gene length of 2,681 bp (Supplementary Table 3). Exon size was conserved between the two genes whereas introns were longer on average in *PhEDS*. *PhGES* gene structure is in accordance with previous published data of monoterpene genomic structure (Martin et al., 2010), except for an unusual long intron of 542 bp in position three.

In vivo Localisation of the Four TPSs

It is generally believed that the plastidial MEP pathway and the cytosolic MVA pathway provide IPP/DMAPP for the synthesis of monoterpenes and sesquiterpenes, respectively. As such, mTPSs are expected to be localised in the plastid, whereas sTPSs are expected to be cytosolic. *In silico* targeting predictions of PhGES, PhCINS, and PhMYRS indicated that the three enzymes were targeted to the plastid, excepted PhGES predicted to be localised in the mitochondria solely by Predotar software (not shown). To verify these predictions, *N. benthamiana* leaves were transiently transformed with each TPS fused with the GFP moiety at the end of their C-terminal (Curtis and Grossniklaus, 2003). Confocal microscopy showed that PhGES was localised in the plastid (Figure 5) as well as PhCINS (Supplementary Figure 2). Our attempt to localise PhMYRS was unsuccessful but its high similarity with PhCINS (Figure 3) led us to be confident with *in silico* predictions. Transformed plants only with agrobacteria expressing the P19 viral suppressor of silencing provided a negative control of GFP fluorescence. Unexpectedly, PhEDS was predicted to be localised in the plastid, but all targeting predictions overlapped with the RR(x)₈W conserved

TABLE 1 | Percentages of terpene compounds and total amount of terpenes (mg.g⁻¹ FW) in several *pelargonium* species and cultivars.

	<i>P. cap</i>	<i>P. grav</i>	<i>P. radens</i>	<i>P. Bour</i>	<i>P. Grasse</i>	<i>P. Egypt</i>	<i>P. Clor</i>	<i>P. quer</i>	<i>P. tom</i>
Phenies	0.61 ± 0.07	0.4 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.56 ± 0.07	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.03	4.57 ± 0.07	0.36 ± 0.03	0.52 ± 0.01
Myrcene	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.18 ± 0.16	0.21 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.06	15.70 ± 0.56	1.01 ± 0.26	3.54 ± 0.14
<i>p</i> -Cymene	0.45 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.42 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.38 ± 0.98	17.31 ± 4.45	4.16 ± 1.08
Phellandrene	0.46 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.85 ± 0.09	0.16 ± 0.09	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.03	22.64 ± 1.22	12.2 ± 2.78	19.27 ± 0.23
Camphene	0.57 ± 0.18	0.00 ± 0.00	1.59 ± 0.32	0.21 ± 0.1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	17.54 ± 1.17	0.00 ± 0.00
Linalol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.5 ± 0.01	0.07 ± 0.07	0.21 ± 0.12	0.23 ± 0.06	6.30 ± 0.41	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Menthone	0.00 ± 0.00	5.85 ± 0.29	88.87 ± 0.77	11.41 ± 0.72	9.44 ± 0.75	8.07 ± 0.07	2.21 ± 0.04	0.00 ± 0.00	57.2 ± 0.97
Citronellol	26.68 ± 3.88	40.85 ± 0.85	0.00 ± 0.00	28.64 ± 2.44	32.12 ± 2.79	44.63 ± 0.53	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.14
Geraniol	0.21 ± 0.12	17.89 ± 0.24	0.00 ± 0.00	38.82 ± 3.45	40.12 ± 3.88	26.56 ± 0.61	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
α -Terpineol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.35 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Others MTs	4.18 ± 0.45	0.00 ± 0.00	2.81 ± 0.19	1.35 ± 0.74	1.02 ± 0.35	1.19 ± 0.29	4.02 ± 1.09	9.85 ± 0.85	5.39 ± 1.51
Guaiadiene	26.50 ± 1.53	14.76 ± 0.45	0.00 ± 0.00	8.77 ± 0.29	0.57 ± 0.07	0.46 ± 0.01	4.63 ± 0.17	0.66 ± 0.04	0.00 ± 0.00
Germaacene D	14.79 ± 1.27	7.66 ± 0.28	1.79 ± 0.28	1.92 ± 0.32	3.67 ± 0.38	3.51 ± 0.3	8.07 ± 0.31	4.7 ± 0.87	2.08 ± 0.16
10-epi- γ -eudesmol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.62 ± 0.07	6.79 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
α -Eudesmol	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.44 ± 0.09	0.00 ± 0.00	2.16 ± 0.19	0.00 ± 0.00
Others STs	23.21 ± 0.29	11.82 ± 0.57	1.97 ± 0.15	6.57 ± 0.94	6.2 ± 0.04	8.2 ± 0.14	29.11 ± 0.55	34.2 ± 0.81	7.26 ± 0.82
Unknowns	2.35 ± 0.30	0.76 ± 0.24	0.00 ± 0.00	1.27 ± 0.45	0.19 ± 0.19	0.28 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Amount (mg/g)	1.93 ± 0.28	0.45 ± 0.03	1.14 ± 0.14	2.77 ± 1.53	1.73 ± 0.46	2.28 ± 0.38	6.24 ± 0.56	1.19 ± 0.15	0.50 ± 0.13

P. cap, *P. capitatum*; *P. grav*, *P. graveolens*; *P. quer*, *P. quercifolium*; *P. tom*, *P. tomentosum*; Commercial cultivars in brackets; *pelargonium rosea* cultivars: 'Bourbon', 'Grasse' and 'Egypt'; 'Clarrida' is a commercial hybrid from unknown lineage. The two main compounds of each species are shaded. Phenies, α - and β -phenes, phellandrenes, α - and β -phellandrenes; camphene, α -, β - and γ -camphenes; menthone, addition of menthone, isomenthone and menthyl citronellol, addition of citronellol, citronellal and several citronellyl like acetate, formate, butyrate and tiglate; geraniol, addition of geraniol, citral, and several geranyl like acetate, formate, butyrate and tiglate; MT, monoterpene; guaiadiene, 6,9-guaiadiene and 1(5),1,1-guaiadiene; ST, sesquiterpene. Average percentages and total amounts as well as their corresponding standard deviations were calculated from results obtained from three independent GC-MS analyses.

motif involved in the biosynthesis of cyclic sesquiterpenes like eudesmol, thus indicating a misprediction of PhEDS subcellular localisation. Unfortunately, our attempts to localise PhEDS *in vivo* were unsuccessful.

Correlation of Expression of the Four TPSs With Terpene Content in Different *Pelargonium* Species

To validate PhGES, PhEDS, PhCINS, and PhMYRS functions *in vivo*, terpene content and expression of the four enzymes were investigated jointly in several *Pelargonium* species. Several *P. × hybridum* cultivars, their putative parents, *P. capitatum*, *P. graveolens* and *P. radens*, as well as some botanical species were analysed (Table 1). Terpene amount ranged from 0.5 mg.g⁻¹ FW up to 2.7 mg.g⁻¹ FW depending on the species. *P. graveolens* produced geraniol and both *P. graveolens* and *P. capitatum* produced citronellol and derivatives, giving a rose and lemon scent to these species. *P. radens* contained almost exclusively menthone and its derivatives relative to the other terpenes detected. Pelargonium rosat cultivars synthesised both rose and mint scented terpenes with different balances between geraniol and citronellol. Finally, *P. cv. 'Clorinda'*, *P. quercifolium* and *P. tomentosum* exhibited a different pattern of terpenes with a higher amount of non-oxygenated monoterpenes like myrcene, phellandrenes and ocimenes.

Expression of both PhGES and PhEDS was assessed by semi-quantitative RT-PCR using PhACTIN as reference (Figure 6). As expected, PhGES was expressed in all pelargonium rosat and in *P. graveolens* that produces citronellol and geraniol as main terpenes, PhEDS was only expressed in rosat 'Grasse' and 'Egypt' cultivars that contain 10-γ-epi-eudesmol. Overall, these results indicated a good correlation between PhGES, and PhEDS gene expression and accumulation of the products synthesised by the respective enzymes in several *Pelargonium* species.

Expressions of PhGES and PhEDS genes were more precisely assessed by qPCR. As shown in Figure 7, the results essentially recapitulated the semi-quantitative RT-PCR results. In addition, PhGES was only slightly expressed in the species *P. capitatum* (previously not analysed by semi-quantitative RT-PCR). Expression of PhEDS in *P. capitatum* was unexpected but similar results were already reported in *Zingiber zerumbet* (Yu et al., 2008). These results confirmed a strong correlation between PhGES and PhEDS gene expression and accumulation of the products synthesised by the respective enzymes.

TPS Family in *Pelargonium* Botanical Species and Phylogenetic Relationships of PhGES, PhEDS, PhCINS, and PhMYRS

RNA-Seq data are publically available for 12 botanical species of *Pelargonium* and for *P. × hybridum* cv. rosat 'Bourbon' (Narnoliya et al., 2017). Hence, this opportunity was used to explore the TPS family in the *Pelargonium* genus, as well as the phylogenetic placement of the four newly discovered

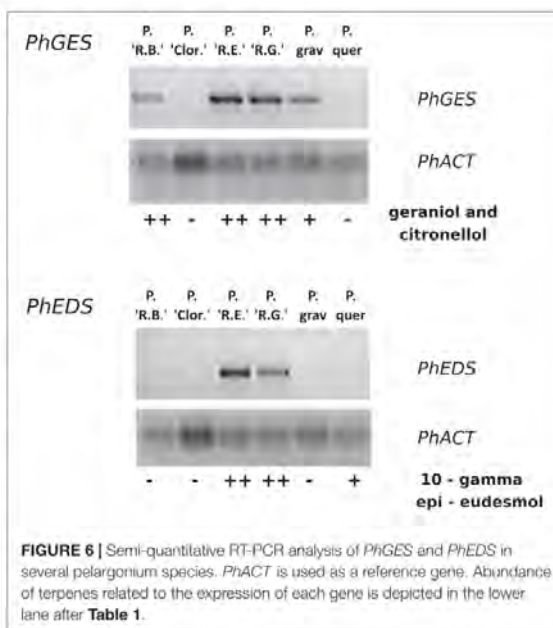
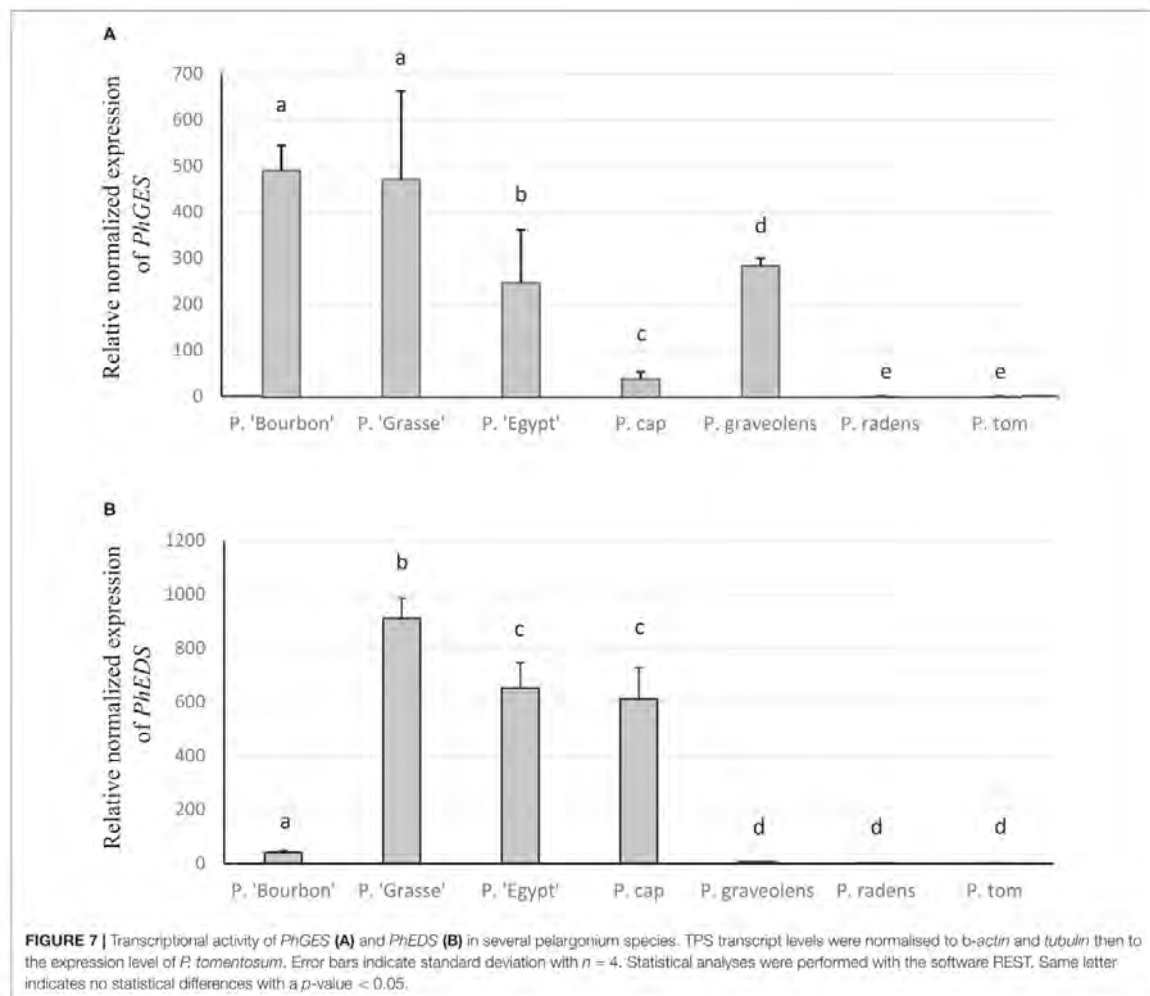


FIGURE 6 | Semi-quantitative RT-PCR analysis of PhGES and PhEDS in several pelargonium species. PhACT is used as a reference gene. Abundance of terpenes related to the expression of each gene is depicted in the lower lane after Table 1.

enzymes. To these aims, transcriptomes were assembled from the 13 Illumina read sets and annotated. 271 TPS sequences belonging to subfamilies -a, -b, -g, and -e/f (Chen et al., 2011) were retrieved using TPS HMM profile from the Illumina transcriptomes and from the 454 *P. × hybridum* cv. rosat 'Grasse' transcriptome, thus excluding homologs and some diTPS enzymes belonging to the TPS-c subfamily (see the section "Materials and Methods" for details). The number of TPS sequences by species varied from three enzymes in *P. cotyledonis* to 36 enzymes in *P. × hybridum* rosat 'Grasse' (Table 2). Because TPS homologs were searched in transcriptome data, the number of TPS retrieved by species is likely underestimated as compared to the total number of TPS encoded by their respective genomes. No clear links could be drawn between the number of transcriptional units per transcriptome and the number of TPS sequences identified (Table 2) showing that the number of TPS per species does not correlate with the number of transcripts inferred during transcriptome assembly. However, analysis of volatile content from available plant specimens in Lyon botanical garden (Supplementary Table 2) showed that the three non-scented species devoid of any detected terpene (*P. cotyledonis*, *P. transvaalense* and *P. australe*) had a low number of TPS sequences in their transcriptome (Table 2). Although the analysed set of plants was limited, this result could mean that non-scented species express or have a lower number of TPS sequences encoded in their genome. It should be noted that the apparent discrepancy in the number of TPSs found between rosat 'Bourbon' and rosat 'Grasse' cultivars is likely due to the different sequencing and assembly methods used.

A maximum likelihood (ML) phylogeny (Figure 8A) was inferred including the 271 TPS sequences identified across the



set of *Pelargonium* species, the four newly discovered enzymes PhGES, PhCINS, PhMYRS, and PhEDS, as well as *Arabidopsis* sequences and functionally characterised enzymes from diverse species. Two cloned sequences from *P. × hybridum* cv. rosat 'Bourbon' homologous to PhGES and PhEDS were included in the phylogeny. As expected, PhCINS and PhMYRS clustered with the TPS-b subfamily that contains most of the mTPSs; PhEDS clustered with the TPS-a subfamily made of angiosperms sTPSs; PhGES clustered with the TPS-g subfamily as many other geraniol synthases (Figure 8A). Species phylogeny (Figure 8B) was reconciled with the TPS ML tree in order to infer orthologous groups of TPSs between the 13 *Pelargonium* species. With the exception of PhMYRS for which no orthologs could be inferred, PhGES, PhEDS, and PhCINS possessed orthologous sequences in other *Pelargonium* species, with the orthologous group comprising PhGES (G-1) being strongly supported by bootstrap values (Figure 8A). PhEDS and PhGES possessed

direct orthologs in *P. × hybridum* rosat 'Bourbon', and PhCINS seemed to be closely related to a paralogous enzyme that consequently could be a second cineole synthase expressed in *P. × hybridum* cv. rosat 'Grasse.' However, no clear correlation could be drawn between presence or absence of an enzyme in a given species, and terpene content analysis (Supplementary Table 4).

Terpene specificity was tentatively assigned to the *Pelargonium* TPSs, both using blast information and connection of *Pelargonium* TPS clades to functionally characterised TPSs in other species. In almost all cases, functionally characterised enzymes with different product affinity clustered together by species (see *V. vinifera* sequences in the TPS-a subfamily for example, Figure 8A) and branched at the base of clades containing *Pelargonium* TPS sequences, consequently providing no indication as for the putative functions of the *Pelargonium* enzymes. As such, terpene specificity of TPSs has evolved

TABLE 2 | Number of assembled transcripts, number of TPS sequences and number of detected compounds amongst a common set of terpenes between species.

Species	Number of transcriptional units	Number of TPS	Number of terpenes
<i>P. cotyledonis</i>	46,138	3	0
<i>P. transvaalense</i>	25,683	6	0
<i>P. myrrhifolium</i>	22,004	7	N.A.
<i>P. australe</i>	32,368	7	0
<i>P. tetragonum</i>	24,598	10	11
<i>P. × hybridum</i> cv. rosat 'Bourbon'	28,133	16	47**
<i>P. citronellum</i>	34,842	16	15
<i>P. × hortorum</i>	47,577	16	17
<i>P. echinatum</i>	30,565	23	9
<i>P. nanum</i>	35,752	23	N.A.
<i>P. incrassatum</i>	27,605	25	N.A.
<i>P. dichondrifolium</i>	39,388	25	N.A.
<i>P. fulgidum</i>	34,484	25	10
<i>P. extipulatum</i>	48,614	32	12
<i>P. × hybridum</i> cv. rosat 'Grasse'	225,783*	36	33**

*The 6 to 10 order of magnitude difference in sequence number between the *P. × hybridum* cv. rosat 'Grasse' and the other transcriptomes is due to the sequencing technology and assembly procedure. **Both *P. × hybridum* cv. rosat 'Bourbon' and *P. × hybridum* cv. rosat 'Grasse' volatiles were analysed independently of the botanical species.

independently in *Pelargonium* genus compared to other lineages. A remarkable exception was represented by the geraniol synthase clade where GESs from different species clustered at the base of the clade containing PhGES orthologous sequences, both forming an independent clade in the TPS-g subfamily (Figure 8A). Thus, GES function seems to be conserved throughout angiosperm evolution, although TPSs functioning as GES evolved also out of the TPS-g subfamily (Yang et al., 2005). The GES group contained also an enzyme acting as a linalool synthase.

DISCUSSION

TPS Gene Expression Explain Terpene Diversity in *P. × hybridum* Cultivars and Their Parents

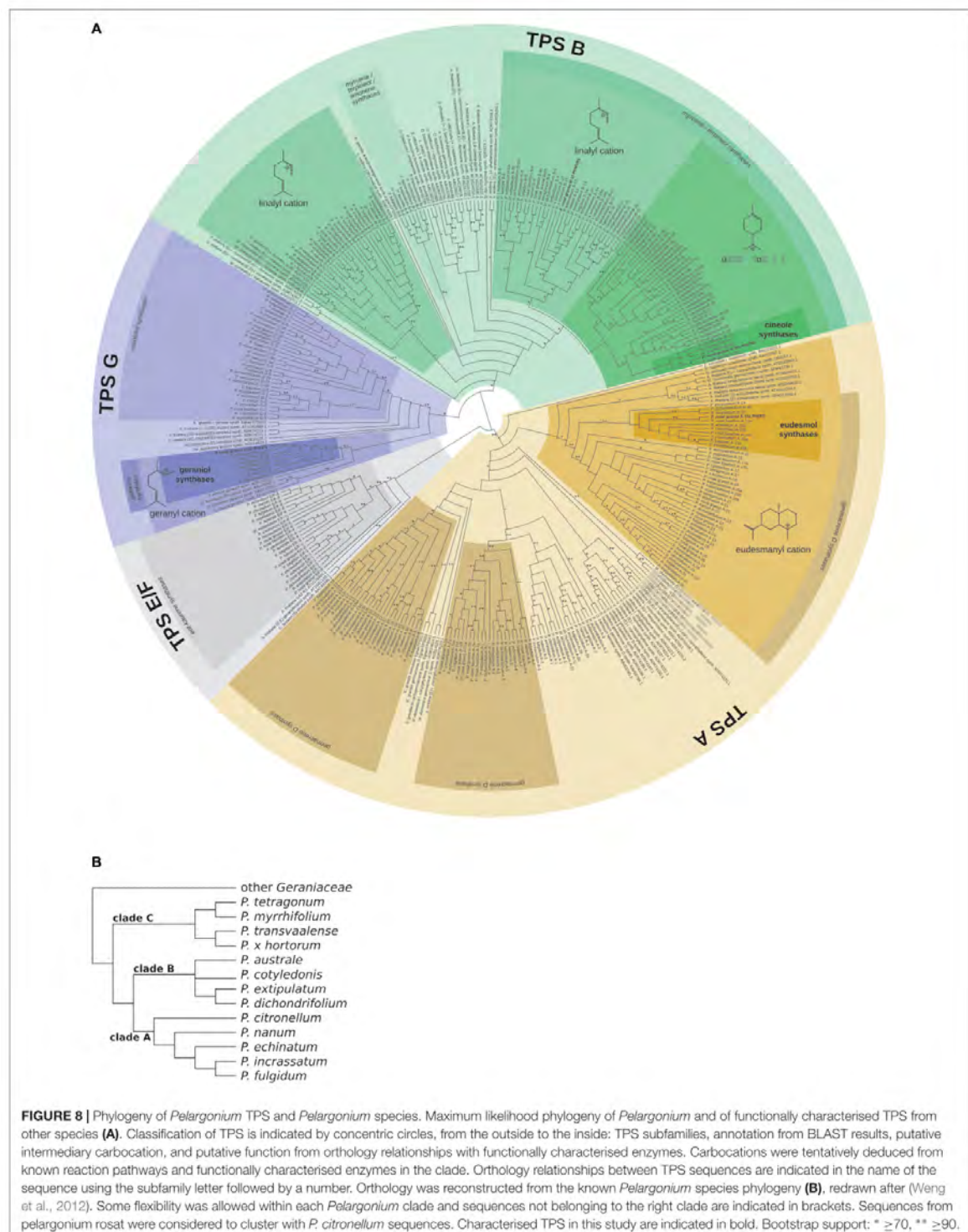
P. capitatum in one hand and *P. graveolens* or *P. radens* in the other hand are the putative parents of *P. × hybridum* cultivars. *P. radens* and *P. graveolens* have been described as mint-scented species with isomenthone as major compound (Van der Walt and Demarne, 1988), but geraniol and citronellol were reported in EO of some accessions of *P. graveolens* (Lis-Balchin, 2003). Such differences in EO composition could be explained either by wrong botanical identification or by the presence of different chemotypes in the species. This last hypothesis is supported by the fact that in *P. capitatum*, at least 8 chemotypes have been described (Viljoen et al., 1995). In any case, the high number of species in *Pelargonium* genus

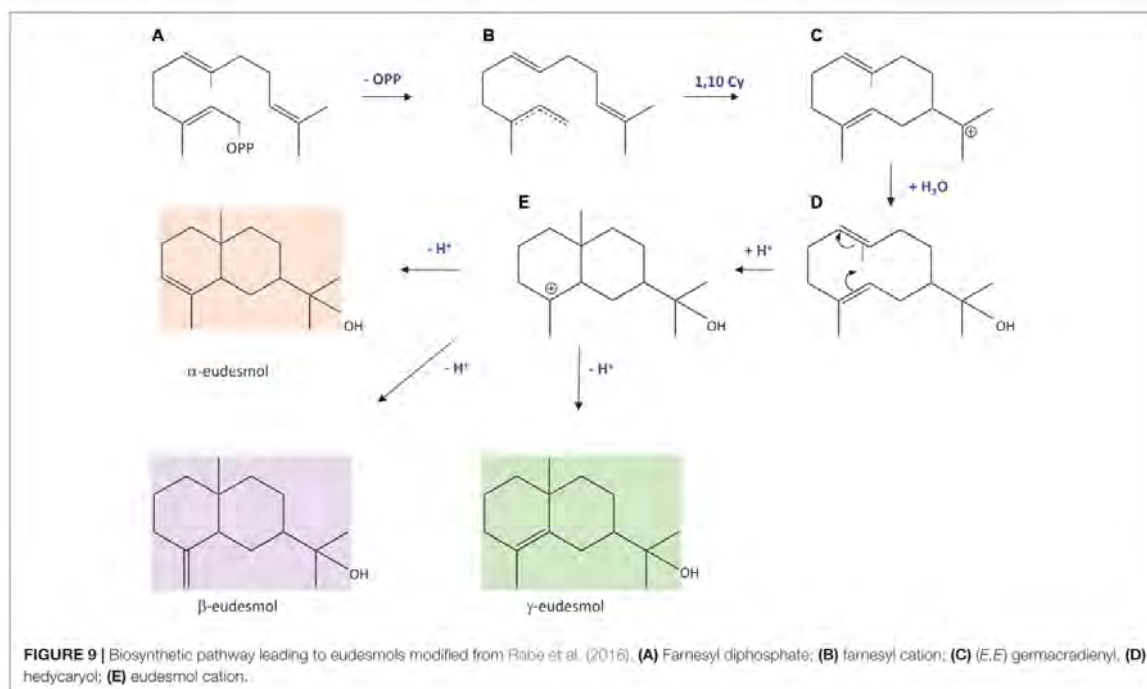
points out the importance of careful botanical identification of accessions. Several cultivars of pelargonium rosat have been obtained in different places of production. All these cultivars are characterised by a high amount of geraniol, citronellol and other derivative compounds, with different balances depending on the cultivars. In contrast, pelargonium rosat cultivars 'Grasse' and 'Egypt' can be chemotypically differentiated from 'Bourbon' cultivar by their high content in 10- γ -epi-eudesmol.

Expression of *PhGES* and *PhEDS* was studied by semi quantitative RT-PCR and qPCR. A good correlation was found between *PhGES* expression and the accumulation of geraniol and downstream products in the studied *Pelargonium* cultivars. Rosat 'Bourbon' and 'Grasse' cultivars, the two highest geraniol and citronellol producers, were also those that expressed the highest level of *PhGES*. In contrast, *P. radens* and *P. tomentosum* that did not produce geraniol or citronellol exhibited a low expression of *PhGES*. Transcriptional regulation of TPS genes has already been shown (Nagegowda, 2010), although other modes of regulation cannot be excluded. qPCR results demonstrated that PhGES was implicated in the biosynthesis of geraniol in pelargoniums *in vivo*. *PhEDS* expression was very high in the two cultivars rosat 'Egypt' and 'Grasse,' both producing a high level of 10- γ -epi-eudesmol, whereas no expression was found in accessions devoid of this terpene, to the exception of *P. capitatum*. In this species, a high level of *PhEDS* transcripts was found but no 10- γ -epi-eudesmol could be detected. A similar unexpected result was previously reported by Yu et al. (2008) who found a high expression of β -eudesmol synthase and no accumulation of the corresponding product. One explanation could be the further conversion of 10- γ -epi-eudesmol to secondary non-volatile derivatives or a lack of FPP substrate. This result remains unclear and needs further investigations.

PhGES, a Key Enzyme in Controlling the Scent of Pelargonium Rosat Cultivars

Geraniol, citronellol and derivative compounds are the main terpenes involved in the fragrance of *P. × hybridum* rosat cultivars, all deriving from the enzymatic activity of PhGES. PhGES belongs to the TPS-g subfamily. Enzymes from this clade lack the RR(x₈)W conserved motif, which facilitates isomerisation of the geranyl cation in the linalyl cation, a step necessary to form cyclic terpenes (Williams et al., 1998). Thus, TPS-g enzymes can only produce acyclic terpenes. Although the first characterised enzyme from this clade was involved in monoterpene synthesis, it is known that this clade gathers mono, sesqui and diterpenes synthases catalysing acyclic terpene biosynthesis. PhGES is well conserved in the different rosat cultivars, as well as in their putative parents, although some do not produce geraniol. Interestingly, PhGES sequence possessed three supplementary amino acids (TAL) in rosat 'Bourbon' and 'Egypt' cultivars, as compared to rosat 'Grasse' cultivar. This three amino acids were also found in *P. graveolens* species. Taken together, this indicate that pelargonium rosat 'Grasse' cultivar could be descending from a different crossing as compared to the two other rosats. GES sequence in *P. cv.* 'Toussaint,' a hybrid cultivated for its high content in citronellol, was more different





compared to rosat cultivars and *P. graveolens*, clearly indicating a different origin.

PhEDS, a New Sesquiterpene Synthase

Eudesmols are sesquiterpenes that are biosynthesised from a farnesyl cation that undergoes a 1,10 cyclisation leading to the germacradienyl cation (Figure 9). A nucleophile attack of the cation by water leads first to the stabilisation of the molecule by addition of a hydroxyl group. Then, mesmerisation between the two double bonds allows an internal 2,7 closure with a protonation producing another carbocation intermediate. Finally, a deprotonation stabilises the molecule, restoring a double bond at a position depending on the position of the lost proton, consequently producing different eudesmol isomers. In this paper, we provide the first cloning and functional characterisation of a 10-*epi*- γ -eudesmol synthase (PhEDS). To our knowledge, one β -eudesmol synthase from ginger catalysing the formation of both α - and β -eudesmol has previously been reported (Yu et al., 2008). β -eudesmol was shown to confer resistance to plants against ant attack (Marinho et al., 2005) and to possess antifungal activity (Guleria et al., 2012). Although eudesmol production was enhanced by abiotic stresses in pelargonium rosat cultivars (Blerot, 2016), it is difficult to assess yet the specific role of 10-*epi*- γ -eudesmol in these plants without further investigations.

TPS Evolution in the *Pelargonium* Genus

Analysis of the *P. × hybridum* rosat 'Grasse,' *P. × hybridum* rosat 'Bourbon,' and the 12 botanical *Pelargonium* transcriptomes

unveiled about 270 TPS sequences from the *Pelargonium* genus. The terpene specificity of most of these enzymes cannot be assigned on the sole base of sequence homology nor phylogenetic relationships. This is due to the rapid evolution by duplication and mutation acquisition of TPS sequences (Chen et al., 2011; Jullien et al., 2014) leading to convergent functional evolution in this family at low phylogenetic levels. Incidentally, functional plasticity of TPS enzymes has been demonstrated experimentally by target mutations of the active site (Yoshikuni et al., 2006; Kampranis et al., 2007). As a consequence, TPS sequences with different enzymatic capabilities from close species are more related to each other than homologous sequences with the same enzymatic specificities from more distantly related species, as is exemplified here by the *Pelargonium* centric TPS phylogeny. It should be noted, however, that this plasticity crosses TPS subfamilies borders only marginally: for example, sTPSs are predominantly found within the TPS-a subfamily whereas mTPSs are for the most part found within the TPS-b subfamily. Contrasting with this observation, closely related paralogs from the same subfamily can use both GPP and FPP as a substrate in *in vitro* assays but produce only monoterpenes or sesquiterpenes *in planta* because of their differential subcellular localisation, either in the chloroplast or in the cytosol where only GPP or FPP is available, respectively (Nagegowda et al., 2008; Huang et al., 2010). Moreover, synthesis of some terpene like linalool can be ensured by enzymes from diverse origins, see for example the linalool synthases sequences placed in TPS-g, -b and -c/f subfamilies in Figure 8A and Magnard et al. (2018). Geraniol synthesis, however, seems to be mainly catalysed by

a group of enzymes clustering in a clade localised within the TPS-g subfamily, although enzymes from other subfamilies have evolved as GES (for example the *P. frutescens* GES belongs to the TPS-b subfamily, see **Figure 8A**). This observation asks why GES enzymes from the TPS-g subfamily keep their product specificity across larger phylogenetic distances as compared to others TPSs. A possible explanation could be that TPS-g enzymes have limited evolutionary routes because of their inability to form cyclic terpenes, as described above.

Orthologous sequences to three of the four newly discovered TPS enzymes in *P. × hybridum* rosat 'Grasse' could be identified by reconciling species phylogeny with the *Pelargonium* TPS phylogeny. It is tempting to assign the same terpene specificity to the *P. × hybridum* rosat 'Grasse' PhGES, PhEUS, and PhCINS respective orthologs, although one should stay cautious in such a functional assignment given the fast evolution of TPS sequences, as discussed above. Presence of these enzymes and of their orthologs does not always correlate with terpene composition observed in the different *Pelargonium* species. This apparent discrepancy can be easily explained by several factors: expression level of the TPS gene, posttranscriptional regulation, utilisation of the enzyme product by subsequent reactions, absence of the substrate at the time of the chemical analysis, chemical analysis sensitivity, etc.

CONCLUSION

In this study, we identified and functionally characterised for the first time a GES and an EDS in pelargonium, two key enzymes controlling scent and EO composition of this odorant and economically important plant. We characterised two other mTPSs and placed the four enzymes in an evolutionary perspective of the TPS family within the *Pelargonium* genus, thus laying the foundation of a better understanding of how pelargonium odour is produced. Functional characterisation of more TPS in *Pelargonium* and finer chemical analysis will provide a better understanding of TPS evolution within the genus and, more generally, will allow gaining insights in how odorant *Pelargonium* species evolved and could be used as new sources of genetic material for perfumery industry. To this aim, large scale multiomic studies of several odorant cultivars and species

REFERENCES

- Andersen, C. L., Jensen, J. L., and Orntoft, T. F. (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. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Bakker, F. T., Culham, A., de Marais, A. B., and Gibby, M. (2005). "Nested radiation in cape *Pelargonium*," in *Plant Species-Level Systematics: New Perspectives on Pattern & Process*, Koeltz Scientific Books, eds F. T. Bakker and L. W. Chatrou (Wageningen: Wageningen University), 75–100.
- Bakker, F. T., Culham, A., Hettiarachi, P., Touloumenidou, T., and Gibby, M. (2004). Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes. *Taxon* 53, 17–31. doi: 10.2307/4135485
- Batoko, H., Zheng, H.-Q., Hawes, C., and Moore, I. (2000). A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus

combining transcriptomics and terpene metabolomics will bring to light entire metabolic pathways involved in the synthesis of compounds making the richness of fragrance observed in *Pelargonium*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BB and LM brought equivalent contribution to the experimental work and deserve therefore to be both ranked as first author. CP and AB gave a large contribution in molecular cloning of pelargonium TPSs. DS-M and SL performed the bioinformatics analysis. LS, FG, and NB were involved in the project as gardeners to maintain the pelargonium collection in greenhouse. SB, J-CC, and FJ supervised the experiments. FJ and DS-M wrote the manuscript. BB, LM, DS-M, FJ, SB, and J-CC contributed to the discussion and interpretation of the results and read and approved the final manuscript.

FUNDING

We thank IFF-LMR company for its financial support.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the botanical garden of "Parc de la Tête d'Or – Lyon" and the National Conservatory of Pelargonium of Bourges for providing the different accessions used in this work. We thank IFF-LMR company for its expertise in pelargonium EO chemical analysis. We thank Jean-Louis Magnard (Lab BVpam) for technical advices in experiments and critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01435/full#supplementary-material>

and for normal golgi movement in plants. *Plant Cell* 12, 2201–2217. doi: 10.1105/tpc.12.11.2201

Berlea, C. M., Schalk, M., Karp, F., Maffei, M., and Croteau, R. (2001). Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 279–286. doi: 10.1006/abbi.2001.2378

Blerot, B. (2016). *Biosynthèse des Composés Odeurants Chez Différents Pelargonium Utilisés Pour la Production d'huile Essentielle*. PhD thesis, University of Saint-Etienne, Saint-Etienne.

Blerot, B., Baudino, S., Prunier, C., Demarne, F., Toulemonde, B., and Caissard, J.-C. (2015). Botany, agronomy and biotechnology of *Pelargonium* used for essential oil production. *Phytochem. Rev.* 5, 935–960.

Böhlmann, J., Meyer-Gauen, G., and Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4126–4133. doi: 10.1073/pnas.95.8.4126

- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Bonnot, C., Proust, H., Pinson, B., Colbalchini, F. P. L., Lesly-Veillard, A., Breuninger, H., et al. (2017). Functional PTB phosphate transporters are present in streptophyte algae and early diverging land plants. *New Phytol.* 214, 1158–1171. doi: 10.1111/nph.14431
- Boukhatem, M. N., Kamell, A., and 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. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.03.045
- Boukhris, M., Nasri-Ayachi, M. B., Mezghani, I., Bouaziz, M., Boukhris, M., and Sayadi, S. (2013). Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Her. (Geraniaceae). *Ind. Crops Prod.* 50, 604–610. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.08.029
- Bradford, M. 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. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Busso, D., Delagoutte-Busso, B., and 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. doi: 10.1016/j.ab.2005.05.015
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113–116. doi: 10.1007/BF02670468
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., and Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* 66, 212–229. doi: 10.1111/j.1365-3113.2011.04520.x
- Chen, X., Köllner, T. G., Jia, Q., Norris, A., Santhanam, B., Rabe, P., et al. (2016). Terpene synthase genes in eukaryotes beyond plants and fungi: occurrence in social amoebae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 12132–12137. doi: 10.1073/pnas.1610379113
- Cock, J. M., Swarup, R., and Dumas, C. (1997). Natural antisense transcripts of the S locus receptor kinase gene and related sequences in *Brassica oleracea*. *Mol. Genet. MGG* 255, 514–524. doi: 10.1007/s004380050524
- Crocchi, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., and Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 73, 587–603. doi: 10.1007/s11103-010-9636-1
- Curtis, M. D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133, 462–469. doi: 10.1104/pp.103.027979
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27, 1164–1165. doi: 10.1093/bioinformatics/btr088
- Davis, E. M., Ringer, K. L., McConkey, M. E., and Croteau, R. (2005). Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant Physiol.* 137, 873–881. doi: 10.1104/pp.104.053306
- Degenhardt, J., Köllner, T. G., and Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Evol. Metab. Divers.* 70, 1621–1637. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.07.030
- Demarne, F.-E. (2003). "Rose-scented geranium a *Pelargonium* grown for the perfume industry," in *Geranium and Pelargonium* ed. M. Lis-Balchin (London: South Bank University), 193–211.
- Demarne, F. E., and Van der Walt, J. J. A. (1992). Composition of the essential oil of *Pelargonium vittifolium* (L.) L'Herit. (Geraniaceae). *J. Essent. Oil Res.* 4, 345–348. doi: 10.1080/10412905.1992.9698083
- Dugé de Bernonville, T., Clastre, M., Besseau, S., Oudin, A., Burlat, V., Glévarec, G., et al. (2015). Phytochemical genomics of the Madagascar periwinkle: unravelling the last twists of the alkaloid engine. *Phytochemistry* 113, 9–23. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.07.023
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.* 7:e1002195. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002195
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, H., and von Nielsen, G. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2, 953–971. doi: 10.1038/nprot.2007.131
- Gang, D. R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K. H., Simon, J. E., Lewinsohn, E., et al. (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* 125, 539–555. doi: 10.1104/pp.125.2.539
- Gauvin, A., Lecomte, H., and Smadja, J. (2004). Comparative investigations of the essential oils of two scented geranium (*Pelargonium* spp.) cultivars grown on Reunion Island. *Flavour Fragr. J.* 19, 455–460. doi: 10.1002/ffj.1354
- Guleria, S., Tiku, A. K., Gupta, S., Singh, G., Koul, A., and Razdan, V. K. (2012). Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory effects of essential oil of *Eucalyptus teretecornis* grown in north-western Himalaya against *Alternaria alternata*. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 21, 44–50. doi: 10.1007/s13562-011-0073-2
- Hassan, M., Maarof, N. D., Ali, Z. M., Noor, N. M., Othman, R., and Mori, N. (2012). Monoterpene alcohol metabolism: identification, purification, and characterization of two geraniol dehydrogenase isoenzymes from *Polygonum minus* Leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1463–1470. doi: 10.1271/bbb.120137
- Hayashi, K., Kawaide, H., Notomi, M., Sakigi, Y., Matsuo, A., and Kawai, H. (2006). Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS Lett.* 580, 6175–6181. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.018
- Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J., Haupt, I., Cosimano, J., et al. (2010). Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiol.* 153, 1293–1310. doi: 10.1104/pp.110.154864
- Huang, X., and Madan, A. (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9, 868–877. doi: 10.1101/gr.9.9.868
- Iijima, Y., Koeduka, T., Suzuki, H., and Kubota, K. (2014). Biosynthesis of geraniol, a potent aroma compound in ginger rhizome (*Zingiber officinale*): molecular cloning and characterization of geraniol dehydrogenase. *Plant Biotechnol.* 31, 525–534. doi: 10.5511/plantbiotechnology.14.1020a
- Iijima, Y., Wang, G., Fridman, E., and Pichersky, E. (2006). Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. *Arch Biochem Biophys.* 448, 141–149. doi: 10.1016/j.abb.2005.07.026
- Jadaun, J. S., Sangwan, N. S., Narnoliya, L. K., Singh, N., Bansal, S., Mishra, B., et al. (2017). Over-expression of DXS gene enhances terpenoid secondary metabolite accumulation in rose-scented geranium and *Withania somnifera*: active involvement of plastid isoprenogenic pathway in their biosynthesis. *Physiol. Plant.* 159, 381–400. doi: 10.1111/pp.12507
- Jones, C. S., Bakker, F. T., Schlichting, C. D., and Nicotra, A. B. (2009). Leaf shape evolution in the south African genus *Pelargonium* L'Her. (Geraniaceae). *Evolution* 63, 479–497. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00552.x
- Juliani, H. R., Koroch, A., Simon, J. E., Hitimana, N., Daka, A., Ranarivelo, L., et al. (2006). Quality of geranium oils (*Pelargonium* species): case studies in Southern and Eastern Africa. *J. Essent. Oil Res.* 18, 116–121.
- Jullien, F., Moja, S., Bouy, A., Legrand, S., Petit, C., Benabdelkader, T., et al. (2014). Isolation and functional characterization of a τ -cadinol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Plant Mol. Biol.* 84, 227–241. doi: 10.1007/s11103-013-0131-3
- Kampranis, S. C., Ioannidis, D., Purvis, A., Mahrez, W., Ninga, E., Katerelos, N. A., et al. (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. doi: 10.1105/tpc.106.047779
- Lalli, J. Y., Viljoen, A. M., Başer, K. H. C., Demirci, B., and Özçek, T. (2006). The essential oil composition and chemotaxonomical appraisal of south african *Pelargoniums* (Geraniaceae). *J. Essent. Oil Res.* 18, 89–105.
- Lane, A., Boeckleemann, A., Woronuk, G. N., Sarker, L., and Mahmoud, S. S. (2010). A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*. *Planta* 231, 835–845. doi: 10.1007/s00425-009-1090-4
- Lange, B. M., Wildung, M. R., Stauber, E. J., Sanchez, C., Pouchnik, D., and Croteau, R. (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2934–2939. doi: 10.1073/pnas.97.6.2934

- Xu, H., Bohman, B., Wong, D. C., Rodriguez-Delgado, C., Scaffidi, A., Flematti, G. R., et al. (2017). Complex sexual deception in an orchid is achieved by co-opting two independent biosynthetic pathways for pollinator attraction. *Curr. Biol.* 27, 1867–1877. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.065
- Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-ya, K., Omura, S., Cane, D. E., et al. (2015). Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 857–862. doi: 10.1073/pnas.1422108112
- Yang, T., Li, J., Wang, H.-X., and Zeng, Y. (2005). A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry* 66, 285–293. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.12.004
- Yoshikuni, Y., Ferrin, T. E., and Keasling, J. D. (2006). Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature* 440, 1078–1082. doi: 10.1038/nature04607
- Yu, F., Harada, H., Yamasaki, K., Okamoto, S., Hirase, S., Tanaka, Y., et al. (2008). Isolation and functional characterization of a β -eudesmol synthase, a new

sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *FEBS Lett.* 582, 565–572. doi: 10.1016/j.febslet.2008.01.020

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Blerot, Martinelli, Prunier, Saint-Marcoux, Legrand, Bony, Sarrabère, Gros, Boyer, Caissard, Baudino and Jullien. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre 3

**Recherche et caractérisation
de sesquiterpène
synthèses**

1 Introduction

Terpenoids constitute the most diverse class of specialised metabolites and the largest family of plant volatile compounds (Chen *et al.*, 2011; Pichersky and Raguso, 2018). They demonstrate a vast array of functions in the ecological interactions with biotic and abiotic factors of plant environment. Terpenoids fulfil roles in defense against herbivores and pathogens, pollinator attractions or responses to mycorrhizal colonization (Gershenzon and Dudareva, 2007; Pare and Tumlinson, 1999; Pichersky and Gershenzon, 2002). Besides, many volatile terpenoids are aromatic substances that contribute to the floral scent and essential oil fragrance (Gang, 2005; Knudsen *et al.*, 2006; Little and Croteau, 1999).

Essential oil (EO) from scented pelargonium leaves is predominantly composed of mono- and sesqui-terpenoids. Many studies of EO from different pelargonium species and hybrids revealed a high diversity in terpenoid composition (Demarne, 2002; Demarne *et al.*, 1993; Lalli *et al.*, 2006; Lis-Balchin, 2002; van der Walt and Demarne, 1988). Most studied pelargoniums are rose-scented *Pelargonium x hybridum* hybrids cultivated for EO production and commercialisation (Gauvin *et al.*, 2004; Juliani *et al.*, 2006). Commonly named “pelargonium rosat” or *P. rosat*, these hybrids are mostly studied for improvement of pelargonium agricultural practices as well as EO yield and quality (Blerot *et al.*, 2016; Kaul *et al.*, 1998; Rajeswara Rao, 2002a; Rajeswara Rao *et al.*, 1996; Ram *et al.*, 1997). Balance between terpenoids is of crucial importance for EO quality, distinct fragrance and flavour properties. Depending on its composition, EO has variable intensity of rosy and minty top notes, and may have lemony, green, woody or spicy secondary notes. Although monoterpenoids are the main compounds of pelargonium fragrance, sesquiterpenoids represent approximately 20 % of the EO. Present in lower quantity but in large numbers, sesquiterpenoids are responsible for complex subtle notes which add value to the fragrance (Cane, 1999; Fraga, 2007; Knudsen *et al.*, 2006). EO from different cultivated hybrids have different sesquiterpenoid profiles, both quantitatively and qualitatively, which results in a hybrid-specific blend. However, little is known about sesquiterpenoid biological functions in pelargonium, their role in EO scent, or the mechanisms underlying their biosynthesis and regulation.

In pelargoniums, biosynthesis of terpenoids takes place in leaves, in specialised structures known as glandular trichomes, or oil glands (Blerot *et al.*, 2016; Boukhris *et al.*, 2013). In plants, mono- and sesqui-terpenoids are produced throughout a plastidic and a cytosolic isoprenoid pathway respectively (Dudareva *et al.*, 2004), from isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). The head-to-tail condensation of one IPP molecule with one DMAPP molecule produces geranyl diphosphate (GPP, C₁₀), and the condensation of two IPP molecules and one DMAPP molecule produces farnesyl pyrophosphate (FPP, C₁₅). GPP and FPP are the respective universal precursors for 10-carbon monoterpene structures and 15-carbon sesquiterpene structures (Chen *et al.*, 2011; Christianson, 2008; Dudareva *et al.*, 2004).

The first specialised metabolic step in the biosynthesis of terpenes is performed by terpene synthases (TPS). These enzymes belong to one of the largest family of specialised metabolism

enzymes, and are extensively studied due to their role in terpene biosynthesis and its regulation (Chen *et al.*, 2011; Davis and Croteau, 2000; Degenhardt *et al.*, 2009). Beyond the difference between substrate chain length of monoterpene synthases (mTPSs) and sesquiterpene synthases (sTPSs), sesquiterpenoids diversity takes origin in sTPS carbocationic mechanism (Cane, 1999, 1990; Fraga, 2007; Tantillo, 2011). Indeed, as illustrated in Figure 3.1, sesquiterpene catalytic mechanism begins with ionisation of the FPP substrate in the presence of magnesium ions (Mg^{2+}). Stabilisation of Mg^{2+} at the entry of the active site prior to the ionisation leads to the cleavage of the diphosphate group (PPI) and the formation of a carbocation, the farnesyl cation. Then, the farnesyl cation can either cyclises or isomerises into the linear nerolidyl cation, which is itself a precursor of different cyclic carbocations. In the simplest case, the cyclisation is followed by a de-protonation or a hydroxylation, leading to the formation of stabilized sesquiterpenes. Protonation or hydroxylation of the farnesyl or nerolidyl cation prior to any cyclisation leads to the formation of acyclic sesquiterpenes. *A contrario*, in numerous cases, this first cyclisation and the formation of a highly reactive carbocation are followed by a cascade recations. Both farnesyl and nerolidyl cations can undergo a range of successive catalytic reactions, including further rearrangements, cyclisation, protonation, de-protonation and hydrid or methyl shifts (Figure 3.1) (Degenhardt *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012; Tantillo, 2011). The hydrophobic active site cavity of each enzyme provides a unique environment for the carbocation. Depending on the active site shape, chemical interactions due to surrounding amino acids and carbocation positions, the electrostatic environment and thermodynamic constraints differ and evolve along the catalytic steps. The environment provided to the carbocation will define the first cyclisation, the different carbocationic intermediates formed, and thus the final sesquiterpenes produced within the same enzymatic reaction (Cane, 1990; Christianson, 2017; Major and Weitman, 2012).

The variability of sTPS catalytic mechanism is largely responsible for the diversity of sesquiterpenoids produced from a unique substrate. Sesquiterpenoid composition in pelargonium EO arise mainly from this enzymatic step and sTPS expression, function, regulation and ability to produce one or multiple sesquiterpenes. Subsequent modifications of sesquiterpenes remain rare, especially when compared to monoterpenoids biosynthetic pathways. Therefore, determination of sTPS expressed in pelargoniums is a first step to understand the production of specific sesquiterpenoid blends in EO. TPS functional and evolutionary plasticity coupled with phylogenetic analysis of pelargonium TPS highlighted the difficulty to predict a sTPS function on the sole basis of sequence identity and phylogenetic relationships (Blerot *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2011; Karunanithi and Zerbe, 2019). Therefore, functional characterisation of sTPSs is necessary to allocate gene expression with specific sesquiterpenoid biosynthesis.

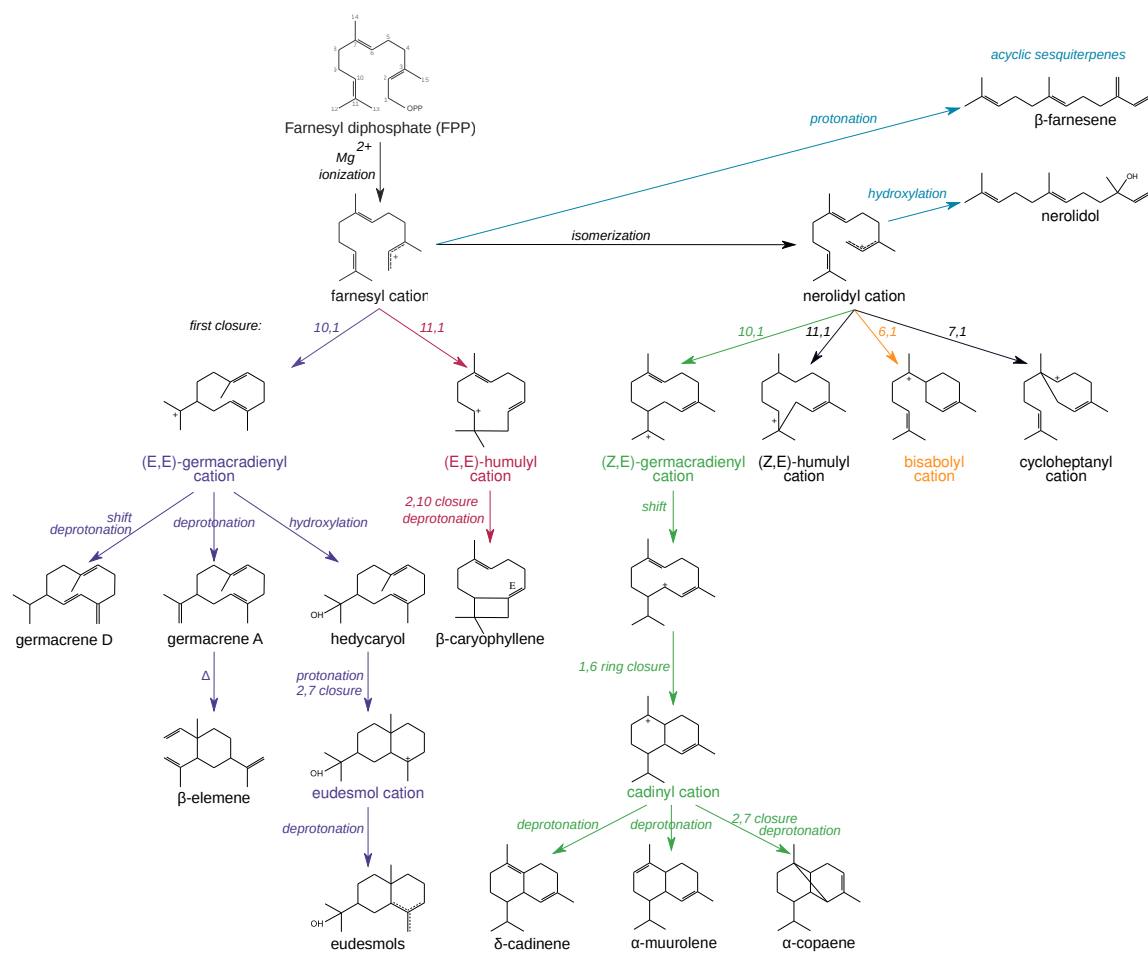


Figure 3.1 | Overview of the putative reaction mechanism of sesquiterpene production: possible cyclisation and cation rearrangement to form sesquiterpenes

In this study, we focused our work on functional characterisation of new sTPSs from pelargonium. To this aim, the existing cDNA library produced from 454 transcriptome of *P. rosat* 'Grasse' young leaves was used. This cDNA database was previously used for characterisation of the pelargonium eudesmol synthase (PhEDS) (Blerot *et al.*, 2018) and was thus screened for homologous sequences to known sTPSs, including *PhEDS*. Three sequences encoding sTPS were identified and functionally characterised *in vitro* after expression *in bacteria* and *in vivo* in yeast and tobacco leaves. Analysis of enzymatic activities permitted the characterisation of a germacrene A synthase (PhGeAS), a germacrene D synthase (PhGeDS) and a multiple product α -copaene synthase (PhCOPS). Expression levels of the cloned genes were evaluated by quantitative RT-PCR. Comparison with accumulation levels of the produced sesquiterpenes was performed to assess the respective implications of these enzymes in sesquiterpene production. With the three newly characterised sTPSs and the previously characterised PhEDS, we were able to conduct further analysis of these enzymes within a same species. In recent years, protein structural studies have begun to take important contributions to investigate TPS mechanism and functional divergence (Chen *et al.*, 2014; Christianson, 2017; Gennadios *et al.*, 2009). Therefore, the four pelargonium sTPS proteins were modelled on reference crystal structure from a plant sTPS (Starks *et al.*, 1997). Both their sequences and active site structures were compared to identify important residue differences that could play key roles in catalytic properties of these enzymes.

2 Material and methods

2.1 Plant Material

P. x hybridum cv rosat 'Grasse' (*P. rosat* 'Grasse') and *P. x 'Toussaint'* were provided by IFF-LMR-Naturals. *P. radens*, *P. citronellum* and the hybrid *P. 'Prince of Orange'* were supplied by 'Le Jardin Botanique de la tête d'Or, Lyon' and 'La Pépinière Heurtebise, Clansayes'. All plants were cultivated in a green house in the BVpam laboratory in Saint-Étienne under a photoperiod of 16 h of light versus 8 h of darkness. The temperature was set to 25 °C in the light and 18 °C in the dark. The hygrometry was 50 % and stable all over the day.

2.2 454 pyrosequencing library and reads analysis

The cDNA library used was the same as in Blerot *et al.* (2018), constructed using the following protocol. Total RNA from *P. rosat* 'Grasse' was extracted from young leaves using the Tri reagent kit according to the manufacturer's instructions and 75 µg was sent to Eurofins MWG GmbH. A normalised random-primed cDNA library was prepared from the RNA. An emulsion-based PCR was performed and one segment of a sequencing plate was sequenced on a GS FLX+ (454/Roche) to yield more than 698,000 reads delivered as assembled reads in FASTA format with quality scoring files of all clusters. Reads were deposited in the SRA (sequence read archive) under the number SRP144736. Cleaned reads were checked using fastQC and assembled using CAP3 (Huang and Madan, 1999) with a minimum similarity threshold of 90 % and a minimum overlap of 40 bases. Assembled sequences were annotated using BLASTx searches performed against the Arabidopsis translated coding sequences [The Arabidopsis Information Resource (TAIR), V102]. Several Perl scripts were designed for data processing and analyses in assembling, annotation and functional classification of the sequences. Sequence analyses and alignment were performed using the Geneious® software.

2.3 RNA Extraction

Total RNA extraction was performed using a modified version from Chang *et al.* (1993) and Cock *et al.* (1997). Fifty mg of young leaves were frozen in liquid nitrogen and ground to powder with an automatic mixer mill (Restch) before addition of 5 mL extraction buffer (2 % (w/v) PVP; 2 % (w/v) CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8; 25 mM EDTA pH 8; 2 M NaCl) and 100 µL β-mercaptoethanol. The homogenised sample was incubated for 15 min at 65 °C followed by 1 min at room temperature and then extracted twice with an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Supernatant (aqueous phase) was collected by centrifugation at 9,000 g for 20 min at 4 °C. RNA was precipitated by the addition of lithium chloride (2 M) and incubated for 24 h at 4 °C. After centrifugation at 19,000 g for 1 h at 4 °C, the pellet was washed twice with ice cold 70 % ethanol and air dried. The pellet was dissolved with 25 µL of water and 500 µL of SSTE buffer (1 M NaCl; 0.5 % (w/v) SDS; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8). Aqueous phase was collected by centrifugation at 19,000 g for 10 min at 4 °C and RNA was precipitated by the addition of 1 mL ethanol 100 % and 150 µL sodium acetate 3 M (pH 5.7). RNA pellet was harvested after overnight

incubation at - 20 °C and centrifugation at 19,000 *g* for 30 min at 4 °C. This pellet was then washed twice with ice cold 70 % ethanol, air dried and solubilised in pure water.

Retrotranscription using iScript™ Reverse Transcriptase Supermix for RT-qPCR kit (Biorad, cat. #1708840) was performed on RNA extracts. Obtained cDNAs were used for sequence amplification by PCR with appropriate primers (Supplemental_data 3.1) and obtention of the full-length protein coding genes before cloning.

2.4 Genome Walking

Terminal 3' region of the *PhCOPS* gene, was amplified using the GenomeWalker™ kit (Clontech, cat. #638904) according to manufacturer's instructions. DNA samples were extracted from leaves using the NucleoSpin® Plant II Genomic DNA kit (Macherey-Nagel, cat. #740770) according to manufacturer's instructions. As recommended by the GenomeWalker™ kit, PCR and nested-PCR were performed using the Advantage 2 PCR kit (Clontech, cat. #639207). Primers were designed following the guidelines from the kit.

2.5 Expression of Recombinant proteins in heterologous system

2.5.1 PhGeAS, PhCOPS, and PhEDS expression in *Escherichia coli*

Full-length *sTPS* genes amplified using primers listed in Supplemental_data 3.1 and cDNA extracts were inserted into the pENTR/D-TOPO vector and transferred by homologous recombination in expression vectors (Busso *et al.*, 2005). Primers used for these steps are also described in Supplemental_data 3.1. *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) pLysS cells (Novagen, Darmstadt, Germany) were then transformed with the expression vector by heat shock. Production of the recombinant protein was performed during 16-18 h at 17 °C under constant gentle shaking in Terrific Broth supplemented with 0.8 % glycerol, 10 mM D-sorbitol and 2.25 mM betaine after induction with 0.5 mM IPTG. The cells recovered by centrifugation were disrupted by sonication in native binding buffer (250 mM NaH₂PO₄, 2.5 M NaCl, 10 mM imidazole, 5 % glycerol, 5 mM protease inhibitor, pH 8) supplemented with 0.5 mg.mL⁻¹ lysozyme. After clarification of the lysate by centrifugation, the recombinant protein was purified by binding to the Talon® metal affinity resin (Clontech, cat. #635515) according to the manufacturer's instruction. The resin-bound protein was incubated overnight at 4 °C in 200 µL of native binding buffer supplemented with 10 units of thrombin (Merck, cat. #605160). The next day, proteins were recovered from the mixture by filtration. Protein concentration was measured using the Bio-Rad reagent (cat. #500-0006) with bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). Enzymatic assays were performed at least in three replicates in a final volume of 500 µL containing 15-50 µg of purified recombinant protein, buffer (25 mM Tris-HCl, 5 % glycerol, 1 mM DTT, 1 mg.mL⁻¹ BSA, pH 7.5) and cofactors (10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). The reaction was initiated by the addition of 50 µM geranyl or farnesyl diphosphate (GPP or FPP) (Sigma) and the mixture was overlaid with 500 µL hexane. After a 2 h incubation at 30 °C, the mixture was vigorously mixed and the upper hexane phase was collected, concentrated under nitrogen stream and analysed by GC-MS. Negative controls were performed using the purified product from Rosetta (DE3) pLysS without expression vector.

2.5.2 PhCOPS, PhGeDS, and PhEDS expression in *Saccharomyces cerevisiae*

To express *sTPS* genes in yeast, plasmids were constructed as described in Boachon *et al.* (2015) and Höfer *et al.* (2013). The constructs were generated by PCR amplification of the desired fragment from cDNA prepared from young leaves of *P. rosat* 'Grasse', with primers harbouring appropriate enzyme restriction sites (Supplemental_data 3.1). The digested PCR fragments were integrated into the yeast expression vector pYeDP60u2 (prepared as described in Hamann et Møller, 2007) using the USER™ cloning system (New England Biolabs, cat. #M5505S) according to (Nour-Eldin *et al.*, 2006). Correct amplification of all constructs was confirmed by sequencing. The *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 strain (Pompon *et al.*, 1996) was transformed with pYeDP60 containing the different *sTPS* sequences. Yeast transformation and cultures were performed as previously done (Boachon *et al.*, 2019; Höfer *et al.*, 2014). For each construction, cultures were performed in three replicates. After 30 h of incubation at 30 °C, 200 mL of yeast culture of each transformant were induced overnight with galactose (20 g.L⁻¹). Cultures were poured in 1 L glass bottles equipped with a lid with 2 entries. A Tenax® (Merck, cat. #21009) tube was inserted at the inlet and a glass cartridge containing Poropak Q (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was inserted at the outlet. Cultures were stirred with a magnetic bar, and a vacuum pump was used enable oxygenation of the cultures by injecting air flow through the inlet tube. The vacuum was also used to pump out volatile organic compounds (VOCs) produced by yeast through the Poropak Q cartridges. VOCs were collected for 2 days, and cartridges were eluted every 24 hours with 1 mL hexane spiked with 50 µM camphor as internal standard before analysis by GC-MS.

2.6 Expression of recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana*

2.6.1 Transient expression of PhCOPS and PhGeAS

PhGeAS and *PhCOPS* full-length coding sequences were amplified using primers reported in Supplemental_data 3.1. Following cloning in the pENTR/D-TOPO entry vector, sequences were transferred into the pMDC32 *in planta* expression vector (Curtis and Grossniklaus, 2003). This construct was transformed into the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 (pMP90). *Agrobacterium* cultures transformed to express independently the two *sTPSs* were co-infiltrated in *Nicotiana benthamiana* leaves according to Batoko *et al.* (2000) together with *agrobacterium* transformed to express the gene encoding the P19 viral suppressor of silencing (Voinnet *et al.*, 2003). After 4 days, transformed leaves were placed in a glass vacuum jar equipped with the same two-entry lid as above. The vacuum pump was used to pump out VOCs produced by tobacco leaves through the Poropak Q cartridges. VOCs were collected for 24 h, and cartridges were eluted with 500 µL hexane before GC-MS analysis.

2.6.2 Subcellular Localisation

Sequences from the *PhGeAS* and *PhCOPS* constructs in the pENTR/D-TOPO entry vector were transferred into the pMDC83 *in planta* expression vector, under the control of a double 35S promoter (Curtis and Grossniklaus, 2003). Expression generates a fusion protein with GFP fused to

the C-terminal part of the sTPS protein. After 4 days, infiltrated leaf sectors of *N. benthamiana* were observed under a confocal microscope as reported in Magnard *et al.* (2015) to determine subcellular localisation of the target protein. Primers used for cloning are listed in Supplemental_data 3.1.

2.7 RT-PCR Analysis

Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was performed with the CFX96™ real-time detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) using the SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, cat. #172-5270). All reactions were carried out in 20 µL using 2 µL of reverse transcribed cDNA as template and 500 nM of each of the primers according to the manufacturer's protocol. Gene primers were designed using the Primer3 software and are listed in Supplemental_data 3.1. Three biological replicates were analysed for each accession and two reverse transcription reactions were performed for each sample. Therefore, data yielded six replicates per accession amplified by RT-PCR. The following thermal profile was used for all PCR reactions: 95 °C for 30 s, followed by 40 quantification cycles [95 °C for 5 s, T_m for 30 s]. After 40 cycles, a melting-curve analysis (65 °C to 95 °C, one fluorescence read every 0.5 °C) was performed to check the specificity of the amplification. Normalised expression values ($2^{-\Delta\Delta C_q}$ method, Livak et Schmittgen, 2001) of *PhCOPS* and *PhGeAS* were calculated by the CFX96™ data manager (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) using β -ACTIN and α -TUBULIN as reference genes. The expression stability of these reference genes was evaluated using Best-Keeper (Pfaffl *et al.*, 2004), geNorm v.3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002), and NormFinder (Andersen *et al.*, 2004). We used REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002) to compare the expression level of a gene in a 'sample' group using a 'control' group as a reference by implementing a pairwise fixed reallocation randomization test (10,000 iterations). Differences in expression between 'sample' and 'control' cDNAs were considered significant for *p*-values < 0.05.

2.8 GC-MS Analysis

GC-MS analysis were used to identify extracts from enzymatic activities, transiently transformed tobacco leaf collect extracts and transformed yeasts collect extracts. It was also performed to determine terpene composition from the different pelargoniums accessions. Terpenes were extracted by overnight incubation at 4 °C in hexane (2 mL per gram of leaves) supplemented with camphor as internal standard for quantification. Three extracts per accession were obtained from three different plants, sampled at the same time as the leaf samples for RNA extraction. An Agilent GC 6850 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 ion trap mass detector was used for GC-MS analyses. The instrument was equipped with a 30 m x 0.25 mm apolar capillary DB5 column. Temperatures of injector and detector were 250 °C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. A volume of 2 µL of extract was injected with a split ratio of 1:2. Oven temperature settings were: 4 min at 60 °C after injection followed by a 4 °C.min⁻¹ temperature ramp from 60 °C to 240 °C. Temperature was then kept on hold at 240 °C for 5 min. All compounds identifications from GC-MS analysis were assessed by comparison of retention time, retention index (Kovats, 1965; Van Den Dool and Kratz, 1963), and standard mass spectra using mass spectrum

database (Adams, 2017). For enzymatic activity, extracts were also analysed with a similar method except that the injector temperature was set at 150 °C to detect undenatured compounds, such as germacrene A, whose thermal rearrangement leads to the detection of β -elemene (Feger *et al.*, 2001).

2.9 Protein modelling

The structure of *Nicotiana tabacum* 5-epi-aristolochene synthase (TEAS) bound to the FPP substrate analogue farnesyl hydroxyphosphonate (FHP) (PDB entry: 5EAT) (Starks *et al.*, 1997) was used for protein modelling. All predicted structural models show high quality (coverage >94 %, sequence similarity >44.5 %, high GMQE and QMEAN scores) and 3D-protein structural models obtained with the SWISS-MODEL software (<http://swissmodel.expasy.org>) were used for protein structure homology modelling (Schwede *et al.*, 2003). Structural analysis and three-dimensional structural drawings were performed using PyMol™ (<http://www.pymol.org/>).

3 Results

3.1 Functional characterisation of three sTPS from *P. rosat* 'Grasse'

To characterise new pelargonium sTPSs, the *P. rosat* 'Grasse' transcriptome was searched for its homologous sequences to known sTPSs, including *PhEDS* (Blerot *et al.*, 2018). Three *TPS* coding sequences were identified as good candidates based on their percentage of identity. Since one of the retrieved sequence (later identified as *PhCOPS*) did not cover the whole *TPS* open reading frame, genome walking was performed to complete the sequence. RT-PCR was subsequently performed on purified *P. rosat* 'Grasse' young leaf RNA with primers encompassing the whole coding regions in order to clone the corresponding full-length cDNA. The three coding sequences of 1653 bp, 1665 bp and 1704 bp long were cloned in bacterial and yeast expression vector (Busso *et al.*, 2005; Nour-Eldin *et al.*, 2006) and recombinant proteins of respectively 551, 554 and 567 amino acids length were produced in corresponding heterologous system. The activity of 551 and 554 amino acids proteins were assessed *in bacteria* and confirmed in yeast and/or tobacco leaves. The bacterial production of the last protein, 567 amino acids protein (theoretical molecular weight of 65.6 kDa), has proven to be challenging and its activity was thus assessed directly in yeast. At the same time, the activity of the previously characterised *PhEDS* (Blerot *et al.*, 2018) was also assessed in yeast. Regarding bacterial expression, full-length His-tagged fusion proteins were purified using Ni²⁺ affinity chromatography and was confirmed to be of the expected theoretical molecular weight of 64.0 kDa by SDS-PAGE (data not shown). Activities of the purified recombinant proteins were assessed on GPP and FPP substrates separately. Obtained extracts and headspace samples collected from yeast cultures expressing recombinant proteins were analysed by GC-MS (Figure 3.2). The 551 amino acids protein was only active with FPP, producing germacrene A as a single product, and was consequently characterised as a germacrene A synthase (*PhGeAS*). The 554 amino acids protein was also only active with FPP, producing α -copaene as the main product (50 %) and minor sesquiterpenes including β -caryophyllene (5 %), α -muurolene (20 %) and δ -cadinene (6 %). This multiple product sTPS was therefore characterised

as an α -copaene synthase (PhCOPS). When the 557 amino acid protein was expressed in yeast, it produced only one sesquiterpene, which was identified as germacrene D, when expressed in yeast and was thus characterised as a germacrene D synthase (PhGeDS). The products of PhEDS produced in yeast confirmed the previous *in vitro* characterisation (Blerot *et al.*, 2018).

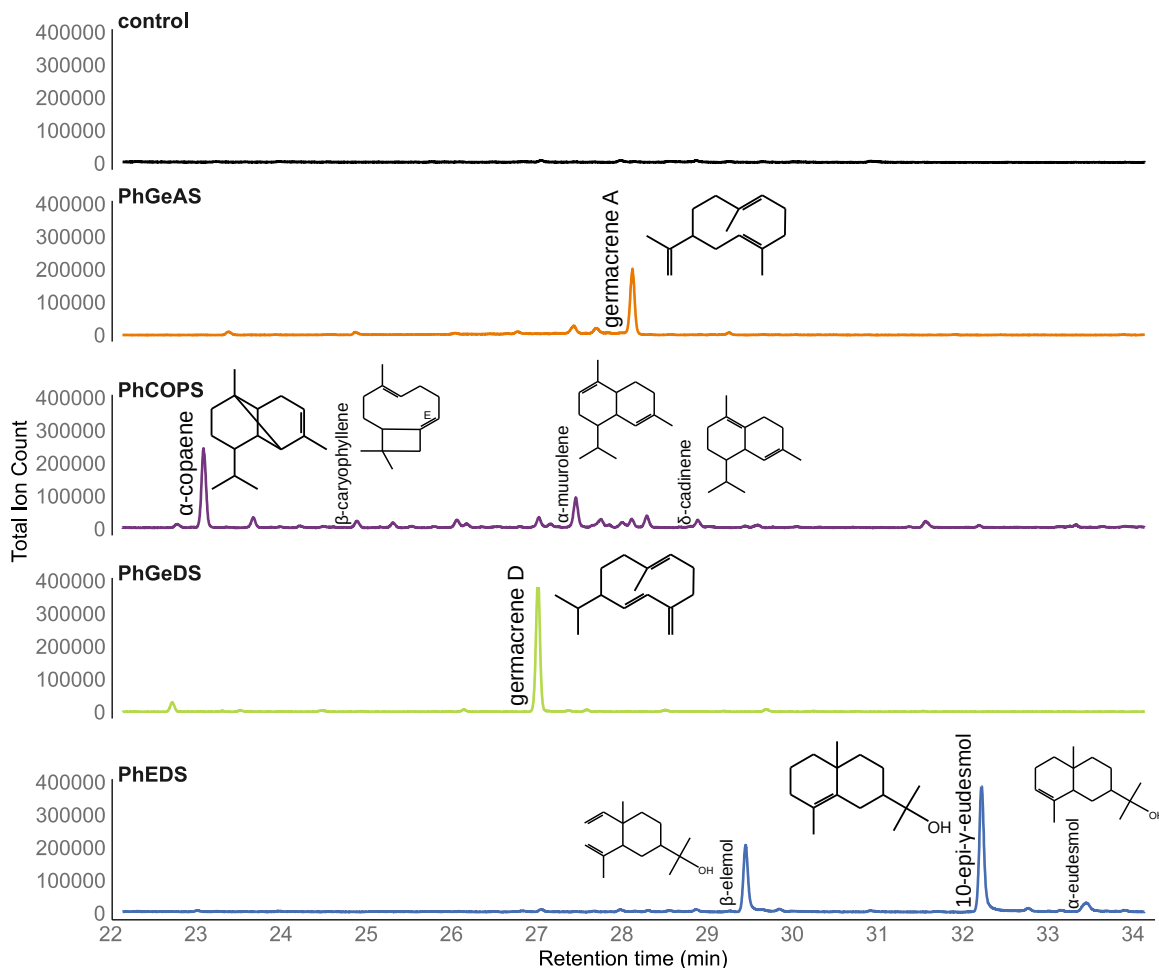


Figure 3.2 | GC-MS analysis of hexane extracts obtained from enzymatic activities of PhGeAS, PhGeDS and PhCOPS, and PhEDS in a heterologous system

Spectrum presented for PhGeAS and PhCOPS correspond to the results from *in vitro* activities after expression in *E. coli*. Spectrum presented for PhGeDS and PhEDS correspond to the results from expression in *S. cerevisiae*. GC-MS analysis used for PhGeAS extract was performed with a lower injector temperature (150 °C instead of 250 °C) to detect germacrene A and not its thermal degraded derivative, β -elemene. Compound identification was determined by comparison to mass spectra databases (Adams, 2007) and linear retention indices.

The enzymatic activities of PhCOPS and PhGEAS were confirmed in transient expression assays in *N. benthamiana* leaves (data not shown). The transient expression in *N. benthamiana* leaves was also used for subcellular localisation of the enzymes. Both *PhCOPS* and *PhGeAS* coding sequences were fused to *gfp* sequence at their C-terminal end in the pMDC83 expression vector (Curtis and Grossniklaus, 2003) and transformed into *N. benthamiana* leaves. Observation of the transiently transformed leaves under a confocal microscope showed that both enzymes were localised in the cytosol, as usually expected for sTPS (Figure 3.3). *In planta* experiments for PhGeDS are currently ongoing.

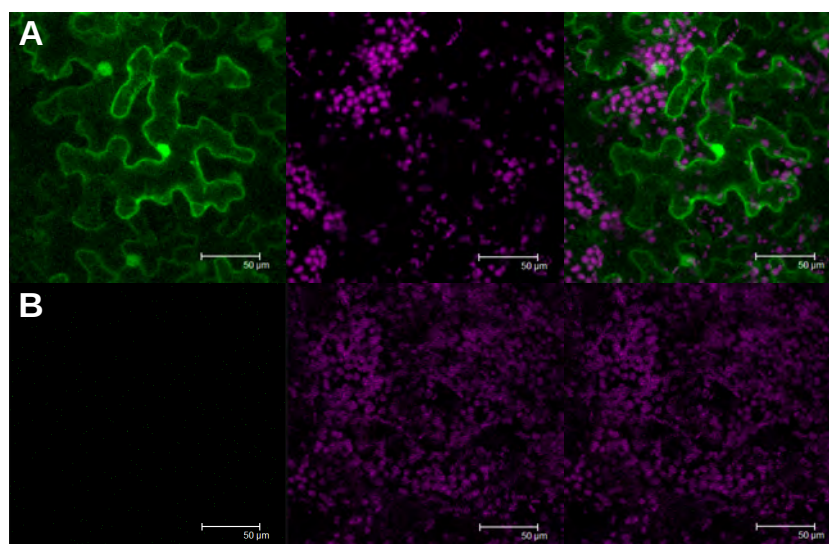


Figure 3.3 | Confocal fluorescence microscopy of *N. benthamiana* leaf cells with GFP fused protein, PhCOPS here

(A) Leaf infiltrated with *PhCOPS-gfp* construct, (B) control leaf infiltrated with the *P19* viral suppressor of silencing alone. Fluorescence of GFP is visible in green (left), plastids are revealed by auto-fluorescence of the chlorophyll in purple (middle) and both signals are merged for clear localisation (right).

3.2 Correlation of *PhCOPS* and *PhGeAS* expression levels with sesquiterpene content

The functional characterisation of PhCOPS and PhGeAS was validated by comparison of their expression with accumulation profiles of the expected corresponding products in different pelargonium accessions (Figure 3.4). Expression profiles of *PhCOPS* and *PhGeAS* in the different accessions were correlated with the accumulation profiles of α -copaene and germacrene A respectively. As expected from the germacrene A accumulation levels, *PhGeAS* showed a high relative normalised expression in *P. rosat* 'Grasse', a slight expression in *P. x* 'Toussaint' and no expression in *P. 'Prince Of Orange'* and *P. radens*. Similarly, α -copaene accumulation levels were correlated with the relatively high expression levels in *P. x hybridum* cv *rosat* 'Grasse' and *P. x* 'Toussaint', the lower expression levels in *P. 'Prince of Orange'* and the absence of expression in *P. radens*. Regarding *P. citronellum*, both *PhGeAS* and *PhCOPS* expression corroborated the presence of germacrene A and α -copaene respectively. However, the expression to accumulation discrepancy unobserved in the others accessions could indicate different efficiencies among orthologous enzymes or a different substrate availability between accessions.

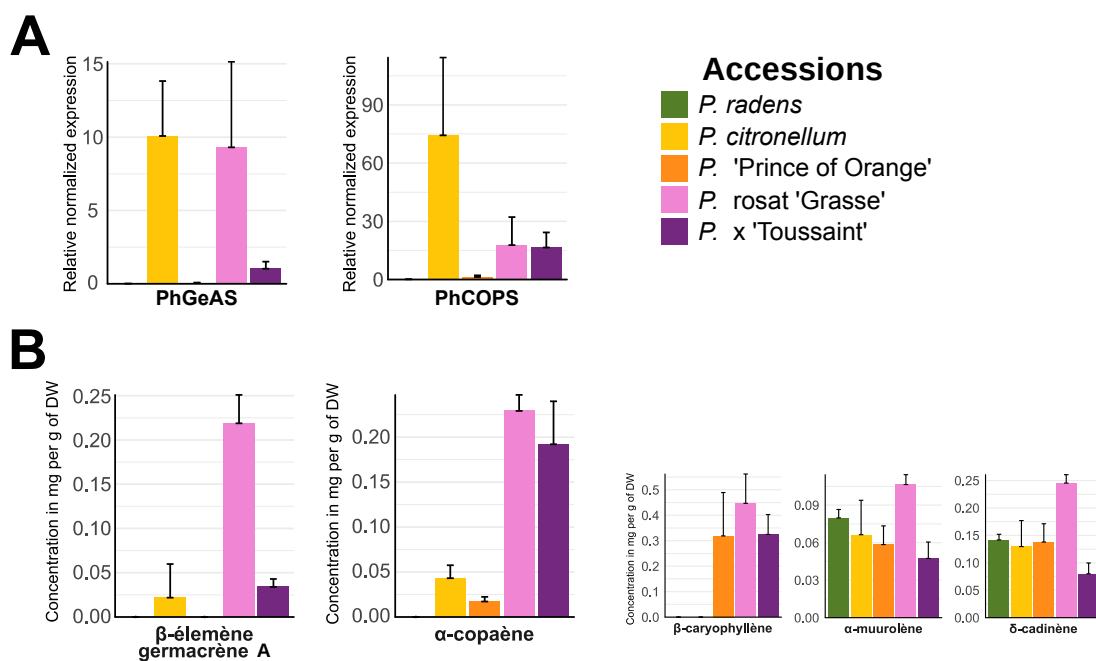


Figure 3.4 | Comparison of (A) PhCOPS and PhGeAS transcriptional activity and (B) *in vivo* production of the formed sesquiterpenes for five pelargonium accessions

A: Expression levels of *sTPSs* were obtained by RT-PCR and normalized to those of β -ACTIN and α -TUBULIN. Values are the means and standard deviation of six replicates. B: GC-MS analysis of hexane-extracted compounds were used to quantify compounds accumulation in each accession. The values are the means and standard deviations of the absolute concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight (DW)) obtained from three independent samples. Only the products of PhCOPS and PhGeAS are presented.

3.3 Sequence and structural analysis of four sesquiterpene synthases from pelargonium

Characterisation of new *sTPSs* is the first step to decipher the mechanisms underlying the production of the complex blend of sesquiterpenes identified in pelargonium EO. The four *sTPSs* characterised from pelargonium revealed four distinctive functions involved in the production of different sesquiterpenes. Further analysis of these four enzymes can help to understand functional plasticity of *sTPSs* in pelargonium and assess structure-function relationships involved in their catalytic mechanism and resulting products. To this aim, sequence analysis and structural analysis were used to compare the different *sTPSs* and highlight key amino acids. The coding sequences of the four characterised *sTPSs* were compared to the reference *N. tabacum* 5-epi-aristolochene synthase (TEAS) (Back *et al.*, 1994; Starks *et al.*, 1997) and motifs reported to be implicated in catalysis by TPS were identified (Figure 3.5). All four proteins shared 44 % to 48 % sequence identity with TEAS. PhCOPS and PhGeAS presented 74.8 % identity between them and respectively 63.4 % and 56.9 % identity to PhEDS at the protein level. PhGeDS presented only 46.2 % and 44.3 % identity to PhCOPS and PhGeAS respectively, and 45.3 % identity to PhEDS. The N-terminal peptide sequence RR(x)₈W and LQLYEASFL motif were conserved (McGeady and Croteau, 1995; Wise *et al.*, 1998). Motifs RxR, DDxxD and Rxx(N,D)Dxx(S,T,G)xxxE involved in Mg²⁺ and PPI stabilisation were well conserved in the four sequences, including the catalytic amino acids deemed to be involved with FPP binding (R286 on Figure 3.5) and Mg²⁺ binding (D323 and D327 on Figure 3.5) (Christianson, 2006; Degenhardt *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012; Starks *et al.*, 1997). All sequences appeared to belong to the *TPS* gene family, and more specifically to the *TPS*-

a gene family, a group of genes mainly composed of angiosperm sSTPs (Bohlmann *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2010).

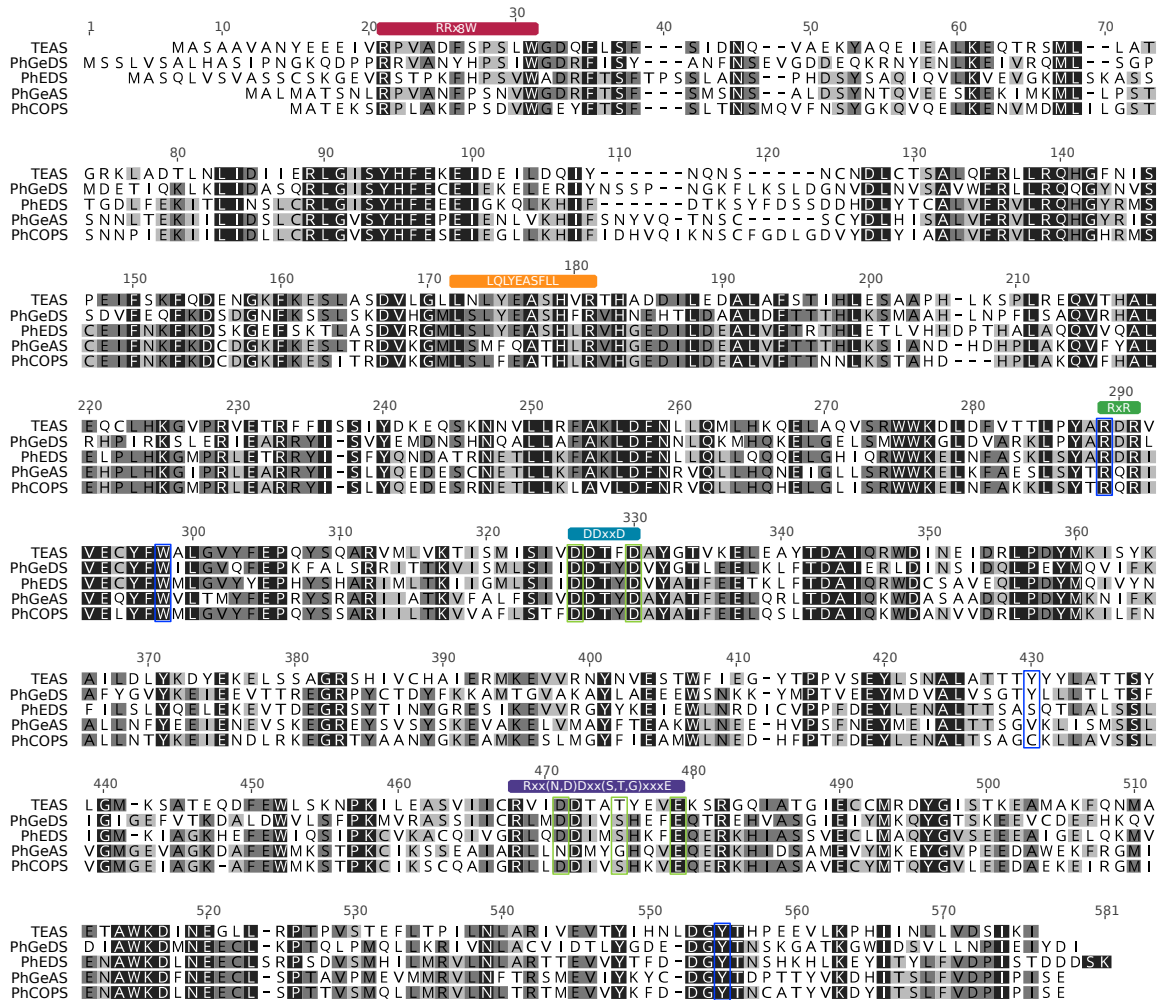


Figure 3.5 | Protein sequence alignment of the four sTPSs isolated from *P. rosat* ‘Grasse’ and TEAS from *N. tabacum* as reference

Alignment was obtained using Geneious® software. Conserved amino acids from finger-print motifs of TPS are identified. Amino acids presumed to be involved in Mg²⁺ or FPP binding are respectively highlighted with green and blue boxes.

To further compare the different sTPSs, three-dimensional structural protein modelling was performed. Crystallography and protein modelling have been widely used to highlight amino acids involved in sTPSs catalytic mechanism (Durairaj *et al.*, 2019; Greenhagen *et al.*, 2006; Ker *et al.*, 2020; Köllner *et al.*, 2009; Rising *et al.*, 2000). The template model was the previously determined structure of the TEAS bound to the FPP substrate analogue farnesyl hydroxyphosphonate (FHP) (PDB entry: [5EAT](#)) (Starks *et al.*, 1997). All predicted structural models showed a highly conserved three-dimensional structure, including the characteristic “terpene fold” (data not shown) (Davis and Croteau, 2000; Lesburg *et al.*, 1997). Protein modelling focused on the active site cavity. Even though pockets from the four modelled sTPSs presented similar localisation and overall conformation, they displayed distinguishable architecture with residue differences that might affect the catalytic mechanism of the protein. Three main factors drive the ability of a TPS to generate a specific carbocation: the stability of the Mg²⁺ ions that bind to the PPI group, the residues involved in the substrate binding and the stability of the substrate in the catalytic environment.

Amino acids supposedly involved in Mg^{2+} and FHP binding were identified in the four sTPSs, based on TEAS crystallographic data and previous protein alignment (Greenhagen *et al.*, 2006; Rising *et al.*, 2000; Starks *et al.*, 1997) (Figure 3.5 & Figure 3.6A&B). Modelling was first used to evaluate the implication of specific amino acids in the stabilisation of the three Mg^{2+} cations. Among the five amino acids binding Mg^{2+} , there was only T488 in TEAS which was not conserved in any of the enzymes and was replaced by a serine or a glycine (S/G475). This amino acid belongs to the Rxx(N,D)Dxx(**S,T,G**)xxxE motif (Figure 3.5) and has been demonstrated to commonly be either a serine (S), a threonine (T) or a glycine (G) in sTPSs (Degenhardt *et al.*, 2009; Durairaj *et al.*, 2019). Presence of either of these three residues permit Mg^{2+} stabilisation. However, T and S can stabilise Mg^{2+} through its hydroxyl group (coloured in red in Figure 3.6A) whereas in presence of glycine, with a lower steric volume, a water molecule is presumed to substitute to the hydroxyl group (Zhou and Peters, 2009). Modelling was then used to investigate residues involved in the substrate binding. Similarly to Mg^{2+} , the substrate must be stabilised. Hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the substrate are part of the chemical interactions responsible for catalysis. Once the PPi group removed and complexed by Mg^{2+} , these interactions affect the cation rearrangement. With the exception of Y404, all residues of the amino acids involved in FHP binding in TEAS were highly conserved in the four proteins (Figure 3.6B). The tyrosine (Y) was conserved only in PhGeDS (Y430) and was substituted in the three other proteins by various smaller, non-aromatic residue, precluding any bound with the substrate. The presence of a different residue at this position was the only difference between the four pelargonium enzymes that might generate differences in chemical interactions regarding substrate binding.

Only few differences were highlighted regarding the residues involved in Mg^{2+} and substrate stabilisation, indicating very little catalytic differences between the four enzymes. Overall, Mg^{2+} and substrate binding amino acids were highly conserved among pelargonium sTPSs. Their functional plasticity does not seem to originate from these interactions of residues alone.

Stability of the substrate in a hydrophobic environment does not rely exclusively on binding amino acids. Surrounding amino acids, capable of various interactions with the subsequent cations, also determine the chemical interaction and affect the catalytic mechanism. For example, one of the most studied cavity shaping amino acids is the D444-Y520-D525 triad in TEAS (Vattekkatte *et al.*, 2018), involved in cation de-protonation (Rising *et al.*, 2000; Starks *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2019). Regarding the four characterised sTPSs, corresponding amino acids (positions 471-548-553, Figure 3.5) were highly conserved, except the 471st amino acid, which was an asparagine (N) in PhGeAS, and an aspartate (D) in the other three sTPSs (Figure 3.6C). Unlike aspartate (D), asparagine (N) side chain presents an amide group instead of a hydroxyl group (indicated in blue instead of red stick end, Figure 3.6C), and thus cannot be involved in the same interactions.

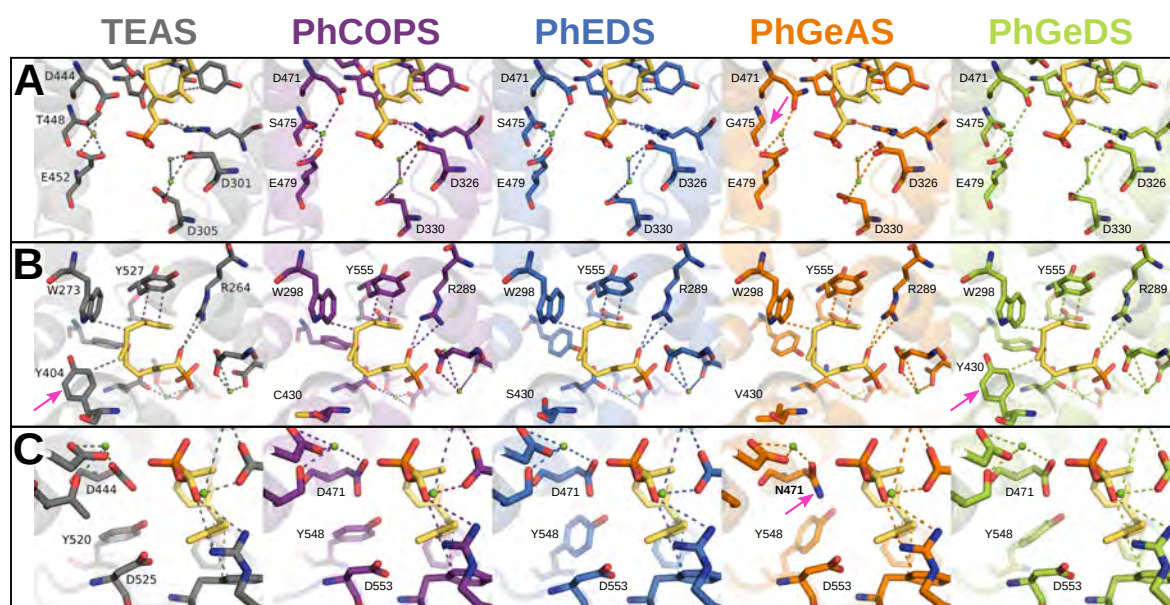


Figure 3.6 | Stereo representation of characterised sTPSs from *P. rosat* 'Grasse' modelled on TEAS presented as reference. Detailed representation of amino acids involved in (A) the Mg^{2+} stabilisation, (B) the substrate binding and (C) interaction of intermediates

Proteins from pelargonium were modelled using TEAS as template, in complex with FHP (Starks *et al.*, 1997). Design was performed using Pymol™. Protein are differentiated by carbon main-chain color: TEAS in grey, PhEDS in blue, PhCOPS in purple, PhGeAS in orange and PhGeDS in green. Green spheres represent Mg^{2+} ions. Substrate and analysed amino acids are represented in sticks. FPP substrate analogue FHP is indicated in yellow. Sticks end coloured in red indicates presence of oxygen atom (e.g. hydroxyl or acid group) in the residue, dark blue colouring indicates nitrogen atom (e.g. amide group) and yellow indicates sulphur atom (e.g. thiol group). TEAS numbering correspond to unaligned TEAS amino acid sequence. All amino acids of the pelargonium proteins are numbered according to the protein alignment in Figure 3.5. Discussed differences are highlighted with pink arrows.

4 Discussion

4.1 Transcriptional activity and sesquiterpene production

It has previously been reported that the biosynthesis of volatile terpene is often regulated at the transcriptional level (Nagegowda, 2010; Tholl, 2006). In sweet basil (*Ocimum basilicum*), three sTPSs producing δ -cadinene, selinene and germacrene D, demonstrated cultivar specific transcription profile, matching the respective products composition (Iijima *et al.*, 2004b). In hop (*Humulus lupulus* L. Cannabaceae), a caryophyllene synthase (producing both β -caryophyllene and α -caryophyllene, commonly called α -humulene) was highly expressed in tissues with high levels of β -caryophyllene and α -humulene (Wang *et al.*, 2008). In shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith), the α -humulene synthase expression profiles in different plant organs matched the corresponding α -humulene levels (Yu *et al.*, 2008). In this study, similar correlation has been demonstrated between both *PhCOPS* and *PhGeAS* expression profiles and accumulation profiles of their product. Production of α -copaene and germacrene A are regulated by the level of expression of *PhCOPS* and *PhGeAS* respectively (Figure 3.4). Nevertheless, *P. citronellum* displayed relatively elevated expression for both sTPS genes, compared to the level of α -copaene and germacrene A accumulated in their leaves (Figure 3.4).

TPS-a gene family is subject to functional plasticity and thus, product promiscuity. sTPSs functional plasticity has been demonstrated throughout characterisation of naturally occurring

variants of TPS homologs (Köllner *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004) as well as site-directed mutagenesis analysis (Garms *et al.*, 2010; Loizzi *et al.*, 2018; Rising *et al.*, 2000; Vedula *et al.*, 2008). Enzymes with a high percentage of identity, or even with a single amino acid difference, can produce the same sesquiterpenes in different proportion or entirely different sesquiterpenes. Among both *Lavandula* or *Artemisia* species, functional characterisation of TPS demonstrated that orthologous sTPSs can have different affinities or efficiencies, resulting in different quantities of the production of the same terpenes (Benabdelkader *et al.*, 2015; Muangphrom *et al.*, 2016). Additionally, studies of sTPS orthologs in *Oryza* species demonstrated that only a few selective mutations are responsible for evolution of orthologous enzymes with different activity profiles (Chen *et al.*, 2014). In our case, *P. citronellum* peculiar expression level could also be the results of PhGeAS and PhCOPS orthologs from *P. citronellum* with a lower affinity. Regarding the multiple product PhCOPS, *P. citronellum* high expression level could indeed resulted from the production of the sesquiterpenes but with different proportions.

Regarding the other four accessions, in spite of the correlation of *PhCOPS* expression with accumulation of the major compound α -copaene, the correlation was not retrieved for the minor compounds. According to our *in vitro* analysis, PhCOPS production was composed of 50 % α -copaene, 20 % α -muurolene, 6 % δ -cadinene and 5 % β -caryophyllene (Figure 3.2). This activity suggests, among others, that α -copaene was produced ten times more than β -caryophyllene. Yet, according to the accumulation profiles *in planta*, β -caryophyllene was produced twice as much as α -copaene (Figure 3.4B). The same observations can be made for the two other minor compounds (α -muurolene and δ -cadinene), suggesting that production of these sesquiterpenes results from the activity of several enzymes like in *Aquilara crassna*, where α -humulene biosynthesis is driven both by an α -humulene synthase and a δ -guaiene synthase (Kumeta and Ito, 2016, 2010). More than two sTPSs can be involved in the biosynthesis of one specific sesquiterpene as exemplified by the characterisation of six sTPSs involved in β -caryophyllene production, six sTPSs involved in α -humulene and six sTPSs involved in germacrene D in *Vitis vinifera* (Martin *et al.*, 2010). Thus, in all studied *P. rosat* it could be inferred that β -caryophyllene, α -muurolene and δ -cadinene production does not only rely on PhCOPS activity.

4.2 Structure-function analysis in pelargonium sesquiterpene synthases

The large number of sTPS genes expressed in plant and the ability of some synthases to catalyse the production of multiple products (Degenhardt *et al.*, 2009; Tholl, 2006; Vattekkatte and Boland, 2020), combined with the larger carbon skeleton of FPP (compared to GPP), are responsible for the structural diversity of the products (Degenhardt *et al.*, 2009; Fraga, 2007). One of the main characteristics of sTPSs is the ability to successively catalyse the formation of several carbocations, through complex electronic reaction cascades, inside a unique active site (Cane, 1990; Degenhardt *et al.*, 2009; Vattekkatte *et al.*, 2018).

Here, we studied four sTPSs from pelargonium, involved in the production of germacrene A and D, eudesmols and α -copaene, δ -cadinene, β -caryophyllene, and α -muurolene. To investigate

the amino acids involved in their catalytic mechanism, analysis of characterised sTPSSs three-dimensional structures was performed using the TEAS crystal structure as model. Protein modelling has been frequently used for *in silico* characterisation of sTPSSs (Chen *et al.*, 2014; Dueholm *et al.*, 2019; Köllner *et al.*, 2009; Kumeta and Ito, 2010). Besides, TEAS catalytic mechanism (Rising *et al.*, 2000; Starks *et al.*, 1997) and functional plasticity (O'Maille *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2020) have been extensively investigated throughout multiple analyses, including site-directed mutagenesis to highlight role of specific amino acids. Because sTPS sequences and functions evolved more rapidly than tertiary structure, the investigations were focused on binding cavities of PhCOPS, PhEDS, PhGeAS and PhGeDS. In particular, analyses focused on amino acid polymorphism regarding the binding and stabilisation of both ion Mg^{2+} , substrate and carbocations.

Analyses of the amino acids involved in Mg^{2+} and cation stabilisation in the different sTPSSs characterised from pelargonium revealed a low polymorphism of these residues. Still, differences in their catalytic environment can be correlated to their respective catalytic mechanism.

Regarding PhGeAS, a single product, germacrene A was produced throughout a direct de-protonation of the (E,E)-germacradienyl cation (Cane, 1999; Starks *et al.*, 1997) (Figure 3.1). However, germacrene A has been proved to constitute an intermediate compound that can be re-protonated. The resulting carbocation can undergo a second ring closure and further skeletal rearrangements and modifications leading to sesquiterpenes like aristolochenes or eudesmanes (Cane, 1999; Christianson, 2017; de Kraker *et al.*, 1998; Kumeta and Ito, 2010; Schwab and Wüst, 2015; Starks *et al.*, 1997) (Figure 3.1). The triad D444-Y520-D525 in TEAS has demonstrated a key role in aristolochenes production, especially towards germacrene A re-protonation (Köllner *et al.*, 2006; Little and Croteau, 2002). Amino acid Y520 has proven able to play a role of proton-shuttle during the enzymatic catalysis: it constitutes a proton donor for intermediate re-protonation and a proton acceptor, replacing the PPi group in the ultimate de-protonation reaction (Starks *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2020). Carboxyl oxygen from D444 and D525 (colored in red in Figure 3.6C) participates in the polarisation of Y520 hydroxyl group. Substitutions of an aspartate (D) in position 444 by an asparagine (N) inhibit the formation of aristolochenes or other germacrene A derivatives. As can be seen from protein alignment (Figure 3.5) and molecular modelling (Figure 3.6D), PhGeAS was the only studied protein not displaying the conserved triad. The corresponding triad D471-Y548-D553 was conserved in PhCOPS, PhEDS and PhGeDS, whereas PhGeAS presented a N471, preventing the polarisation of Y545. Without a proton donor, re-protonation of germacrene A is impossible, and no further products can be formed. Therefore, these observations suggest that similarly to TEAS, in PhGeAS, few amino acids can prevent germacrene A re-protonation leading further carbocation modifications.

Eudesmanols, like germacrenes, are formed *via* the (E,E)-germacradienyl cation after a 1,10-cyclisation of the farnesyl cation (Figure 3.1). Nucleophilic attack of the cation by water (hydroxylation) forms hedycaryol (González *et al.*, 2016). This intermediate, similarly to germacrene A in the aristolochenes synthesis, can be re-protonated and undergo further rearrangement and modifications. In particular, subsequent 2,7 ring closure generates a tertiary

carbocation responsible for the formation of α -, β - and γ -eudesmols (Blerot *et al.*, 2018; Rabe *et al.*, 2016) (Figure 3.1). In contrast with PhGeAS, the presence of the required triad D471-Y548-D553 in PhEDS, was assumed to be responsible for the re-protonation of the hedycaryol intermediate (Figure 3.6C).

D471-Y548-D553 triad's ability to play a proton-shuttle role was also conserved in PhGeDS, but no re-protonation was observed. PhGeDS, similarly to PhGeAS produces a single sesquiterpene, germacrene D *via* the (E,E)-germacradienyl cation after a 1,10-cyclisation of the farnesyl cation. However, unlike germacrene A, germacrene D formation involves hybrid shifts before the final de-protonation (Christianson, 2017; He and Cane, 2004). Contrary to germacrene A or germacrene C, no example of compounds resulting of a germacrene D re-protonation can be found in literature. Modelled PhGeDS had more similarities with TEAS model than with the three pelargonium sTPSSs. PhGeDS was the only studied protein for which both proton-shuttle triad and all TEAS liaisons with Mg^{2+} and FHP were conserved. However, PhGeDS must present a structural differences that could be account for the hybrid shift that occurs on the (E,E)-germacradienyl cation to form germacrene D instead of germacrene A or aristolochenes (Figure 3.1).

Regarding PhCOPS, structure-function analyses were more complicated. Multiple product enzymes, with multiple catalytic mechanisms within a same catalytic site participate to the complexity of the catalytic mechanism of sTPSSs. Even though catalytic mechanism responsible for PhCOPS products are well studied (Benedict *et al.*, 2001; Göpfert *et al.*, 2009; Lodewyk *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2012a), production of multiple sesquiterpenes *via* different parent cations (Figure 3.1) makes structure-function relationships difficult to decipher. Site-directed mutagenesis, followed by functional characterisation, would be required to highlight amino acids involved in the mechanism and their role.

5 Conclusions

TPS-a family is one of the most expanded TPS families, regrouping most of the sTPSSs from angiosperms (Chen *et al.*, 2011; Gang, 2005). Sequencing and bioinformatic advances permitted genomic characterisation of complete TPS family. In several species such as *V. vinifera* (Martin *et al.*, 2010), *Eucalyptus grandis* and *E. globulus* (Külheim *et al.*, 2015), *Citrus sinensis* (Alquézar *et al.*, 2017), *Daucus carota* (Ibdah *et al.*, 2019) and *Cannabis sativa* (Allen *et al.*, 2019), families of 50-100 genes, mostly composed of mTPSSs and sTPSSs, were described. Functional characterisation of new TPS-a is a first step to understand the mechanisms underlying terpenoids production.

In this study, we identified and characterised three new sTPSSs from *P. rosat* 'Grasse'. These enzymes are involved in biosynthesis of germacrene A, germacrene D, α -copaene, α -muurolene, δ -cadinene and β -caryophyllene. To our knowledge, only one sTPS, a 10-epi- γ -eudesmol synthase (PhEDS) had already been characterised from rose-scented pelargonium (Blerot *et al.*, 2018). Correlation between expression level of the cloned enzymes and accumulation level of the produced sesquiterpenes, suggested a regulation at the transcriptional level. However, the apparent production of a same sesquiterpenoid by multiple sTPSSs highlighted the complexity of

sesquiterpenoids production, and the multiplicity of sTPSs that might be involved in pelargonium EO sesquiterpenoid profiles. The metabolic investment of plant in biosynthesis of such compounds suggests a better fitness and a biological interests. So does the evolution of multiple enzymes toward the production of the same compound. A better assessment of the functional evolution of enzyme would require the characterisation of more sTPSs from the same pelargonium hybrid.

Moreover, characterisation of several sTPSs from a particular species participates in deciphering enzymatic mechanisms underlying sesquiterpene blend production in volatile profiles (Alquézar *et al.*, 2017; Deguerry *et al.*, 2006; Dueholm *et al.*, 2019). Functional characterisation of three new sTPSs gave new insights on sesquiterpene production in *P. rosat* 'Grasse' and allowed further analyses of both their catalytic structure and mechanism. We used *in silico* modelling analysis of the four characterised sTPSs from *P. rosat* to observe structure-function relationships and highlight amino acids presumed to be involved in specific catalytic steps. These results allowed a better understanding of catalytic mechanisms underlying sesquiterpenoid formation, and highlighted shared steps in the formation of different sesquiterpenes.

Due to sTPSs functional plasticity, formed product could be modified in response to a single amino acid variation (Köllner *et al.*, 2009; Loizzi *et al.*, 2019, 2018; Rising *et al.*, 2000). Combined with complex sTPS carbocationic reaction mechanisms and sesquiterpene chemical pathways, understanding the structure-function relationship of sTPSs remains very complex. Functional characterisation of the complete sTPS family in *P. rosat* 'Grasse' would represent new data to the pool of known characterised sTPSs. Incidentally, database enrichment would increase the power of prediction-based approach and modelling analysis of these enzymes. In addition, such a comprehensive study could be used to study the evolution of *TPS-a* gene family in *P. rosat* 'Grasse'.

Supplemental data

Supplemental_data 3.1 | Sequences of primers used for sTPS caracterisation

In the forward primers used for cloning into bacterial expression vectors, the “cacc” sequence allows directional cloning into the pENTR/D-topo entry vector and the underlined sequence encodes for the thrombin cleavage site used to separate the protein from the His-tag of the bacterial expression vector. The sequence in bold allows cloning into the pYEDP60 vector.

Gene	Primer sequence (5' → 3')	Direction	Use of primer
<i>PhCOPS</i>	CAGTGTCTCTGTAGGCTTCTATGG	Forward	Cloning of full length gene
	GATCCGAGAGATTTGCCTTG	Reverse	
<i>PhGeAS</i>	CTACTCACTCACTCTCTCAAGGC	Forward	Cloning of full length gene
	CCACACTAATACAGAATTGCAAGC	Reverse	
<i>PhCOPS</i>	caccTTGGTTCCGCGTGGATCCATGGCGACCGAAAAAA GTCGT	Forward	Cloning into bacterial expression vectors
	CTATTCTGAAATGGGTATGGGATCA	Reverse	
<i>PhGeAS</i>	caccTTGGTTCCGCGTGGATCCATGGCATTGATGGCAAC TTC	Forward	Cloning into bacterial expression vectors
	TTATTCTGAAATGGGTATGGGATC	Reverse	
<i>PhGeDS</i>	GGCTTAA [U]ATGTCTTCCTTAGTTTCAGCACT	Forward	Cloning into yeast expression vector
	GGTTTAA [U]CAAGACATAAAAAGACATGCAACA	Reverse	
<i>PhEDS</i>	GGCTTAA [U]ATGGCTTCCCAATTAGTATCAG	Forward	Cloning into yeast expression vector
	GGTTTAA [U]CCAAATTATTTGAATCATCATCAG	Reverse	
<i>PhCOPS</i>	CAGTGTCTCTGTAGGCTTCTATGG	Forward	Cloning of full length gene
	GATCCGAGAGATTTGCCTTG	Reverse	
<i>PhGeAS</i>	caccACTAATACAGAATTGCAAGC	Forward	Cloning of full length gene
	CTACTCACTCACTCTCTCAAGGC	Reverse	
<i>PhCOPS</i>	caccATGGCGACCGAAAAAAGTTCGT	Forward	Cloning into <i>in planta</i> expression vectors
	TTCTGAAATGGGTATGGGATCA	Reverse	
<i>PhGeAS</i>	caccATGGCATTGATGGCAACT	Forward	Cloning into <i>in planta</i> expression vectors
	TTCTGAAATGGGTATGGGATC	Reverse	
<i>PhCOPS</i>	CTATTCATTGAGGCCAAGTGG	Forward	RT-qPCR (129 bp amplicon)
	ATTTACCCATTCCCACAAGAG	Reverse	
<i>PhGeAS</i>	GACATTGCTCAAGTTCGCCA	Forward	RT-qPCR (86 bp amplicon)
	TCCACCACCTTGAAATCATG	Reverse	
<i>PhACTIN</i>	CAAGAGCTGGAGACTTCAAAGAC	Forward	RT-qPCR (175 bp amplicon)
	CGAAACCACATACAACCTCCATCA	Reverse	
<i>PhTUB</i>	TCCATTTTCATGCTTTCTCGTAC	Forward	RT-qPCR (193 bp amplicon)
	TTTACATCTTTAGGCACACGTC	Reverse	

Chapitre 4

**Étude de la voie du
citronellole**

1 Introduction

The *Pelargonium* genus belongs to the *Geraniaceae* family and includes almost 280 species, mainly originated from South Africa (recently reviewed in Blerot *et al.*, 2016). More than thirty species and multiple hybrids are scented-pelargonium. Among them, *Pelargonium x hybridum* cv rosat, also named pelargonium rosat hybrids (*P. rosat*), are mostly famous for their rose-scented essential oil (EO), widely used by fragrance and cosmetics industries (Demarne, 2002; Lis-Balchin *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 2016). In spite of numerous studies on their production and cultivation, the origin of the hybrids currently cultivated for EO production remains unclear (Demarne, 2002; Demarne and van der Walt, 1989; Ochocka *et al.*, 2002; Tembe and Deodhar, 2010). Pelargoniums rosat result from crossings between one rose-scented parent, *Pelargonium capitatum* and one mint-scented parent, presumably *P. radens* or *P. graveolens*. Four main hybrids were thus named according to their main production area: *P. rosat* 'Bourbon', 'China', 'Egypt' and 'Grasse'.

P. rosat EO is prized for its rosy, lightly minty and citrusy scent. EO composition and variation from the different *P. rosat* have been extensively studied (Blerot *et al.*, 2016; Lis-Balchin, 1991; Rajeswara Rao, 2002b; Tembe and Deodhar, 2010; Verma *et al.*, 2010). Main compounds are always acyclic monoterpenoids including geraniol, β -citronellol (thereafter referred to as citronellol), and their derivatives such as aldehydes (geranial and citronellal) and various esters (geranyls and citronellyls). Both geraniol and citronellol are major compounds of pelargonium rosat EO. In spite of their analogous chemical structure (Figure 4.1), these two compounds differ in aroma properties and are responsible for an intense rose-like scent. Fragrance industries pay a special attention to the geraniol:citronellol ratio in the EO, as it is dependent of the hybrid and multiple agronomic parameters, and will impact the final EO odour profile and quality (Doimo *et al.*, 1999; Kaul *et al.*, 1998; Southwell and Stiff, 1995; Verma *et al.*, 2013c).

Biosynthetic pathways and regulation mechanisms involved in geraniol and citronellol production in pelargonium remain incompletely characterised. Geraniol production in *P. rosat* has recently been reported: this monoterpene is produced from geranyl diphosphate (GPP) by a geraniol synthase (GES), an enzyme belonging to the large family of terpene synthases (TPS) (Blerot *et al.*, 2018). However, biosynthesis of citronellol has yet to be fully understood although multiple studies clearly demonstrated that citronellol is likely derived from geraniol in pelargonium (Banthorpe *et al.*, 1983; Suga and Shishibori, 1973), rose (Dunphy and Allcock, 1972) and several other plant species such as grape, tomato, orange, ginger, basil, citronella, and an orchid from the *Caladenia* genus (Akhila, 1986; Davidovich-Rikanati *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2013; Iijima *et al.*, 2014, 2006; Luan *et al.*, 2005; Potty and Bruemmer, 1970; Xu *et al.*, 2017b). Direct reduction of geraniol in citronellol has been highlighted by labelling experiment in rose and ginger (Dunphy and Allcock, 1972; Iijima *et al.*, 2014) and recently observed by *in vitro* characterisation of a reductase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) (Yuan *et al.*, 2011) (Figure 4.1). Meanwhile, several studies demonstrated at least partially the occurrence of a multi-step pathway involving a first oxidation of geraniol by an alcohol dehydrogenase (ADH) in citral, a tautomere equilibrium of geranial ((E)-citral) and neral ((Z)-citral), followed by a reduction of citral to citronellal, and finally a reduction of citronellal to citronellol by an

ADH (Fischer *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2008; Iijima *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017b) (Figure 4.1). Among other studies, occurrence of this second pathway is supported by labelling experiments in ginger and *in vitro* characterisation of enzymes involved in the different proposed steps (Iijima *et al.*, 2014; Sato-Masumoto and Ito, 2014; Xu *et al.*, 2017b). Both direct and multi-step synthesis of citronellol involve a C=C double bond reduction in C2-C3 by a NAD(P)H-dependent reductase, *e.i.* in presence of a NADH or NADPH cofactor. In any case, both pathways could occur in the same cell but citral double bond is more susceptible to be reduced than geraniol double bond, thus favouring the multi-step hypothesis.

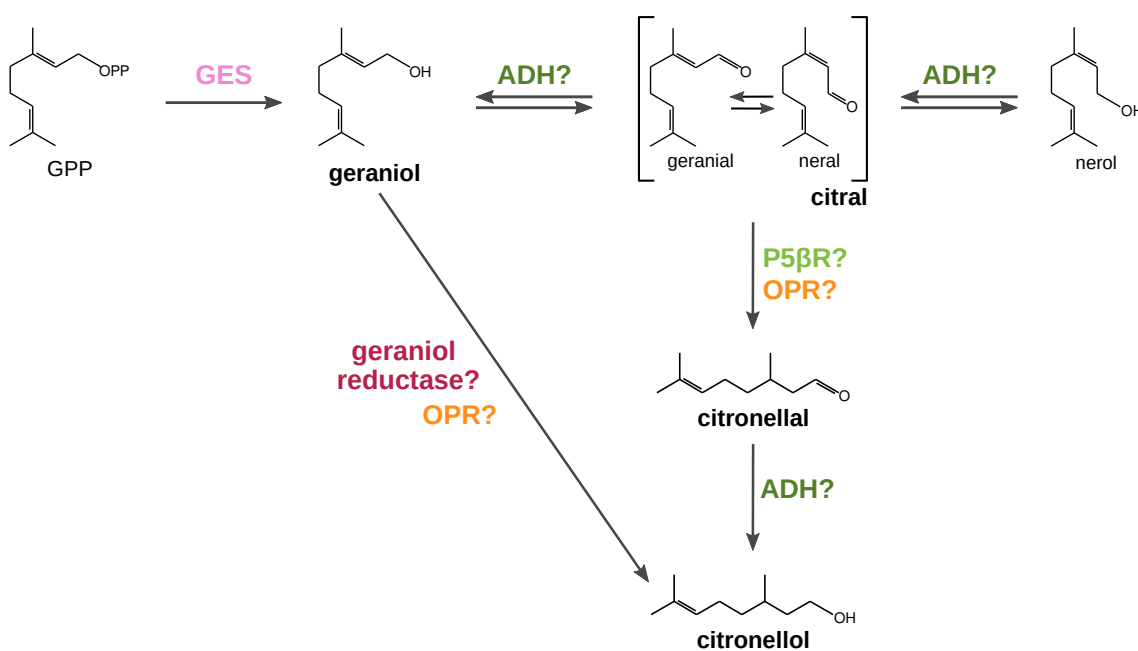


Figure 4.1 | Proposed citronellol biosynthetic pathways

Two putative pathways are proposed for citronellol production in pelargonium. Both pathways begin with the production of geraniol from GPP, by a GES already characterised in *P. rosat*. One pathway corresponds to the direct reduction of geraniol C=C double bond to citronellol. The second pathway is a three-step pathway from geraniol to citronellol: a first oxidation of geraniol by an ADH to citral, followed by a C=C double bond reduction of citral to citronellal, and a final reduction of citronellal to citronellol by an ADH. GPP: geranyl diphosphate; GES: geraniol synthase; ADH: alcohol dehydrogenase; P5βR: progesterone 5β-reductase; OPR: 12-oxophytodienoate reductase. Enzymes indicated with a question mark corresponds to uncharacterised step in pelargonium.

Two reductase families capable of reducing C=C double bond were previously suggested to be involved in the production of citronellol. The 12-OxoPhytodienoate Reductase (OPR) family are enzymes homologous to old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* (Williams and Bruce, 2002), involved in the jasmonic acid biosynthesis pathway. The OPR characterised from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) demonstrated the ability to reduce geraniol directly into citronellol (Yuan *et al.*, 2011) while citral reduction in *in vitro* assays by an OPR has also been reported in *Gluconobacter oxydans* (Richter *et al.*, 2011) and more recently in rose-scented pelargonium (Iijima *et al.*, 2016). Two of the three characterised OPR in pelargonium proved to be capable of accepting geranial as substrate and thus producing citronellal, but could not reduce geraniol into citronellol. However, their metabolic function as citral reductases *in planta* remained unproven and OPR substrate promiscuity led the authors to suspect that the physiological substrate could be methacrolein (an ubiquitous environmental pollutant), and not citral. A second family of enzymes,

the Progesterone 5 β -Reductase (P5 β R) is capable of reducing substrates carrying an activated C=C double bond (a C=C double bond conjugated to a carbonyl group and thus susceptible to nucleophilic attack). P5 β R genes encode a Rossmann-fold structural domain characteristic of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) super-family (Jörnvall *et al.*, 1995; Jun *et al.*, 2002; Persson *et al.*, 2003) with specific finger-print motifs and catalytic residues (Gavidia *et al.*, 2007; Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010; Thorn *et al.*, 2008). Initially, P5 β R were characterised as the first step of the cardenolides biosynthetic pathway (Gärtner *et al.*, 1994; Herl *et al.*, 2006; Munkert *et al.*, 2011), involved in the production of cardiac glycosides used in cardiac insufficiency and cancer therapy (Kreis *et al.*, 1998; Newman *et al.*, 2008), where they reduce progesterone in 5 β -pregnane-3,20-dione. Subsequently, multiple P5 β R were shown to be able to reduce 8-oxogeraniol, a geraniol derivative (Duplais *et al.*, 2020; Geu-Flores *et al.*, 2012; Kries *et al.*, 2017; Sherden *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 2017) and thus having a functional role of iridoid synthase (ISY). ISY are extensively studied, especially in *Catharanthus roseus* because of the importance of iridoids as pharmacological and biologically active compounds (Dinda, 2019; Tundis *et al.*, 2008). Finally, further characterisation of P5 β R in different plant species demonstrated that this family was able of reducing a vast array of substrates, most notably enones (Burda *et al.*, 2009; Durchschein *et al.*, 2012; Munkert *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2018). In particular, P5 β R from *Digitalis lanata*, *Plantago major* (Fellows *et al.*, 2018), *Arabidopsis thaliana* (Durchschein *et al.*, 2012), *C. roseus* (Geu-Flores *et al.*, 2012), *Vitis vinifera* (Ernst *et al.*, 2015), *Antirrhinum majus* (Kries *et al.*, 2017) and *Caladenia plicata* (Xu *et al.*, 2017b) displayed a citral reducing activity. Besides, NAD(P)H-dependent reductases from the SDR super-family are suspected to be involved in the C=C double bond reduction of pulegone (Davis *et al.*, 2005) or isopiperitone (Bergman *et al.*, 2020), two intermediates of the menthone/isomenthone biosynthetic pathway. In a recent study, the citral reducing P5 β R from *C. plicata* was characterised as a geraniol reductase (CpGER1), involved in the citronellol production driving the pollination strategy of this orchid (Xu *et al.*, 2017b).

To decipher citronellol biosynthesis in pelargonium, we searched for sequences of *OPR* and *P5 β R* genes in transcriptomic data of ten carefully chosen accessions of pelargoniums. The expression analysis of these genes together with metabolic profiling of the accessions allowed us to target five *P5 β R* genes. By studying further the associated enzymes *in vitro* and *in planta*, and evaluating their catalytic properties, we characterised a cytosolic P5 β R, PhCIR1, whose function is a citral reductase involved in citronellol production in pelargonium. Protein modelling was used to compare PhCIR1 architecture with phylogenetically distant citral reducing P5 β R. It demonstrated that the function was conserved throughout tertiary structure despite the distant sequence relationship.

2 Material and methods

2.1 Plant Material

P. x hybridum cv rosat and *P. x 'Toussaint'* were provided by IFF-LMR-Naturals and their partners, from cuttings in fields: *P. rosat* 'Grasse' and *P. x 'Toussaint'* were retrieved from IFF-LMR-Naturals collection in Grasse, while *P. rosat* 'Bourbon', 'China' and 'Egypt' were collected from the fields of pelargonium EO producers from Réunion island, China and Egypt respectively. *P. capitatum*, *P. radens*, *P. citronellum* and *P. 'Prince of Orange'* hybrid were supplied by 'Le Jardin Botanique de la tête d'Or, Lyon' and 'La Pépinière Heurtebise, Clansayes', and *P. graveolens* was supplied by INRAE collection from Angers. All plants were cultivated in a green house in the BVpam laboratory in Saint-Étienne under a photoperiod of 16 h of light versus 8 h of darkness. The temperature was set to 25 °C in the light and 18 °C in the dark. The hygrometry was 50 % and stable all over the day.

2.2 RNA Extraction

Total RNA extraction was performed using a modified version from Chang *et al.* (1993) and Cock *et al.* (1997). Fifty mg of young leaves were frozen in liquid nitrogen and ground to powder with an automatic mixer mill (Restch) before addition of 5 mL extraction buffer (2 % (w/v) PVP; 2 % (w/v) CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8; 25 mM EDTA pH 8; 2 M NaCl) and 100 µL β-mercaptoethanol. The homogenised sample was incubated for 15 min at 65 °C followed by 1 min at room temperature and then extracted twice with an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Supernatant (aqueous phase) was collected by centrifugation at 9,000 *g* for 20 min at 4 °C. RNA was precipitated by the addition of lithium chloride (2 M) and incubated for 24 h at 4 °C. After centrifugation at 19,000 *g* for 1 h at 4 °C, the pellet was washed twice with ice cold ethanol 70 % and air dried. The pellet was dissolved with 25 µL of water and 500 µL of SSTE buffer (1 M NaCl; 0.5 % (w/v) SDS; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8). Aqueous phase was collected by centrifugation at 19,000 *g* for 10 min at 4 °C and RNA was precipitated by the addition of 1 mL ethanol 100 % and 150 µL sodium acetate 3 M (pH 5.7). RNA pellet was harvested after overnight incubation at - 20 °C and centrifugation at 19,000 *g* for 30 min at 4 °C. This pellet was then washed twice with ice cold 70 % ethanol, air dried and solubilised in pure water.

Retrotranscription using iScript™ Reverse Transcriptase Supermix for RT-qPCR kit (Biorad, cat. #1708840) were performed on RNA extracts. Obtained cDNAs were used for sequence amplification by PCR with appropriate primers (Supplemental_data 4.1) and to obtain the full-length protein coding genes before cloning.

2.3 High throughput RNA sequencing (RNAseq) and reads analysis

Total RNA from *P. citronellum*, *P. capitatum*, *P. graveolens*, *P. 'Prince of Orange'*, *P. radens*, *P. x 'Toussaint'* and *P. rosat* 'Bourbon', 'China', 'Egypt' and 'Grasse' was extracted from young leaves. Triplicates extracts from each of the ten accessions with a RNA integrity number (RIN) higher than 6.5 were sequenced by BGI Tech Solutions (Hong Kong, China), using 4 lanes in a

Illumina HiSeq X ten platform. More than 60,000,000 paired-end (PE) reads were obtained per sequencing reaction. The quality of the reads were checked using fastQC (Andrews, 2010) and cleaned using sortmerna v2.1 (Kopylova *et al.*, 2012), Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) and a collection of customised Perl scripts (v5.26).

2.4 Transcriptome assembly and annotation

Clean reads were corrected using SPAdes¹⁷ v3.10.1 (Bankevich *et al.*, 2012), khmer¹⁸ v2.1.1 (Crusoe *et al.*, 2015) and ErrorCorrectReads.pl Perl script from ALLPATHS-LG pipeline (Gnerre *et al.*, 2011). *De novo* transcriptome assembly was performed using a pipeline based on SGA assembler v0.10.15 (Simpson and Durbin, 2010) as described in Bonnot *et al.* (2017). Obtained contigs were deduplicated and rectified with CAP3 (2/10/15) (Huang and Madan, 1999), SSPACE v3.0 (Boetzer *et al.*, 2011) and Pilon (Walker *et al.*, 2014). Coding sequences were predicted from transcripts using a pipeline based on interproscan 5.24–63.0, Blast v2.6.0 using Uniprot online database (<https://www.uniprot.org/>) and TransDecoder v3.0.1¹⁹ softwares. Chimeras formed throughout annotation were identified among *P5βR* and *OPR* sequences and were clustered using vsearch v2.13.6 (Rognes *et al.*, 2016) and manual review of the coding sequence (CDS). Transcript expression was then calculated with RSEM v1.3.1 (Li and Dewey, 2014). Several Perl scripts were designed and used for data processing and analysis in assembling, annotation and functional classification of the sequences.

2.5 Phylogenetic analysis

Homologous sequences or group of sequences were fetched in assembled transcriptomes using blastp analysis and known sequences from characterised enzymes. *P5βR* sequences were retrieved using geraniol reductase sequence from *C. plicata* (*CpGER1*, GenBank: [ASF57706.1](#); (Xu *et al.*, 2017b) as baits. Regarding *OPR*, sequences of the three characterised geraniol reducing *OPRs* from rose-scented pelargonium (*PgOPR1-3*, DDBJ DNA databank: [LC157913](#), [LC157914](#) and [LC157915](#), Iijima *et al.*, 2016) and their respective homologs in *Arabidopsis* ([NM_100810.2](#), [NM_101664.5](#), [NM_106319.5](#), [NM_179352.5](#), [NM_201702.2](#) and [NM_202428.2](#), Lin *et al.* (1999) and Theologis *et al.* (2000)) were used. Both group of sequences were clustered to remove chimeras and sequences which evidently belonged to the same gene were manually joined together afterwards. Sequences were then aligned with clustalω v1.2.4 (Sievers *et al.*, 2011) using previous baits sequences as models. Sequences of functionally characterised enzymes from neighbour families of *Pelargonium* genus were added to clustered *P5βR* sequences, including sequences of characterised citral reducing *P5βRs* from *Digitalis lanata* (*DIP5βR1*, Q6PQJ9), *Catharanthus roseus* (CrISY, AIW09147.1), *Arabidopsis thaliana* (At5β-StR, NP_194153.1) and *Plantago major* (PmMOR, D6N9X1) (Durchschein *et al.*, 2012; Fellows *et al.*, 2018; Kries *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016; Thorn *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2017b), as well as sequences from *Apostasia shenzhenica* and

¹⁷ <http://bioinf.spbau.ru/spades>

¹⁸ <https://github.com/dib-lab/khmer/>

¹⁹ <https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>

Oryza sativa (Zhang *et al.*, 2017, Bioproject [PRJNA122](#)). Final alignment was manually edited to remove non-homologous sites and obvious misalignments.

Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree were inferred from P5 β R peptide sequences and *OPR* nucleotide sequences using RAxML pthreads v8.2.11 (Stamatakis, 2014), JTT evolutionary model (JTTDCMUT+G for P5 β R and GTR+1+G for *OPR*) and amino acid or base substitution frequencies deduced from the alignment, as determined with the help of ModelTest-ng (Darriba *et al.*, 2019). Bootstrap values were obtained during the RAxML run until convergence (300 bootstraps). P5 β R tree was rooted using *Streptophyta* sequences from *Selaginella mollendorffii*, *Physcomitrella patens* and *Marchantia polymorpha* sequences, and *OPR* tree was rooted using two *Saccharomyces cerevisiae* *OPR* sequences (Niino *et al.*, 1995).

2.6 Expression of recombinant in *E. coli*

Full-length *P5 β R* genes were amplified using primers listed in Supplemental_data 4.1 and cDNA extracts were inserted into the pENTR/D-TOPO vector and transferred by homologous recombination in expression vectors (Busso *et al.*, 2005). Primers used for these steps are also described in Supplemental_data 4.1, and sequenced genes verification and alignment were performed using the Geneious® software.

E. coli strain Rosetta (DE3) pLysS cells (Novagen, Darmstadt, Germany) were then transformed with the expression vector by heat shock. Production of the recombinant protein was performed during 16-18 h at 17 °C under constant gentle shaking in terrific broth supplemented with 0.8 % glycerol, 10 mM D-sorbitol and 2.25 mM betaine after induction with 0.5 mM IPTG. The cells recovered by centrifugation were disrupted by sonication in native binding buffer (250 mM NaH₂PO₄, 2.5 M NaCl, 10 mM imidazole, 5 % glycerol, 5 mM protease inhibitor, pH 8) supplemented with 0.5 mg.mL⁻¹ lysozyme. After clarification of the lysate by centrifugation, the recombinant protein was purified by binding to the Talon® metal affinity resin (Clontech, cat. #635515) according to the manufacturer's instruction. The resin-bound protein was incubated overnight at 4 °C in 200 μ L of native binding buffer supplemented with 10 units of thrombin (Merck, cat. #605160). The next day the purified protein was recovered from the mixture by filtration. Protein concentration was measured using the Bio-Rad reagent (cat. #500-0006) with bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.7 Enzymatic assays

Enzymatic assays were performed at least in three replicates, using protocol adapted from Xu *et al.* (2017b). Enzymatic activities were performed in a final volume of 50 μ L containing 4 μ g of purified recombinant protein and HEPES buffer (50 mM, pH = 7) supplemented with 5 mM DTT, 1 mM substrate and 2 mM cofactors. After a 50 min incubation at 25 °C, the mixture was overlaid with 100 μ L of hexane for volatile organic compounds extraction. Mixture was vigorously mixed, the upper hexane phase was collected and analysed by GC-MS. Negative controls were performed using the purified product from Rosetta (DE3) pLysS bacterial culture without expression vector. Two cofactors, NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) and NADPH (nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate), were tested for each substrate. Tested substrate included citral (Sigma, cat #W230316), isopiperitone (Sigma, cat #PHL82627), pulegone (Acros organics, cat #418500050), and geraniol (Sigma organics, cat #41090050) standards, as well as progesterone (Sigma, cat #P0130).

For kinetic studies, the same protocol was followed, except that reaction were performed in a final volume of 100 μ L, 8 μ g of protein and substrate concentration between 25 to 2000 μ M. Kinetic data were obtained using SAFAS Xenius XL (SAFAS) spectrophotometer and UV-Star® Greiner Bio-one 96-well plates (Grosseron, cat. #0438158). Variation of optical density at $\lambda = 340$ nm was measured every 60 s, during 50 min of incubation.

2.8 Expression of recombinant in *Nicotiana benthamiana*

2.8.1 Transient expression in leaf disk

P5 β R full-length coding sequence was amplified using primers reported in Supplemental_data 4.1. Following cloning in the pENTR/D-TOPO entry vector, sequences were transferred into the pK7WG2D *in planta* expression vector (Karimi *et al.*, 2002). This construct was transformed into the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 (Invitrogen, cat. #18313-015). *Agrobacterium* cultures transformed to express P5 β R were co-infiltrated in *Nicotiana benthamiana* leaves according to Karimi *et al.* (2002) together with *agrobacterium* transformed to express the gene encoding the P19 viral silencing suppressor (Voinnet *et al.*, 2003).

After 4 days, leaf disk from transformed leaves were inoculated according to Voinnet *et al.* (2003) protocol with minor modifications. Leaf disks were placed in glass Petri dishes with 4 mL of buffer (20 mM Na₂HPO₄, pH 7.4 adjusted with 0.1 M citric acid) supplemented with 400 μ M substrate and vacuum infiltrated. After 3 h of incubation, both buffer solution and leaf disks were extracted with hexane, extracts were concentrated under nitrogen stream and analysed by GC-MS. Extracts from leaves infiltrated with *agrobacterium* transformed to express the gene encoding the P19 viral supressor constituted negative control for the experiment. Extracts from substrate supplemented buffer without leaf disk and from leaf disks incubated in substrate-depleted buffer were also used as controls and references. All samples were made in triplicates.

2.8.2 Subcellular localisation

Sequences from the P5 β R constructs in the pENTR/D-TOPO entry vector were also transferred into the pMDC83 *in planta* expression vector, under the control of a double 35S promoter (Curtis and Grossniklaus, 2003). Expression generate a fusion protein with GFP fused to the C-terminal part of the protein. After 4 days, infiltrated leaf sectors of *Nicotiana benthamiana* were observed under a confocal microscope as reported in Curtis and Grossniklaus (2003) to determine subcellular localisation of the target protein. Primers used for cloning are listed in Supplemental_data 4.1. Leaves infiltrated only with *agrobacterium* transformed to express the gene encoding the P19 viral supressor provided a negative control of GFP fluorescence.

2.9 RT-PCR Analysis

Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was performed with the CFX96™ real-time detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) using the SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, cat. #172-5270). All reactions were carried out in 20 µL using 2 µL of reverse transcribed cDNA as template and 500 nM of each of the primers according to the manufacturer's protocol. Gene primers were designed using the Primer3 software and are listed in Supplemental_data 4.1. Three biological replicates were analysed for each accession and two reverse transcription reactions were performed for each sample. Therefore, data yielded six replicates per accession amplified by RT-PCR. The following thermal profile was used for all PCR reactions: 95 °C for 30 s, followed by 40 quantification cycles [95 °C for 5 s, T_m for 30 s]. After 40 cycles, a melting-curve analysis (65 °C to 95 °C, one fluorescence read every 0.5 °C) was performed to check the specificity of the amplification. Normalised expression values ($2^{-\Delta\Delta C_q}$ method, Livak et Schmittgen, 2001) of *PhGES* and *PhCIR1* were calculated by the CFX96™ data manager (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) using β -ACTIN and α -TUBULIN as reference genes (Supplemental_data 4.1). The expression stability of these reference genes was evaluated using Best-Keeper (Pfaffl *et al.*, 2004), geNorm v3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002), and NormFinder (Andersen *et al.*, 2004). We used REST 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002) to compare the expression level of a gene in a 'sample' group using a 'control' group as a reference by implementing a pairwise fixed reallocation randomization test (10,000 iterations). Differences in expression between 'sample' and 'control' cDNAs were considered significant for *p*-values lower than 0.05.

2.10 GC-MS Analysis

GC-MS analysis was used to identify extracts from enzymatic activities and tobacco leaf disk transient transformations. It was also performed to determine EO composition from the different pelargonium accessions. Terpenes were extracted by overnight incubation at 4 °C in hexane (2 mL per gram of leaves) supplemented with camphor as internal standard for relative quantification. Three extracts per accession were obtained from three different plants, sampled at the same time as the leaf samples for RNA extraction. Agilent GC 6850 coupled with Agilent 5973 ion trap mass detector was used for GC-MS analyses. The instrument was equipped with a 30 m x 0.25 mm apolar capillary DB5 column. Temperatures of injector and detector were set to 250 °C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. A volume of 2 µL of extract was injected with a split ratio of 1:2.

Full pelargonium leaf extracts were analysed with the following method: oven temperature started at 60 °C after injection followed by a 3 °C.min⁻¹ temperature ramp from 60 °C to 245 °C. Temperature was then kept on hold at 245 °C for 4 min. Regarding *in vitro* and *in planta* enzymatic activities, extracts were analysed using a method with an oven temperature ramp of 3 °C.min⁻¹ after injection from 60 °C to 120 °C and then 12 °C.min⁻¹ up to 240 °C. Temperature was then kept on hold at 245 °C for 5 min. Extracts from the enzymatic activity with progesterone as substrate required the following method: 120 °C as initial oven temperature followed by a 4 °C.min⁻¹ temperature ramp from 120 °C to 300 °C, and a 4 min hold at 300 °C.

All compound identifications from GC-MS analysis were assessed by comparison of retention time, retention index (Kovats, 1965; Van Den Dool and Kratz, 1963), and standard mass spectra using mass spectrum database (Adams, 2017).

2.11 Protein modelling

The structure of *Plantago major* multisubstrate oxido-reductase (PmMOR) of the P5 β R family was used for protein modelling (Fellows *et al.*, 2018). More specifically, the crystal structure of PmMOR^{V150M} mutant was the only structure available in complex with geraniol and NADP (PDB entry: [5MLR](#)) and was thus chosen. All predicted structural models showed high quality coverage (>95 %, sequence similarity >43.45 %, high GMQE and QMEAN scores) and 3D-protein structural model and protein structure homology modelling were obtained with the SWISS-MODEL software (<http://swissmodel.expasy.org>) (Schwede *et al.*, 2003). Structural analysis and three-dimensional structural drawings were performed using PyMol™ (<http://www.pymol.org/>).

3 Results

3.1 Multi-omique screening for candidates

To unravel the biosynthetic pathway that produces citronellol from geraniol, we chose a multi-omic approach, thus correlating gene expression with chemical phenotypes of several accessions of pelargonium. As such, young leaves of ten accessions of scented pelargoniums with known EO composition (Demarne and Van der Walt, 1993; Kulkarni, 1998; Lalli *et al.*, 2006; Lis-Balchin, 1991; Tembe and Deodhar, 2010) were sampled in triplicates. Each sample was divided in two: one moiety was used to analyse the terpenoid content by GC-MS, in particular geraniol, citronellol, their aldehyde counterparts, and other esters derivatives (geranyls and citronellyls), thereafter referred to as citronellol pathway compounds; the other moiety was used to for gene expression profiling by high-throughput sequencing (RNA-seq).

All ten accessions displayed clear differences in the content of citronellol pathway compounds (Figure 4.2). The four hybrids used for EO production (*P. rosat* 'Grasse', 'Bourbon', 'Egypt' and 'China'), *P. capitatum* (one of the rosat hybrid parent), as well as *P. x* 'Toussaint' showed various amounts of geraniol and citronellol in different relative proportions. Both *P. radens* and *P. graveolens*, the putative parents of the rosat hybrids, showed a complete lack of citronellol pathway compounds. *P.* 'Prince of Orange' produced only geraniol and derivatives, and did not accumulate citral, citronellal nor citronellol. Finally, *P. citronellum* accumulated a high level of citral but no compound downstream of the putative pathway. Presence of accumulated citral and citronellal in all citronellol producing accessions tended to indicate that the targeted reductase is involved in the citral reduction of a three step biosynthetic pathway, rather than a direct geraniol reduction.

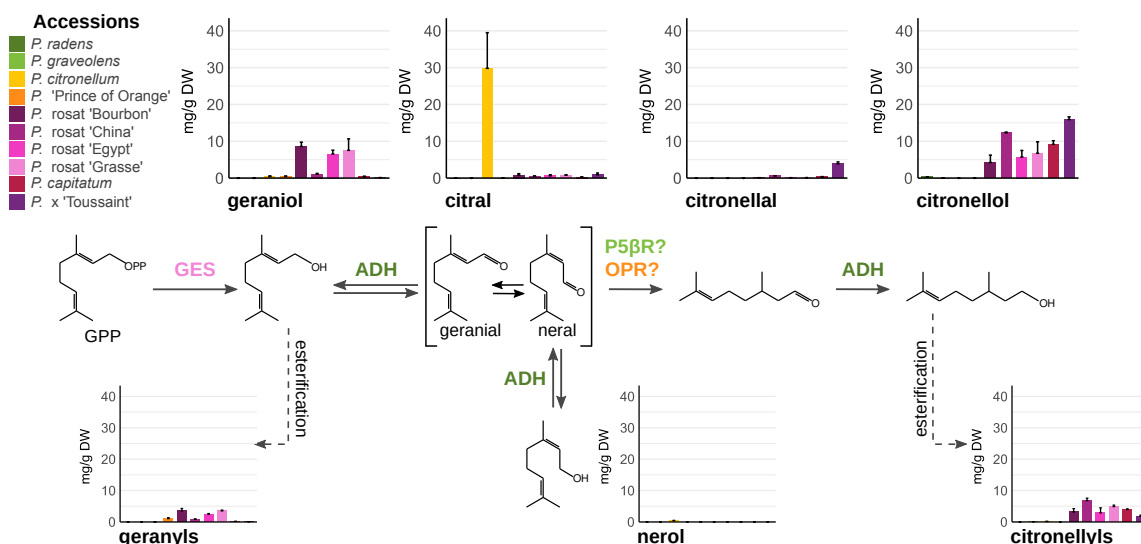


Figure 4.2 | Accumulation profiles of compounds of the citronellol pathway in ten scented pelargoniums

GC-MS analysis of hexane-extracted compounds were used to quantify compounds accumulation ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight (DW)) in each accession. The values are the means and standard deviations obtained from three independent samples. Geranyls and citronellyls values correspond to the sum of each of the esters derivatives of geraniol and citronellol respectively. GES: geraniol synthase; ADH: alcohol dehydrogenase; P5βR: progesterone 5β-reductase; OPR: 12-oxophytodienoate reductase.

The transcriptome profiling generated about 40 to 50 millions cleaned paired-end reads of 150 bp long per sample. In the absence of any common reference such as a sequenced pelargonium genome, transcriptomes of each accession were *de novo* assembled and annotated by homology search. The ten transcriptomes were then screened for putative reductases involved in citral double bond reduction or in direct reduction of geraniol to citronellol. Two enzymatic families were targeted in priority: the P5βR and the OPR. Published sequence from citral-reducing P5βR of the orchid *Caladenia plicata* (CpGER1; Xu *et al.*, 2017b), three known OPR sequences from rose-scented pelargonium (Iijima *et al.*, 2016), and their respective homologs in *Arabidopsis* (Lin *et al.*, 1999; Theologis *et al.*, 2000) were used as baits. Initial screen of the transcriptomes revealed several fragmented transcripts. After manual refinement of the sequences, 84 P5βR and 46 OPR homologous sequences were found (Supplemental_data 4.2).

To properly correlate the expression of P5βR and OPR transcripts with the citronellol pathway compounds in the different accessions, orthologous and paralogous relationships needed to be assigned. To this end, we inferred a maximum likelihood (ML) phylogenetic tree for each protein family. Sequences from biochemically and structurally characterised enzymes, as well as from *Arabidopsis* and *Oryza* genus, were added to the P5βR tree to help clustering pelargonium sequences. *Pelargonium* sequences clustered in three distinct clades (Figure 4.3). Interestingly, clade I contained the sequences from biochemically characterised enzymes, including citral reducing P5βR from *P. major* (PmMOR) and CpGER1 and five ISY from *C. roseus* (Munkert *et al.*, 2015b). Clade II included sequences mainly from pelargoniums, as well as two P5βRs from the orchid *A. shenzhenica* and one *C. roseus* characterised enzyme (Munkert *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2017). Finally, a third clade (clade III) was defined by pelargonium sequences and one arabidopsis sequence.

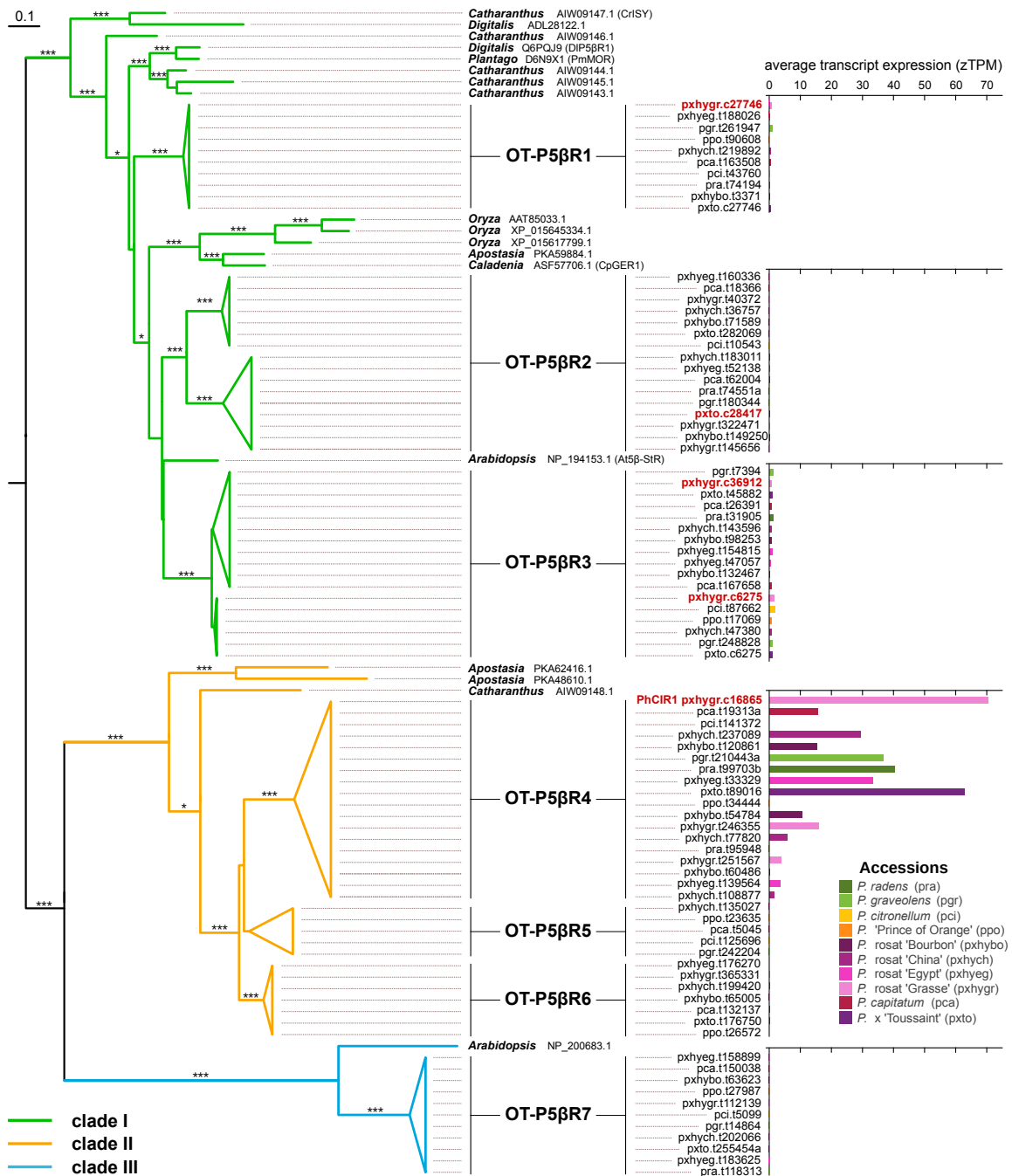


Figure 4.3 | Maximum likelihood phylogenetic tree of *P5βR* family in pelargoniums

The tree was inferred from peptide sequences using the JTTDCMUT+G model and ML optimisation of amino acids substitution frequencies; bootstrap support is indicated as follow: *** ≥ 90 %, ** ≥ 80 %, * ≥ 70 %. Sequences from *A. thaliana*, *A. shenzhenica*, *C. plicata*, *C. roseus*, *D. lanata*, *P. major* and *O. sativa* were included. Among them, names of the coded proteins which demonstrated a citral reducing activity (CrISY, DIP5βR1, PmMOR, CpGER1 and At5β-StR) have been adjoined to their sequence ID. *P5βR* from *D. lanata* (DIP5βR1) has been extensively studied for their role in cardenolide pathway and CrISY, involved in *C. roseus* iridoids production, constitutes the ISY of reference. The tree was rooted using *Streptophyta* sequences. Sequences were clustered in seven groups of putative orthologs (OT) based on phylogenetic distance and bootstrap support values of the clades. Expression of pelargonium sequences corresponds to average standardised expression in transcripts per million (zTPM). Cloned sequences are indicated in bold and red.

Based on phylogenetic distances, statistical support and accession appearance, we defined seven pelargonium *P5βR* putative orthogroups (OT), each containing paralogs or homeologs²⁰.

²⁰ Paralogs are homologous sequences within the same genome, thus descending from sequence duplication. Homeologs *sensu stricto* (homoeologs) are sequences originating through speciation from allopolyploidisation

Expression of these transcripts were then transformed to z-score to standardised the expression level across accessions. Transcripts from *OT-P5βR4* were strongly accumulated in pelargonium young leaves, with a maximum of ~70 zTPM for the *pxhygr.c16865* transcript of *P. rosat* 'Grasse' (Figure 4.3). By contrast, transcripts in other *OT-P5βRs* were expressed about 10 to 100 times lower. The expression pattern of *OT-P5βR4* transcripts was consistent with a role of these enzymes in the reduction of citral in citronellal. As such, *OT-P5βR4* transcripts were strongly expressed in the four rosat hybrids, *P. capitatum* and *P. x 'Toussaint'*, all of which producing massive amounts of citronellol and citronellyls (Figure 4.2). Accordingly, the *OT-P5βR4* transcript in *P. citronellum*, an accession highly accumulating citral but no citronellal, was merely expressed. We noticed that the two *P5βR4* homologs of *P. radens* and *P. graveolens* were strongly expressed, even though these two accessions accumulated neither citronellal nor downstream compounds. Several paralogs or homeologs, of *OT-P5βR4*, notably from rosat hybrids, showed a marked expression.

OPR phylogenetic tree was structured with the help of *Arabidopsis* homologous sequences. As for *P5βR*, pelargonium *OPR* transcripts were clustered and five groups of orthology (*OT-OPR1* to *OT-OPR5*) were defined (Supplemental_data 4.3). Strongly contrasting with *P5βRs*, the expression of *OPR* transcripts was low in all five *OT* (3.5 zTPM maximum). Importantly, none of the group presented an expression pattern that could be correlated with the accumulation of citronellol pathway compounds in the ten pelargonium accessions. Notably, *P. citronellum* transcripts were expressed in each group, with similar level compared to homologs from accessions producing citronellol.

Taken together, these results showed that transcripts from *OT-P5βR4* constitute the best reductase candidates for citronellol production in pelargonium. Given their weak expression level, *OPR* enzymes were excluded as candidate and consequently were not studied further.

3.2 Biochemical characterisation of five *P5βRs*

To assess the putative functional role of *OT-P5βR4* sequences in pelargonium as citral reductase, the corresponding transcript in *P. rosat* 'Grasse', *pxhygr.c16865*, was cloned to test its ability to reduce citral. As various controls for enzymatic specificity between the different phylogenetic clades, four other sequences were also characterised: *pxhygr.c27746* from *OT-P5βR1*, *pxto.c28417* from *OT-P5βR2*, and two candidates from *OT-P5βR3*, *pxhygr.c36912* and *pxhygr.c6275*. To help with the reading, these sequences are thereafter referred to as *P5βR4*, *P5βR1*, *P5βR2*, *P5βR3a* and *P5βR3b*. *P5βR2*, *P5βR3a* and *P5βR3b* were selected for their proximity with characterised *P5βRs* such as *CpGER1* and *PmMOR* from *P. major*. Furthermore, *P5βR3a* and *P5βR3b* were interesting to study potential functional variations between two close paralogs with highly similar sequences. Finally, *P5βR1* was selected because of its divergence from *CpGER1* and other candidates. To obtain recombinant proteins, sequences from transcriptomic data were used to design specific primers encompassing the whole coding regions of the selected *P5βR* candidates (Supplemental_data 4.1). RT-PCR was subsequently performed and full-length cDNA sequences were cloned in a bacterial expression vector.

In presence of citral and NADPH, P5 β R4 fully reduced citral in citronellal (Figure 4.4A). P5 β R4 showed a marked preference for NADPH as a cofactor (relative activity set to 100 %), as compared to NADH (relative activity of 77 %) (Figure 4.4B). The other enzymes showed various level of relative activity with both cofactors. Interestingly, P5 β R2 was the most active enzyme (104 % of relative activity, substrate fully consumed) with a strong affinity for NADH. P5 β R3a and P5 β R3b showed similar activity profiles. Except for P5 β R2, all enzymes were able to reduce progesterone into 5 β -pregnane-3,20-dione, preferentially or exclusively with NADPH (Figure 4.4B). Notably, P5 β R4 was the most active enzyme for this substrate. Remarkably, all proteins displayed a low activity with progesterone as compared to citral.

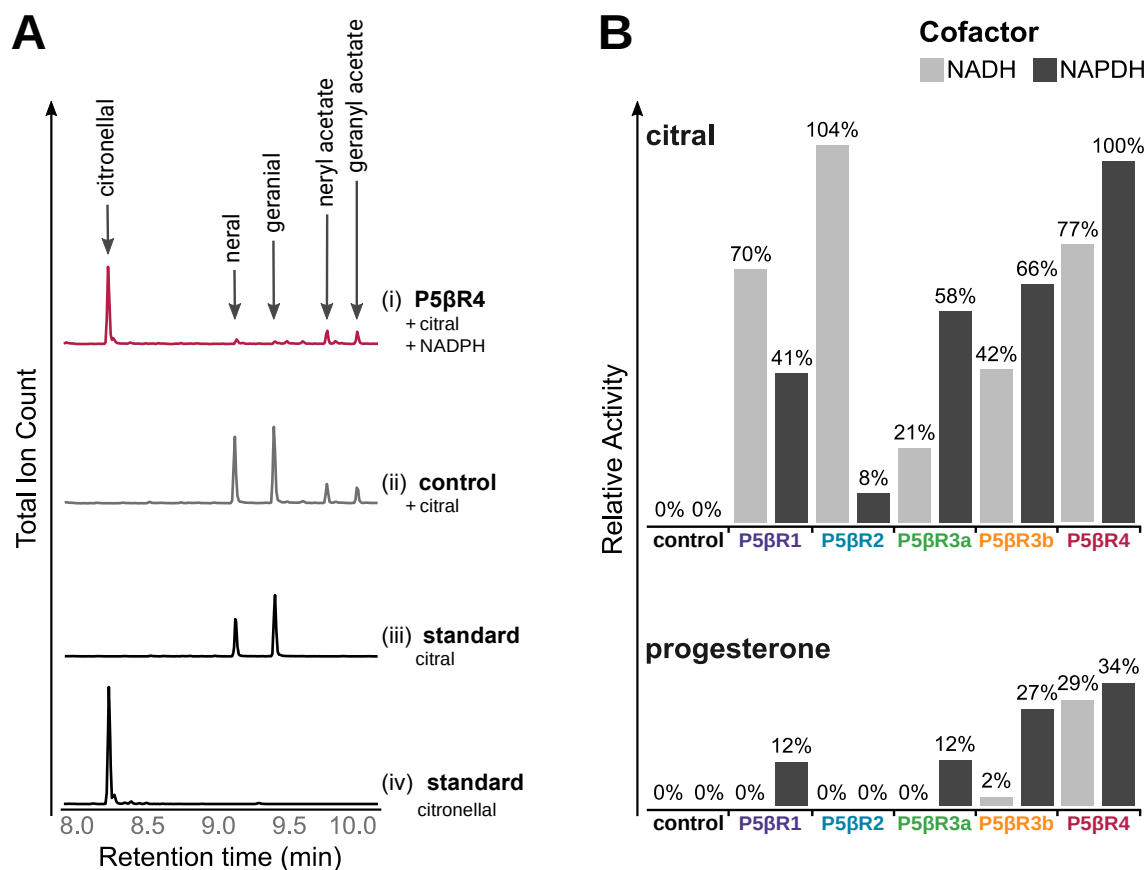


Figure 4.4 | (A) GC-MS spectrum of hexane extracts obtained after incubation of recombinant P5 β R4, with NADPH. (B) Relative activity of each recombinant P5 β Rs with citral or progesterone, in presence of NADH or NADPH

Presented spectrum (A) correspond to P5 β R4 *in vitro* activity after expression in *E. coli* with citral and NADPH cofactor (i). Similar assays of P5 β R4 *in vitro* activity in the absence of cofactor was used as a control (ii). Compound identification was determined using citral (iii) and citronellal (iv) standards and confirmed by comparison to mass spectra database (Adams, 2007) and linear retention indices. All assays were performed using 4 μ g of purified recombinant proteins incubated for 50 min at 25 °C, in a 50 μ L mix with 1 mM of substrate (citral or progesterone) and 2 mM of cofactor (NADH or NADPH). (B) P5 β R4 activity was used as a reference to measure all relative activities: 100% relative activity corresponds to 95.75 % of the transformed substrate and represents an activity of 0.24 μ mol.min⁻¹.mg⁻¹ of citronellal.

To assess the catalytic properties of the enzymes, the kinetics of citral reduction were assessed by spectrophotometric measurement of the oxidation of NADH or NADPH during citronellal production by each protein. As previously shown, P5 β R4 and P5 β R2 were the most efficient enzymes in presence of NADPH and NADH respectively (Figure 4.5). In presence of NADPH, P5 β R4 displayed an average citronellal production of 0.24 μ mol.min⁻¹.mg⁻¹, with a production of

0.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ in the first 10 min of incubation, and a k_M value of 1.35 ± 0.18 mM with a turnover rate (k_{cat}) of 0.36 s^{-1} . P5 β R2 displayed, in presence of NADH, a k_M value of 1.90 ± 0.45 mM and a k_{cat} value of 0.25 s^{-1} . Taken together, these results indicated that P5 β R4 and P5 β R2 were the most efficient among our set of tested homologs to reduce citral into citronellal, with P5 β R4 displaying a slightly higher affinity and efficiency. However, given the high expression of P5 β R4 as compared to the weak expression of P5 β R2, as well as the better correlated expression profile of the former with the chemical phenotypes of the ten accessions, we concluded that P5 β R4 was the functionally active citral reductase in pelargonium leaves. We consequently denominated P5 β R4 from *P. rosat* 'Grasse' as PhCIR1 (in reference to *Pelargonium* x *hybridum* **C**itral **R**eductase **1**).

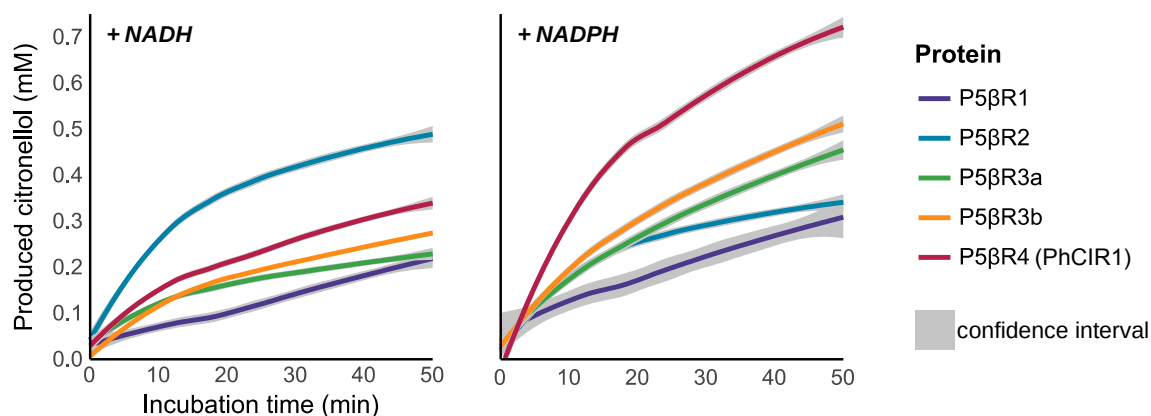


Figure 4.5 | Kinetic assessment of enzymatic activity of five P5 β Rs from pelargonium

Analyses were performed using 80 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ of protein in presence of 2 mM of cofactor (NADH or NADPH) and citral concentration between 25 and 2000 μM . Confidence interval were measured based on three replicates.

Given the substrate promiscuity shown by P5 β R enzymes, we assessed PhCIR1 substrate specificity and questioned whether PhCIR1 could reduce geraniol, as well as isopiperitone and pulegone. Indeed, transcriptome profiling indicated a strong expression of *PhCIR1* ortholog in *P. graveolens* and *P. radens* (Figure 4.3), two accessions with (almost) no compound from the citronellol pathway, but with a high content of menthone and isomenthone (Supplemental_data 4.4). PhCIR1 could not reduce geraniol (Tableau 4.1), indicating that the enzyme was not involved in a direct reduction pathway of geraniol to citronellol. Besides, PhCIR1 showed a weak reduction activity relative to citral towards isopiperitone and no activity towards pulegone (Tableau 4.1). These results indicated that PhCIR1 is unlikely to be involved in the C=C double bound reduction of compounds in the menthone/isomenthone pathway.

Tableau 4.1 | Relative activity of P5 β R with different substrates

Substrate	NADH	NAPDH	Product
citral	76.9 %	100 %	citronellal
progesterone	29.3 %	33.9 %	5 β -pregnane-3,20-dione
geraniol	ND	ND	citronellol*
isopiperitenone	3.1 %	ND	isomenthone
pulegone	ND	ND	menthone*

P5 β R4 100 % relative activity corresponds to 0.24 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of citronellal. ND: not detectable; *: expected product.

3.3 *In planta* characterisation of PhCIR1

In order to confirm the role of PhCIR1 as the functional citral reductase in pelargonium young leaves, *PhCIR1* mRNA levels were assessed by RT-qPCR on five representative accessions. Simultaneously, mRNA levels of the previously characterised *PhGES* (Blerot *et al.*, 2018) were assessed to correlate the expression of the two genes with terpene accumulation patterns (Figure 4.2). *P.* 'Prince of Orange' lowly expressed *PhGES* and did not express *PhCIR1* (Figure 4.6), in accordance with the low accumulation of geraniol and geranyls and the absence of citronellal and other downstream derivatives of the citronellol pathway. A high expression of *PhGES* and the absence of expression of *PhCIR1* in *P. citronellum* (Figure 4.6) was consistent with the high level of citral accumulated in this accession (Figure 4.2). These results clearly demonstrated that *PhCIR1* mRNA expression controls the production of citronellal, citronellol and citronellyls. Consequently, all compounds of the citronellol pathway are accumulated when both genes are expressed as in *P. x* 'Toussaint' and *P. rosat* 'Grasse'. As noticed in the transcriptomic data, *P. radens* strongly accumulated the mRNA of *PhCIR1* (Figure 4.3). However, this accession did not express *PhGES*, which explains the lack of any compounds of the citronellol pathway. Since PhCIR1 was unlikely to be a good candidate for C=C double bond reduction in the menthone/isomenthone pathway, we could not find any suitable hypothesis to explain this unexpected result. Accumulation of the ortholog of *PhCIR1* in *P. radens* could serve in another metabolic pathway yet to be discovered, or result from 'silent metabolism'. Overall, *PhCIR1* mRNA accumulation was consistent with transcriptomic data and correlated perfectly with the accumulation of the different compounds of the citronellol pathway, thus suggesting a strong transcriptional regulation of the pathway.

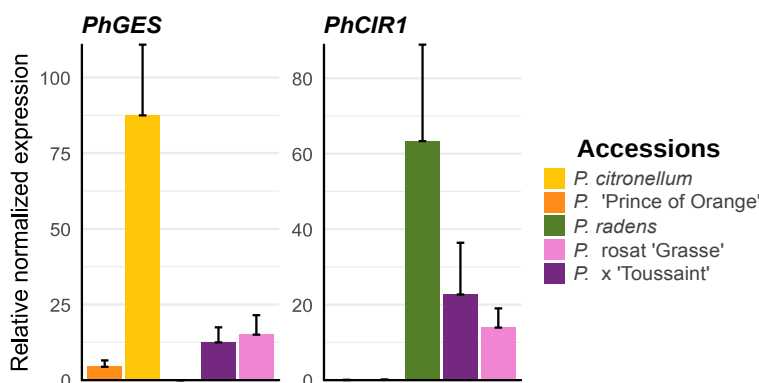


Figure 4.6 | *PhGES* and *PhCIR1* (*P5 β R4*) transcriptional expression profiles in pelargonium

Transcript levels of target genes were normalised to those of β -ACTIN and α -TUBULIN. Values are the means and standard deviation of six replicates.

To assess citral reduction by PhCIR1 *in planta*, the enzyme was transiently expressed in *N. benthamiana* leaves. Transformed leaf disks were then incubated in presence of citral, and citronellal accumulation was determined by GC-MS analyses. Transformed leaf disks produced citronellol (Figure 4.7(i)), confirming the role of PhCIR1 as a citral reductase *in planta*. *N. benthamiana* leaves showed a strong endogenous ADH activity able to reduce citral into geraniol and nerol (Figure 4.7(ii)), as well as citronellal into citronellol (not shown). This ADH activity explains why we could not detect citronellal with PhCIR1 transformed leaf disks as all produced citronellal must have been reduced in citronellol. Endogenous reduction of citronellal and citral was indeed due to the presence of leaf disk because both molecules were otherwise stable in the assay buffer (Figure 4.7(iii) & (iv)). Incubation of PhCIR1 transformed leaf disks with geraniol produced traces of citronellol, likely initiated by some oxidation of geraniol to geranial by endogenous *N. benthamiana* ADH. In presence of citronellal, only citronellol was obtained, thus showing that PhCIR1 could not catalyse the oxidation of citronellal into citral, as expected. Leaf disks incubated with no substrate did not produced any detectable amount of monoterpenes (data not shown). Taken together, these results indicated that PhCIR1 can reduce citral into citronellal in leaf physiological conditions.

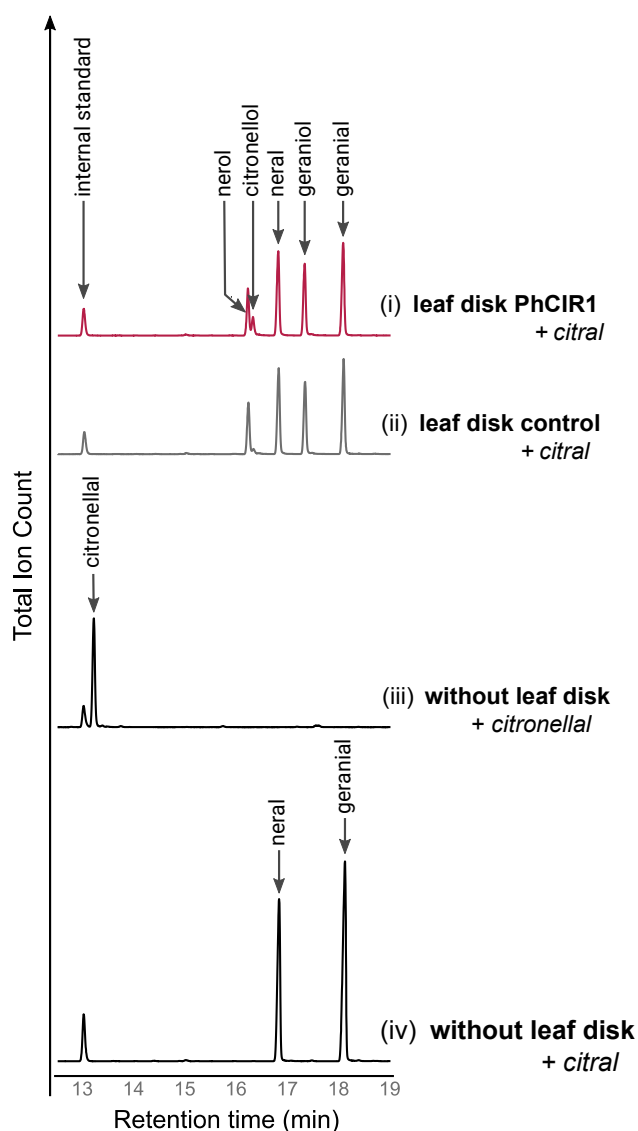


Figure 4.7 | GC-MS spectrum of hexane extracts obtained after incubation of *N. benthamiana* leaf disks transformed with *PhCIR1*, in buffer supplemented with citral

Presented spectrum correspond to incubation buffer extracted with hexane. Production of citronellol was observed only in extracts from leaf disks transformed with *PhCIR1* in presence of citral (i). Control leaf disks correspond to extract from leaf disks not transformed with *PhCIR1*, incubated in the same conditions (ii). Extracts from buffer supplemented with citronellal (iii) or citral (iv) incubated without leaf disks were used as controls. Extracts from leaf disks showed similar profiles. Compound identification was determined using standard and confirmed by comparison to mass spectra database (Adams, 2007) and linear retention indices.

Because *PhGES* is targeted to the chloroplast (Blerot *et al.*, 2018), as expected for a monoterpene synthase, we asked whether *PhCIR1* would be localised in the same subcellular compartment. To answer this question, *PhCIR1* coding sequence was fused to *gfp* and transiently expressed in *N. benthamiana* leaves. As shown in Figure 4.8, GFP signal was detected in the cytosol of epidermal cells, indicating a cytosolic location of PhCIR1. This result raises the question of how geraniol or citral is transported from the chloroplast and where it is produced by PhGES, to be made available for PhCIR1 in the cytosol.

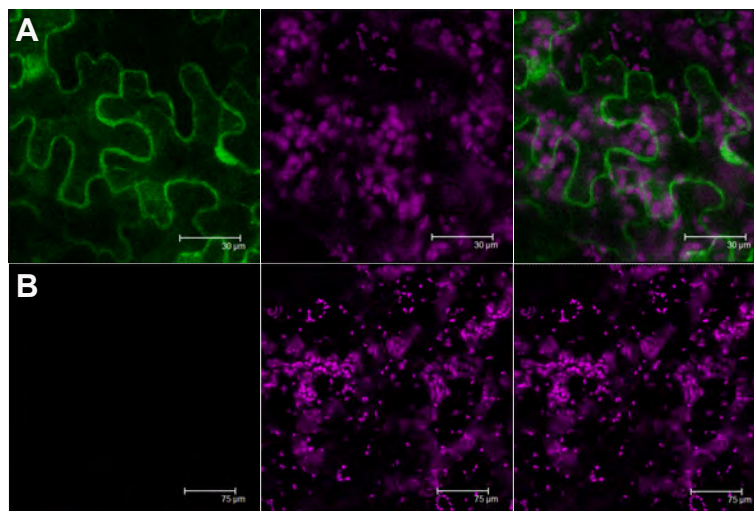


Figure 4.8 | Confocal fluorescence microscopy of *N. benthamiana* leaf cells expressing GFP-fused proteins

(A) Leaf infiltrated *PhCIR1-gfp* construct, (B) control leaf infiltrated with the *P19* viral suppressor of silencing alone. Fluorescence of GFP is visible in green (left), plastids are revealed by auto-fluorescence of the chlorophyll in purple (middle) and both signals are merged for clear localisation (right).

3.4 Sequence and structural analysis of pelargonium *P5βRs*

Our phylogenetic analysis revealed that *PhCIR1* belongs to a large clade of uncharacterised *P5βRs*. *P5βR1*, *P5βR2*, *P5βR3a* and *P5βR3b* displayed amino acid identities ranging from 68 to 93 % between them, whereas *PhCIR1* displayed only 42 to 43 % identity with the four other *P5βRs*, indicating that *PhCIR1* sequence was divergent compared to functionally characterised *P5βRs*. To understand the potential implication of this result from a functional point of view, we examined the conservation of known motifs and functionally important residues of the five *P5βRs* as compared to the PmMOR protein. We chose this enzyme because it has been extensively studied and a mutant version of the protein (PmMOR^{V150M}) has been crystallised with geranic acid in the active site (Fellows *et al.*, 2018). Overall, PmMOR, *P5βR1*, *P5βR2*, *P5βR3a* and *P5βR3b* showed a very good conservation of amino acids along the whole sequence, whereas *PhCIR1* showed much more variations (Figure 4.9). Importantly, most of the known motifs (detailed in Supplemental_data 4.5), including the two motifs containing the catalytic residues (TGxKHYxGP and NFYYxxED) were conserved between all the proteins (Figure 4.9). *PhCIR1* yet showed some interesting peculiarities: for example, the DxxD motif supposed to be involved in NADPH interaction was replaced by a NSTN sequence. This change however does not seem to impact *PhCIR1* use of NADPH or NADH (Figure 4.5).

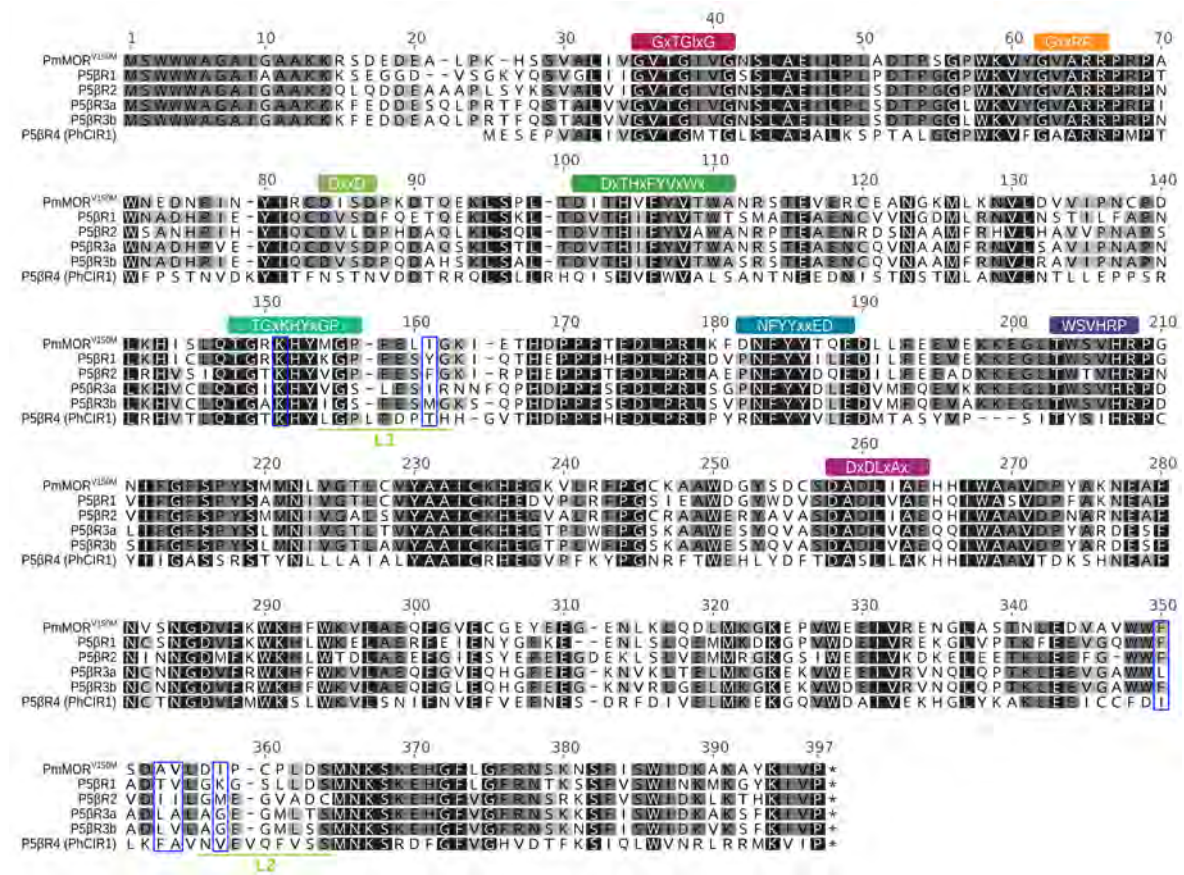


Figure 4.9 | Protein sequence alignment of five cloned P5βRs from pelargonium using mutant V150M of *Plantago major* citral reducing multi-product reductase (PmMOR^{V150M}) as reference

Alignment was obtained using Geneious® software. Conserved amino acid regions characteristic of the P5βR family are identified and detailed in Supplemental_data 4.5. Amino acids presumed to be involved in geranyl binding are highlighted in blue boxes. Loops (L1 and L2, discussed in structural analysis) corresponding sequences are indicated in green.

To obtain further insight of the consequences of the sequence modification in PhCIR1 as compared to characterised P5βRs, we modelled the tertiary structure of the enzyme using SWISS-MODEL software and PmMOR^{V150M} available crystal structure (PDB entry: 5MLR). The modelled tertiary structure of PhCIR1 showed a remarkable conservation with that of PmMOR^{V150M} with only subtle variations (Figure 4.10A). The monomer of the protein was folded into a Rossmann-fold domain responsible for the cofactor binding and part of the active site cavity and motifs, and a C-terminal capping domain containing the majority of the substrate binding residues (Fellows *et al.*, 2018; Thorn *et al.*, 2008). Finger-print motifs showed the same localisation in PhCIR1 as compared to PmMOR^{V150M} (data not shown). This result highlighted the low influence of the sequence over the final tertiary structure of this P5βR.

Examining the rim of the catalytic pocket, we noticed that two loops were displaced in PhCIR1: L1 and L2, highlighted in green in Figure 4.10B (amino acids outlined in green in Figure 4.9). In PhCIR1, L1 seemed to partially cover the entry of the catalytic site, whereas L2 protruded inside the catalytic pocket. Examining the same region on the other four pelargonium P5βRs showed that these conformational changes were specific to PhCIR1. These two loops are highly variable between different P5βRs and were shown to serve as gatekeepers of the catalytic pocket (Petersen

et al., 2016), participating in the specificity of the substrate. As such, L1 and L2 could be involved in PhCIR1 substrate specificity.

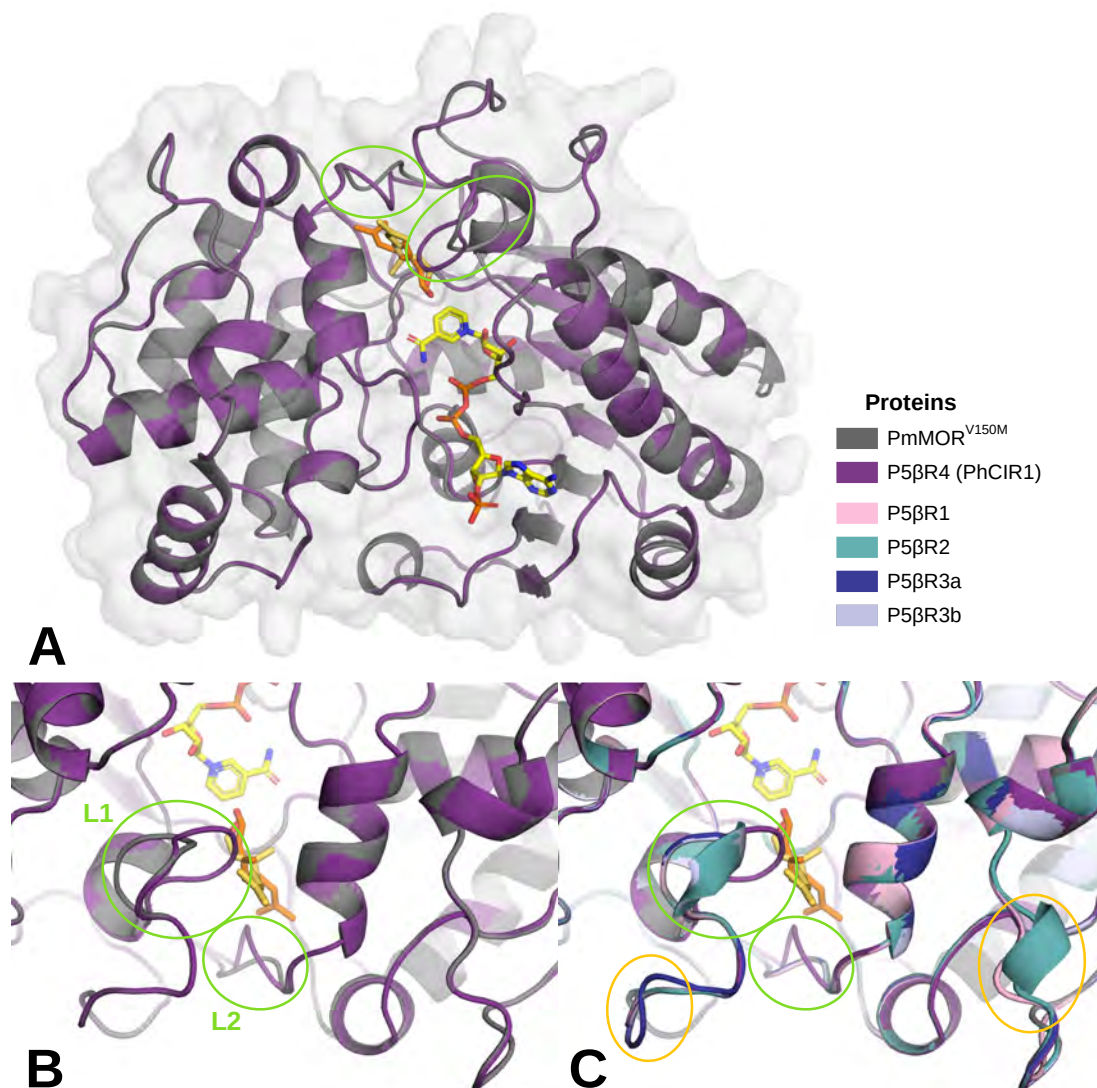


Figure 4.10 | Superimposition of P5βRs modelled on reference PmMOR^{V150M}. (A) Comparison of PhCIR1 overall structure with PmMOR^{V150M} and (B) detailed view of the substrate cavity. (C) Comparison of PhCIR1 substrate cavity with the four others characterised P5βRs

Protein from pelargonium were modelled using PmMOR^{V150M} as template, in complex with NADP cofactor and geranic acid substrate (in yellow) (PDB entry: 5MLR, Fellows *et al.*, 2018). The structure were designed using Pymol™: surface protein are visible in pale gray (A), and substrates are represented in sticks (red: oxygen atom, blue: nitrogen atom, orange (on NADP): phosphorus atom). PhCIR1 loop differences (L1 and L2) are highlighted in green. Additional loop differences observed in other modelled proteins are highlighted in orange and protein corresponding colour are indicated in the legend.

The overall architecture of the catalytic pocket was well conserved between PhCIR1 and PmMOR^{V150M} (Figure 4.11A & B) despite large differences in amino acid composition. Residues binding the substrate in PmMOR^{V150M} are highlighted in blue boxes on Figure 4.9. Interestingly, we remarked that while PmMOR^{V150M} had a sequence composed of **FxxAxxVxxI** in the 350-360 region of the protein, PhCIR1 displayed the same amino acids but shifted by one position, *i.e.* **IxxFxxAxxV**. We predict that this shift could have important implications related to substrate binding in the catalytic pocket, most notably by turning head to tail the geranial molecule as depicted on Figure 4.11B.

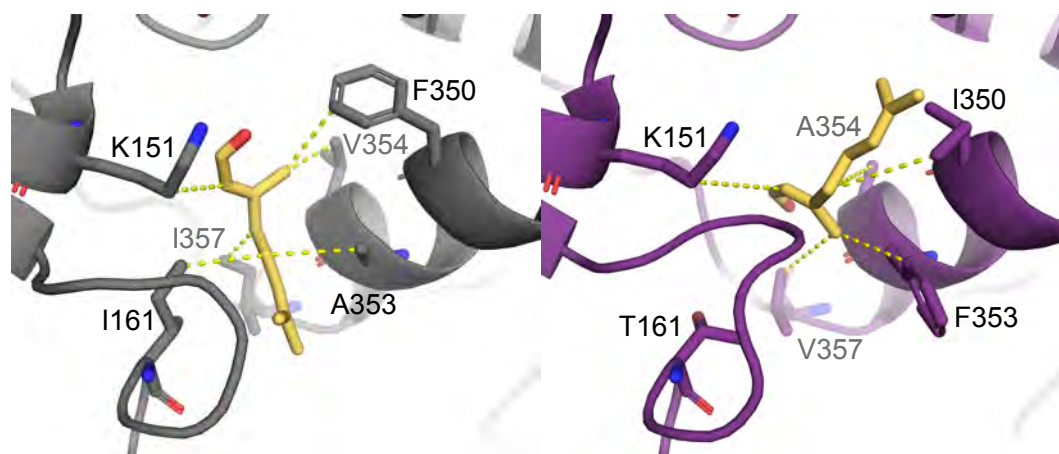


Figure 4.11 | Stereo representation of PmMOR^{V150M} (left) and PhCIR1 (right) binding sites and substrate positioning

PhCIR1 (purple) was modelled using PmMOR^{V150M} (grey) as template, in complex with NADP cofactor and geranic acid substrate (in yellow) (PDB entry: 5MLR, Fellows *et al.*, 2018). Amino acids putatively involved in geranic acid stabilisation and their bounds with the substrate are indicated in yellow dashes. Amino acids numbering correspond to position in protein alignment (Figure 4.9). Bounds for PmMOR^{V150M} structure are the ones from crystallographic analysis. In PhCIR1 modelling, bounds were transposed from PmMOR^{V150M} (except for amino acid in position 161) and position of geranic acid was manually adjusted to evaluate its putative conformation in the active site. The structures were designed using Pymol™: substrates and analysed amino acids are represented in sticks (red: oxygen atom, blue: nitrogen atom).

4 Discussion

4.1 Citronellol biosynthesis is a multi-step process in pelargonium, driven by a P5βR family enzyme

Geraniol and citronellol are important compounds for the fragrance of *P. rosat* EO. A previous work on *P. rosat* hybrids proved that geraniol is produced by a monoterpene synthase (PhGES) (Blerot *et al.*, 2018). In this study we deciphered the second step of the pathway by characterising the enzyme responsible for the C=C double bond reduction leading to citronellol. Two alternative pathways are postulated for citronellol synthesis (Figure 4.1): a single step pathway by reduction of geraniol to citronellol and a multi-step reaction involving the reduction of citral in citronellal. We demonstrated that five P5βRs from pelargonium can reduce citral in citronellal with a similar ability. However, only one enzyme, PhCIR1, was highly expressed and presented an expression profile correlated with citral and citronellol accumulation in different pelargoniums. Our findings corroborated previous studies in pelargonium suggesting that production of citronellol requires a NADPH-dependent reductase (Banthorpe *et al.*, 1983) although we demonstrated that PhCIR1 was also active with NADH. Unlike the *in vitro* results obtained by Yuan *et al.* (2011) on several species, PhCIR1 could not reduce geraniol directly and unlike the *in vitro* results obtained by Iijima *et al.* (2016) on pelargonium, we found no involvement of an enzyme belonging to the OPR family as a functional citral reductase in pelargonium.

Because *PhGES* and *PhCIR1* expression are localised respectively into the chloroplast and the cytosol, this raises the question of the transport of geraniol or geraniol between the two compartments to be made available as a substrate to PhCIR1. In the well characterised iridoid pathway of *C. roseus*, the P5βR reduction step ensured by CrISY enzyme, as well as all biosynthetic steps leading from geraniol to 8-oxogeraniol, also take place in the cytosol (Miettinen

et al., 2014; Richter *et al.*, 2011), which presume that geraniol is the intermediate exported from the chloroplast. The characterisation and localisation of the ADH responsible for geraniol oxidation in pelargonium should point out which intermediate is exported.

PhCIR1 inability to reduce geraniol and citronellal highlighted the fact that the C=C double bond reduction step in citronellol biosynthesis can occur only if an aldehyde function is conjugated to the C=C double bond. In perilla and basil, characterised ADHs demonstrated the ability to catalysed three reactions: the oxidation of geraniol in geranial, the reverse reaction of geranial reduction to geraniol, and the reduction of neral to nerol (Iijima *et al.*, 2006; Sato-Masumoto and Ito, 2014). Likewise, *N. benthamiana* leaf disks incubated with citral led to the production of geraniol and nerol. Therefore, when PhCIR1 was expressed in *N. benthamiana* leaf disks, the reductase was competing for citral with the endogenous ADH (Figure 4.7). A similar competition could occur in pelargonium. However, nerol was barely retrieved, suggesting that in pelargonium, PhCIR1 activity toward citral supersedes ADHs activities.

Now that we demonstrated the occurrence of the three step pathway from geraniol to citronellol in pelargonium, accumulations profiles of *P. citronellum* could provide a lot of information regarding the regulation of this pathway. Indeed, in this accession *PhCIR1* was not expressed (Figure 4.3 & Figure 4.6) and citronellol was not produced. Besides, citral was highly accumulated and both geraniol and nerol were barely detected (Figure 4.2). On the one hand, this concurs the hypothesis that citronellol production relies on *PhCIR1* expression. On the other hand, in contrast with assays in tobacco leaves, citral is not reduced into either nerol or geraniol in the absence of PhCIR1. Thus, it suggests that in pelargonium, ADH activities towards citral reduction are limited. Similarly to PhCIR1, ADH in pelargonium must intervene in the regulation of the pathway, to control citral availability for PhCIR1 activity, either by control of the ADH expression or by control of the ADH activity (substrate specificity and efficiency).

Combined with the PhCIR1 inability to reduce geraniol in citronellol, it appears that enzymatic regulations and activities in this pathway are specifically suited for citronellol production over geraniol or nerol production. which might raised the question whether it provides an evolutionary advantage or not. Nonetheless, this is insufficient to exclude the possibility that citronellol might also be produced throughout a one step pathway: the two pathways could coexist, as suspected in ginger (Iijima *et al.*, 2014).

4.2 Evolution and specificity of PhCIR1

Phylogenetic analysis showed that PhCIR1 might belong to a clade (clade II) well-represented in pelargoniums. However, this clade is little-known and regrouping only one characterised P5 β R: CrP5 β R6 (*C. roseus*, AIW09148.1, Figure 4.3) one of the paralogs of CrISY, with no ability to reduce 8-oxogeranial (Munkert *et al.*, 2015b). According to sequence analyses, *PhCIR1* and clade II sequences proved to be markedly divergent from clade I sequences and thus differed from known citral reducing P5 β Rs. Yet, structural analysis revealed highly conserved three-dimensional structure. The main structural divergences between PhCIR1, PmMOR^{V150M} and the four other

P5 β Rs characterised are summarised by the L1 and L2 loops (Figure 4.10) showing a specific conformation in PhCIR1 structure. Architectural differences of those same protein segments have been observed and investigated in several P5 β R from different species (Kries *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 2016; Sandholu *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2018). Molecular dynamics simulations performed on wild-type and mutants of recombinant DIP5 β R1 and At5 β -StR, from *D. lanata* and *A. thaliana* respectively, demonstrated conformational flexibility of L1 and L2 (Petersen *et al.*, 2016). Their proximity with the active site suggests a role in substrate selectivity *via* an “open” and “closed” conformations. Site-directed mutagenesis targeting these two loops induced various modifications of the enzyme efficiency and modulation of its selectivity (Fellows *et al.*, 2018; Kries *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016; Sandholu *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 2018). Two phenylalanines (F158 and F350 in Figure 4.9) highly conserved in P5 β R family (Bauer *et al.*, 2010; Munkert *et al.*, 2015a; Munkert *et al.*, 2015b) demonstrated a role as “gate-keepers” involved in substrate selectivity by participating to the conformational flexibility in the active site (Petersen *et al.*, 2016). When the two phenylalanines are removed, the ability to process smaller molecule (such as 2-cyclohexen-1-one) tends to be impaired, whereas conversion efficiency of bigger molecule (such as progesterone) is increased (Petersen *et al.*, 2016). Sequence alignment and structural superimposition of multiple P5 β R revealed that such structural deviations occurred concurrently with the presence of amino acid insertions or deletions in the corresponding sequence (Schmidt *et al.*, 2018). Thus, the loops conformation observed only in PhCIR1 structure might result from the presence of insertion in PhCIR1 sequence (or deletion in the other sequences) visible in positions 157 and 359 (Figure 4.9). Consequently, due to this sequence's differences, PhCIR1 may present a stronger substrate selectivity and be able to process less substrates than the other P5 β R. Conversely, the absence of “gate-keeper” phenylalanines in P5 β R3a could indicate an ability to process wider and very different substrates.

P5 β Rs are capable of reducing a vast array of substrates carrying an active C=C double bond (Burda *et al.*, 2009; Durchschein *et al.*, 2012; Munkert *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2018). Their promiscuity is thought to be an ancestral trait responsible for their ability to be active in different metabolic pathways without evolutionary pressure towards efficiency for a specific substrate (Nguyen and O'Connor, 2020; Schmidt *et al.*, 2018). Studies of P5 β R family in plant tends to suggest that they are involved in primary metabolism reactions (Nguyen and O'Connor, 2020) and that evolution of P5 β R towards iridoid and progesterone pathways may be accidental (Hult and Berglund, 2007). Hult and Berglund (2007) as well as Copley (2015), pointed out that promiscuity of an enzyme reflects a point in their evolution where the protein was “good enough” for the required performance. This reminds that natural selection relies on available enzymes (Jacob, 1977) and does not require all enzymes to fit perfectly into a specific pathway. From this point of view, evolutionary selection of the P5 β R for a specific pathway might not rely on the best efficiency but on the fact that one enzyme might properly fit all the required criteria. This would account for the fact that P5 β R from non-cardenolide species, such as At5 β -StR or PmMOR, can present higher efficiencies towards progesterone than DIP5 β R1, even though DIP5 β R1 is responsible for progesterone reduction in *D. lanata* cardenolide biosynthesis (Fellows *et al.*, 2018; Herl *et al.*, 2009). In our case, PhCIR1 might thus has been selected for its putative stronger substrate

selectivity due to L1 and L2 loop characteristics, that might limit or prevent “accidental”, unexpected reactions. Therefore, a regulation at the transcriptional level control the selective high expression of *PhCIR1* and *in vivo* availability of PhCIR1 to reduce citral into citronellal. Incidentally, PhCIR1’s lack of activity regarding pulegone and piperitone prevents alternative production of mint-scented terpenoids.

Based on this hypothesis, instead of being interpreted as an aberration, *PhCIR1* expression in *P. radens* (and *P. graveolens*) could be considered as a part of “silent metabolism” (Lewinsohn and Gijzen, 2009; Nguyen and O’Connor, 2020). That is to say, the enzyme accumulation could correspond to a relic that has not yet been eliminated through evolution or selection, with no apparent substrate or function. Yet, no harm arise from its accumulation and this promiscuous enzyme remains available.

4.3 Stereospecificity of PhCIR1

In *P. rosat* EO, two enantiomers of citronellol are present (Wüst *et al.*, 1998; Wüst and Mosandl, 1999). Enantiomer (S)-(-)-citronellol possesses a sweet rosy flavour while (R)-(+)-citronellol has a bitter odour. Different ratios of citronellol enantiomer have been identified in the different *P. rosat* hybrids and appear to have a direct effect on the EO fragrance (Ravid *et al.*, 1992). As citronellol stereo-configuration is being inherited from citronellal, PhCIR1 reduction could be involved in the different ratio observed in *P. rosat* EO.

Stereoselective activity has indeed been repeatedly observed among P5 β R members (Gärtner *et al.*, 1994; Herl *et al.*, 2009). The acronym P5 β R itself derives from their ability to stereospecifically reduce progesterone in 5 β -pregnane-3,20-dione, but not in 5 α -pregnane-3,20-dione. The initial protonation (nucleophilic attack) directed by the NAD(P)H cofactor has to occur on the β -face of the molecule (Gavidia *et al.*, 2007; Herl *et al.*, 2006) to form specifically 5 β -configured, functional pregnanes (Agrawal *et al.*, 2012; Bauer *et al.*, 2010; Schönfeld *et al.*, 1985; Tschesche *et al.*, 1970). When tested with other substrates, P5 β R demonstrated different stereoselectivity levels, depending on the substrate (Durchschein *et al.*, 2012; Geu-Flores *et al.*, 2012; Herl *et al.*, 2009). P5 β R stereospecific reduction of 8-oxogeraniol has led to a distinction between ISY forming (*cis-trans*) products (β -face attack) and epi-ISY forming (*cis-cis*) products (α -face attack) (Kries *et al.*, 2017). Regarding the reduction of citral, fewer studies have been performed but reduction of citral by At5 β -StR demonstrated a stereospecific production of (S)-(-)-citronellal (Durchschein *et al.*, 2012). Meanwhile, Luan *et al.* (2005) demonstrated that in grape berry, *in vivo* reduction of geraniol is stereoselective as it produces mostly (S)-(-)-citronellol (> 95 %).

In *OT-P5 β R4* (Figure 4.3), several close paralogous transcripts to *PhCIR1*, mainly distinct by a few amino acids in the putative substrate binding, were strongly and specifically expressed in *P. rosat* (Figure 4.3). These few differences might have an effect on the enzyme stereoselectivity. In many plants, chiral products are commonly produced in a stereospecific manner and rarely jointly observed within the same plant. In such a case, as (-)- and (+)-pinene in pine, the two enantiomers are produced by two different stereospecific enzymes (Phillips *et al.*, 2003, 1999). The two

citronellol enantiomers might similarly be produced in pelargonium by two paralogous P5 β Rs with different stereospecificity regarding citral. Therefore, the relative expression and activity between the two enzymes could be involved in the different ratio of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol in *P. rosat* hybrids. Characterisation and chiral analysis of enzymatic activities of both PhCIR1 and its paralogs are currently underway to investigate this hypothesis.

5 Conclusion

Pelargonium EO is a complex blend of multiple terpenes and derivatives that determine its fragrance. EO quality and subtle olfactive differences can result from variations of many compounds as well as enantiomeric ratios. Rose scent in EO pelargonium comes from proportion of geraniol and (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol while citrus notes are mainly provided by citral and citronellal.

In this study, we demonstrated that these four compounds belong to the same pathway and we were able to characterise the enzyme responsible for the key double bond reduction step. PhCIR1 characterisation corroborated the role of P5 β R in the citronellol production. The participation of P5 β Rs in this pathway, in addition to iridoid and cardenolide pathway, points out P5 β Rs' ability to be recruited in various metabolic pathways of specialised metabolisms. Transcriptional regulation of PhCIR1 appears to have a major role on the terpenome composition and seems to be the result of an evolutive strategy combining promiscuous capacities and fitness. Further understanding of the stereoselective production of citronellol will provide new insights on terpenoid production in pelargonium. The same multi-omic approach will also be a starting point to characterise ADH functions necessarily involved in the pathway, allowing for complete understanding of citronellol production in rose-scented pelargonium.

Supplemental data

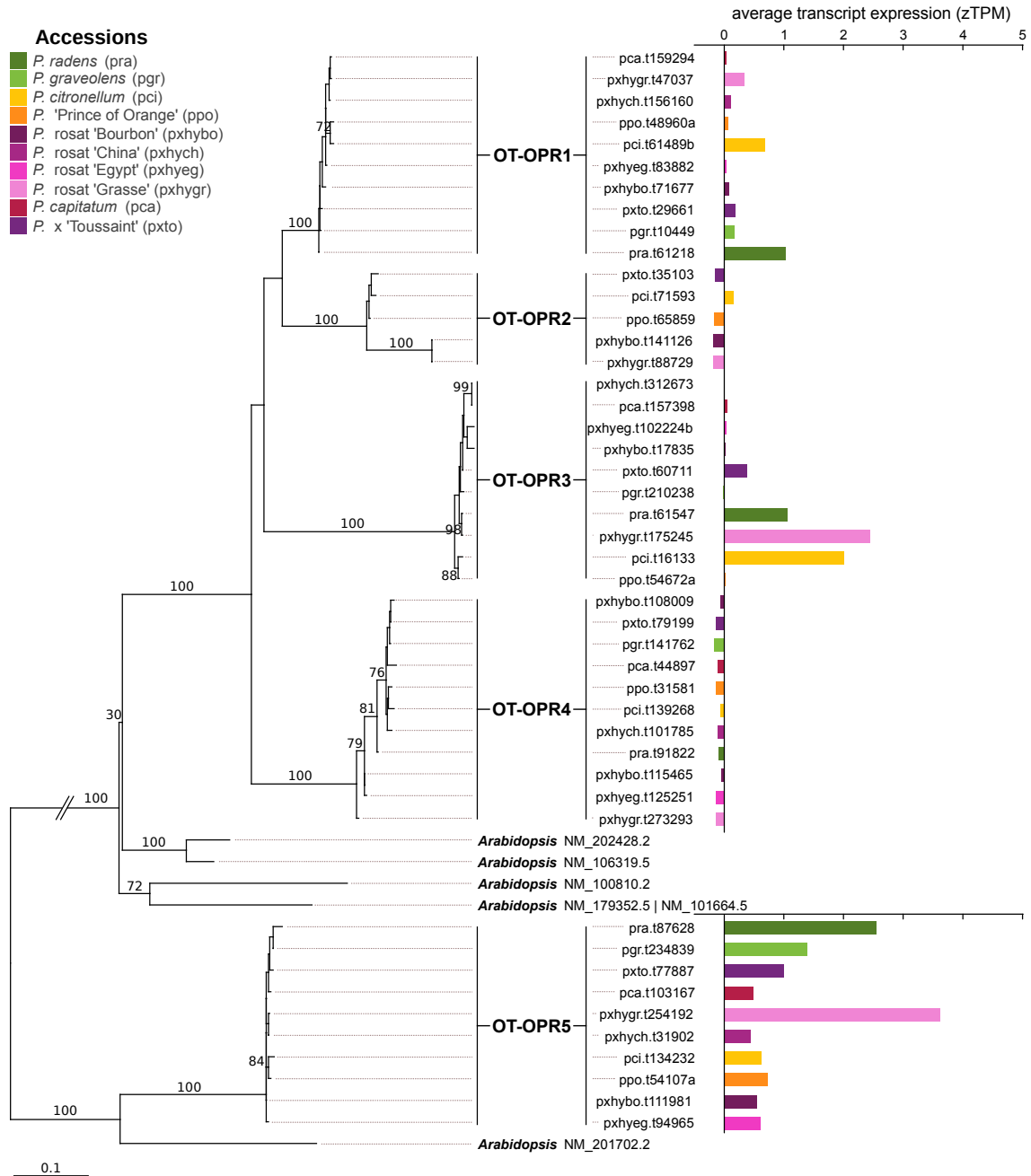
Supplemental_data 4.1 | Sequences of primers used for P5βR characterisation

In the forward primers used for cloning into bacterial expression vectors, the “cacc” sequence allows directional cloning into the pENTR/D-topo entry vector and the underlined sequence encodes for the thrombin cleavage site used to separate the protein from the His-tag of the bacterial expression vector.

Gene	Primer sequence (5' → 3')	Direction	Use of primer
<i>P5βR1</i>	TCTCTGTCAATTCTCCATATCTGCA	Forward	Cloning of full length gene
	AGGGAACGATTTTGTAACTTTCA	Reverse	
<i>P5βR2</i>	TCACACCTACTCGTTTCCCA	Forward	Cloning of full length gene
	GGGTTGATCAAGGCACAATCT	Reverse	
<i>P5βR3a</i>	CTCCATCTCCAATCACTA	Forward	Cloning of full length gene
	CAATGCAATGCTGAACTT	Reverse	
<i>P5βR3b</i>	ACAAAATCTCATCTTCAAATTTCTCAAT	Forward	Cloning of full length gene
	TGCTCTAGTTTCTCAAGGCACA	Reverse	
<i>PhCIR1</i> (<i>P5βR4</i>)	TGCAAATGGAGTCCGAACC	Forward	Cloning of full length gene
	GGGTATAACTTTTATTCTTCTAAGCCT	Reverse	
<i>P5βR1</i>	caccTTGGTTCCGCGTGGATCCATGAGCTGGTGG TGGGCT	Forward	Cloning into bacterial expression vectors
	TTAGGGAACGATTTTGTAACTTTCATC	Reverse	
<i>P5βR2</i>	caccTTGGTTCCGCGTGGATCCATGAGTTGGTGGT GGGCC	Forward	Cloning into bacterial expression vectors
	TCAAGGCACAATCTTGTGAGTTTTGA	Reverse	
<i>P5βR3a</i>	caccTTGGTTCCGCGTGGATCCATGAGTTGGTGGT GGGCTGGT	Forward	Cloning into bacterial expression vectors
	TCTCAAGGCACAATCTTGA AAC	Reverse	
<i>P5βR3b</i>	caccTTGGTTCCGCGTGGATCCATGAGTTGGTGGT GGGCTGGT	Forward	Cloning into bacterial expression vectors
	TCTCAAGGCACAATCTTGA AAC	Reverse	
<i>PhCIR1</i> (<i>P5βR4</i>)	caccTTGGTTCCGCGTGGATCCATGGAGTCCGAA CCAGTAGC	Forward	Cloning into bacterial expression vectors
	CTAGGGTATAACTTTTATTCTTCTAAGCCT	Reverse	
<i>PhCIR1</i> (<i>P5βR4</i>)	caccATGGAGTCCGAACCAAGTAGC	Forward	Cloning into <i>in planta</i> expression vector
	TCTTTTACCCCGGCTTACCT	Reverse	
<i>PhCIR1</i> (<i>P5βR4</i>)	caccATGGAGTCCGAACCAAGTAGC	Forward	Cloning into <i>in planta</i> expression vector for subcellular localisation
	CTAGGGTATAACTTTTATTCTTCTAAGCCT	Reverse	
<i>PhCIR1</i> (<i>P5βR4</i>)	TTGTTGCGCCACCAAATCAG	Forward	RT-qPCR (101 bp amplicon)
	ACGTTGGCTAGCATGGTTGA	Reverse	
<i>PhACTIN</i>	CAAGAGCTGGAGACTTCAAAGAC	Forward	RT-qPCR (175 bp amplicon)
	CGAAACCACATACAACCTCCATCA	Reverse	
<i>PhTUB</i>	TCCATTTTCATGCTTTCCTCGTAC	Forward	RT-qPCR (193 bp amplicon)
	TTTACATCTTTAGGCACCACGTC	Reverse	

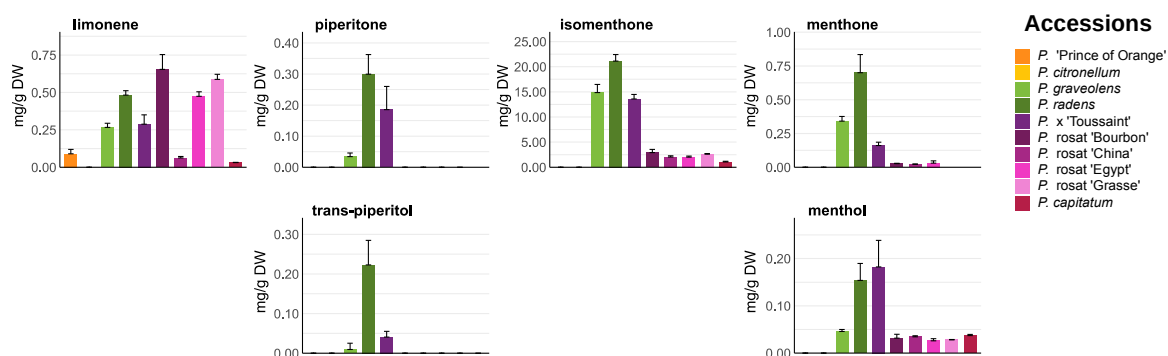
Supplemental_data 4.2 | Number of retrieved OPR and P5βR sequences from transcriptomes for each accession

Accessions	OPR transcripts	P5βR transcripts
<i>P. capitatum</i> (pca)	4	9
<i>P. citronellum</i> (pci)	5	6
<i>P. graveolens</i> (pgr)	4	7
<i>P.</i> 'Prince of Orange' (ppo)	5	6
<i>P. radens</i> (pra)	4	6
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'Bourbon' (pxhybo)	6	10
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'China' (pxhych)	4	11
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'Egypt' (pxhyeg)	4	10
<i>P. x hybridum</i> cv rosat 'Grasse' (pxhygr)	5	11
<i>P. x</i> 'Toussaint' (pxto)	5	8
Total	46	84



Supplemental_data 4.3 | Maximum likelihood phylogenetic tree of OPR family in pelargoniums

The tree was inferred from nucleotide sequences using the GTR+I+G model and ML optimisation of base substitution frequencies; bootstrap support is indicated when ≥ 70 %. Homologous sequences from *Arabidopsis* were included. The tree was rooted using the two *S. cerevisiae* OPRs. Sequences were clustered in five groups of putative orthologs (OT) based on phylogenetic distance and bootstrap support values of the clades. Expression of pelargonium sequences corresponds to average standardised expression in transcripts per million (zTPM).



Supplemental_data 4.4 | Accumulation profiles of compounds of the *p*-menthanes pathway in ten scented pelargoniums

GC-MS analyses of hexane-extracted compounds were used to quantify the compound accumulation ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight (DW)) in each accession. The values are the means and standard deviations obtained from three independent samples.

Supplemental_data 4.5 | Sequence signature motifs in P5 β R and their structural and functional roles

Conserved amino acids suggested to be part of the binding pocket and catalytic site are highlighted (bold and underline)

Motifs	Function	Family	Reference
<u>G</u> x <u>T</u> G <u>I</u> xG	Binding of the diphosphate group of NADPH	SDR derivative	Gavidia <i>et al.</i> (2007), Persson <i>et al.</i> (2003), Thorn <i>et al.</i> (2008)
Gxx <u>RR</u>	O-2'-Phosphate binding, discriminate between NADH and NADPH	SDR derivative	Gavidia <i>et al.</i> (2007), Thorn <i>et al.</i> (2008)
<u>D</u> xxD	Selective interaction with the adenine ring of NADPH	SDR derivative	Gavidia <i>et al.</i> (2007), Persson <i>et al.</i> (2003) Thorn <i>et al.</i> (2008)
DxTHxFYVxW x	Structural role in stabilizing central β -sheet	P5 β R specific	Pérez-Bermúdez <i>et al.</i> (2010)
TGx <u>K</u> HYxGP	Contains catalytic lysine residue	P5 β R specific	Gavidia <i>et al.</i> (2007), Thorn <i>et al.</i> (2008)
NFY <u>Y</u> xxED	Contains catalytic tyrosine residue	P5 β R specific	Gavidia <i>et al.</i> (2007), Thorn <i>et al.</i> (2008)
WSV <u>H</u> RP	Proline packs against the nicotinamide ring of NADPH, structural role in positioning motifs TGx <u>K</u> HYxGP and WSV <u>H</u> RP	P5 β R specific	Pérez-Bermúdez <i>et al.</i> (2010)
DxDLxAx	Assist the hybrid transfer from the cofactor to the substrate	P5 β R specific	Pérez-Bermúdez <i>et al.</i> (2010)

Chapitre 5

**Pélargoniums rosat et
variations du
terpénome**

1 Introduction

Les variations de la production et de l'émission des composés organiques volatils (COV) en fonction des modifications climatiques ont souvent été observées chez les plantes, (Helmig *et al.*, 1999 ; Loreto et Schnitzler, 2010 ; Peñuelas et Staudt, 2010 ; Selmar et Kleinwächter, 2013). Un cas éloquent est celui de l'isoprène, un hémiterpène dont les variations d'émissions ont été très étudiées, particulièrement dans le contexte de réchauffements climatiques (Lantz *et al.*, 2019 ; Peñuelas et Staudt, 2010 ; Tiiva *et al.*, 2008). L'influence du climat sur la production de terpènes ne se limite pas à l'isoprène et des altérations de la production de mono- et sesqui-terpènes ont aussi été montrées chez de nombreuses plantes herbacées et ligneuses (Helmig *et al.*, 2006 ; Loreto et Schnitzler, 2010 ; Mahdavi, Moradi et Mastinu, 2020 ; Tingey *et al.*, 1980). Notamment, des variations saisonnières de la production ou de l'émission de mono- et sesqui-terpènes ont été observées chez diverses espèces telles que la lavande, le pin ou le douglas vert (Llusà et Peñuelas, 2000 ; Snow *et al.*, 2003 ; Staudt *et al.*, 2000). Une étude regroupe l'analyse des variations de composés émis et stockés chez sept espèces ligneuses méditerranéennes (Llusà et Peñuelas, 2000) : chez le pin d'alep et le buplèvre ligneux, le stockage était maximum à l'automne et minimum au printemps alors que l'émission était constante au cours de l'année. Chez le ciste blanc, le profil d'accumulation était identique aux deux autres plantes tandis que l'émission était maximale en été. Selon les études, les techniques de mesure utilisées sont variables : certaines mesurent l'émission des terpènes et d'autres analysent le contenu terpénique, le choix se faisant essentiellement selon si l'organe étudié possède des structures de stockage (p. ex. trichomes ou canaux résinifères) ou non. L'hypothèse conventionnelle est que les deux paramètres varient dans le même sens et que chez les plantes ne possédant pas de structure de stockage, l'émission reflète l'activité de biosynthèse. Bien que cela ne soit pas toujours vérifié, dans de nombreux cas, une bonne corrélation a été observée entre les variations du contenu terpénique et des terpènes émis (Ormeño *et al.*, 2010). Il demeure important de prendre en considération que cette approximation ne tient pas compte des mécanismes de glycosylation/déglycosylation, qui peuvent permettre un stockage de composés dans des cellules du mésophylle foliaire ou du pétale (Wu *et al.*, 2019 ; Zeng *et al.*, 2016).

La notion de climat recouvre de nombreux facteurs abiotiques comme la température, la pluviométrie, la sécheresse ou encore le rayonnement solaire qui peuvent être optimum pour la physiologie de la plante ou au contraire constituer des facteurs de stress (Mittler, 2006). Cette influence multi-paramétrique du climat sur la production de terpènes est, de fait, très complexe à analyser. Combinés ou individuellement, l'existence d'une influence de ces paramètres sur le terpénome n'est plus à démontrer. Chez diverses plantes aromatiques notamment, les effets ont été observés lors d'un stress hydrique (Kleinwächter *et al.*, 2015 ; Simon *et al.*, 1992), d'un stress thermique (Majrooni Senji et Abdollahi Mandoulakani, 2018) ou encore lors de stress thermique et hydrique (Munné-Bosch et Alegre, 2003) ou thermique et lumineux combinés (Fahlén, Welander et Wennersten, 1997).

Les terpènes présentent de nombreux rôles écologiques qui relèvent d'interactions biotiques comme dans l'attraction des pollinisateurs ou la défense contre les herbivores et la répulsion de nuisibles (Cheng *et al.*, 2007 ; Farré-Armengol *et al.*, 2015 ; Fürstenberg-Hägg, Zagrobelny et Bak, 2013 ; Pichersky et Raguso, 2018). Par ailleurs, la production de terpènes constitue aussi une réponse de défense à des stress engendrés par des facteurs abiotiques. Chez l'hévéa soumis à un stress lumineux, l'inhibition de la production de monoterpènes dans les feuilles a mis en évidence leur rôle d'antioxydant (Chen, Bai et Cao, 2009). Une exposition trop intense ou prolongée à la lumière et à des températures extrêmes induit une diminution du taux d'assimilation du CO₂ de la plante et une saturation de la chaîne photosynthétique. La réaction de composés terpéniques avec les radicaux libres formés tend à limiter le stress oxydatif. Chez certaines plantes aromatiques, un diterpène, l'acide carnosique, semble conférer une activité antioxydante similaire en réponse à un stress hydrique (Munné-Bosch et Alegre, 2003). Chez le chêne vert, les propriétés physico-chimiques des composés terpéniques permettent une protection de la chaîne photosynthétique lors d'un stress thermique (Copolovici *et al.*, 2005). Plus exactement, les composés terpéniques participent au maintien de l'intégrité des membranes en améliorant leur thermotolérance par régulation de leur fluidité et en limitant les dégradations membranaires liées au stress oxydatif. À des températures trop intenses, cela permet d'assurer le bon fonctionnement de la chaîne et le maintien du taux d'assimilation de CO₂ nécessaire à la plante (Salvucci et Crafts-Brandner, 2004). Les travaux de Loreto *et al.* (1998) et Delfine *et al.* (2000) ont confirmé l'activité thermotolérante des terpènes chez le chêne vert et le chêne liège et ont également montré que la fumigation de terpènes induit chez le chêne liège des réponses similaires à celle d'un stress thermique. Ceux-ci agiraient donc également comme molécule signal. Selon le niveau de stress, les effets sur le métabolisme de la plante peuvent varier et même conduire à des effets inverses : un stress modéré peut stimuler la biosynthèse des terpènes afin d'améliorer ses défenses tout en maintenant son métabolisme primaire alors qu'un stress très prononcé altère les fonctions physiologiques majeures (p. ex. la photosynthèse et l'assimilation du carbone) de la plante de manière irréversible (Kleinwächter *et al.*, 2015 ; Niinemets, 2010 ; Pazouki *et al.*, 2016). Dans de telles conditions la plante réduira la production énergivore de terpènes pour privilégier une économie d'eau et la synthèse de sucres (Hüve *et al.*, 2012).

Les variations qualitatives ou quantitatives de terpènes émis ou produits chez des plantes soumises à des variations climatiques résultent d'une régulation des voies de biosynthèse du métabolisme spécialisé. La régulation peut avoir lieu au niveau de l'activité des enzymes impliquées dans la disponibilité des substrats, des cofacteurs (Niinemets *et al.*, 2002 ; Pateraki et Kanellis, 2010) mais également au niveau de l'activité des enzymes responsables de la formation des terpènes (les terpène synthases (TPS)) et de leurs modifications (Ryšlavá *et al.*, 2013). Des facteurs abiotiques tels que le stress hydrique, la température ou encore le rayonnement UV-B semblent pouvoir moduler la régulation de l'expression de certaines TPS. Ainsi, chez le thé, l'analyse d'une banque de RNA-seq a clairement montré que le stress hydrique entraîne un abaissement de l'expression de la plupart des gènes de TPS (Zhou *et al.*, 2017). Chez la tomate, une augmentation de la température conduit à une surexpression de deux TPS codant respectivement une α -phellandrene synthase et une β -caryophyllène synthase (Pazouki *et al.*,

2016). L'émission différentielle de ces deux composés a aussi été observée chez des cultivars de thym résistants à la chaleur (Mahdavi, Moradi et Mastinu, 2020). En ce qui concerne les UV-B, ceux-ci induisent un stress oxydatif qui pourrait être contrôlé par une augmentation de terpènes : chez le riz et la pêche il a été montré que l'application d'UV-B induit l'expression de *TPS* (Liu *et al.*, 2017) et un facteur de transcription sensible à la lumière (HY5, pour *elongated hypocotyl*) semble être impliqué dans la régulation de l'expression de *TPS* (Michael *et al.*, 2020) mais aussi dans celle des gènes en amont, à l'origine des substrats des *TPS* (Chenge-Espinosa *et al.*, 2018 ; Lee *et al.*, 2015).

Étant donné que la composition de l'huile essentielle (HE) de pélargonium définit sa valeur olfactive et commerciale, mieux comprendre l'influence potentielle du climat sur cette composition présente un intérêt agronomique et économique. Cette étude essaye donc de répondre à une question plus générale : quelle est l'importance des conditions abiotiques dans la production d'une HE de qualité ? Actuellement la production d'HE repose principalement sur quatre cultivars : *Pelargonium x hybridum* cv. rosat 'Bourbon', 'Chine', 'Égypte' et 'Grasse' (*P. rosat*) qui ont hérité leur nom du lieu de leur culture. Très prisées en parfumerie fine, les HE présentent des profils olfactifs bien spécifiques et reconnaissables par les parfumeurs. Selon le parfum désiré et les notes recherchées, l'origine de l'huile utilisée n'est pas la même. L'HE d'Égypte (produit à partir de *P. rosat* 'Égypte'), se différencie par des notes plus vertes et épicées, recherchées pour relever les notes fruitées et rosées d'un parfum (Blerot *et al.*, 2016). L'HE de Chine (de *P. rosat* 'Chine') possède une odeur plus mentholée et plus citronnée, souvent utilisée pour les parfums masculins. L'HE la plus recherchée par les parfumeurs est néanmoins l'HE de type 'Bourbon' (produit par *P. rosat* 'Bourbon', principalement à la Réunion et Madagascar), présentant une odeur fine de rose et des notes plus délicates et moins mentholées permettant une utilisation aussi bien pour les parfums masculins que féminins. Même s'il est difficile de pointer une molécule particulière qui serait responsable de la qualité de l'HE, le ratio citronellol:géranol ainsi que la proportion des stéréo-isomères R-(+) et S-(-) de citronellol (Bergman *et al.*, 2020 ; Ravid *et al.*, 1992 ; Yamamoto *et al.*, 2004) sont des critères déterminants pour la qualité de l'HE. Le ratio de ces deux composés est variable au cours de l'année, avec une augmentation du pourcentage de citronellol au cours du printemps ou de l'été suivant les expérimentations (Doimo *et al.*, 1999; Rajeswara Rao *et al.*, 1996). Ces résultats parfois contradictoires peuvent s'expliquer par des pratiques culturales différentes. En effet, le paillage plastique (De Carvalho Silva *et al.*, 2014), la densité de culture (Rajeswara Rao, 2002a), l'irrigation (Eiasu *et al.*, 2012) et le nombre de récoltes (Kaul *et al.*, 1998) sont autant de facteurs liés aux pratiques et conditions de cultures qui influencent la production d'HE de pélargonium.

Afin de s'affranchir de ces paramètres, nous avons conduit en milieu contrôlé une étude focalisée sur l'influence de la température et de l'hygrométrie que nous appellerons « climat » dans la suite de cet exposé. Pour cette expérience, des *P. rosat* d'origines différentes (Chine et Égypte) ont été cultivés dans des chambres de culture mimant les conditions tempérées de la Chine continentale (température modérée et humidité relative assez élevée) ou celles d'Égypte (climat plus chaud et sec). Les pratiques de culture et de récolte étant identiques, le but principal de cette

expérience était de mesurer l'influence couplée de ces deux facteurs abiotiques sur la biosynthèse des terpènes chez deux cultivars de *pélargoniums* différents.

2 Étude de facteurs écologiques en conditions contrôlées

2.1 Plan d'expérience

Dans une première expérience (Exp 1, Figure 5.1), des plants de *pélargoniums* ont été cultivés soit dans un climat dit tempéré, soit dans un climat dit chaud (se rapprochant des conditions de cultures d'Égypte). Après deux mois, les jeunes feuilles ont été prélevées et les COV ont été extraits à l'hexane. Pour chaque échantillon, le profil biochimique a été obtenu par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (GC-MS). Bien que les quantités de matériel végétal utilisées soient insuffisantes pour une distillation *per se*, les profils biochimiques obtenus à partir d'extrait hexanique sont considérés comme représentatifs de la composition de l'HE. Pour l'ensemble des analyses, un détail des méthodes utilisées est disponible en chapitre 6 de ce tapuscrit.

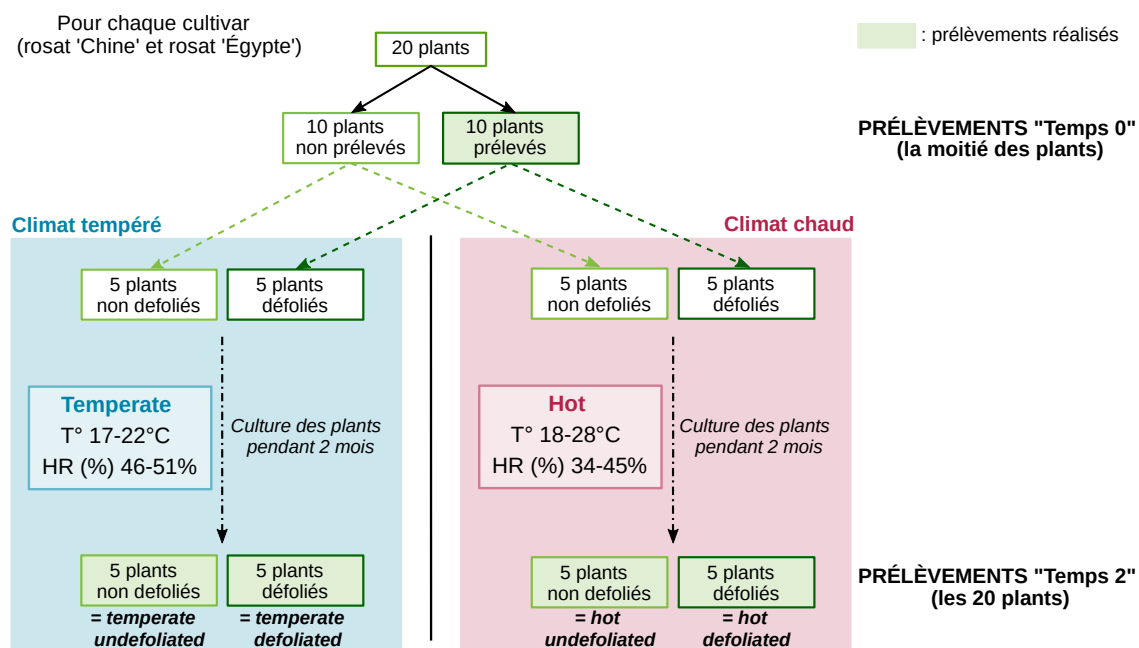


Figure 5.1 | Plan d'expérience (Exp 1) utilisé pour valider notre protocole et évaluer l'influence du climat sur les profils biochimiques de *pélargoniums rosat*

Les valeurs présentées pour les conditions de température et d'humidité relative (HR) correspondent aux moyennes des mesures réalisées sur les deux mois de cultures. Le premier nombre correspond systématiquement à la moyenne en période non éclairée (nuit) et le second à celle en période éclairée (jour).

Deux hybrides ont été étudiés : *P. rosat* 'Chine' et *P. rosat* 'Égypte', usuellement cultivés en climat tempéré (Chine) ou chaud et sec (Égypte). De plus, ces deux rosat présentent des HE aux compositions proches mais caractéristiques. L'objectif étant d'observer si le climat fait varier la composition de l'HE et d'autre part si les variations sont similaires d'un hybride à l'autre. Afin de déterminer correctement les variations exclusivement dues aux différences climatiques, les potentielles variations liées au protocole expérimental ont également été évaluées. Pour cela, les plants ont été prélevés avant le début de l'expérience pour évaluer la variabilité intraclonale (entre

individus). Néanmoins, ce prélèvement initial a été réalisé uniquement sur la moitié des plants de l'expérience. En effet, la défoliation (prélèvements de feuilles) est susceptible d'induire un stress. Appliquer ce traitement uniquement à la moitié des plants permet en fin d'expérience de comparer les profils biochimiques des deux groupes (plants défoliés ou non-défoliés). Si les profils sont significativement différents selon le traitement, cela signifie que la défoliation a un effet sur la composition de l'HE.

Tous les plants de l'étude provenaient de boutures réalisées le même jour et cultivées pendant quatre mois dans les mêmes conditions (climat tempéré). Pour chaque cultivar de l'expérience, 20 plants ont été utilisés, 10 ont été prélevés à temps « 0 ». Les plants ont été repartis équitablement de sorte que 5 plants défoliés et 5 plants non-défoliés soient cultivés en conditions tempérées tandis que 5 plants défoliés et 5 plants non-défoliés soient cultivés en conditions chaudes et sèches. Les conditions de cultures sont résumées en Figure 5.1 et les valeurs indiquées correspondent aux moyennes réelles sur deux mois.

2.2 Variations quantitatives selon les conditions expérimentales

À partir des données GC-MS recueillies, la composition de l'HE a été déterminée par identification et quantification des composés du profil biochimique. L'ensemble des données a été analysé à l'aide du logiciel R. L'analyse des données recueillies après deux mois de culture (Figure 5.2) montre pour le cultivar 'Chine' que ni une défoliation initiale, ni le climat n'ont un impact significatif sur la production d'HE. Chez le cultivar 'Égypte' en revanche, un climat chaud et sec induit une augmentation de la quantité de terpènes accumulés. L'effet de la défoliation est mitigé puisque ce traitement induit une stimulation de la biosynthèse terpénique mais uniquement lorsque les plantes sont en conditions tempérées.

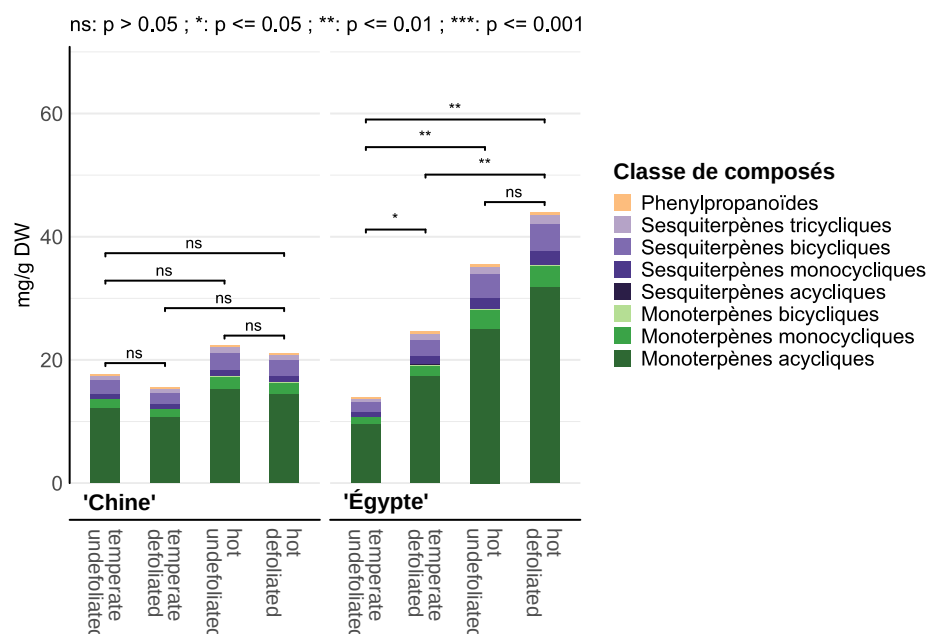


Figure 5.2 | Histogrammes empilés indiquant la quantité et la composition de l'HE de pélargoniums rosat selon les conditions expérimentales (Exp 1)

La composition correspond aux proportions des différentes catégories de COV. Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW, de l'anglais *dry weight*). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon sur les quantités totales par condition. La légende des conditions indiquées en abscisses fait référence aux catégories d'échantillons telles que présentées dans le plan d'expérience (Figure 5.1). *Temperate* : culture en climat tempéré ; *hot* : culture en climat chaud et sec ; *undefoliated* : plants non-prélevés en début d'expérience ; *defoliated* : plants prélevés en début d'expérience. Dès lors, la catégorie « *temperate undefoliated* » correspond aux échantillons de plants non prélevés en début d'expérience et cultivés en conditions tempérées.

Cette première analyse montre que les conditions climatiques n'affectent pas de la même façon les deux cultivars. D'un point de vue qualitatif, les proportions de mono- et sesqui-terpènes ne présentent pas de variations notables. Ni le climat, ni la défoliation, n'affectent significativement les quantités relatives des classes de terpènes.

2.3 Variations qualitatives selon les conditions expérimentales

Afin d'évaluer correctement l'impact qualitatif du climat et de la défoliation sur les HE de pélargoniums, deux analyses multivariées sur ces mêmes données ont été réalisées : l'analyse de redondance (RDA, de l'anglais, *redundancy analysis*) et l'analyse en composante principale (ACP, PCA en anglais). Trois facteurs sont étudiés : l'effet lié au cultivar (entre *P. rosat* 'Chine' et 'Égypte'), l'effet de la défoliation (plant défolié à temps 0 ou non) et l'effet du climat (tempéré ou chaud). La RDA, aussi appelée « ACP sur variables instrumentales », permet de valider le modèle expérimental et d'identifier les facteurs ayant un impact significatif sur les variations observées. L'ACP permet quant à elle, de visualiser la distribution des échantillons. Chaque composé – et donc chaque variable – est pris en compte et l'ACP fournit une représentation graphique illustrant un maximum de la variance observée.

D'après la RDA, les trois facteurs expliquent 80.7 % de la variance observée dans nos données, ce qui donne une légitimité à poursuivre ces analyses par une ACP. Par ailleurs, l'analyse indique que le cultivar, le climat et la défoliation sont bien des facteurs explicatifs des variations qualitatives

mesurées et que les variations selon le cultivar ou le climat sont très hautement significatives. La répartition des individus (extraits analysés) selon ces facteurs est visible sur l'ACP (Figure 5.3A). La distribution des échantillons selon la composante 1 (axe des abscisses) met en évidence la séparation entre les échantillons du cultivar 'Chine' et ceux du cultivar 'Égypte' (indiqués en vert et violet respectivement, Figure 5.3A). La discrimination selon le cultivar indique donc que ces deux hybrides ont des profils biochimiques distincts. En effet, quelques soient les conditions de culture (climat et défoliation), les compositions terpéniques des plants de *P. rosat* 'Chine' et de *P. rosat* 'Égypte' sont différentes. Il existe donc bien une composante génétique à l'origine des productions d'HE de pélagonium de qualités différentes.

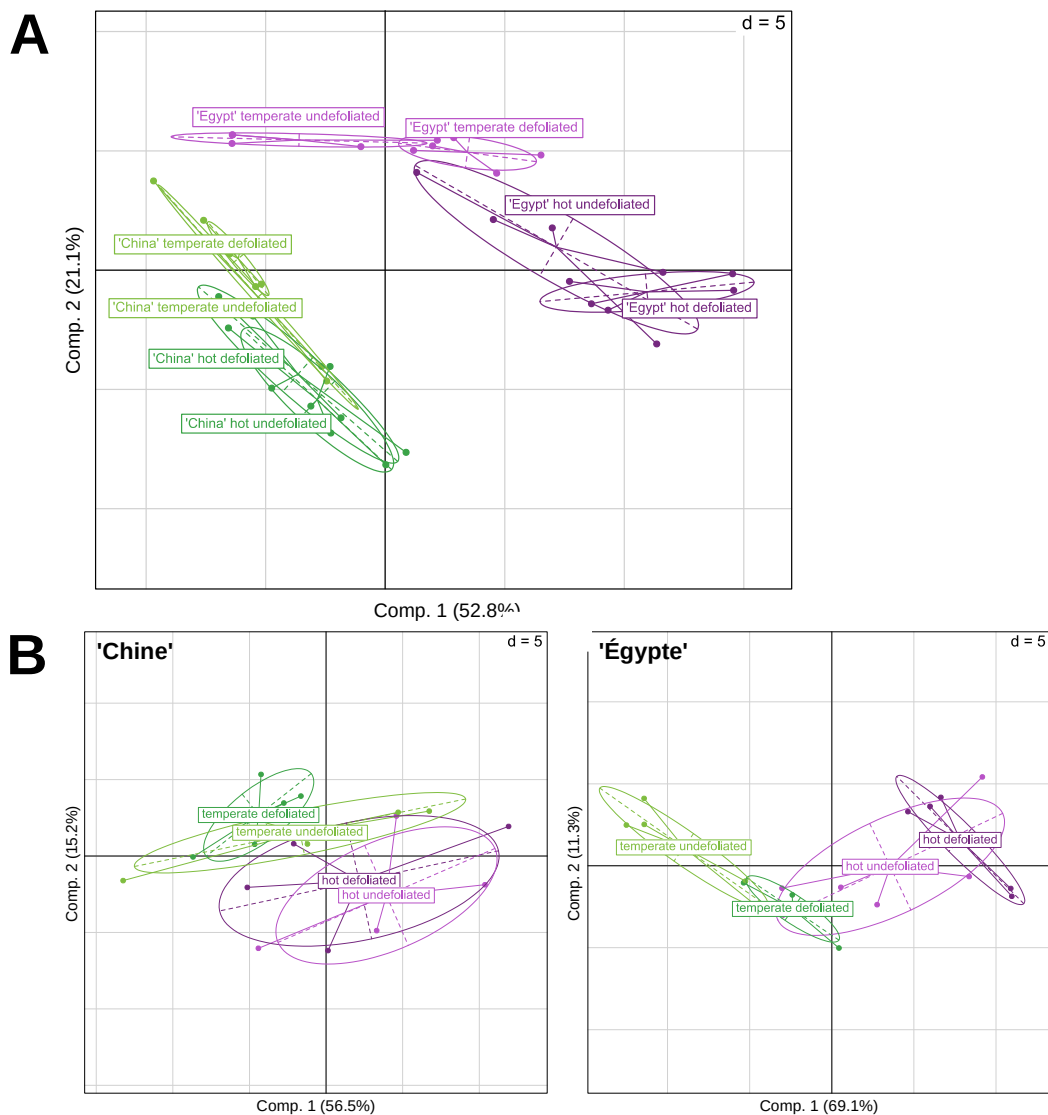


Figure 5.3 | ACP sur les échantillons après deux mois de culture lors de l'Exp 1. (A) Analyse de l'ensemble des données (B) analyse des données par cultivar

(A) La matrice quantitative utilisée regroupe les 86 composés identifiés. Les deux axes utilisés pour la représentation graphique expliquent environ 74 % de la variance. (B) Les données des cultivars *P. rosat* 'Chine' et 'Égypte' ont été analysées séparément. Les ACP par cultivar permettent une meilleure observation des variations selon les autres facteurs étudiés (défoliation et climat). Les matrices quantitatives utilisées regroupent l'ensemble des composés identifiés pour chaque échantillon de chaque cultivar. Les deux axes utilisés pour la représentation graphique expliquent environ 72 % et 79 % de la variance. Pour chaque ACP, les ellipses de couleurs regroupent les individus ayant été cultivés dans les mêmes conditions et la valeur statistique des résultats observés est supportée par une analyse RDA. La légende des groupes fait référence aux catégories d'échantillons telles que présentées dans le plan d'expérience (Figure 5.1).

Étant donné l'importance de la discrimination selon le cultivar, les mêmes analyses multivariées ont été réalisées sur les données de chaque cultivar séparément afin d'analyser plus finement les variations selon les autres facteurs (Figure 5.3B). Pour chaque cultivar, l'ACP montre bien des groupes différenciés selon le climat. Par ailleurs, chez le cultivar 'Égypte' deux groupes distincts ont été observés pour le traitement défoliation en climat tempéré (p. ex. « *'Egypt' temperate defoliated* » et « *'Egypt' temperate undefoliated* »), corroborant ainsi l'analyse statistique obtenue sur les valeurs quantitatives (Figure 5.2). Cette analyse conforte les deux conclusions précédentes : i) chez les deux cultivars, un changement de climat induit une altération qualitative de la production de terpènes, ii) la défoliation ne modifie la composition terpénique que chez le cultivar 'Égypte' en conditions tempérées.

2.4 Influence de la défoliation sur la biosynthèse des composés terpéniques

Afin de préciser les modifications qualitatives induites par la défoliation chez le cultivar 'Égypte', des graphiques en violon ont été réalisés sur l'ensemble des composés de l'HE (Supplemental_data 5.1) ; les composés majoritaires sont présentés en Figure 5.4. Cette même analyse a aussi été réalisée sur le cultivar 'Chine' afin de vérifier si malgré un effet non significatif sur l'ensemble des composés, l'abondance individuelle de certains n'était pas modifiée par la défoliation (Supplemental_data 5.2). L'analyse des données montre qu'aucune variation significative due à la défoliation n'a pu être observée à l'échelle des composés en climat chaud chez le cultivar 'Égypte' ou dans les deux conditions de culture chez le cultivar 'Chine'. Dès lors, cette analyse confirme que seule une défoliation en climat tempéré induit un changement de la composition terpénique chez le cultivar 'Égypte'. En ce qui concerne ces échantillons, parmi les douze composés majoritaires (Figure 5.4), neuf montraient une augmentation significative chez les plants blessés. Il faut néanmoins remarquer une grande variation intraclonale (matérialisée par l'étalement vertical des données en violons pour certains composés).

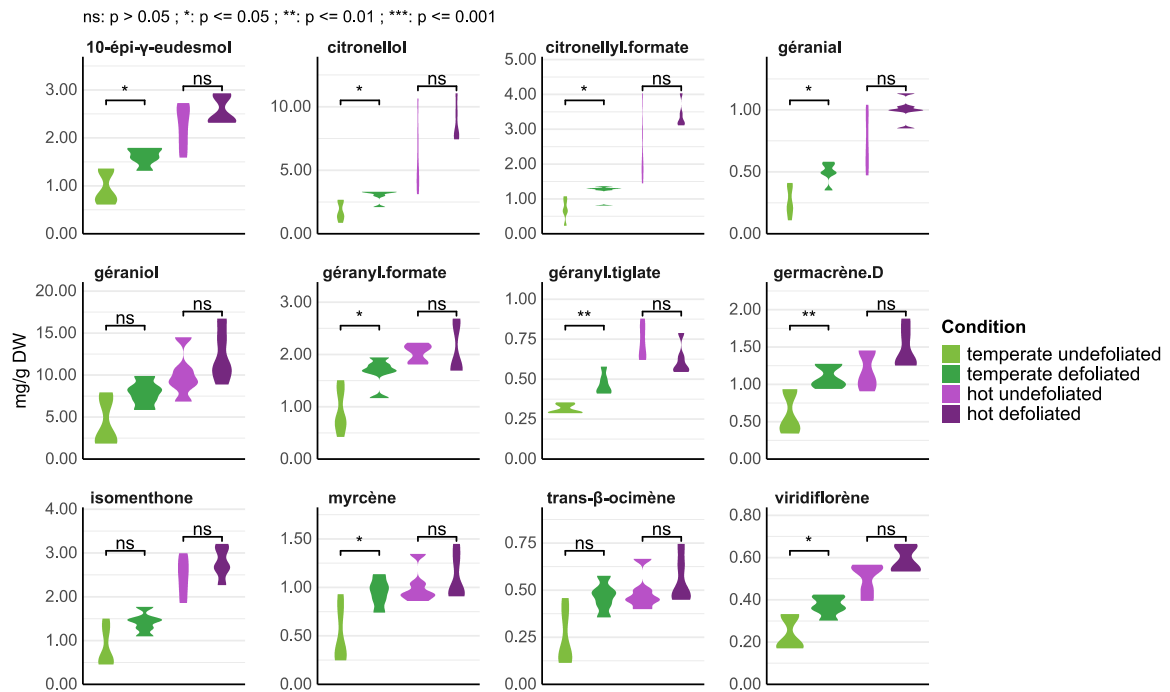


Figure 5.4 | Graphique en violon des composés majeurs de l'HE de pélargoniums 'Égypte' cultivés dans différentes conditions (Exp 1)

Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. La légende des groupes fait référence aux catégories d'échantillons telles que présentées dans le plan d'expérience (Figure 5.1).

2.5 Influence d'un climat chaud et sec sur la composition des terpénomes

Compte tenu du fait que la défoliation a un effet minime, nous avons choisi pour la suite de nos analyses de négliger ce facteur et de regrouper les échantillons défoliés et non-défoliés (*defoliated* et *undefoliated*) afin d'analyser uniquement l'effet climat. Une analyse des variations de chaque composé, représentée avec des diagrammes en violons, (Supplemental_data 5.3 ; Supplemental_data 5.4) montre que chez le cultivar 'Chine' 55 % des composés (40 sur 72) présentent une concentration significativement différente selon le climat de culture tandis que pour le cultivar 'Égypte', cette valeur atteint 77 % (57 sur 74). Pour les deux cultivars, la majorité des composés sont présents en concentration supérieure lorsque le climat est chaud et sec. Néanmoins, pour certains composés, la concentration chute en conditions chaudes et sèches.

Afin d'identifier les composés discriminants de l'effet du climat une analyse par régression des moindres carrés partiels (pls-da, de l'anglais *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) a été réalisée pour chaque cultivar (Figure 5.5A&C). Cette analyse discriminante permet d'identifier les variables, ici les composés, expliquant le plus les variations observées selon le climat de culture. Pour les deux pls-da, la distribution des individus se fait principalement selon l'axe des abscisses. Deux groupes distincts sont visibles, séparant nettement les échantillons selon le climat de culture. Les composés discriminants sont identifiés sous forme de vecteurs qui représentent les liens de covariance entre les données et chaque composé. Les composés dirigés vers le groupe « hot » indiquent donc une corrélation positive avec les individus de ce groupe. Autrement dit, ces composés sont discriminants d'une HE obtenue en climat chaud et sec. En s'appuyant sur les

diagrammes de chaque composé (Figure 5.5B&D), il est visible que la concentration de ces composés est significativement plus élevée chez les plants du climat chaud. De manière similaire, les composés dont les coordonnées tendent vers le groupe « *temperate* » sont des composés discriminants d'une culture en conditions tempérées. Dans ce cas, les concentrations sont supérieures chez les plants cultivés en climat tempéré. Néanmoins, chez *P. rosat* 'Égypte', aucun composé n'est notablement discriminant du climat tempéré : les géranyls sont les plus représentatifs du climat tempéré car ils font partie des rares composés n'augmentant pas en climat chaud et sec.

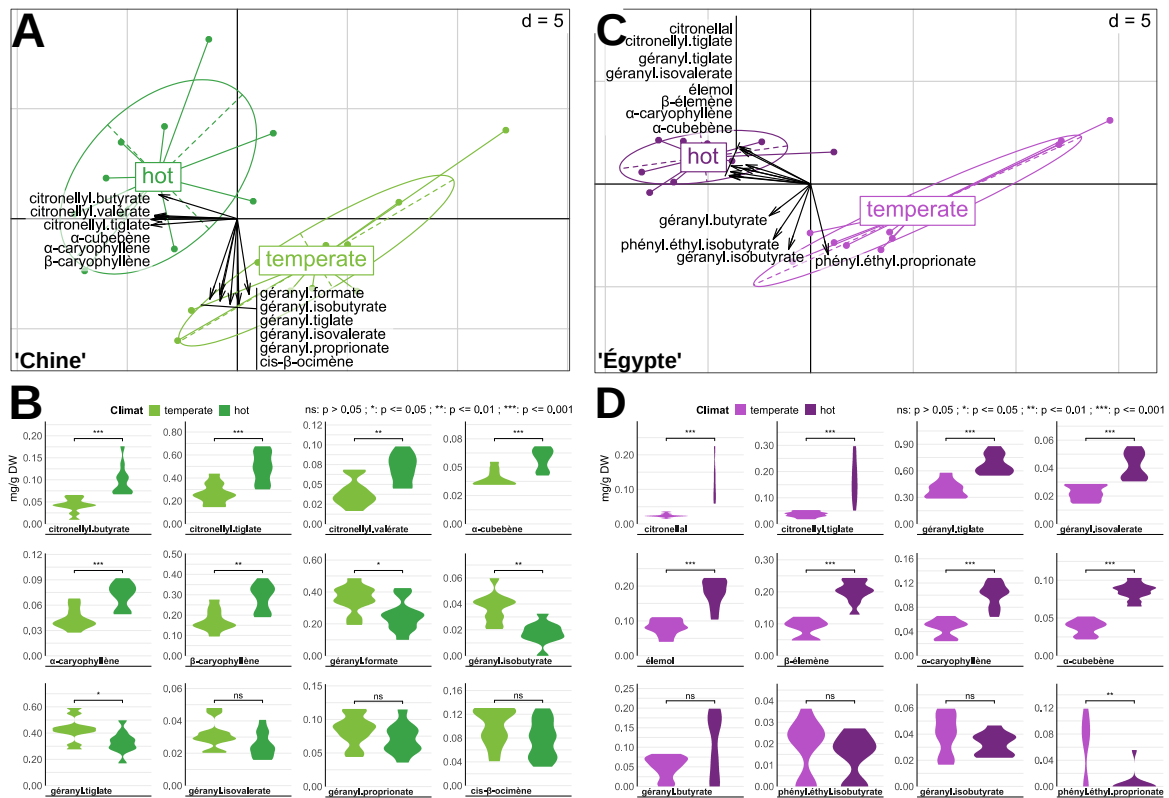


Figure 5.5 | Analyse discriminante (pls-da) des profils biochimiques de l'Exp 1 pour *P. rosat* 'Chine' (A) et *P. rosat* 'Égypte' (C) selon le climat de culture. Diagrammes en violon des composés discriminants de *P. rosat* 'Chine' (B) et *P. rosat* 'Égypte' (D) en climat tempéré ou chaud et sec

Les composés présentés sont ceux identifiés comme les plus explicatifs de l'effet du climat. (A,C) Les données utilisées regroupent l'ensemble des composés identifiés pour chaque échantillon de chaque cultivar. Les données de chaque groupe correspondent aux données des plants *undefoliated* et *defoliated*, non distinguées. Le sens et la longueur des flèches traduisent le lien de covariance et sa force, entre les données et chaque composé. (B,D) Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon.

Cette analyse montre que les composés discriminants du climat ne sont pas forcément des composés majoritaires et sont différents en fonction du cultivar. Certains terpènes, tels que l' α -cubebène, l' α -caryophyllène (communément appelé α -humulène) ou encore le citronellyl tiglate, sont discriminants du climat chaud aussi bien chez 'Chine' que 'Égypte'. Inversement, le géranyl tiglate et le géranyl isovalérate sont discriminants du climat chaud et sec chez le cultivar 'Chine', alors qu'ils sont discriminants du climat tempéré chez le cultivar 'Égypte'. Dans l'ensemble, bien que le géraniol et le citronellol ne soient pas présents parmi les composés discriminants, leur dérivés (géranyls, citronellyls) sont très représentés chez les deux cultivars.

En conclusion, notre étude a permis de mettre en place un protocole expérimental approprié à l'analyse de l'effet du climat sur des pélargoniums rosat. Les résultats ont mis en évidence qu'il existe bien une influence du climat de culture sur la composition de l'HE. Par ailleurs, cultivés en conditions chaudes et sèches les deux cultivars étudiés présentent des réponses différentes et l'effet climatique a été observé sur un grand nombre de composés.

3 Effet d'un stress climatique plus prononcé sur la composition de l'huile essentielle

3.1 Plan d'expérience

Pour chacun des cultivars ('Chine' et 'Égypte'), quatre plants ont été cultivés pendant deux mois dans un climat tempéré et quatre autres dans un climat plus chaud. Un prélèvement a été réalisé après deux mois de culture. Dans ce plan d'expérience, tous les prélèvements ont été effectués en duplicata (deux prélèvements par plant) afin d'atténuer la variabilité intracloinale. Pour cette seconde expérience (Exp 2), le différentiel entre les climats tempéré et chaud a été augmenté. Les conditions du climat dit chaud ont été accentuées (afin de se rapprocher des conditions de cultures égyptiennes) : la température est donc plus élevée et l'humidité relative plus basse (Figure 5.6).

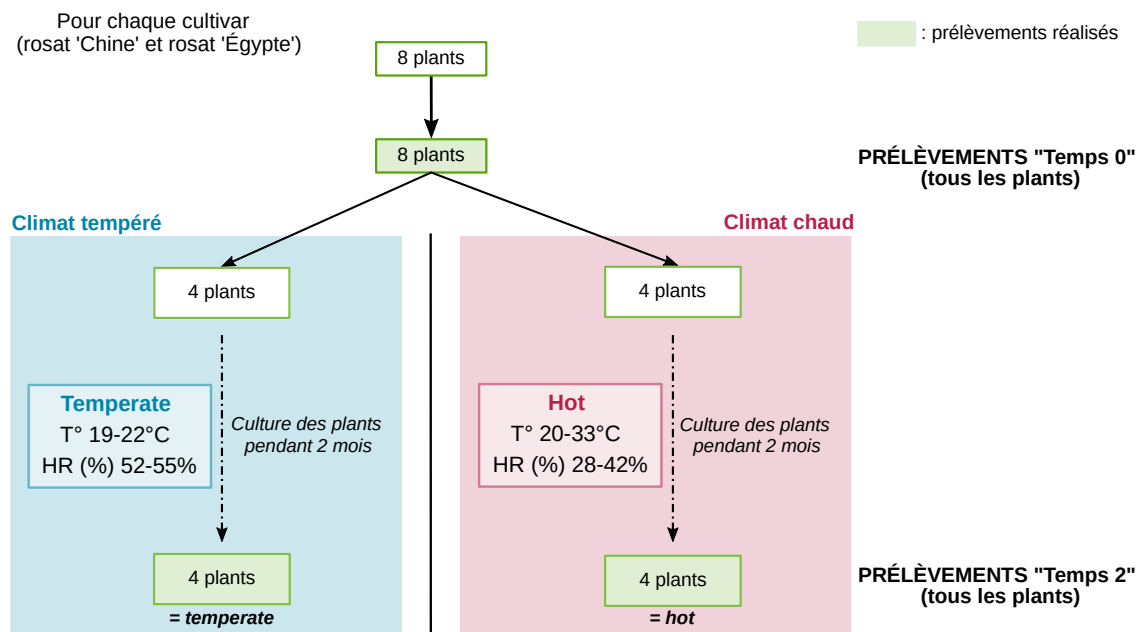


Figure 5.6 | Plan d'expérience (Exp 2) utilisé pour valider notre protocole et évaluer l'influence d'un climat plus prononcé sur les profils biochimiques de pélargoniums rosat

Les valeurs présentées pour les conditions de température et d'humidité relative (HR) correspondent aux moyennes des mesures réalisées sur les deux mois de culture. Le premier nombre correspond systématiquement à la moyenne en période non éclairée (nuit) et le second à celle en période éclairée (jour).

3.2 Impact de la température sur la quantité de terpènes produits

Dans les nouvelles conditions climatiques, une diminution de la teneur en HE est observée chez les deux cultivars (Figure 5.7). Un climat plus chaud et plus sec induit une réponse inverse à celle observée lors de la première expérience et semble correspondre à une réduction de la biosynthèse terpénique. Ces conditions sont plus stressantes que les précédentes pour la plante. Pour pouvoir

qualifier le traitement appliqué de stress à proprement parlé, une mesure de l'impact sur la photosynthèse serait nécessaire. Néanmoins, dans la suite de cet exposé, le terme de stress sera utilisé pour faire référence aux climats chauds et secs auxquels les *pélargoniums* ont été soumis : les conditions de la première expérience sont qualifiées de stress modéré tandis que celles de cette seconde expérience sont qualifiées de stress sévère.

D'un point de vue qualitatif, le climat chaud et sec tend à affecter différemment les mono- et sesqui-terpènes : la proportion de sesquiterpènes est réduite en climat chaud et sec.

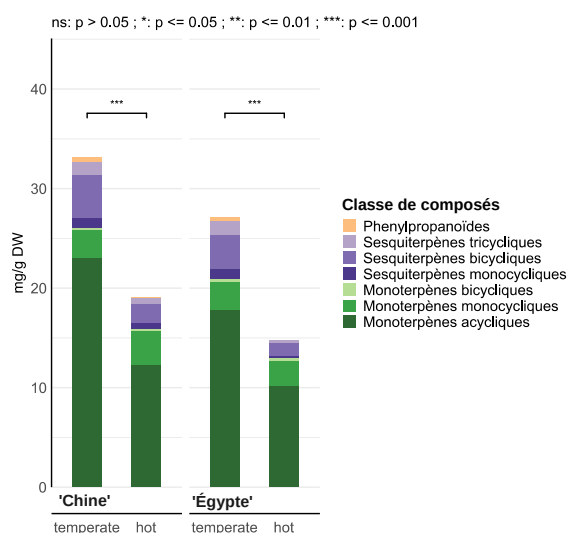


Figure 5.7 | Histogrammes empilés indiquant la quantité et la composition de l'huile essentielle de *pélargoniums* rosat selon les conditions de culture (Exp 2)

La composition correspond aux proportions des différentes catégories de COV. Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon sur les quantités totales par condition. La légende des conditions indiquées en abscisses fait référence aux catégories d'échantillons présentées dans le plan d'expérience (Figure 5.6) : *temperate* : culture en climat tempéré ; *hot* : culture en climat chaud et sec.

3.3 Évaluation de l'effet climat sur la composition de l'huile essentielle

De la même manière que pour la première expérience, les analyses multivariées (RDA, PCA et pls-da) ont été réalisées sur les nouvelles données afin de vérifier l'effet qualitatif du climat. Sur l'ACP, avec des conditions climatiques plus sévères, les profils biochimiques des deux cultivars sont toujours très séparés (Figure 5.8). L'analyse de redondance confirme l'effet très hautement significatif des deux facteurs étudiés : le cultivar et le climat. Ces deux facteurs expliquent 81 % de la variance observée dans nos données. L'effet du cultivar, comme précédemment, est très visible sur l'ACP et atténue l'éloignement des groupes selon le climat. Pour autant, l'effet du climat est bien illustré lorsque l'ACP est réalisée pour chaque cultivar séparément (figures non présentées).

L'analyse des variations de chaque composé, représentée avec des diagrammes en violons, (Supplemental_data 5.5 ; Supplemental_data 5.6) montre que chez le cultivar 'Chine', 75 % des composés (50 sur 67) présentent une concentration significativement différente selon le climat de culture tandis que pour le cultivar 'Égypte', cette valeur atteint 83 % (52 sur 63). Contrairement aux premières analyses en stress modéré, la majorité des composés sont présents en concentrations inférieures et une minorité en concentration supérieure lorsque le climat est chaud et sec. De la même façon que lors de la première expérience, des analyses discriminantes ont été utilisées afin de déterminer les composés les plus explicatifs de ces variations hétérogènes (Figure 5.9).

Chez le cultivar 'Égypte', seulement sept composés ont présenté une concentration plus élevée en climat chaud et sec (Supplemental_data 5.6) et tous ces composés sont retrouvés comme composés discriminants de ce climat. Les composés associés au géraniol et au citronellol sont toujours représentés chez les deux cultivars. De la même manière que lors de la première expérience, les composés discriminants identifiés ne sont pas les mêmes chez les deux cultivars. Parmi les composés en commun, le citronellal se distingue car il n'est pas discriminant du même climat selon le cultivar. En revanche, dans cette expérience, des composés à odeur de menthe (isomenthone et menthol) sont discriminants du climat chaud et sec chez les deux cultivars.

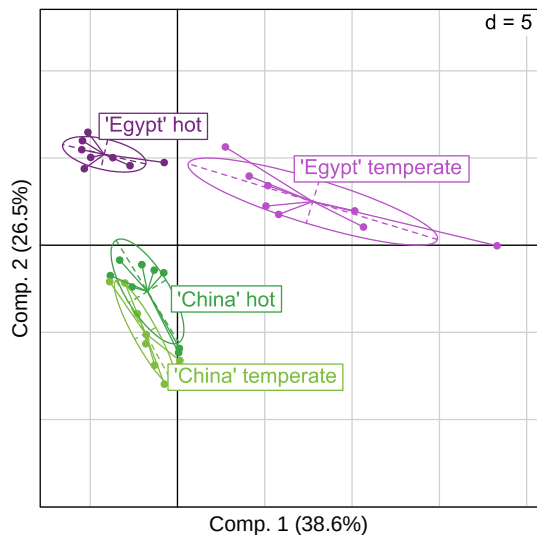


Figure 5.8 | ACP sur l'ensemble des échantillons analysés après deux mois de culture lors de l'Exp 2

La matrice quantitative utilisée regroupe les 79 composés identifiés. Les deux axes utilisés pour la représentation graphique expliquent environ 65 % de la variance. Les ellipses de couleurs regroupent les individus ayant été cultivés dans les mêmes conditions. La valeur statistique des résultats observés est supportée par une analyse RDA. La légende des groupes fait référence aux catégories d'échantillons présentées dans le plan d'expérience (Figure 5.6).

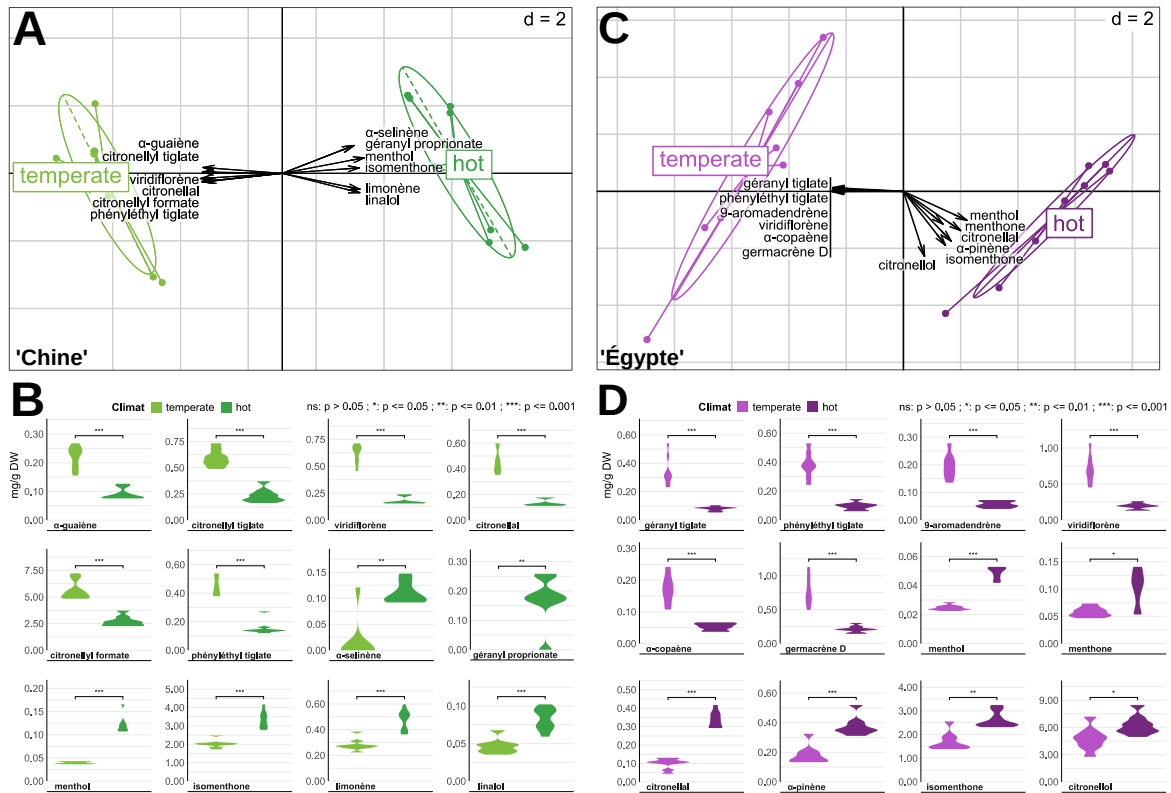


Figure 5.9 | Analyse discriminante (pls-da) des profils biochimiques de l'Exp 2 pour *P. rosat* 'Chine' (A) et *P. rosat* 'Égypte' (C) selon le climat de culture. Diagrammes en violon des composés discriminants de *P. rosat* 'Chine' (B) et *P. rosat* 'Égypte' (D) en climat tempéré ou chaud et sec

Les composés présentés sont ceux identifiés comme les plus explicatifs de l'effet du climat. (A,C) Les données utilisées regroupent l'ensemble des composés identifiés pour chaque échantillon de chaque cultivar. Le sens et la longueur des flèches traduisent le lien de covariance et sa force entre les données et chaque composé. (B,D) Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon.

Finalement, cette seconde étude corrobore nos premières conclusions : le climat de culture influence la composition de l'HE de pélagonium, cette influence est dépendante du cultivar et impacte un grand nombre de composés.

3.4 Effet différentiel du stress climatique sur des composés terpéniques d'une même voie de biosynthèse

Au cours de ces expériences, deux stress climatiques différents ont été étudiés : un stress modéré (Exp 1) et un stress dit sévère (Exp 2) en conditions plus chaudes et sèches. Selon l'intensité du stress appliqué et selon le cultivar, les effets observés sont variables et les composés ne sont pas toujours affectés de la même manière.

Dans les deux conditions de stress étudiées, deux groupes de composés se distinguent parmi les composés discriminants : le géraniol, le citronellal, le citronellol et leurs dérivés d'une part, et le limonène, l'isomenthone et le menthol d'autre part. S'ils forment des groupes, c'est qu'ils sont fréquemment retrouvés au sein d'une même voie de biosynthèse. En effet, il y a d'une part les composés dérivés du géraniol qui sont par ailleurs responsables de l'odeur de rose et d'autre part, les composés mentholés dérivés du limonène.

Afin d'évaluer l'influence particulière du stress climatique sur la biosynthèse de ces deux groupes, les variations des composés impliqués dans leur biosynthèse ont été analysées en détails (Figure 5.10 ; Figure 5.11).

3.5 Effets du climat sur la voie des *p*-menthanes

L'isomenthone, le menthone et le menthol sont des monoterpénoïdes monocycliques très présents dans l'HE de pélargoniums et responsables de ses notes mentholées. L'isomenthone en particulier fait partie des composés principaux. Il représente en moyenne 6 % de l'HE des pélargoniums rosat. Chez *P. rosat* 'Chine' et 'Égypte', l'isomenthone est le quatrième composé majoritaire. Ces trois monoterpénoïdes, très retrouvés chez la menthe, sont produits *via* la voie dite des *p*-menthanes. Chez le pélargonium, leur biosynthèse serait également réalisée à partir du limonène (Bergman *et al.*, 2020). Le limonène est un composé à odeur d'orange, caractéristique des agrumes et lui-même produit à partir du géranyl diphosphate (GPP) *via* une monoterpène synthase (mTPS). Une succession de réactions enzymatiques (hydroxylation, déshydrogénation, réduction), permet ensuite la production d'isomenthone et de menthone, puis de menthol par réduction de la menthone (Bergman *et al.*, 2020 ; Davis *et al.*, 2005 ; Lange, 2015) (Figure 5.10).

Pour l'ensemble des conditions testées, l'isomenthone est toujours le composé de la voie des *p*-menthanes majoritairement présent dans l'HE de pélargonium. Le limonène, la menthone et le menthol étant toujours présents en concentrations largement inférieures. Un stress climatique modéré (*mild stress*) comme sévère (*severe stress*) induit une augmentation de la concentration en isomenthone chez les deux cultivars. En revanche, cette augmentation est discriminante uniquement lors d'un stress sévère. En effet, il a été démontré qu'un stress sévère entraîne une moindre accumulation des terpènes (Figure 5.7). Pourtant, la synthèse d'isomenthone et des autres dérivés du limonène (menthone et menthol) semble être stimulée par une culture en conditions chaudes et sèches.

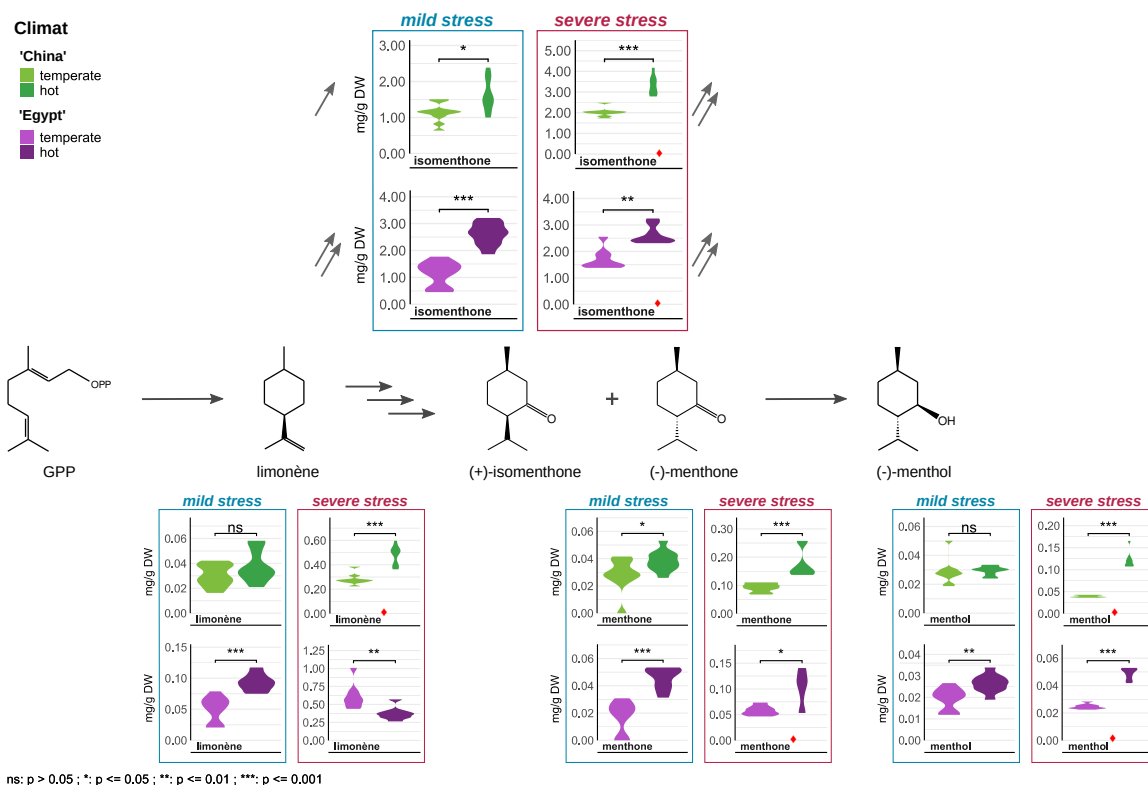


Figure 5.10 | Variations des concentrations des composés de la voie des *p*-menthanes selon les conditions de culture

Schéma de la voie de biosynthèse des *p*-menthanes, d'après Davis *et al.* (2005). La triple flèche correspond à plusieurs étapes enzymatiques successives. Les graphiques en violon des composés sont alignés sur la voie de biosynthèse afin d'observer les variations pour les deux cultivars *P. rosat* 'Chine' (en vert) et 'Égypte' (en violet) et pour les deux stress climatiques testés : stress modéré (*mild stress*, Exp 1) et stress sévère (*severe stress*, Exp 2). Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. Le ♦ indique les composés discriminants identifiés lors des pls-da. Les flèches grises illustrent les variations pour le composé principal : l'isomenthone.

3.6 Effets du climat sur la voie du citronellol

Le géraniol et le citronellol sont deux composés principaux des HE de pélagoniums rosat. Combinés, ils représentent 30 à 40 % de leur HE. Avec le citronellyl formate et le géranyl formate, ils participent à l'odeur de rose de l'HE de pélagonium. Chez le pélagonium, la biosynthèse de géraniol est réalisée à partir de GPP, grâce à une mTPS, la géraniol synthase (Blerot *et al.*, 2018) tandis que la production de citronellol se fait à partir du géraniol (Banthorpe, Long et Pink, 1983), via trois étapes enzymatiques et deux intermédiaires (chapitre 4). Ces intermédiaires, le citral (mélange des isomères néral et géraniol) et le citronellal, sont retrouvés en plus faibles proportions dans l'HE et possèdent une odeur citronnée. Le géraniol comme le citronellol, peuvent être à l'origine de plusieurs dérivés estérifiés, par condensation avec des acides (p. ex. le géranyl formate issu de l'estérification du géraniol par l'acide formique) (Figure 5.11).

Contrairement à la voie des *p*-menthanes, l'effet d'un stress climatique n'affecte pas la voie du citronellol de la même façon d'un cultivar à l'autre. Chez le cultivar 'Chine', un stress climatique modéré entraîne une augmentation de la concentration en citronellol et des autres composés en aval du géraniol tandis qu'un stress sévère entraîne, *a contrario*, une diminution de leur concentration. L'absence de variation significative du géraniol lors d'un stress modéré et son

apparente accumulation lors d'un stress sévère, suggère une régulation de la voie en aval du géraniol et en amont du citral. En ce qui concerne *P. rosat* 'Égypte', un stress modéré entraîne une augmentation de la concentration de l'ensemble des composés de la voie, y compris le géraniol et les géranyls. En revanche, lors d'un stress sévère les concentrations en géraniol et géranyls sont plus faibles alors qu'en aval, le citronellol et le citronellal sont toujours en concentrations plus élevées. Chez le cultivar 'Égypte', la voie de biosynthèse semble être régulée en amont du géraniol. La concentration des composés en aval résulterait alors de l'absence de régulation négative du reste de la voie.

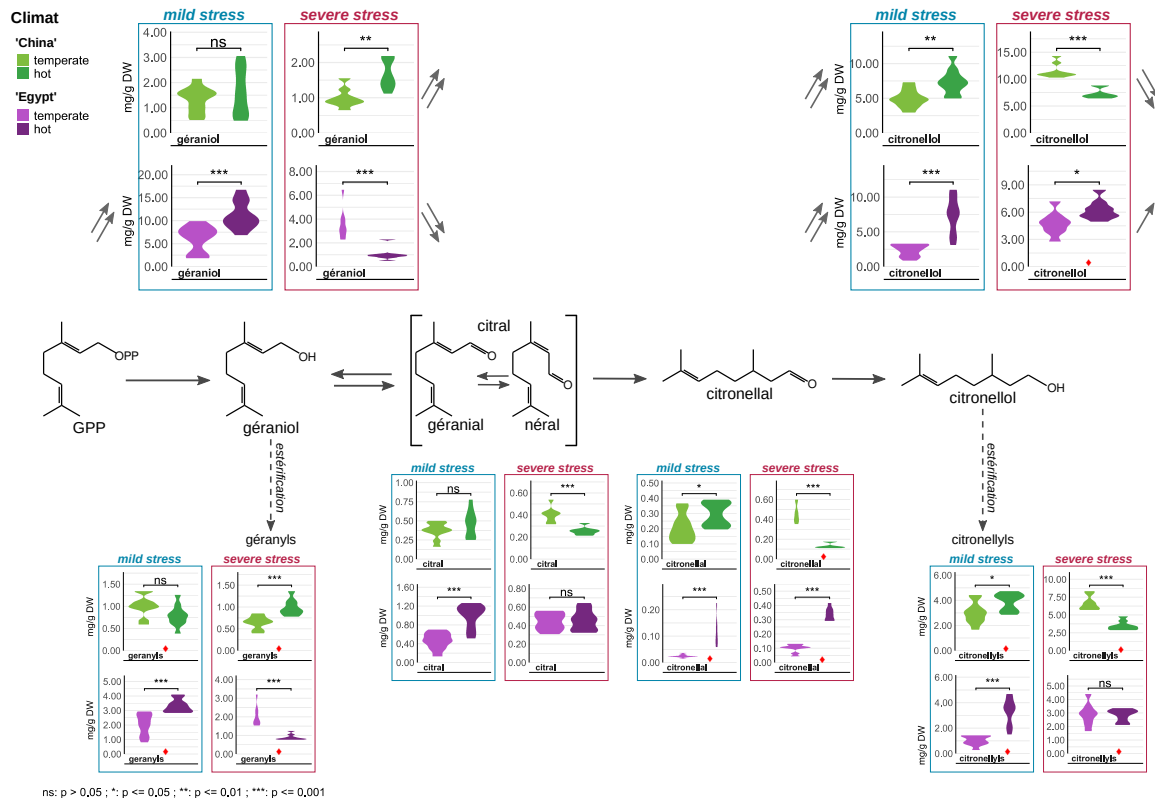


Figure 5.11 | Variations des concentrations des composés de la voie du citronellol selon les conditions de culture

Schéma de la voie de biosynthèse du citronellol. La triple flèche correspond à plusieurs étapes enzymatiques successives. Les graphiques en violon des composés sont alignés sur la voie de biosynthèse afin d'observer les variations pour les deux cultivars *P. rosat* 'Chine' (en vert) et 'Égypte' (en violet) et pour les deux stress climatiques testés : stress modéré (*mild stress*, Exp 1) et stress sévère (*severe stress*, Exp 2). Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. Le ♦ indique qu'il s'agit d'un composé discriminant lors de la pls-da correspondante. Les flèches grises illustrent les variations pour les composés principaux : le géraniol et le citronellol.

Finalement, notre analyse de ces deux expériences indique que selon la température et l'hygrométrie de culture, les *P. rosat* 'Chine' et 'Égypte' produisent des HE quantitativement et qualitativement différentes : en conditions chaudes et sèches, la production de terpènes est stimulée mais un stress plus sévère entraîne l'effet inverse. Quelque soit l'intensité du stress climatique, la voie des *p*-menthanes semblent être stimulée. En effet, en stress modéré les *p*-menthanes sont retrouvés en plus grandes concentrations, comme la majorité des terpènes, et en stress sévère, bien que l'ensemble de la biosynthèse terpénique soit freinée, une augmentation des composés mentholés est observée. En revanche, pour ce qui est des proportions de géraniol et de citronellol, les proportions diffèrent selon les conditions ; les variations de ces composés et la régulation de leur biosynthèse semblent dépendantes du cultivar et de l'intensité du stress. L'analyse des différentiels de concentrations de plusieurs composés, en se basant sur leur appartenance à une même voie de biosynthèse, permet d'estimer leur régulation chez le *pélargonium*.

Il est important de noter qu'il existe des biais techniques et biologiques entre les deux expériences : les deux stress ont été étudiés lors de deux expériences distinctes et les compositions obtenues en climat tempéré diffèrent d'une expérience à l'autre. Les observations présentées sont donc à nuancer.

4 Discussion

4.1 Réponse au stress chez les *pélargoniums*

Soumises à un stress, les plantes présentent de nombreux mécanismes de défense qui s'accompagnent souvent d'une modification des COV produits et émis (Bennett et Wallsgrave, 1994 ; Fürstenberg-Hägg, Zagrobelny et Bak, 2013 ; Loreto et Schnitzler, 2010 ; Mittler, 2006 ; Sharkey, 2005). Chez de nombreuses plantes, cette réponse au stress implique tout particulièrement les terpènes, par modulation de leur production constitutive ou bien par la synthèse *de novo* de certains composés (Fujita *et al.*, 2006 ; Huber *et al.*, 2005 ; Mittler, 2006). Chez les *P. rosat*, même en l'absence de stress, des composés terpéniques sont produits de manière constitutive et en grande quantité. Dans cette étude, l'application des différents traitements n'a démontré aucune synthèse *de novo*.

Un des stress étudiés était l'effet de la défoliation des plants, qui mime l'effet d'une blessure ou d'une attaque par un herbivore (Fürstenberg-Hägg, Zagrobelny et Bak, 2013). Comme chez les aiguilles d'épicéa (*Picea abies*) (Martin, Gershenzon et Bohlmann, 2003), ce stress a entraîné chez *P. rosat* 'Égypte' une augmentation significative de la concentration en mono- et sesqui-terpènes, sans modifier la composition du terpénome. Chez l'épicéa, ces observations ont été réalisées trois jours après un traitement des aiguilles aux jasmonates, des phytohormones connues pour induire des réponses au stress et souvent impliquées dans la modulation du terpénome (Gomi, 2020 ; Ruan *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2016). Dans notre cas, une analyse après deux mois ne permet pas d'évaluer les mécanismes d'induction des défenses à court terme. En revanche, cela nous a permis d'observer qu'à long terme ce stress induit chez *P. rosat* 'Égypte' la formation de nouvelles feuilles

plus chargées en terpènes, vraisemblablement afin de limiter toute nouvelle attaque. Finalement, cette étude peut-être assimilée à une étude de l'effet d'une taille des plants de *pélargoniums*. D'un point de vue agronomique, tailler les *pélargoniums* au cours de leur culture fait partie des pratiques culturales empiriques, irrégulières d'un producteur à l'autre (Blerot *et al.*, 2016). La taille permet de favoriser la pousse de jeunes feuilles, plus chargées en trichomes et en HE que les feuilles plus âgées (Kaul et Rajeswara Rao, 1999 ; Sastry, Krishnan et Radha, 2001 ; Turner, Gershenzon et Croteau, 2000 ; Yoshida et Tamai, 1958) et ainsi d'améliorer le rendement en HE. Comme démontré dans notre étude, selon les cultivars, la taille des *pélargoniums* pourrait également stimuler la production de terpènes lors de la formation des nouvelles feuilles afin d'obtenir des feuilles encore plus riches en HE et de composition inchangée.

Le second stress étudié lors de nos analyses était un stress climatique. Des analyses en conditions contrôlées de l'effet isolé de la température, de l'humidité, de la lumière ou du taux de CO₂ ont permis chez plusieurs espèces d'établir le rôle de ces paramètres abiotiques dans les variations climatiques saisonnières de l'HE (Llusià et Peñuelas, 2000 ; Snow *et al.*, 2003 ; Staudt *et al.*, 2000). Les analyses chez *P. rosat* ont non seulement confirmé un rôle de la température dans les variations saisonnières de leur HE (Doimo *et al.*, 1999 ; Rajeswara Rao *et al.*, 1996) mais celles-ci démontrent également que le climat de leur zone géographique de culture a un effet qualitatif et quantitatif sur l'HE produite (Rajeswara Rao *et al.*, 1990). En effet, les principales HE présentes aujourd'hui sur le marché sont produites à partir de cultivar de *P. rosat* différents et dans des zones géographiques différentes (tel que *P. rosat* 'Chine' cultivé en Chine et *P. rosat* 'Égypte' cultivé en Égypte) (Blerot *et al.*, 2016). Or, ces HE présentent des différences olfactives d'origine méconnue qui sont décisives pour les parfumeurs. Étant donné que les profils terpéniques des deux cultivars sont très distincts lorsqu'ils sont soumis à un même climat, il est fortement probable qu'une composante génétique soit également impliquée dans ces différences olfactives.

4.2 Stress climatique modéré vs stress climatique sévère

Les effets d'un stress sur une plante dépendent de la nature du stress mais également de l'intensité de celui-ci (Niinemets, 2010 ; Sharkey, 2005). Typiquement, un stress thermique impacte l'ouverture des stomates et la photosynthèse ce qui entraîne une réduction de l'assimilation du CO₂ et de l'énergie disponible pour le métabolisme (Copolovici *et al.*, 2012 ; Hüve *et al.*, 2011 ; Salvucci et Crafts-Brandner, 2004 ; Zhang et Sharkey, 2009). Dans le cas d'un stress thermique modéré, le niveau d'impact sur les mécanismes cellulaires est compatible avec une stimulation de la production des COV de défenses. En revanche, un stress sévère entraîne des dommages irréversibles qui s'accompagnent d'une inhibition des voies de biosynthèse des COV (Loreto *et al.*, 2006 ; Niinemets, 2010 ; Pazouki *et al.*, 2016 ; Staudt et Bertin, 1998). Étant donnée que toutes les plantes n'ont pas la même tolérance aux températures basses comme élevées, les paramètres différenciant un stress modéré d'un stress sévère sont intrinsèques à chaque espèce (Bettray et Vömel, 1992 ; Copolovici *et al.*, 2012 ; Loreto *et al.*, 1998). Par exemple, chez le chêne vert (Loreto *et al.*, 1998) l'émission de terpènes est maximale à 35 °C alors qu'elle est inhibée à des températures supérieures.

D'après nos expériences, chez le pélagonium, une culture dans un climat à 18-28°C (18 °C en moyenne la nuit et 28 °C en moyenne le jour) et une humidité relative entre 34-45 % constitue un stress modéré, particulièrement favorable à la production d'HE chez le cultivar 'Égypte'. *A contrario*, dans un climat à 20-33°C et une humidité relative entre 28-42 %, les plants ont subi un stress sévère peu propice à la production d'HE. Néanmoins, soumis à un stress modéré, les teneurs en HE obtenues pour les deux pélagoniums suggèrent une tolérance cultivar-dépendante. Les températures optimales de production pour le *P. rosat* 'Chine' seraient plus basses et non observées dans ces expériences. À l'inverse, le cultivar 'Égypte' serait plus adapté à des conditions chaudes et sèches, voire, les conditions considérées comme un stress modéré ici pourraient en réalité correspondre aux conditions optimales de culture tandis que les conditions dites tempérées constituaient un stress par le « froid ».

4.3 Variations intrinsèques aux voies de biosynthèse des terpènes

Chez le *P. rosat*, les terpènes surproduits lors d'un stress climatique pourraient protéger la plante contre les effets de la température. En effet, ces molécules possèdent des activités thermotolérantes et antioxydantes qui permettent de maintenir l'intégrité des membranes et agir contre le stress oxydatif provoqué (Copolovici *et al.*, 2005 ; Delfine *et al.*, 2000 ; Loreto *et al.*, 1998 ; Munné-Bosch et Alegre, 2003).

Chez le ciste des crêtes, il a été montré qu'une augmentation de la température ou un stress hydrique modéré conduit à une augmentation de l'expression de deux gènes (*DXS* et *HMGR*) codant des enzymes à l'origine de la synthèse d'IPP (isopentényl diphosphate) et de DMAPP (diméthylallyl diphosphate), les précurseurs des terpènes (Pateraki et Kanellis, 2010). La *DXS* (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate réducto-isomérase) est une enzyme clé de la voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP dans les chloroplastes qui permet la synthèse de monoterpènes (communément appelée voie du MEP, pour *methylerythritol 4-phosphate pathway*) (Lois *et al.*, 2000). L'*HMGR* (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase) est quant à elle une enzyme clé de la voie de biosynthèse des mêmes précurseurs dans le cytosol et permet la synthèse de sesquiterpènes (communément appelée voie du MVA, pour *mevalonate pathway*) (Chappell *et al.*, 1995). Une régulation négative des gènes correspondant chez le pélagonium expliquerait l'inhibition de la production terpénique en stress sévère, pour favoriser le maintien du métabolisme primaire essentiel à la plante.

Dans la seconde expérience (Exp 2), l'effet du stress sévère a plus fortement réduit la proportion de sesquiterpènes que celle de monoterpènes (Figure 5.2 ; Figure 5.7). Des observations comparables chez la tomate (Pateraki et Kanellis, 2010) expliquent ce différentiel par une régulation négative moins forte de la voie plastidiale conduisant aux monoterpènes que de la voie cytosolique conduisant aux sesquiterpènes. Cependant, la régulation au niveau de ces enzymes en amont des TPS n'expliquerait pas toutes nos observations : l'effet observé n'est pas le même pour tous les monoterpènes et certains traduisent une régulation positive alors que la majorité indique une régulation négative. En revanche, une régulation ciblée de certaines voies de biosynthèse (en aval du substrat des mTPS, le GPP) expliquerait des variations intrinsèques à certaines voies de

biosynthèse de monoterpènes. La régulation de l'expression des *TPS* en réponse à un stress a déjà été observée et explique la production spécifique de certains composés de défense (Huber *et al.*, 2005 ; Majroomi Senji et Abdollahi Mandoulakani, 2018 ; Pazouki *et al.*, 2016 ; Zhou *et al.*, 2020). Dans notre cas, les variations observées pour l'isomenthone, le géranol et le citronellol en stress sévère s'expliqueraient par une régulation ciblée de la voie des *p*-menthanes et de la voie du citronellol. Leurs variations de concentrations résulteraient alors d'une régulation en amont du GPP limitant la disponibilité en substrat pour l'ensemble des mTPS combinée à une régulation sélective de la géranol synthase et de la limonène synthase. Cela pourrait également s'accompagner d'une régulation de l'expression de gènes ou de l'activité des enzymes impliquées dans les modifications secondaires subséquentes telles que des réductases ou déshydrogénases. Bien entendu, de telles régulations peuvent être également dues à des variations de la disponibilité et de la compétition vis-à-vis des substrats et cofacteurs (Niinemets *et al.*, 2002 ; Rasulov *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les composés terpéniques les plus impliqués dans les réponses au stress climatique s'avèrent également être des molécules dominantes du parfum de l'HE. Selon le climat de culture, l'HE produite pourra présenter une odeur plus mentholée, due à la présence dominante d'isomenthone ou bien une odeur plus proche de l'odeur de rose prisée des parfumeurs, grâce à une proportion prépondérante de géranol et citronellol.

5 Conclusion

Les hybrides de *P. rosat* font partie des producteurs d'HE cultivés de manière très empirique. Beaucoup de différences existent entre les pratiques et conditions de culture utilisées selon les zones géographiques et même selon l'hybride cultivé. L'influence de chaque paramètre sur le métabolisme spécialisé de la plante et sur le parfum de l'HE est mal connue.

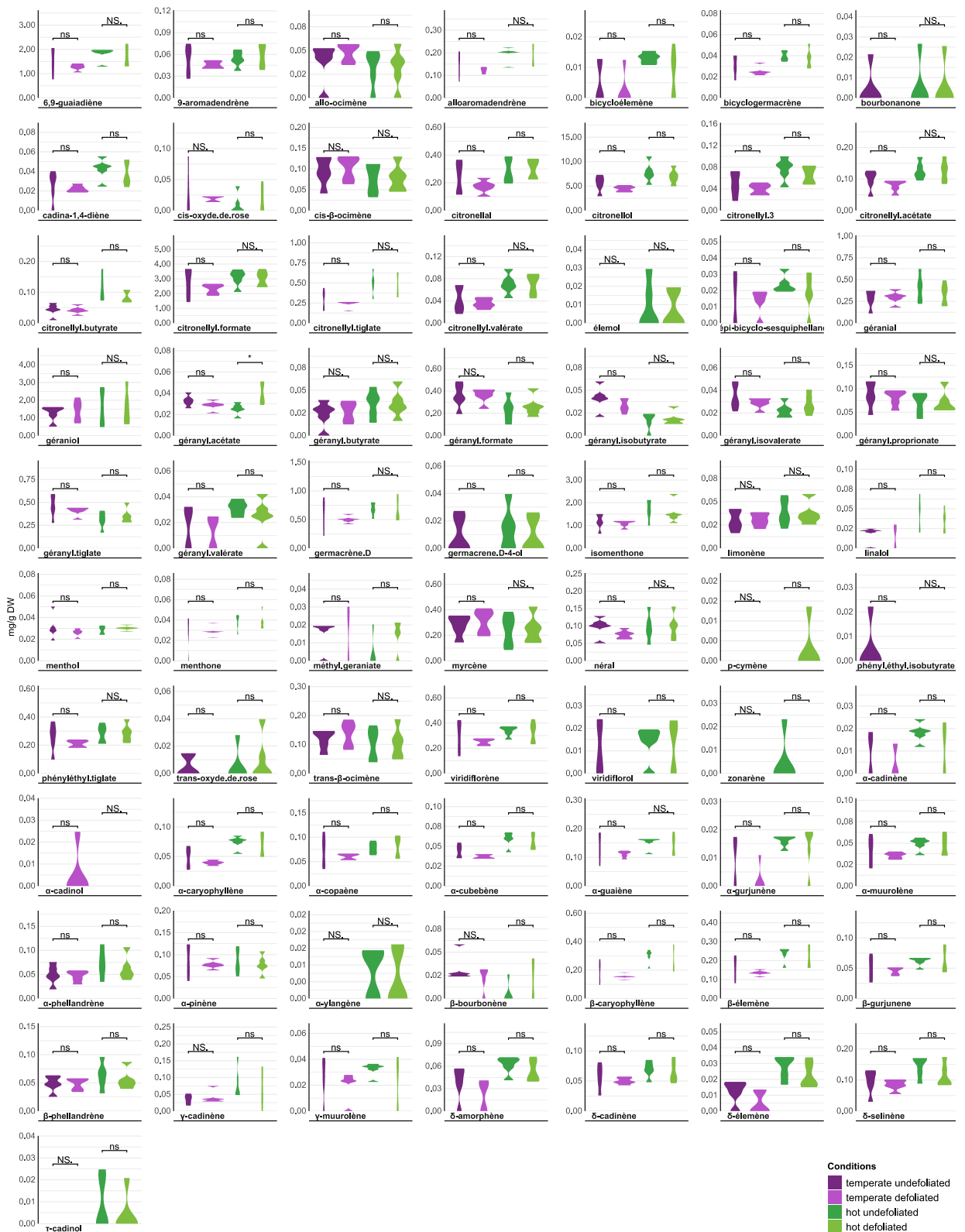
Dans cette étude, nous avons mis en place un protocole permettant d'évaluer l'influence de certains de ces paramètres et notamment l'effet d'un climat chaud et sec. Mieux comprendre le comportement de chaque cultivar de *P. rosat* soumis à différents traitements permet d'estimer les meilleurs couples cultivar-culture (climat et traitement pré-récolte) pour un rendement en HE qualitativement et quantitativement optimal. Par ailleurs, cette approche permet également d'appréhender la régulation des voies de biosynthèse des composés terpéniques chez les *pélargoniums rosat*. Pour une meilleure appréhension de ces mécanismes, des analyses complémentaires de l'expression des différents gènes concernés seraient nécessaires.

Supplemental data



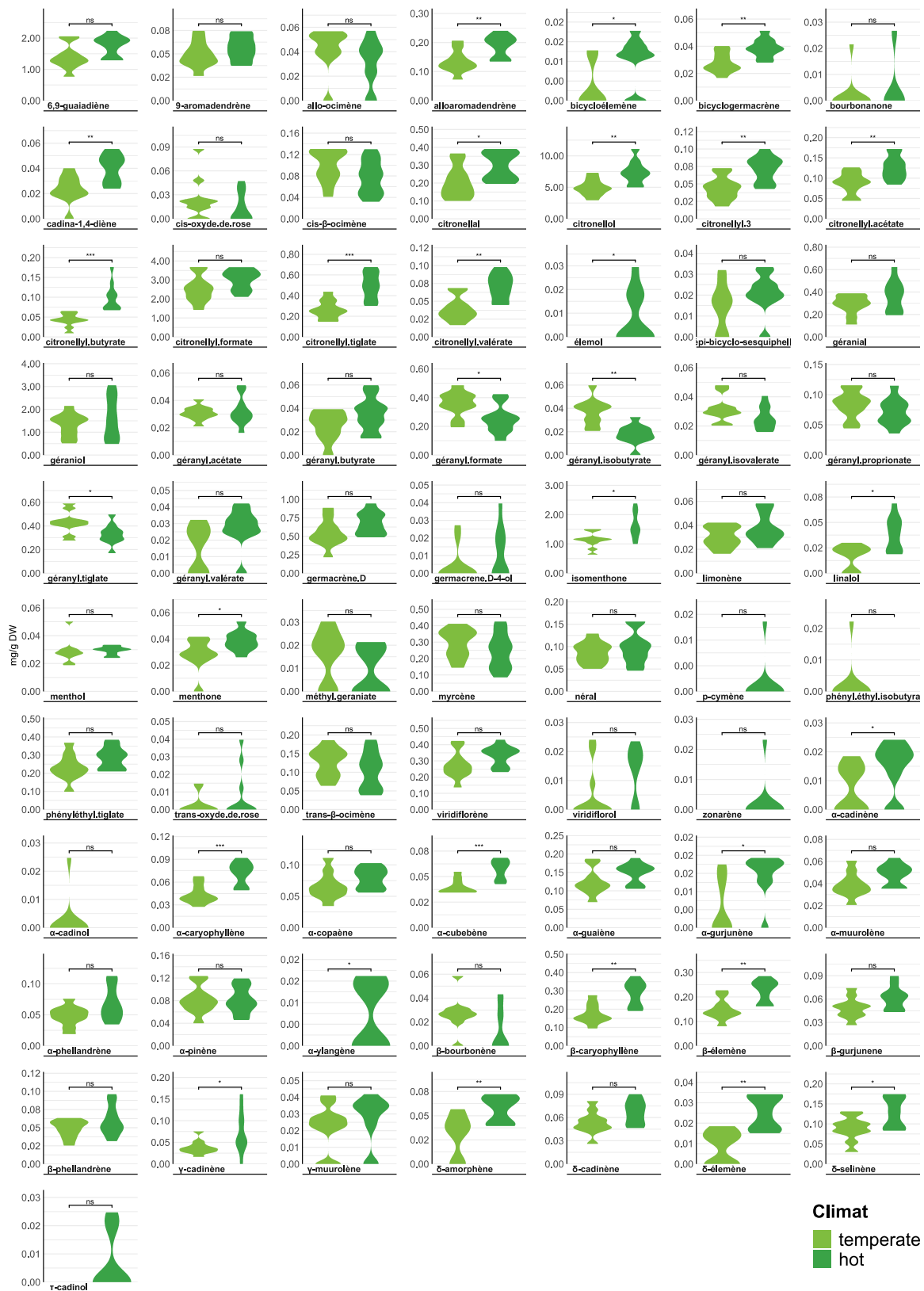
Supplemental_data 5.1 | Analyse de l'effet de la défoliation (Exp 1) : diagrammes en violon pour chaque composés identifiés dans l'HE de *P. rosat* 'Égypte'

Les données présentées sont celles de la première expérience. Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. La légende des conditions indiquées en abscisses fait référence aux catégories d'échantillons présentées dans le plan d'expérience (Figure 5.1). ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.



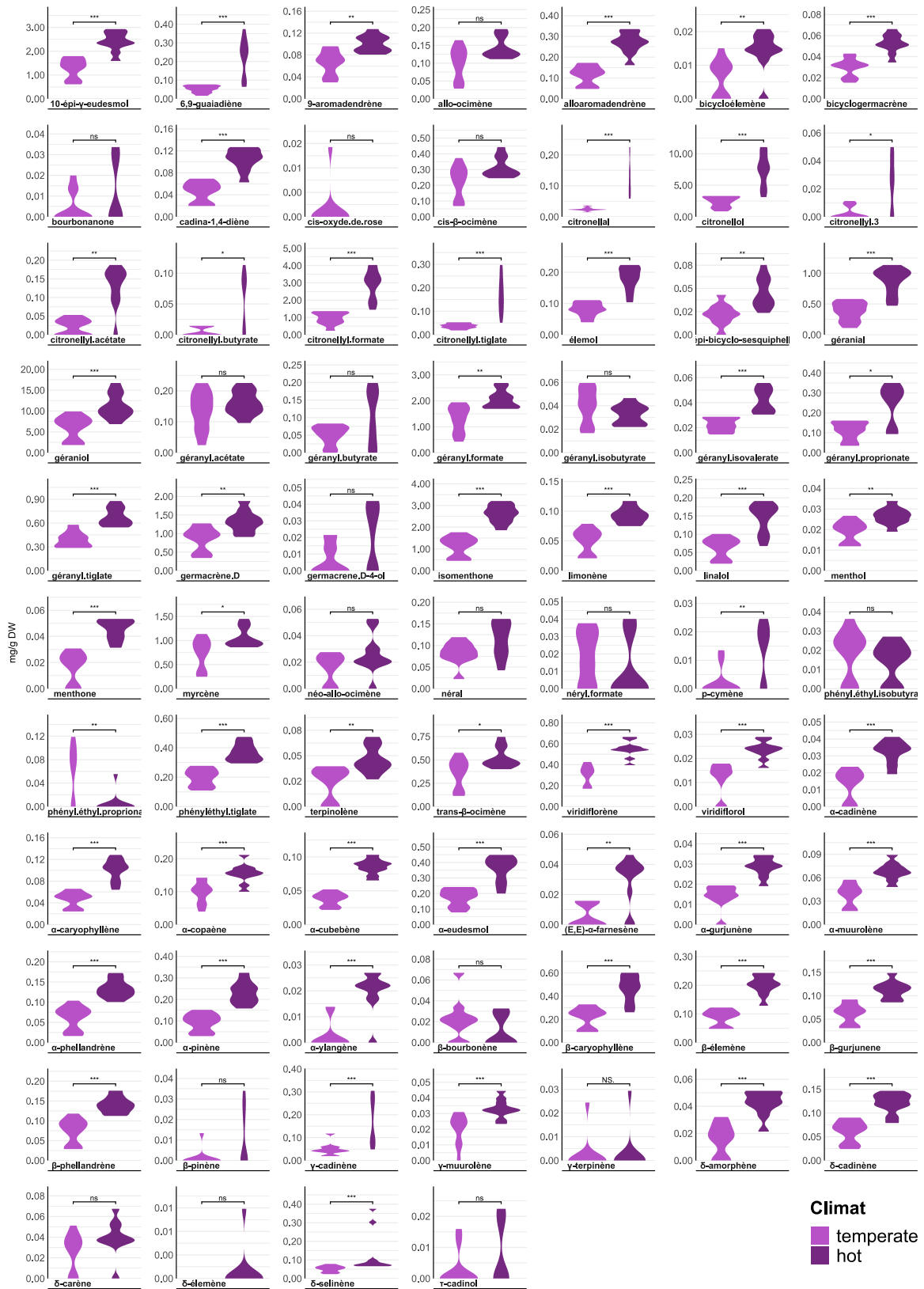
Supplemental_data 5.2 | Analyse de l'effet de la défoliation (Exp 1) : diagrammes en violon pour chaque composés identifiés dans l'HE de *P. rosat* 'Chine'

Les données présentées sont celles de la première expérience. Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. La légende des conditions indiquées en abscisses fait référence aux catégories d'échantillons présentées dans le plan d'expérience (Figure 5.1). ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.



Supplemental data 5.3 | Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de *P. rosat* 'Chine', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 1

Les données présentées sont celles de l'Exp 1 (Figure 5.1, stress modéré). Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.



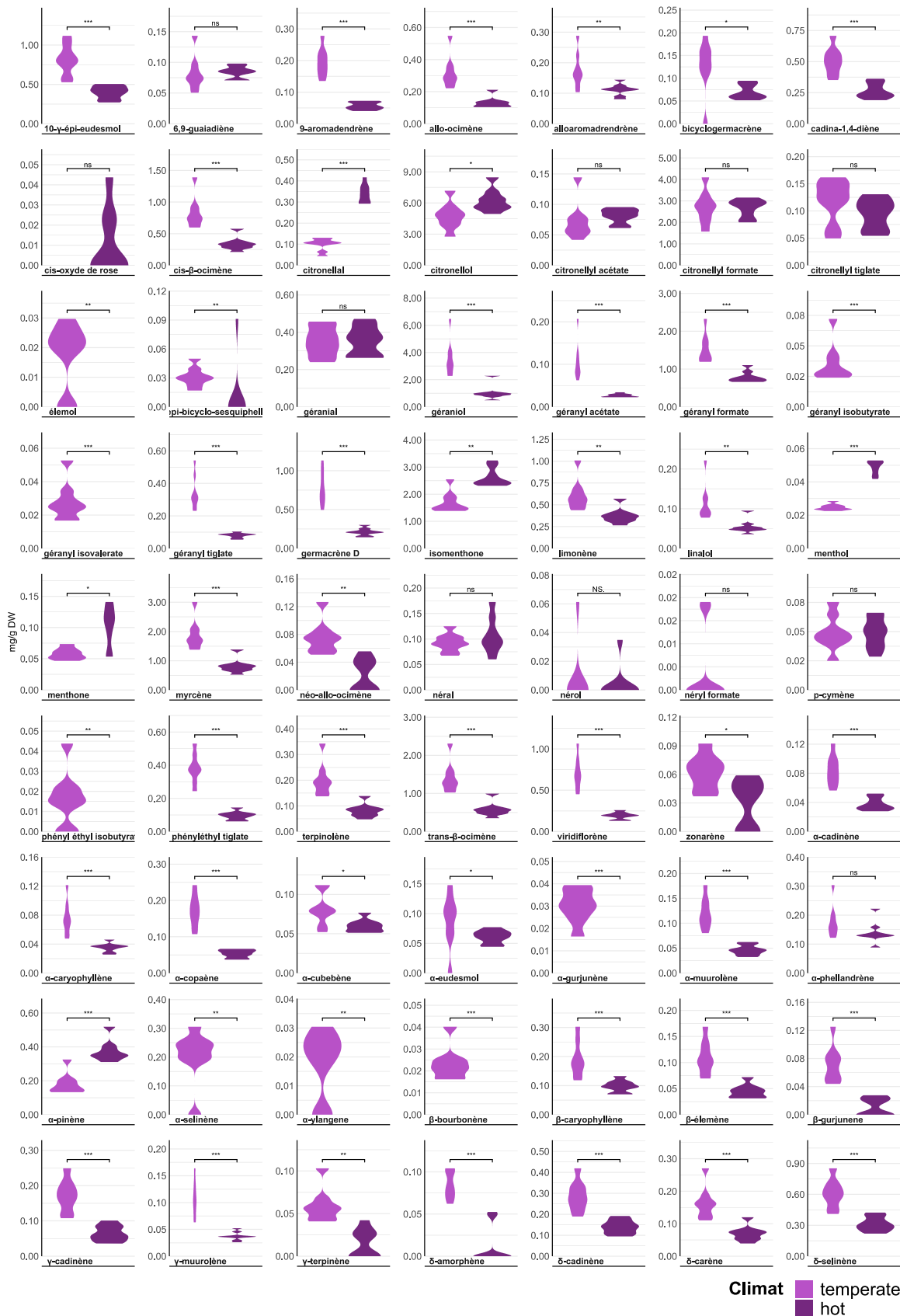
Supplemental_data 5.4 | Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de *P. rosat* 'Égypte', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 1.

Les données présentées sont celles de l'Exp 1 (Figure 5.1, stress modéré). Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.



Supplemental data 5.5 | Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de *P. rosat* 'Chine', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 2

Les données présentées sont celles de l'Exp 2 (Figure 5.6, stress sévère). Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.



Supplemental_data 5.6 | Diagrammes en violon pour les différents composés identifiés dans l'HE de *P. rosat* 'Égypte', dans différentes conditions climatiques de l'Exp 2

Les données présentées sont celles de l'Exp 2 (Figure 5.6, stress sévère). Les quantifications absolues sont exprimées en mg de composés par g de poids sec (DW). Les valeurs statistiques ont été obtenues avec un test de Wilcoxon. ns : $p > 0,05$; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$.

Chapitre 6

Matériel et méthodes

1 Matériel

1.1 Matériel végétal

1.1.1 *Pelargoniums*

La collection de pélargoniums disponible au sein du LBVpam comporte 87 accessions. Cette collection se constitue d'espèces botaniques de *Pelargonium*, d'hybrides et de cultivars odorants et/ou ornementaux. La plupart a pour origine le Conservatoire national du pélargonium de Bourges²¹, le Jardin Botanique du Parc de la Tête d'Or de Lyon²² et la pépinière Heurtebise²³ de Clansayes. Les plants de *P. graveolens* ont été récupérés via l'INRAE d'Angers²⁴. Les hybrides *Pelargonium x hybridum* cv rosat 'Chine', *P. rosat* 'Égypte' et *P. rosat* 'Bourbon' sont cultivés en Chine, en Égypte et à la Réunion respectivement et proviennent directement de boutures des champs cultivés par les partenaires de notre collaborateur IFF-LMR-Naturals. De la même manière, les hybrides *P. rosat* 'Grasse' et *P. x 'Toussaint'* proviennent du partenaire exclusif de IFF-LMR-Naturals, Sébastien Rodriguez, à Grasse. Les pélargoniums de la collection ont été cultivés en serre extérieure, en phytotron ou en chambre de culture au laboratoire, sur le campus Métare de l'Université Jean Monnet.

1.1.2 *Nicotiana benthamiana*

Les expériences de tests enzymatiques *in planta* ont été réalisées sur l'espèce modèle *Nicotiana benthamiana*, par expression transitoire des gènes cibles après infiltration d'*Agrobacterium tumefaciens* transformées. Les plants de tabacs ont été cultivés en chambre de culture, les semis sont renouvelés à partir des graines de plants non utilisés.

1.2 Souches

Les souches bactériennes utilisées dans ces travaux sont des souches de génie génétique pour la production de cellules compétentes et leurs transformations lors de clonage de gènes.

1.2.1 *Escherichia coli*

Deux souches d'*E. coli* ont été utilisées pour les expériences présentées. La souche *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen, cat. #C4040-50) a été utilisée lors du clonage des gènes afin de multiplier les vecteurs recombinants, vérifier les constructions par séquençage et les conserver. La souche *E. coli* Rosetta™ DE3pLysS (Merck, cat. #709563) est une souche d'expression utilisée pour les surexpressions de protéines recombinantes. Cette souche possède un plasmide qui permet la production d'ARNt correspondant à des codons rarement retrouvés chez les bactéries et fréquents chez les eucaryotes (et donc les plantes). La présence de ce plasmide, qui apporte également une résistance au chloramphénicol, assure la bonne production de protéines

21 Conservatoire national du pélargonium – Domaine Horticole de Bourges, 40 Chemin de Tortiot – 18000 Bourges (FR)

22 Jardin Botanique du Parc de la Tête d'Or – Place Général Leclerc – 69006 Lyon (FR)

23 Pépinière Heurtebise – 67 Chemin Morin – 26130 Clansayes (FR)

24 Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement – IRHS, Agrocampus-Ouest, INRAE, Université d'Angers – 42 rue Georges Morel – 49071 Beaucouzé (FR)

recombinantes eucaryotes. La surexpression protéique est réalisée par induction à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) grâce à la présence du gène codant l'ARN polymérase T7 sous contrôle du promoteur lacUV5).

1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* WATT11 a été utilisée pour la caractérisation des TPS dans des levures. Elle est dérivée de la souche W3030-B (*MAT a*; *ade 2-1*; *his 3-11, -15*; *leu 2-3, 112*; *ura 3-1*; *can^R*; *cyr⁺*) conçue initialement pour l'expression de cytochrome P450 de plantes (Höfer *et al.*, 2014 ; Masimirembwa *et al.*, 1999 ; Pompon *et al.*, 1996).

1.2.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Les souches d'*A. tumefaciens* ont été utilisées pour l'étude de protéines recombinantes *in planta*. Les souches C58pMP90 et LBA4404 (Invitrogen, cat. #18313-015) présentées dans le Tableau 6.1, ont permis la transformation de cellules végétales et ont été utilisées pour la transformation transitoire de *N. benthamiana*. Les deux souches possèdent un gène de sélection par antibiotique, en l'occurrence celui de la résistance à la rifampicine.

Tableau 6.1 | Description des souches bactériennes utilisées

Souche	Fournisseur	Génotype	Résistance
<i>Escherichia coli</i>			
One Shot® TOP10	Invitrogen, cat. #C4040-50	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str R) endA1 nupG</i>	streptomycine / kanamycine
Rosetta™ (DE3pLysS)	Merck, cat. #709563	<i>F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (CamR)</i>	chloramphénicol
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
C58pMP90	NA	(Koncz et Schell, 1986)	rifampicine
LBA4404	Invitrogen, cat. #18313-015	<i>Ach5 (rif r) Ti pAL4404 (strepr) Octopine</i>	rifampicine

1.3 Vecteurs

1.3.1 Vecteurs de multiplication, de séquençage et de conservation des gènes

La multiplication des gènes d'intérêt, leur séquençage et leur conservation ont été réalisés grâce à deux vecteurs : pGEM®-T Easy Vector (Promega, cat. #A1360) et pCR® Blunt (Invitrogen, cat. #K2750-20).

Le vecteur pGEM®-T Easy Vector (Figure 6.1A) permet le clonage A-T de fragments d'ADN obtenus suite à une PCR (de l'anglais *Polymerase Chain Reaction*) en présence d'une Taq ADN polymérase (DreamTaq® ou Advantage2®). Le vecteur présente un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r) pour la sélection des clones porteurs du vecteur après transformation. Le site de polyclonage situé au sein du gène *lacZ* (codant la β -galactosidase) permet, en présence de X-gal, une sélection blanc-bleu des clones ayant intégrés le vecteur avec insert. La ligature de l'insert inhibe la production de β -galactosidase, empêche le clivage du X-gal et donc la production de pigment bleu.

Le vecteur pCR® Blunt (Figure 6.1B) permet quant à lui le clonage de fragments d'ADN aux extrémités franches. Le vecteur contient un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection des clones porteurs du vecteur après transformation. Le site de polyclonage est situé au sein du gène *lacZα*. Celui-ci est fusionné en partie C-terminale au gène *ccdB*, codant la protéine létale *ccdB*. La ligature de l'insert perturbe l'expression du gène *lacZα-ccdB* et permet la croissance uniquement des clones ayant intégrés le vecteur avec insert.

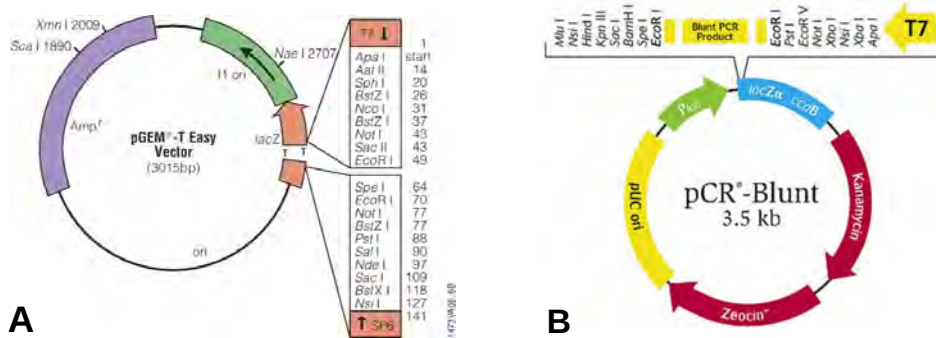


Figure 6.1 | (A) Carte du vecteur de clonage pGEM®-T Easy ; (B) Carte du vecteur de clonage pCR® Blunt

1.3.2 Vecteurs d'entrée pour les recombinaisons Gateway®

Le vecteur pENTR™ / D-TOPO® (Invitrogen, cat. #K2400-20) (Figure 6.2A) a essentiellement été utilisé comme vecteur d'entrée pour les recombinaisons Gateway® (Landy, 1989). Il permet le clonage directionnel de fragments flanqués en 5' du motif nucléotidique CACC, apporté par l'amorce d'amplification. Le vecteur présente un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection des clones porteurs du vecteur après transformation. Les séquences *attL* sont les bornes de recombinaison du système Gateway®.

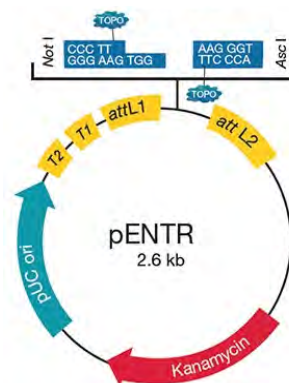


Figure 6.2 | Carte du vecteur d'entrée pENTR™ /D-TOPO®

1.3.3 Vecteurs d'expression bactériens

La surexpression de protéines recombinantes en système bactérien a été réalisée dans les vecteurs de destination Gateway® (Landy, 1989) pHGWA, pHGGWA, pHMGWA, pHNGWA et pHXGWA (Busso, Delagoutte-Busso et Moras, 2005). Ces vecteurs (Figure 6.3) sont issus du vecteur pET22b (Novagen) et possèdent le gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*) ainsi que la cassette Gateway® nécessaire à la recombinaison LR. Celle-ci se compose des séquences *attR* et du gène *ccdB* au niveau du site d'insertion. Les vecteurs se distinguent par leur(s) différente(s)

étiquette(s) à l'extrémité N-terminale (N-ter). Tous présentent également en N-ter l'étiquette poly-histidine (6x His, Figure 6.3) conduisant à la production d'une protéine recombinante « taguée » qui pourra être purifiée sur résine d'affinité. La surexpression en tant que telle provient de la régulation de l'expression du gène d'intérêt par le promoteur fort T7.

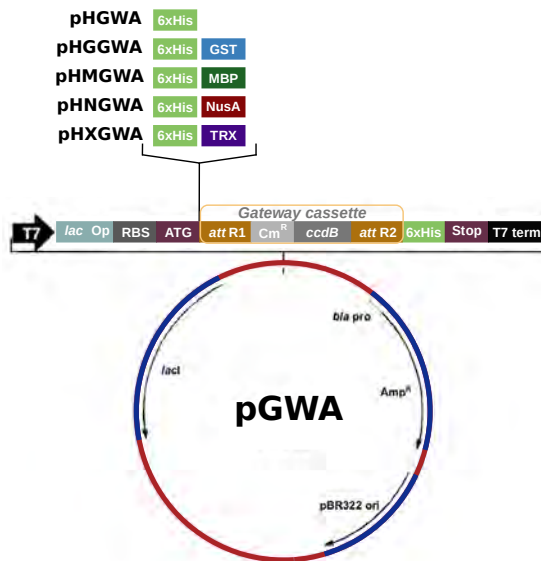


Figure 6.3 | Vecteur de destination pGWA et dérivés (d'après Busso *et al.*, 2005)

GST : glutathione S-transférase ; 6xHis : 6 histidines tag ; MBP : Maltose binding protein ; NusA : N-utilizing substance A ; TRX : thioredoxin.

1.3.4 Vecteurs d'expression en levures

La surexpression des protéines recombinantes en levures a été réalisée dans le vecteur d'expression pYeDP60u2. Ce vecteur fait partie de la série des pYeDP (Pompon *et al.*, 1996) et contient les marqueurs de sélection *URA3* (nécessaire pour une croissance en milieu non supplémenté en uracile ou uridine) et *ADE2* (nécessaire pour la complémentation en adénine du milieu de culture) pour la sélection des levures porteuses du vecteur. Le vecteur contient également des sites de restriction *BamHI* et *EcoRI* pour la linéarisation du plasmide, un promoteur *pGAL* (*GAL10-CYC1*) qui permet une induction au galactose de l'expression du gène d'intérêt et un terminateur tPGK (Figure 6.4). Le vecteur pYEDP60u2 a été optimisé afin d'être compatible avec la technique de clonage par la technique USER™ (*uracil-specific excision reagent*). Cela permet un clonage directionnel et direct dans un vecteur d'expression en système hétérologue.

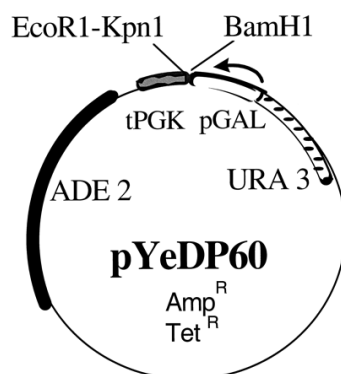


Figure 6.4 | Carte du vecteur pYEDP60, d'après Masimirembwa *et al.* (1999)

1.3.5 Vecteurs d'expression *in planta*

La production de protéines recombinantes *in planta* a été réalisée grâce aux vecteurs d'expression Gateway® pK7WG2D, pMDC32 et pMDC83. Ces vecteurs utilisent le système de clonage Gateway® et miment le fonctionnement des plasmides Ti grâce à une séquence d'ADN de transfert (ADN-T) délimitée par les bornes LR et BP (visibles sur la Figure 6.5 et Figure 6.6) qui permet l'intégration du gène d'intérêt au génome nucléaire des cellules végétales, après transformation par *A. tumefaciens*.

Le vecteur pK7WG2D (Karimi, Inzé et Depicker, 2002) est un vecteur de destination du système de recombinaison Gateway® construit à partir du vecteur pZP200 (Hajdukiewicz, Svab et Maliga, 1994). Il présente le gène de résistance à la streptomycine et le gène *ccdB* pour la sélection des clones porteurs du vecteur avec insert, ainsi que le gène de résistance à la kanamycine au sein de la cassette d'ADN-T, pour la sélection des explants transformés. L'expression du gène d'intérêt est sous contrôle d'un promoteur simple 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (*CaMV*, de l'anglais *Cauliflower Mosaic Virus*). Le vecteur présente également une cassette de gène marqueur permettant une visualisation précoce des cals transgéniques. Elle se compose d'un promoteur *rolD* fusionné à la séquence *Egfp* codant la GFP (*green-fluorescent protein*) liée à une séquence d'adressage au réticulum endoplasmique (Figure 6.5).

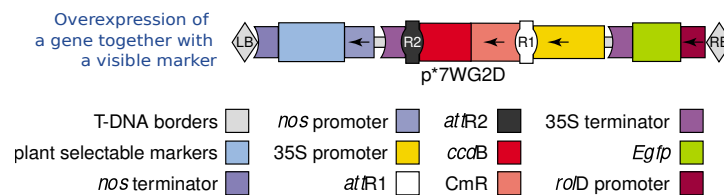


Figure 6.5 | Carte de la cassette d'ADN-T du vecteur d'expression *in planta* pK7WG2D (d'après Karimi *et al.*, 2002)

Les vecteurs pMDC32 et pMDC83 (Figure 6.6) dérivent de la série de vecteurs pCambia (Curtis et Grossniklaus, 2003). Ils présentent tous deux le gène de résistance à la kanamycine et le gène *ccdB*, pour la sélection des clones porteurs du vecteur avec insert ainsi que le gène de la résistance à l'hygromycine au sein de la cassette d'ADN-T, pour la sélection des explants transformés. Ici, l'expression du gène d'intérêt est sous contrôle du promoteur double 35S. À la différence de pMDC32, le vecteur pMDC83 possède le gène *gfp6his* codant la GFP taguée du polypeptide hexahistidine. Celui-ci est fusionné au gène d'intérêt et permet la production d'une protéine cible fusionnée en extrémité C-terminale (C-ter) à la GFP. L'intégration du gène d'intérêt se réalise après recombinaison Gateway® LR. Les vecteurs pK7WG2D et pMDC32 ont été utilisés pour la caractérisation fonctionnelle ou la surexpression d'une protéine d'intérêt *in planta*. Le vecteur pMDC83, a permis l'étude de la localisation subcellulaire par expression transitoire du gène *in planta*.

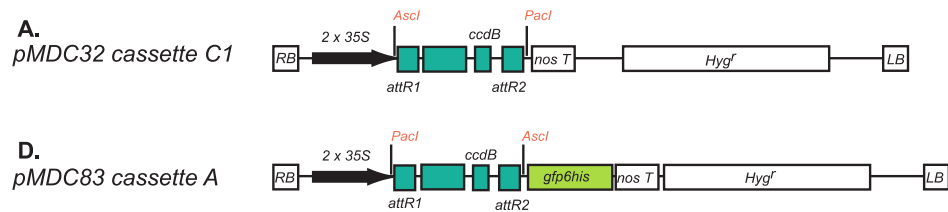


Figure 6.6 | Carte de la cassette d'ADN-T des vecteurs d'expression *in planta* pMDC32 et pMDC83 (d'après Curtis et Grossniklaus, 2003)

2 Biologie moléculaire

2.1 Extraction d'acides nucléiques

2.1.1 Extraction d'ADNg

Les extractions d'ADN génomique (ADNg) ont été réalisées à l'aide du kit « Genomic DNA from Plant » NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, cat. #740770), à partir de jeunes feuilles (< 2,5 cm) de pélargoniums et selon les recommandations du fournisseur, avec des modifications mineures. Les échantillons sont homogénéisés par broyage automatique avec le Mixer Mill MM 400 (Retsch) : les feuilles congelées sont soumises à deux broyages de 30 s à 30 Hz, en présence de deux billes d'acier pré-refroidies.

Après extraction, la qualité des extraits et la quantité d'acides nucléiques extraits ont été évaluées à l'aide d'un Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific). Les extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.1.2 Extraction d'ARN

Les extractions d'ARN totaux de pélargonium ont été réalisées selon une version modifiée du protocole proposé par Chang, Puryear et Cairney (1993) et Cock, Swarup et Dumas (1997). Les échantillons de 50 mg de jeunes feuilles (de taille inférieure à 2,5 cm) de pélargoniums ont été congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80 °C avant extraction. Les feuilles congelées ont été soumises à deux broyages de 30 s à 30 Hz, en présence de deux billes d'acier pré-refroidies et à l'aide du broyeur Mixer Mill MM 400 (Retsch). La poudre obtenue a été dissoute dans 5 mL de tampon d'extraction (2 % (w/v) PVP ; 2 % (w/v) CTAB ; 100 mM Tris-HCl pH 8 ; 25 mM EDTA pH 8 ; 2 M NaCl) et 100 µL de β-mercaptoéthanol. Après homogénéisation, les échantillons ont été incubés 15 min au bain-marie à 65 °C, puis 1 min à température ambiante. Une première extraction volume pour volume au chloroforme:alcool isoamylique (24:1) a été réalisée. Le surnageant (phase aqueuse) a été récupéré par centrifugation à 9000 g pendant 20 min à 4 °C et séparé en aliquots de 500 µL. Une seconde extraction volume pour volume a été réalisée. Les phases aqueuses récupérées ont été mélangées puis redistribuées afin d'ajouter 250 µL de chlorure de lithium à 2 M par millilitre d'extrait. Une incubation de 24 h à 4 °C a permis la précipitation des ARN, qui ont ensuite été récupérés par centrifugation à 19000 g pendant 1 h 30 min à 4 °C. Les culots obtenus ont été nettoyés deux fois à l'éthanol 70 % à -20 °C, séchés à l'air puis repris dans 25 µL d'eau stérile et 500 µL de tampon SSTE (1 M NaCl ; 0,5 % (w/v) SDS ; 10 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA ; pH 8). Les échantillons ont ensuite été extraits par un volume de chloroforme:alcool

isoamylique (24:1). Après centrifugation à 19000 g pendant 10 min à 4 °C et récupération des phases aqueuses, une nouvelle précipitation des ARN a été réalisée par ajout de 1 mL d'éthanol 100 % et 150 µL d'acétate de sodium à 3 M à pH 5,7 suivi d'une incubation sur la nuit à -20 °C. Enfin, les ARN ont été récupérés par centrifugation à 19000 g pendant 30 min à 4 °C. Les culots ont été nettoyés deux fois à l'éthanol 70 % à -20 °C puis séchés avant d'être repris dans 2 x 30 µL d'eau pure.

Après extraction, la qualité des extraits et la quantité des acides nucléiques extraits ont été évaluées à l'aide d'un Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific). Les extraits ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.1.3 Extraction d'ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidique ont été réalisées à l'aide du kit « Plasmid DNA Purification » NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, cat. #740588), à partir de précultures bactériennes réalisées en milieu Luria-Bertoni (LB) complété des antibiotiques adéquats et selon les recommandations du fournisseur, avec des modifications mineures.

Après extraction, la qualité des extraits et la quantité d'acides nucléiques extraits ont été évaluées à l'aide d'un Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific). Les constructions ont été vérifiées par séquençage et les extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2 Vérification de la qualité des ARN et obtention d'ADN complémentaires

2.2.1 Traitement à l'ADNase

Après extraction des ARN totaux, un traitement est nécessaire afin d'éliminer l'ADN résiduel. Pour cela, un traitement des échantillons en présence d'une désoxyribonucléase (ADNase) a été effectué à l'aide de la « RQ1 RNase-Free Dnase » (Promega, cat. #M6101). Un mix réactionnel de volume final 100 µL a été préparé pour chaque réaction et contenait 20 µg d'ARN non traités, du tampon RQ1 à 1X, 20 U de RQ1 RNase-free DNase et 80 U d'inhibiteur de RNase (RNAsin, Promega, cat. #N251A). Après 1 h d'incubation à 37 °C, les échantillons ont été nettoyés trois fois au phénol-chloroforme-AIA (25:24:1) et la phase aqueuse a été récupérée. Les ARN ont ensuite été précipités par ajout de 30 µL d'acétate de sodium à 3 M pH 5,7 et 900 µL d'éthanol 100 % puis incubés sur la nuit à -80 °C. Enfin, les ARN ont été récupérés par centrifugation à 19000 g pendant 30 min à 4 °C. Les culots ont été nettoyés deux fois à l'éthanol 70 % à -20 °C puis séchés avant d'être repris dans 30 µL d'eau pure.

Après extraction, la qualité des extraits et la quantité d'acides nucléiques extraits ont été évaluées à l'aide d'un Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific) et les extraits ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2.2 Vérification de la qualité des ARN

La qualité et la pureté des échantillons avant et après traitement à l'ADNase ont été vérifiées par migration des ARN sur gel d'électrophorèse et par PCR réalisée directement sur les ARN : l'absence d'amplification confirme l'absence de matrice ADN. Pour une vérification plus précise, tous les échantillons d'ARN ont été validés à l'aide de l'« Experion™ Automated Electrophoresis Station » (Biorad) du GIMAP²⁵. L'analyse sur Experion™ produit à la fois une analyse par électrophorèse automatisée ainsi qu'une analyse de chaque échantillon par détection de fluorescence permettant d'obtenir, pour chaque échantillon, la concentration, la valeur du ratio [28S:18S] et l'indice de qualité des ARN (RQI, de l'anglais *RNA Quality Index*, compris entre 1 et 10). La qualité des échantillons est validée lorsque le RQI est supérieur à 7. La qualité des ARN utilisés pour le séquençage à haut débit (RNAseq) a été également vérifiée à la réception des échantillons par la plateforme de séquençage : un RIN (de l'anglais *RNA integrity number*, compris entre 1 et 10) supérieur à 6,5 détermine une qualité suffisante pour le séquençage.

2.2.3 Obtention d'ADN complémentaire par rétrotranscription

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été obtenus par rétrotranscription (RT) à partir des extraits d'ARN totaux à l'aide du kit « iScript™ Reverse Transcriptase Supermix for RT-qPCR » (Biorad, cat. #1708840) et selon les recommandations du fournisseur. Les RT ont été réalisées à partir de 800 ng d'ARN totaux dans 20 µL de volume final et en duplicata, afin de limiter les variations liées à cette étape.

2.3 Amplification de l'ADN

2.3.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification de fragments d'ADN destinés aux constructions ou à un séquençage s'effectue à l'aide d'une ADN polymérase pourvue d'une activité « proof-reading », avec le kit « Phusion® HF DNA Polymerase » (BioLabs, cat. #F-530S). Le mix réactionnel de volume final 50 µL contient 1X de Phusion® HF Buffer, 200 µM de chaque dNTP (désoxyribonucléoside triphosphate), 1 U de Phusion DNA Polymerase, 0,5 µM de chaque amorce spécifique et 2 µL d'ADNc dilué au 5^e. La réaction d'amplification est réalisée à l'aide du thermocycleur MyCycler™ (Biorad) et selon le programme suivant : 30 s de dénaturation à 98 °C suivi de 30 cycles composés d'une dénaturation de 10 s à 98 °C, d'une hybridation de 30 s à environ 5 °C en dessous de la température de fusion des oligonucléotides (T_m) et d'une amplification à 72 °C pendant 30 à 45 s (selon la taille du fragment à amplifier) et enfin de 5 min d'élongation finale à 72 °C.

Les amplifications par PCR de contrôle – tel que les criblages de colonies transformées – ne nécessitant pas la haute fidélité d'amplification apportée par l'activité « proof-reading » de l'enzyme, elles ont été réalisées avec le kit « DreamTaq™ Hot Start DNA Polymerase » (ThermoFisher, cat. #EP0702). Le mix réactionnel de volume final 25 µL contient 1X de DreamTaq™ Green Buffer, 200 µM de chaque dNTP, 1 U de DreamTaq™ DNA Polymerase, 0,4 µM de chaque amorce

²⁵ GIMAP pour Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes – Faculté de Médecine de l'Université Jean Monnet – Lyon-Saint-Étienne

spécifique et 2 μL de matrice ADN. La réaction d'amplification est réalisée à l'aide du thermocycleur MyCycler™ (Biorad) et selon le programme suivant : 2 min de dénaturation à 95 °C suivi de 35 cycles composés d'une dénaturation de 30 s à 95 °C, d'une hybridation de 30 s à environ 5 °C en dessous de la température de fusion des oligonucléotides (T_m) et d'une amplification à 72 °C pendant 1-2 min (selon la taille du fragment à amplifier) et enfin de 5 min d'amplification à 72 °C.

Les amorces utilisées pour les différentes constructions sont listées dans les chapitres correspondants.

2.3.2 Visualisation des acides nucléiques sur gel d'électrophorèse

L'analyse des produits issus de PCR a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8-1,5 % en fonction de la taille du ou des fragments d'ADN attendus, dans du Tris-acétate-EDTA (TAE) 1X et coloration au bromure d'éthidium (BET) par ajout direct dans le gel. La visualisation s'est faite par observation sous lumière UV. Les marqueurs de taille « BenchTop 100 bp DNA ladder » et le « BenchTop 1 kb DNA ladder » (Promega, cat. #G829B et #G754A) ont été utilisés. Les produits PCR ont été déposés avec du tampon de charge « Blue/orange 6X loading Dye » (Promega, cat. #G190A), excepté pour les produits issus de PCR en présence du tampon DreamTaq™ Green Buffer.

Après migration, les fragments d'ADN d'intérêt ont été purifiés à l'aide du kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel, cat. #740609) selon les recommandations du fournisseur.

2.3.3 Marche génomique

L'obtention des extrémités 5' et/ou 3' des gènes incomplets a été effectuée par marche génomique à l'aide du kit « GenomeWalker™ Universal Kit » (Clontech, cat. 638904). La banque d'ADNg a été réalisée à partir d'ADNg extrait de *P. rosat* 'Grasse'. Les deux PCR successives (PCR et Nested-PCR) ont été réalisées avec l'« Advantage® 2 Polymerase Mix » (Clontech, cat. #639201) selon les recommandations du fournisseur.

2.3.4 PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Le taux d'expression des gènes d'intérêt a été étudié par PCR quantitative en temps réel (RT-PCR quantitative ou RT-qPCR) avec le système de détection en temps réel « CFX96™ Touch System » (Biorad). Les conditions optimales de la réaction de qPCR ont été déterminées à l'aide du protocole du fournisseur (Biorad, cat. #172-5270). De manière générale, les analyses par qPCR ont été effectuées en duplicata. Les qPCR ont été réalisées à partir des ADNc obtenus par rétrotranscription des ARN purifiés et vérifiés. Les réactions ont été réalisées à l'aide du kit « SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix » (Biorad, cat. #172-5270) selon les recommandations du fournisseur : volume final de 20 μL , contenant 1X de mix SsoAdvanced universal SYBR® Green supermix, 500 nM de chaque amorces et 2 μL d'ADNc dilués au 25^e. Le cycle de qPCR en deux étapes comprend une dénaturation initiale de 30 s à 95 °C suivie de 40 cycles de 5 s de dénaturation à 95 °C et d'une étape d'hybridation et de synthèse de 30 s à T_m

des amorces du gène étudié au cours de laquelle la fluorescence est mesurée (cf. Table des amorces dans les chapitres correspondants). Après les 40 cycles, une courbe de fusion a été réalisée avec une mesure de la fluorescence tous les 0,5 °C au cours d'un gradient allant de 65 °C à 95 °C. Cette analyse permet de vérifier la spécificité de l'amplification.

Les analyses ont été réalisées sur des ADNc en 6 réplicats (3 échantillons d'ARN extraits de 3 échantillons biologiques, 2 rétrotranscriptions par échantillon d'ARN) et pour chaque gène étudié, des triplicats de témoins négatifs (sans ADNc) et une gamme de dilution ont été analysés. Trois gènes de références ont été utilisés : les gènes de la tubuline (α -TUBULIN) et de l'actine (β -ACTINE) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). La stabilité de ces gènes de références a été évaluée à l'aide de Best-Keeper (Pfaffl *et al.*, 2004), geNorm v. 3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002) et NormFinder (Andersen, Jensen et Ørntoft, 2004).

Les amorces sélectionnées pour les différents gènes étudiés sont répertoriées dans les chapitres correspondants (cf. Table des amorces des chapitres 2 et 3). Le traitement des données obtenues a été réalisé à l'aide du logiciel CFX96™ data manager (Bio-Rad) et les valeurs d'expression normalisées par rapport aux gènes de référence ont été obtenues selon la méthode du delta-delta du cycle threshold ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak et Schmittgen, 2001). Le logiciel REST 2009 (Pfaffl, Horgan et Dempfle, 2002) a été utilisé pour comparer les expressions de gènes des échantillons à celles des références.

2.4 Techniques de clonage et recombinaison

2.4.1 Clonage non GATEWAY®

Les clonages des fragments d'ADN dans les vecteurs pGEM®-T Easy Vector (Promega, cat. #A1360), pCR® Blunt (Invitrogen, cat. #K2750-20) et pENTR™ / D-TOPO® (Invitrogen, cat. #K2400-20) ont été effectués selon les recommandations des fournisseurs. Les gènes d'intérêt pleine longueur pour le clonage dans le vecteur pENTR / D-TOPO® ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques afin d'ajouter en 5' de la protéine un site de clivage à la thrombine. Ce site de protéolyse spécifique est utilisé pour la purification des protéines.

Les clonages dans le vecteur pYeDP60, destinés à l'expression par des levures, ont été réalisés à l'aide de la technique de clonage USER™ (New England Biolabs, cat. #M5505S). La préparation du vecteur et le clonage ont été réalisés selon le protocole de Nour-Eldin *et al.* (2006). Pour l'utilisation de cette technique, les gènes d'intérêt pleine longueur ont été amplifiés à l'aide de la Phusion DNA Polymerase et avec des amorces adaptées : elles possèdent une séquence de 7 pb avec un résidu déoxyuracil ([U]) à leur extrémité 3' (cf. Table des amorces du chapitre 3). La présence de ces extrémités cohésives complémentaires sur le fragment PCR et le vecteur linéarisé sont nécessaires pour le clonage (Figure 6.7).

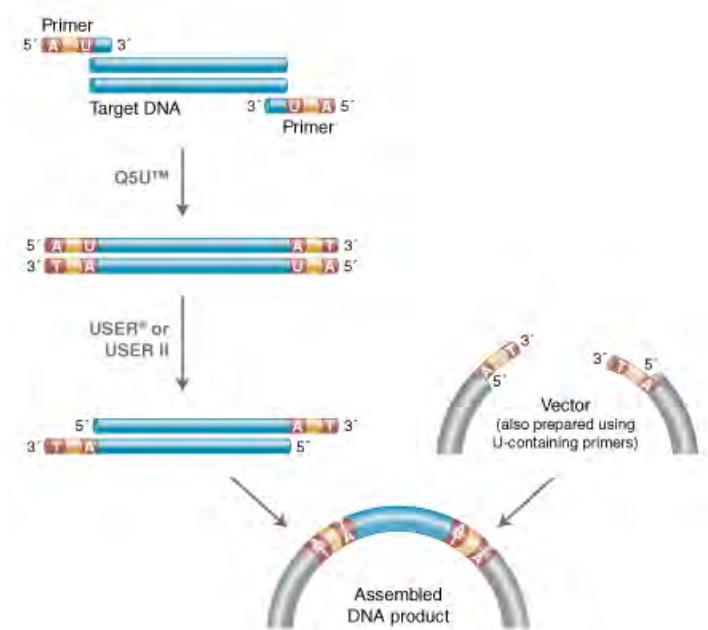


Figure 6.7 | Schéma d'un clonage par excision uracil-spécifique de la technique USER™ (New England Labs, Cat. #M5505)

2.4.2 Recombinaison avec le système GATEWAY®

Le système Gateway® correspond à un système de clonage permettant une recombinaison rapide et efficace de cassettes génétiques entre vecteurs. Il se compose de deux réactions de clonage : une réaction BP et une réaction LR, toutes deux reposant sur la présence de séquences de recombinaison dérivées du système d'intégration/excision du bactériophage λ (Landy, 1989). La réaction LR nécessite un vecteur d'entrée porteur des bornes de recombinaison *attL* et de la cassette génétique insérée et un vecteur de destination possédant les bornes de recombinaison *attR*. Dans nos analyses, le vecteur d'entrée utilisé était le vecteur pENTR™ / D-TOPO® porteur du gène d'intérêt (amplifié à l'aide d'amorces spécifiques afin d'ajouter en 5' de la protéine un site de clivage à la thrombine) et les vecteurs de destinations étaient les vecteurs d'expression *in bacteria* (vecteurs pHGWA, pHGGWA, pHMGWA, pHNGWA et pHXGWA) ou *in planta* (pK7WG2D, pMDC32 et pMDC83). Les différentes recombinaisons LR ont été réalisées d'après les recommandations du fournisseur décrites dans le guide d'utilisation « Gateway® Technology » (Invitrogen, cat. #12535-019 et #12535-027), avec le « Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix » (Invitrogen, cat. #11791-020).

2.5 Transformation de bactéries et levures compétentes

Les constructions obtenues après clonage ont été transformées dans des bactéries compétentes. Les cultures de bactéries ont été réalisées en milieux de culture LB liquide ou solide complémenté des antibiotiques adéquats. Les souches de bactéries vérifiées ont été stockées à -80 °C dans du glycérol à 30 %.

2.5.1 Préparation d'*E. coli* compétentes

Les cellules compétentes d'*E. coli* ont été préparées à partir d'une préculture de 10 mL en milieu LB incubée sur la nuit à 37 °C et sous agitation. Deux mL ont été dilués dans 100 mL de milieu LB complétement avec les antibiotiques de sélection adéquats et remis en incubation dans les mêmes conditions. Les cultures ont été incubées jusqu'à obtenir une culture de densité optique à $\lambda = 600$ nm comprise entre 0,3 et 0,5. Après refroidissement sur glace, les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 700 *g* pendant 10 min à 4 °C puis reprises dans 4 mL de tampon TFB1 (30 mM KOAc ; 50 mM MnCl₂ ; RbCl 100 mM ; CaCl₂ 1 mM ; 15 % (w/v) glycérol ; pH 5,8) à 4 °C. Après 1 h d'incubation à 4 °C, les bactéries ont été à nouveau récoltées par centrifugation et reprises dans 4 mL de tampon TFB2 (10 mM Na MOPS (pH 7) ; 75 mM CaCl₂ ; 10 mM RbCl ; 15 % (w/v) glycérol) à 4 °C. Les bactéries ont été aliquotées par 50 μ L et conservées à -80 °C après congélation dans l'azote liquide.

2.5.2 Transformation de *E. coli* thermo-compétentes

Les transformations utilisant les souches *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen, cat. #C4040-50) et *E. coli* Rosetta™ DE3pLysS (Merck, cat. #709563) ont été effectuées selon les protocoles des fabricants avec des modifications mineures. La transformation se fait par choc thermique (*heat-shock*) après une incubation de la construction d'intérêt en présence des cellules compétentes. Les transformations ont été réalisées à partir des produits de ligature ou à partir des ADN plasmidiques des constructions vérifiées par séquençage.

2.5.3 Préparation de *S. cerevisiae* compétentes

Les cellules compétentes de *S. cerevisiae* ont été préparées à partir de précultures de 10 mL en milieu YPD (composition en Supplemental_data 6.1) incubées deux jours à 30 °C et sous agitation. Quatre cultures de 50 mLensemencées avec 5 mL de précultures ont été réalisées et incubées à 30 °C et sous agitation jusqu'à obtenir une DO ($\lambda = 600$ nm) entre 0,6 et 1 (soit une incubation d'environ 5-6 h). Une fois la DO atteinte, les cultures ont été placées sur glace pendant 15 min afin de stopper la croissance des levures puis centrifugées 15 min à 3800 *g*. Les culots cellulaires ont été délicatement remis en suspension et « poolés » dans 40 mL de solution AcLiTE supplémentée avec du DTT à 10 mM (composition en Supplemental_data 6.1). La suspension obtenue a ensuite été incubée 1 h à 30 °C. Après incubation la suspension a été divisée en deux et centrifugée 10 min à 3800 *g* et à 4 °C. Chaque culot a été nettoyé deux fois, sur glace, par resuspension dans 20 mL de sorbitol à 1 M glacé et centrifugation 10 min à 3800 *g* et 4 °C. Lors de la dernière étape, environ 3 mL de surnageant de sorbitol ont été conservés pour remettre les culots en suspension. Enfin, les levures ont été aliquotées par 200 μ L et conservées à -80 °C jusqu'à utilisation.

2.5.4 Transformation de *S. cerevisiae* électro-compétentes

Les transformations de la souche *S. cerevisiae* WAT11 (Pompon) ont été effectuées par électroporation selon le protocole de Boachon *et al.* (2019) et Höfer *et al.* (2014). Dans une cuve à électroporation Gene Pulser®/MicroPulser™ de 0,2 cm (Biorad, cat. #1652086), 0,5-1 μ g d'ADN plasmidique purifié et 50 μ L de cellules électro-compétentes ont été mélangés. L'électroporation a

été effectuée à l'aide de l'électroporateur MicroPulser™ (BioRad, cat. #165-2100) avec une impulsion de 5 ms à 1,8 kV. Les levures ont été immédiatement reprises dans 800 µL de milieu YPGA liquide (composition en Supplemental_data 6.1) pour la sélection à l'uracile et adénine et centrifugées 1-2 min à 2500 g. Les levures ont ensuite été remises en suspension dans du milieu sélectif SGI (composition en Supplemental_data 6.1) et étalées sur boîte de SGI solide. Les cultures de *S. cerevisiae* ont été incubées 3 jours à 28-30 °C.

2.5.5 Préparation d'*A. tumefaciens* compétentes

Les cellules compétentes d'*A. tumefaciens* ont été préparées selon un protocole adapté des travaux de Mersereau, Pazour et Das (1990) et Shen et Forde (1989). Les cellules ont été obtenues à partir d'une préculture de 5 mL en milieu LB incubée sur la nuit à 28 °C et sous agitation. Les précultures ont été diluées dans 500 mL de milieu LB complété avec les antibiotiques de sélection adéquats et remises en incubation dans les mêmes conditions sur la nuit (environ 16 h). Une fois que la culture a atteint une DO à $\lambda = 550$ nm comprise entre 0,5 et 0,8, les bactéries ont été refroidies sur glace, collectées par centrifugation à 4000 g pendant 10 min à 4 °C. Trois nettoyages par remise en suspension délicate dans de l'eau glacée et une centrifugation à 4000 g pendant 10 min à 4 °C ont été réalisés. Au fur et à mesure des nettoyages, les bactéries ont été reprises dans 500 mL, puis dans 250 mL, puis 50 mL. Après ces étapes, les bactéries collectées ont été remises en suspension délicatement dans 5 mL de solution de glycérol stérile à 10 % et 4 °C. Les bactéries ont été aliquotées par 50 ou 100 µL et conservées à -80 °C après congélation dans l'azote liquide.

2.5.6 Transformation d'*A. tumefaciens* thermo-compétentes

Les transformations de la souche d'*A. tumefaciens* C58pMP90 a été effectuée par choc thermique après homogénéisation de 200 µL de cellules thermo-compétentes et 3-5 µg d'ADN plasmidique purifié dans 400 µL de milieu LB liquide. Après trois chocs thermiques alternant des incubations de 5 min dans l'azote liquide et de 25 min à 37 °C, les bactéries ont été reprises dans 15 mL de milieu LB liquide et mises à incuber 4 h 30 à 28 °C afin de permettre l'expression des gènes de résistance. Les bactéries ont ensuite été collectées par centrifugation légère, remises en suspension dans du milieu LB et 100 µL ont été étalés sur boîte de LB solide complété des antibiotiques de sélection adéquats. Les cultures d'*A. tumefaciens* ont été incubées 2 à 4 jours à 28 °C.

2.5.7 Transformation d'*A. tumefaciens* électro-compétentes

Les transformations de la souche LBA4404 (Invitrogen, cat. #18313-015) ont été effectuées par électroporation, à l'aide d'un protocole adapté des travaux de Mersereau, Pazour et Das (1990) et Shen et Forde (1989). Dans une cuve à électroporation Gene Pulser®/MicroPulser™ de 0,2 cm (Biorad, cat. #1652086), 50-100 ng d'ADN plasmidique purifié et 50 µL de cellules électro-compétentes ont été mélangés. L'électroporation a été effectuée à l'aide de l'électroporateur MicroPulser™ (BioRad, cat. #165-2100) avec une impulsion de 5 ms à 1,8 kV. Les bactéries ont été immédiatement reprises dans 1 mL de milieu LB liquide et mises à incuber 4 h à 28 °C sous

agitation douce afin de permettre l'expression des gènes de résistance. Les bactéries ont ensuite été collectées par centrifugation légère, remises en suspension dans du milieu LB et 100 μ L ont été étalés sur boîte de LB solide complémenté des antibiotiques de sélection adéquats. Les cultures d'*A. tumefaciens* ont été incubées 2 à 4 jours à 28 °C.

3 Biotechnologies végétales

3.1 Culture de pélargoniums

3.1.1 Culture en serres et chambres de culture

Les pélargoniums de la collection sont cultivés sur le campus Métare de l'Université Jean Monnet. La plupart des plants mères est cultivé en serre extérieure, tandis que les boutures et plants utilisés dans les expériences sont cultivés au laboratoire, en chambre de culture ou dans un phytotron. L'arrosage des plantes est réalisé pot à pot, deux fois par semaine afin de laisser une période sèche sur la semaine. En chambre de culture, les conditions de cultures sont un cycle jour/nuit avec une alternance de 16 h d'éclairage de luminosité 5000 Lux, à 25 °C et 52 % d'humidité relative et 8 h d'obscurité, à 17 °C et 60 % d'humidité relative. En phytotron, les pélargoniums sont soumis à un cycle jour/nuit avec une alternance de 14 h d'éclairage de luminosité 20000 Lux à 24 °C et 70 % d'humidité relative et 8 h d'obscurité à 17 °C et 80 % d'humidité relative.

3.2 Transformation transitoire de feuilles de *N. benthamiana*

Afin d'étudier les enzymes d'intérêt *in planta*, les gènes codant les enzymes à étudier ont été exprimés chez le modèle *N. benthamiana*, par transformation transitoire de feuilles.

Une préculture d'*A. tumefaciens* transformée avec un vecteur d'expression *in planta*, porteur du gène d'intérêt codant l'enzyme à étudier a été préparée. Une culture d'*A. tumefaciens* porteuse du gène codant la protéine virale P19 a été préparée pour chaque transformation et pour une transformation témoin. Cette protéine est responsable de la répression du mécanisme d'extinction de gènes étrangers, présent chez les cellules végétales (Voinnet *et al.*, 2003) et permet donc une meilleure expression du gène d'intérêt chez la plante transformée.

Les précultures de 5 mL en milieu LB incubées sur la nuit à 28 °C et sous agitation ont été diluées dans 50 mL de milieu LB complémenté avec les antibiotiques de sélection adéquats et remises en incubation dans les mêmes conditions pendant environ 20 h. Après incubation, les bactéries ont été collectées par centrifugation à 2800 *g* pendant 10 min à température ambiante. Les culots ont été nettoyés trois fois par remises en suspension délicate dans 50 mL de milieu LB liquide et centrifugation à 2800 *g* pendant 10 min. Les culots nettoyés ont été repris dans 50 mL de milieu d'induction (50 mM MES ; 2 mM NaH₂PO₄ ; 0,5 % glucose ; 0,2 mM acétosyringone) pour les souches d'*A. tumefaciens* C58pMP90 ou dans de l'eau pour les souches d'*A. tumefaciens* LBA4404. Les cultures ont été dosées au spectrophotomètre et diluées afin d'avoir des cultures de DO à $\lambda = 500$ nm équivalentes, comprises entre 0,25 et 0,5. Les souches d'*A. tumefaciens*

C58pMP90 ont été incubées 1 à 2 h avant infiltration afin de permettre l'induction de l'expression des gènes de virulence par l'acétosyringone. Chaque culture porteuse du gène cible a été co-transfectée avec la culture porteuse du gène codant la protéine P19 (v:v). L'infiltration des feuilles de tabacs a été réalisée selon le protocole de Batoko *et al.* (2000). Les faces inférieures des feuilles de plants de tabacs âgés de 4 semaines ont été infiltrées avec les cultures préparées à l'aide d'une seringue sans aiguille. Les plants transformés ont été placés 4-5 jours en chambre de culture avant analyse.

Ces expériences de transformations transitoires ont été utilisées pour des analyses biochimiques telles que des activités enzymatiques *in planta* ou bien pour la localisation d'expression du gène d'intérêt.

4 Biochimie

4.1 Production d'enzymes recombinantes en système bactérien

4.1.1 Expression de protéines recombinantes chez *E. coli*

Avant toute analyse fonctionnelle des enzymes d'intérêts en système bactérien, il est nécessaire de produire ces enzymes en quantité suffisante et de les purifier. La composition de l'ensemble des milieux et solutions utilisés est détaillée en Supplemental_data 6.2.

À partir de souches d'*E. coli* Rosetta™ DE3pLysS (Merck, cat. #709563) transformée avec le vecteur d'expression bactérien contenant le gène d'intérêt codant l'enzyme à étudier, des cultures ont été réalisées. Une culture non transformée, a été réalisée en parallèle, comme témoin négatif de surexpression. Des précultures de 5 mL en milieu LB incubées sur la nuit à 37 °C et sous agitation ont été diluées dans 200 mL de milieu TB modifié (composition en Supplemental_data 6.2) complémenté avec les antibiotiques de sélection adéquats et remises en incubation dans les mêmes conditions jusqu'à obtenir des cultures avec une densité optique (DO) à $\lambda = 600$ nm comprise entre 0,4 et 0,6. Les cultures ont ensuite été induites par ajout d'IPTG à 0,5 mM puis incubées sur la nuit à 17 °C sous agitation douce. Après incubation, les bactéries ont été collectées par centrifugation à 2800 *g* pendant 5 min à 4 °C. Les culots obtenus ont été incubés 30 min dans la glace en présence de 8 mL de tampon de lyse (composition en Supplemental_data 6.2) puis soumis à une lyse cellulaire par traitement aux ultrasons (9 cycles de 10 s à une intensité de 70, à l'aide du sonicateur Sonopuls HD 2200 (Bandelin) équipé d'une sonde de 13 mm de diamètre). L'extrait obtenu a été centrifugé à 10000 *g* pendant 20 min à 4 °C.

4.1.2 Purification de protéines recombinantes chez *E. coli*

La purification des protéines extraites a été réalisée par chromatographie d'affinité de chélation de cations métalliques : l'étiquette poly-histidine des protéines recombinantes se fixe sur les cations de Cobalt (Co^{2+}) immobilisés sur une matrice de sepharose. Les surnageants (environ 8 mL) ont ainsi été mis à incuber en présence de 400 μL de résine TALON® Metal Affinity Resin (Clontech, cat. #635501) préalablement lavée trois fois avec 10 mL de tampon de lavage (composition en

Supplemental_data 6.2). Après 2 h d'incubation sous agitation à 10 rpm et 4 °C, les échantillons ont été centrifugés à 16 g pendant 5 min à 4 °C afin de récupérer la résine. Celle-ci a été rincée 5 fois dans 10 mL de tampon de lavage afin d'éliminer les protéines et molécules non-fixées ou non-spécifiques. Après rinçage, les protéines d'intérêt ont été incubées sur la nuit à 4 °C dans 200 µL de tampon adapté à la protéine d'intérêt : tampon de Landmann (Landmann *et al.*, 2007) pour les terpènes synthases (TPS) et tampon HEPES pour les progestérone 5-β-réductases (P5βR) (composition en Supplemental_data 6.2). L'incubation a été réalisée en présence de 10 U de thrombine (Merck, cat. #605160) permettant ainsi la protéolyse spécifique du site de clivage à la thrombine en 5' de la protéine et de détacher la protéine d'intérêt de la résine. Le lendemain, les protéines ont été collectées à l'aide d'une colonne d'exclusion Micro Bio-Spin® Bio-Gel P-30 (Biorad, cat. #7326204) afin de récupérer la solution contenant la protéine purifiée sans résine.

4.1.3 Analyses des protéines par SDS-page

Les protéines recombinantes et l'efficacité de la purification ont été analysées par électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE, de l'anglais *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), à l'aide d'échantillons récupérés lors des différentes étapes. Les compositions des gels, solutions et tampons nécessaires à l'analyse ont été détaillées en Supplemental_data 6.3. Dans un premier temps, 20 µL d'échantillons ont été dénaturés pendant 10 min à 100 °C dans du tampon de Laemli (4:1) puis déposés sur un gel de concentration à 5 % d'acrylamide tamponné à pH 6,8 par du Tris. Pour chaque gel, 10 µL de marqueur de taille « Precision Plus Protein™ All Blue Standards » (Bio-Rad, cat. #1610373) ont également été déposés. Les protéines ont été séparées par un gel à 10 % d'acrylamide tamponné à pH 8,8 par du Tris. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon de migration 1X et soumis à un champ électrique de 90 V jusqu'à migration complète. Après migration, les protéines ont été fixées et colorées par incubation du gel pendant 45 min dans une solution de Bleu de Coomassie. La lecture du gel a été effectuée après 2 lavages de 30 min dans de la solution de décoloration, suivis d'une incubation sur la nuit dans l'eau.

4.1.4 Dosage protéique

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) à l'aide du réactif « BioRad Protein Assay » (Biorad, cat. #5000002) selon les recommandations du fournisseur avec des modifications mineures. Le dosage spectrophotométrique a été effectué par mesure de la DO à $\lambda = 595$ nm. La quantité de protéines a été déterminée grâce à une courbe étalon de la concentration en protéines en fonction de la DO réalisée en parallèle, sur une gamme de concentrations préparée avec une solution protéique d'albumine sérique bovine (BSA, de l'anglais *bovine serum albumin*).

4.2 Études enzymatiques

4.2.1 Activités enzymatiques in vitro

Suite à la surexpression et la purification des protéines d'intérêt, des analyses fonctionnelles ont été réalisées par incubation des enzymes en présence des différents substrats, selon un protocole adapté à chaque classe d'enzyme étudiée. Pour toutes les analyses réalisées, des témoins négatifs dépourvus d'enzyme ou de cofacteur NAD(P)H ont été réalisés.

L'activité des P5 β R (chapitre 4) a été testée selon le protocole adapté de Xu *et al.* (2017b) : 4 μ g de protéine ont été placés dans un mix réactionnel de volume final 50 μ L, composé de tampon HEPES pH 7 à 50 mM, de DTT à 5 mM, de substrat à 1 mM et de cofacteur à 2 mM (Supplemental_data 6.2). Le mix a été incubé à 25 °C (thermocycleur MyCycler™, Biorad) pendant 50 min. Après incubation, les échantillons ont été recouverts de 100 μ L d'hexane et délicatement vortexés afin d'extraire les composés volatils du mix réactionnel vers la phase hexanique. La phase hexanique a été récupérée et analysée en GC-MS afin d'identifier les éventuels composés produits. Plusieurs substrats ont été testés tels que le citral (Sigma, cat #W230316), la progestérone (Sigma, cat #P0130), l'isopipéritone (Sigma, cat #PHL82627), la pulégone (Acros organics, cat #418500050) et le géraniol (Sigma organics, cat #41090050). Pour chaque substrat, deux cofacteurs ont été testés : le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH).

Pour les TPS (chapitre 2 et chapitre 3), le protocole suivi a nécessité un mix réactionnel de volume final 500 μ L ajusté avec du tampon de Landmann contenant : les cofacteurs (Mg²⁺ et Mn²⁺), 20 à 50 μ g de protéine, du DTT à 1 mM, de la BSA à 1 mg.mL⁻¹ et du substrat à 60 μ M (Supplemental_data 6.2). Le mix a été recouvert de 500 μ L d'hexane et mis à incuber à 30 °C pendant 3 h. Après incubation, les échantillons ont été délicatement vortexés afin d'extraire les composés volatils du mix réactionnel vers la phase hexanique. La phase hexanique a été récupérée et analysée en GC-MS afin d'identifier les éventuels composés produits. Pour chaque enzyme, à la fois le géranyl et le farnésyl diphosphate (GPP et FPP) ont été testés.

4.2.2 Études cinétiques in vitro

La cinétique de l'activité des P5 β R (chapitre 4) a été déterminée par le suivi de la consommation du cofacteur. Le NADH et le NADPH présentent un maximum d'absorbance à $\lambda = 340$ nm. Une fois oxydé, le NAD⁺ ou le NADP⁺ obtenu n'absorbe plus à cette longueur d'onde. Dès lors, le suivi de la DO à $\lambda = 340$ nm permet d'estimer la formation de produits issus de l'activité enzymatique. Le suivi de la cinétique a été réalisé pour plusieurs réactions en parallèle grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre SAFAS Xenius XL (SAFAS) de l'IUT²⁶ de Saint-Étienne, capable de produire les spectres d'absorbance pour des cinétiques en microplaques de 96 puits. Le mix réactionnel utilisé pour ces analyses reprend les composants et concentrations de celui utilisé pour les activités enzymatiques des P5 β R, présenté ci-dessus. En revanche, le volume final était ici de 100 μ L et plusieurs concentrations en substrat (allant de 25 à 2000 μ M) ont été testées. Le mix réactionnel a

²⁶ Département Génie Biologique de l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) de l'Université Jean Monnet – Lyon-Saint-Étienne

été réparti dans des plaques 96 puits « UV-Star® Greiner Bio-one » (Grosseron, cat. #0438158) conçues pour éliminer tout bruit de fond lié à l'absorbance du puits à la longueur d'onde choisie. La cinétique réalisée a permis d'obtenir une mesure d'absorbance à $\lambda = 340$ nm toutes les 60 s pour chaque puits, durant les 50 min d'incubation réalisées.

Pour une analyse rigoureuse, chaque réaction testée a été réalisée en triplicatas, des témoins négatifs ont été effectués (mix réactionnel sans enzyme) pour les différentes conditions et des mesures de blancs (mix réactionnel sans cofacteur) ont été réalisées afin de s'affranchir de l'absorbance des autres composants. Par ailleurs, afin de pouvoir estimer la fiabilité des mesures ainsi que calculer la quantité de produit formé en fonction du temps d'incubation à partir des valeurs d'absorbance, une gamme étalon pour chaque cofacteur a été réalisée. Les valeurs des k_M et V_{max} ont été calculées à l'aide du logiciel en ligne IC50 Tool Kit²⁷.

4.2.3 Activité enzymatique en système levure

À partir de souches de *S. cerevisiae* WAT11 transformée avec le vecteur d'expression pYeDP60u2 contenant le gène codant l'enzyme à étudier, des cultures ont été réalisées. Une culture transformée avec le vecteur vide a été réalisée en parallèle, comme témoin négatif de surexpression. Des précultures de 40 mL en milieu YPGE (composition en Supplemental_data 6.1) incubées 48 h à 30 °C et sous agitation douce ont été réalisées. Après incubation, les levures ont été collectées par centrifugation 4 min à 2500 g. Les culots ont été repris dans 200 mL de milieu YPGE et incubés 30 h à 30 °C sous agitation douce. Les cultures ont ensuite été induites par ajout de 20 mg de galactose dans chaque culture (pour une concentration finale de 200 g.L⁻¹) et transférées dans des bouteilles en verre de 1 L équipées d'un bouchon à double entrées. Un tube de Tenax® (Merck, cat. #21009) a été placé à l'entrée de la bouteille et une cartouche en verre contenant du Poropak Q (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a été placée à la sortie. Les cultures ont ensuite été incubées pendant trois jours, sous agitation magnétique et sous oxygénation par injection d'air à l'aide d'une pompe à vide. L'air était injecté *via* l'entrée de la bouteille, en sortie, l'aspiration de la pompe à vide permet une collecte des COV sur la cartouche de Poropak Q. Les échantillons ont été récoltés par élution des cartouches toutes les 24 h avec 1 mL d'hexane supplémenté avec 50 μ M de camphre (standard interne) puis analysés par GC-MS.

4.2.4 Activité enzymatique par infiltration de disques foliaires

Les feuilles de *N. benthamiana* ne contiennent pas naturellement les substrats monoterpéniques des P5 β R. Par conséquent, l'activité *in planta* des P5 β R a été testée *in vitro* sur des disques foliaires de *N. benthamiana* transformés et incubés dans un tampon contenant le substrat des enzymes.

Le protocole est adapté de Höfer *et al.* (2013), avec des modifications mineures. Dans un premier temps, des plants de tabacs ont été transformés avec la souche porteuse de la construction d'intérêt. Après 3-4 jours de culture, des disques foliaires de 7 mm de diamètre (environ 25 par condition testée) ont été prélevés et placés dans une boîte de Pétri en verre avec

²⁷ <http://ic50.tk/kmvmax.html>

4 mL de tampon phosphate-citrate (tampon Na_2HPO_4 à 20 mM dont le pH a été ajusté à 7,4 avec de l'acide citrique à 0,1 M) contenant 400 μM de substrat. Les disques ont ensuite été infiltrés 2 fois 3 min sous vide. Des disques témoins ont également été infiltrés avec la solution tampon dépourvue de substrat. Les disques ont ensuite été incubés pendant 3 h à température ambiante et à la lumière. Après incubation, les disques et la solution tampon ont été extraits à l'hexane avant analyse en GC-MS.

4.2.5 Localisation subcellulaire des enzymes

La localisation subcellulaire des enzymes d'intérêt a été réalisée par transformation transitoire de tabacs en utilisant la souche d'*A. tumefaciens* porteuse du vecteur pMDC83 dans lequel le gène codant pour l'enzyme a été inséré. L'enzyme produite est une protéine chimère fusionnée à la GFP et donc localisable par observation en microscopie à fluorescence. Pour une localisation précise de la protéine d'intérêt, l'observation a été effectuée à l'aide du microscope confocal inversé à balayage laser TCS-SP2 (Leica Microsystems) du CMCM de Saint-Étienne²⁸. La longueur d'onde d'excitation de la GFP émise par un laser Argon était de 488 nm tandis que l'excitation de la chlorophylle a été induite par émission par un laser Hélium-néon rouge réglé à $\lambda = 633$ nm. Les observations ont été réalisées 3-4 jours après transfection des feuilles, à l'aide d'un objectif x40/0,80 W et l'acquisition des images a été effectuée avec le logiciel LCS (Leica Confocal Software).

4.3 Analyses des composés organiques volatils (COV)

4.3.1 Collecte des COV émis

Afin d'étudier les composés émis par une plante, un système de collecte de volatils a été utilisé. Le système repose sur un recueil d'air par pression négative dans une cuve en verre, fermée par un couvercle à deux entrées. Une pompe force la circulation d'air entre les deux entrées du couvercle et donc la circulation d'air de la cuve. Une cartouche de matrice d'adsorbant de type « Tenax® Porous Polymer Adsorbent » (Merck, cat. #21009) a été placée au niveau de l'entrée d'air dans la cuve afin de purifier l'air et de limiter les contaminations par des composés exogènes. Au niveau de la sortie d'air, une cartouche de matrice d'adsorbant de type « Porapak® Porous Polymer Adsorbent » (Merck, cat. #20328) a permis la fixation des COV de l'air aspiré. Cette technique a été utilisée pour la caractérisation fonctionnelle *in planta* d'enzymes recombinantes via l'étude des composés émis par des plants de tabac transformés. La collecte a été réalisée sur une période de 24 h pour les tabacs transformés, avec un débit de 100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Une fois la collecte terminée, la cartouche de Porapak® (Merck, cat. #20328) a été éluée avec 200 μL d'une solution d'hexane contenant du camphre à 50 μM et l'échantillon recueilli a été analysé en GC-MS. Le camphre ajouté constitue le standard interne permettant la quantification des composés.

4.3.2 Extraction des COV à l'hexane

L'extraction d'échantillons végétaux à l'hexane permet l'identification et la quantification des COV qu'ils contiennent et donc de connaître la composition de l'huile essentielle produite. À partir

28 Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique de l'Université Jean Monnet – Lyon-Saint-Étienne

de feuilles de pélagoniums (< 2,5 cm) ou de feuilles de tabac transformés, 500 mg de matière végétale ont été extraits avec 2 mL d'hexane (ratio de 4:1) contenant du camphre à 10 mg.mL⁻¹ pendant 24 h à 4 °C. Le camphre ajouté constitue le standard interne permettant la quantification des composés.

Dans le cas des échantillons obtenus pour les activités enzymatiques par infiltration de disques foliaires, une extraction par affrontement à l'hexane a été réalisée. L'échantillon a été affronté avec 1 volume d'hexane puis centrifugé à 100 g. La phase hexanique a été récupérée et l'échantillon a été ré-affronté avec 0,5 volume d'hexane puis centrifugé. Les deux phases hexaniques ont été regroupées et concentrées sous flux d'air avant d'être analysés en GC-MS.

4.4 Analyse en GC-MS

L'identification et la quantification des COV a été effectuée par analyse en chromatographie en phase gazeuse, couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS, de l'anglais *gas chromatography-mass spectrometry*). Les analyses ont été réalisées sur un appareil Agilent® GC 6850 équipé d'un détecteur sélectif de masse à piège à ions Agilent® 5973 et d'une colonne capillaire apolaire Agilent® DB-5 MS (30 m x 0,25 mm avec une épaisseur de film de 0,25 µm) (Agilent, cat. #122-5532). Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient de 250 °C et 280 °C respectivement. Le gaz vecteur était de l'hélium à flux constant de 1 mL.min⁻¹. Le volume d'injection était de 2 µL avec un ratio de split 1:2. Pour la grande majorité des analyses, le programme utilisé consistait en une température initiale du four (après l'injection) de 60 °C suivi d'une augmentation de 3 °C.min⁻¹ jusqu'à 245 °C et enfin 4 min à 245 °C. En revanche, pour les études d'activité des enzymes P5βR (chapitre 4), la température initiale du four était réglée à 60 °C l'augmentation était de 3 °C.min⁻¹ jusqu'à 120°C puis de 12 °C.min⁻¹ jusqu'à 240°C et le programme se terminait par 5 min à 240 °C. Lorsque le substrat testé était la progestérone, la température initiale du four était de 120 °C suivi d'une augmentation de 4 °C.min⁻¹ jusqu'à 300 °C, terminée par 4 min à 300 °C. L'identification des molécules détectées a été réalisée par comparaison des temps de rétention, des indices de rétention (Van Den Dool et Kratz, 1963 ; Kovats, 1965) et des spectres de masses. Pour cela, le logiciel Data Analysis®, les bases de données Wiley, NIST08, le livre de référence Adams (Adams, 2017) ainsi que la base de données d'identification de IFF-LMR-Naturals ont été utilisés. La quantification des composés a été effectuée grâce au standard interne (le camphre ici).

5 Technique de Bio-informatique

5.1 Séquençage

5.1.1 Séquençage d'ADN

Les séquences amplifiées et les constructions réalisées dans ce projet ont été déterminées et vérifiées par séquençage. Le séquençage de l'ADN a été réalisé par la société Eurofins Genomics. Les analyses des séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel Geneious, permettant la recherche de similitudes des domaines conservés par BLAST (de l'anglais *Basic Local Alignment*

Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) et les alignements multiples de séquences par MUSCLE (de l'anglais *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) avec le programme ClustalW2 (Edgar, 2004a ; Edgar, 2004b).

5.1.2 Préparation d'une banque d'ADNc

Pour certaines analyses présentées dans ce tapuscrit, une banque d'ADNc de jeunes feuilles de *P. rosat* 'Grasse' (< 2,5 cm), déjà disponible au laboratoire à mon arrivée, a été utilisée. Pour obtenir cette banque d'ADNc, un extrait d'ARN totaux de jeunes feuilles de *P. rosat* 'Grasse' a été envoyé à Eurofins MWG GmbH. Dans un premier temps, une librairie d'ADNc normalisée a été préparée et dans un second temps une PCR en émulsion et un séquençage GS FLX+ (454/Roche) ont été réalisés. Les reads ont été déposés sur le SRA (SRP144736).

5.1.3 Séquençage haut-débit des ARNs (RNAseq)

Trente extraits d'ARN totaux des dix accessions de pélagoniums ont été séquencés sur 4 pistes de la plateforme Illumina HiSeq X ten au BGI en Chine²⁹. Après traitement à l'ADNase, les ARN ont été rétrotranscrits *via* des amorces polyT et utilisés dans la préparation des librairies de séquençage. Au moins 60 000 000 reads *paired-end* (PE)³⁰ ont été obtenus pour chaque réaction de séquençage. Les reads ont été nettoyés des adaptateurs et du barcoding par le service de bioinformatique du BGI et un filtre de qualité Q20 minimum a été appliqué. Cette valeur correspond à une probabilité de misidentification d'une base lors du séquençage de 0,01.

5.2 Analyses transcriptomiques

5.2.1 Nettoyage des reads

L'obtention de statistiques indicatrices de la qualité des reads s'effectue par le logiciel FastQC (Andrews, 2010). Une collection de script Perl (v5.26) a été utilisée pour différentes étapes du nettoyage des reads ainsi que pour chaîner plusieurs logiciels entre eux. Les reads ont d'abord été coupés de 13 bases en 5' de façon à se débarrasser du biais introduit par la préparation de la librairie Illumina. Une suite de nucléotides surreprésentés étant présente en 3' des reads, celle-ci a également été éliminée. Les reads ont également été nettoyés de répétitions de nucléotides uniques (par ex. A) d'au moins 25 mers de long situés aux deux extrémités. Les ARNr (ARN ribosomiques) présents malgré la rétrotranscription amorcée par polyT ont été éliminés avec sortmerna v2.1 (Kopylova, Noé et Touzet, 2012). Finalement, les reads ont été filtrés par Trimmomatic v0.36 (Bolger, Lohse et Usadel, 2014) et 2 jeux de reads nettoyés ont été créés : un premier jeu de reads dont la qualité est au minimum de Q30 (probabilité de faire une erreur d'identification de base de 0,001) a servi au cours de l'assemblage *de novo* ; un deuxième jeu de reads dont la qualité minimum est de Q20 a servi pour aligner les reads sur les références créées et obtenir l'expression des unités de transcription. Les reads ont ensuite été resynchronisés : les

²⁹ Beijing Genome Institute est un centre de séquençage à Honk-kong, en Chine

³⁰ Type de séquençage qui consiste à séquencer les lectures par paires

reads orphelins éventuellement créés au cours du processus de nettoyage ont été mis à part et les paires ont été recréées.

5.2.2 Assemblage de novo, annotation et expression des transcriptomes

L'absence de génome séquencé pour les différentes accessions de pélargoniums oblige à l'obtention de transcriptomes *de novo* créés à partir des reads de chaque cultivar. Les reads provenant des triplicatas ont été concaténés par paire et un pipeline d'assemblage basé sur sga v0.10.15 (Simpson et Durbin, 2010) a ensuite été utilisé. Les reads ont d'abord été corrigés par SPAdes v3.10.1 (Bankevich *et al.*, 2012) puis la profondeur de séquençage a été normalisée à 40X maximum grâce à khmer v2.1.1 (Crusoe *et al.*, 2015). Les paires dont les extrémités se recouvraient ont alors été assemblées et leur séquence ont été corrigées grâce au script ErrorCorrectReads.pl du pipeline ALLPATHS-LG (Gnerre *et al.*, 2011). L'assemblage a ensuite été réalisé au cours d'une succession d'itérations du pipeline d'assemblage de sga à partir d'un recouvrement entre les reads de 80 nucléotides jusqu'à 50 nucléotides. Au cours de chaque itération, les reads non assemblés ont été isolés et utilisés pour l'itération suivante. Les contigs formés ont alors été déduplicés et groupés grâce à CAP3 (2/10/15) (Huang et Madan, 1999) puis assemblés avec SSPACE v3.0 (Boetzer *et al.*, 2011). Les contigs obtenus ont finalement été corrigés avec Pilon (Walker *et al.*, 2014).

Les transcrits assemblés *de novo* ont été annotés par recherche d'homologues. Un pipeline basé sur interproscan v5.24-63 (Quevillon *et al.*, 2005) et des successions de blastp et blastx v2.6.0 (Altschul *et al.*, 1997) sur la base de données UniProt³¹ ont permis d'isoler les CDS au sein des transcrits et de déduire la séquence protéique associée. Les GO terms³², identifiant Pfam et autres données sont recueillis au cours de l'annotation. Transdecoder v3.0.1³³ a été utilisé sur les transcrits ne présentant pas d'homologie de séquence pour identifier les CDS putatives. Au cours de l'annotation, les chimères formées entre différents transcrits par le pipeline d'assemblage ont été identifiées (au sein du même transcrit, présence de plusieurs CDS contenant des homologues dans les bases de données). Les transcrits chimériques ont été séparés. Dans le cas des familles de gènes ciblées, les transcrits correspondant ont été déduplicés avec l'aide de vsearch v2.13.6 (Rognes *et al.*, 2016) puis par examen manuel des CDS après alignement. Les transcrits initiaux ont alors été remplacés dans les transcriptomes par les transcrits déduplicés.

Les reads de qualité Q20 ont été alignés sur les références créées précédemment grâce à bowtie2 v2.3.2 (Langmead et Salzberg, 2012). L'expression de chaque transcrit a été calculée avec RSEM v1.3.1 (Li et Dewey, 2014). Ces analyses ont été réalisés essentiellement par Dr Denis Saint-Marcoux.

31 <https://www.uniprot.org/>

32 informations (propriétés, ontologie, descriptions) sur le produit génique, référencées dans le cadre du projet *Gene Ontology* et couramment utilisées pour l'annotation

33 <https://github.com/TransDecoder/>

5.3 Analyses phylogénétiques

Dans le but de faciliter la comparaison des transcriptomes des dix cultivars, les transcrits ont été catégorisés dans des orthogroupes (groupe de séquences orthologues) à l'aide d'Orthofinder v2.3.1 (Emms et Kelly, 2015) et d'analyses phylogénétiques, sur la base de leur similarité de séquence protéique et leur groupement phylogénétique.

Les homologues d'une séquence ou groupe de séquences donnés ont été identifiés dans les transcriptomes par hmmer v3.1b2 (Eddy, 2009), blastp ou tblastn.

Pour obtenir une phylogénie moléculaire, les alignements de séquences ont été créés par clustal ω v1.2.4 (Sievers *et al.*, 2011) au cours de 10 itérations et en utilisant un profil Pfam comme guide, si disponible. Les alignements de nucléotides en fonction des codons ont été obtenus en rétrotraduisant les alignements protéiques en nucléotides sur la base des CDS correspondantes. Les alignements ont été édités manuellement de façon à ne conserver que les sites homologues et à supprimer les séquences trop divergentes ou redondantes éventuellement présentes. Les modèles évolutifs optimaux ont été obtenus d'après l'alignement par ModelTest-ng (Darriba *et al.*, 2019) optimisé pour RaxML. Finalement, RaxML v8 (Stamatakis, 2014) a permis d'inférer l'arbre de maximum de vraisemblance correspondant à l'alignement de séquences fourni. Les valeurs de bootstrap ont été obtenues par bootstrapping rapide. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées essentiellement par Dr Denis Saint-Marcoux. Les figures de phylogénie ont été réalisées à l'aide des logiciels Dendroscope³⁴ et Figtree³⁵.

5.4 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été effectué avec le logiciel R (v3.6.3) et avec l'aide de Dr Florence Nicolè et de la méthodologie présentée par Hervé, Nicolè et Lê Cao (2018). Plusieurs script R ont été utilisés pour les analyses et la réalisation des figures et graphiques.

5.5 Modélisation protéique

La modélisation protéique et les analyses structurales ont été réalisées avec le logiciel PyMolTM³⁶. Pour l'étude des sTPS, la structure de la 5-épi-aristolochène de *Nicotiana tabacum* (TEAS) en complexe avec le farnésyl hydroxphosphonate (FHP, analogue du FPP) a été utilisé comme modèle de référence (Starks *et al.*, 1997, PDB : 5EAT). En ce qui concerne l'étude des P5 β R, le modèle de référence choisi était la structure du mutant V150M (mutation du 150^e acide aminé, une valine, par une méthionine) de l'oxydo-réductase multisubstrate de *Plantago major* (PmMOR^{V150M}), en complexe avec du géranial et du NADP (Fellows *et al.*, 2018, PDB : 5MLR). Les modèles protéiques bidimensionnels ont été obtenus à l'aide du logiciel en ligne SWISS-MODEL³⁷ (Schwede *et al.*, 2003) et présentaient tous une qualité suffisante, soit au moins 40 % d'identité de séquence entre la cible et la référence.

34 <http://dendroscope.org/>

35 <https://github.com/rambaut/figtree>

36 <http://www.pymol.org/>

37 <http://swissmodel.expasy.org>

6 Tableaux annexes

Supplemental_data 6.1 | Milieux et solutions pour la préparation et la culture de *S. cerevisiae*

Milieux de culture

Produits	YPD	YPGA	SIG	YPGE
Yeast extract	10 g/L	10 g/L		10 g/L
Bacto™ peptone	20 g/L	10 g/L		10g/L
Bacto™ casamino acids			1 g/L	
Yeast nitrogen base (YNB)			7 g/L	
Glucose	20 g/L	20 g/L	10 g/L	5 g/L
Adénine		200 mg/L		
Tryptophane			20 mg/L	
Agar (facultatif)			20 g/L	
<i>eau distillée qsp 1 L</i>				
<i>Autoclave 121 °C, 20 min</i>				
Éthanol				50,6 mL

Solution AcLiTE

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Acétate de lithium	M = 65,99 g.mol ⁻¹	1,9 M	5 g
Tris-Hcl, pH=8	1 M	125 mM	5 mL
EDTA	0,5 M	12,5 mM	1 mL
<i>eau distillée qsp 40 mL et pH = 7,5</i>			
<i>Autoclave 121 °C, 20 min</i>			
DTT	1 M	10 mM	400 µL

Supplemental data 6.2 | Milieux de culture bactérienne et solutions pour la surexpression et purification de protéines**Milieu TB (Terrific Broth)**

Produitss	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Terrific Buffer			9,52 g
Glycérol	80 %	0,8 %	2 mL
D-sorbitol	1 M	10 mM	50 mL
<i>eau distillée qsp 200 mL</i>			
<i>Autoclave 121 °C, 20 min</i>			
Bétaïne	1 M	2,25 mM	500 µL

Tampon Native Purification 5X

Produits	Masse molaire	Concentration finale	Quantité
NaH ₂ PO ₄	119,98 g.mol ⁻¹	20 mM	6 g
NaCl	58,44 g.mol ⁻¹	2,5 M	29,2 g
<i>eau distillée qsp 200 mL et pH = 8</i>			

Solution d'Imidazole

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Imidazole	M = 68,08 g.mol ⁻¹	3 M	20,4 g
Solution A	10X	0,1X	8,77 mL
Solution B	10X	0,1X	1,23 mL
<i>eau distillée qsp 100 mL et pH = 6</i>			

NaH₂PO₄ à 200 mM et NaCl à 5 M
Na₂HPO₄ à 200 mM et NaCl à 5 M

Tampon de lavage

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Solution d'imidazole	3 M	20 mM	100 mL
<i>tampon Native Purification 1X qsp 100 mL et pH = 8</i>			

Tampon de reprise

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
SDS	10 %	2 %	8 mL
Glycérol	80 %	20 %	10 mL
Tris-HCl, pH=8	1M	60 mM	2,5 mL
<i>eau distillée qsp 40 mL</i>			

Tampon de lyse (Native Binding)

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Solution d'imidazole	3 M	10 mM	99 µL
Glycérol	80 %	5 %	1,875 mL
<i>Tampon Native Purification 1X qsp 30 mL et pH = 8</i>			
Protease Inhibition Cocktail for plantes		5 mM	30 µL
Lysozyme		0,5 mg.mL ⁻¹	15 mg
<i>pH = 7,5 (monoterpène synthases et réductases) ou 8 (sesquiterpène synthases)</i>			

Tampon HEPES

Produits	Masse molaire	Concentration finale	Quantité
HEPES	238,2 g.mol ⁻¹	50 mM	238,2 mg
<i>qsp eau distillée 20 mL et pH = 7</i>			
Protease Inhibition Cocktail for plantes		5 mM	20 µL
Lysozyme		0,5 mg.mL ⁻¹	10 mg

Tampon de Landmann

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Tris-HCl pH=8	1 M	25 mM	125 µL
Glycérol	80 %	5 %	312,5 µL
Solution MgCl ₂	200 mM	10 mM	250 µL
Solution MnCl ₂	100 mM	1 mM	50 µL
<i>eau distillée qsp 5 mL et pH = 7,5 (monoterpène synthases) ou 8 (sesquiterpène synthases)</i>			

Tampon d'élution

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Solution d'imidazole	3 M	250 mM	1,25 mL
<i>Tampon Native Purification 1X qsp 15 mL et pH = 8</i>			

Supplemental_data 6.3 | Solutions pour l'analyse des protéines par SDS-page

Gel de séparation (10%), pour 10 mL

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Tris-HCl pH=8,8	1,5 M	375 mM	2,5 mL
Eau distillée			4,8 mL
SDS	10 %	0,1 %	100 µL
APS	10%	0,1%	100 µL
Acrylamide	40 %	10 %	2,5 mL
TEMED			6 µL

Gel de concentration (5%), pour 5 mL

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Tris-HCl pH=6,8	0,5 M	125 mM	1,25 mL
Eau distillée			3,075 mL
SDS	10 %	0,1 %	50 µL
APS	10%	0,1%	60 µL
Acrylamide	40 %	5 %	625 µL
TEMED			5 µL

Tampon de migration

Produits	Masse molaire	Concentration finale	Quantité
Tris	121,14 g.mol ⁻¹	25 mM	3,03 g
SDS		0,1 %	1 g
Glycine	75,07 g.mol ⁻¹	192 mM	14,41 g
<i>eau distillée qsp 1L</i>			

Solution de coloration

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Bleu de Coomassie R250		0,25 %	0,5 g
Acide acétique	100%	20%	40 mL
Éthanol	100 %	20 %	40 mL
<i>eau distillée qsp 200 mL</i>			

Solution de décoloration (1 L)

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Eau distillée			450 mL
Éthanol	100 %	45 %	450 mL
Acide acétique	100 %	10 %	100 mL

Tampon de Laemli 4X

Produits	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité
Tris-HCl pH = 6,8	1 M	10 mM	2,5 mL
Glycérol	80 %	40 %	5 mL
SDS			0,8 g
Bleu de Bromophénol			2,5 mg
<i>eau distillée qsp 10 mL</i>			
<i>aliquoté par 500 µL, conservé à -20°C</i>			
β-mercaptoéthanol		25 %	70 µL

Conclusions & Perspectives

1 Conclusions du projet

La diversité des pélargoniums et notamment des pélargoniums odorant à longtemps attirée les parfumeurs et botanistes. De nos jours, cet intérêt se concentre autour de l'HE de *P. rosat*, très prisée pour la parfumerie fine. L'odeur de rose aux notes de citron, d'épices ou de menthe que renferme leur HE prend son origine dans sa composition : un mélange complexe de mono- et de sesqui-terpénoïdes. Actuellement, un regain d'intérêt est constaté dans le domaine des arômes et des parfums où les pélargoniums odorants sont considérés comme une source de molécules pour la confection de produits naturels et une source de nouvelles senteurs. Les producteurs souhaiteraient optimiser leur sélection variétale ainsi que la production et la qualité de l'HE afin de pouvoir assurer auprès des parfumeurs un approvisionnement stable en HE avec le meilleur parfum et à moindre coût.

La collaboration entre IFF-LMR-Naturals et le LBVpam vise à accroître les connaissances quant aux mécanismes de production du parfum chez les pélargoniums. Ainsi, ce projet de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les voies de biosynthèse du métabolisme terpénique ainsi que l'influence de stress abiotiques sur ce métabolisme. Nos travaux regroupent la caractérisation de trois mTPS, quatre sTPS et une réductase, impliquées dans la production d'une douzaine de terpénoïdes. Nous avons également mis en évidence les effets du climat sur la qualité de l'HE et créée une base de données multi-omiques. L'ensemble des résultats acquis offre de nombreuses perspectives pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la biosynthèse du parfum chez le pélargonium.

2 Deux P5βR pour deux énantiomères de citronellol

Parmi les objectifs de cette thèse, un des points essentiels était l'élucidation de la biosynthèse du citronellol. Ce tapuscrit présente la caractérisation chez *P. rosat* 'Grasse' de la GES (PhGES), responsable de la production du géraniol et la caractérisation de PhCIR1, impliquée dans la synthèse de citronellal à partir de citral. Par ailleurs, la construction d'une base de données multi-omiques permet d'envisager à court terme la caractérisation d'ADH qui viendrait compléter le schéma de biosynthèse du géraniol au citronellol. Les ADH de la famille des AKR ou des MDR sont des enzymes potentiellement impliquées dans l'oxydation du géraniol en géraniol et dans la réduction du citronellal en citronellol.

Actuellement, nos premières avancées ont mis en évidence que chez le pélargonium, du citronellol est produit à partir du géraniol, *via* une voie de biosynthèse en trois étapes : la production de géraniol et de citronellol est liée à celle de citral (géraniol et néral) et de citronellal. Ces composés sont parmi les terpénoïdes les plus importants dans l'industrie de la parfumerie (Chen et Viljoen, 2010 ; Lenardão *et al.*, 2007 ; Pybus et Sell, 2007 ; Saddiq et Khayyat, 2010 ; Surburg et Panten, 2006). Lors de la biosynthèse de ces molécules, la réduction du citronellal en citronellol s'effectue sur un carbone asymétrique et peut donc conduire soit au (R)-(+)-citronellal soit au (S)-(-)-citronellal. Ces composés sont ensuite réduits en (R)-(+)-citronellol et en (S)-(-)-citronellol respectivement.

La citral réductase caractérisée au cours de nos travaux (PhCIR1) appartient à la famille des P5 β R, connues pour être stéréospécifiques (Durchschein *et al.*, 2012 ; Gärtner, Keilholz et Seitz, 1994 ; Gavidia *et al.*, 2007 ; Geu-Flores *et al.*, 2012 ; Herl *et al.*, 2006 ; Herl *et al.*, 2009 ; Kries *et al.*, 2017). Notamment, testées *in vitro*, At5 β -StR caractérisée chez *Arabidopsis thaliana* (Durchschein *et al.*, 2012 ; Herl *et al.*, 2009), CrISY caractérisée chez *Catharanthus roseus* (Geu-Flores *et al.*, 2012 ; Kries *et al.*, 2017) et CpGER1 caractérisée chez *Caladenia plicata* (Xu *et al.*, 2017b) forment exclusivement du (S)-(-)-citronellal, issue d'une attaque nucléophile sur la face β du substrat. Par contre, AmISY caractérisée chez *Antirrhinum majus* (AmISY) produit 60 % de (R)-(+)- et 40 % de (S)-(-)-citronellal (Kries *et al.*, 2017). Chez le pélagonium, des analyses de la chiralité du citronellal produit par notre enzyme sont en cours et la chiralité du citronellol retrouvé dans l'HE de pélagonium a déjà fait l'objet d'études. Celles-ci ont montré que le ratio (R)-(+)- / (S)-(-)-citronellol est variable dans les hybrides cultivés (Ravid *et al.*, 1992). Le (S)-(-)-citronellol apportent une note de rose plus délicate et douce que le (R)-(+)-citronellol, le premier étant présent notamment en plus grande quantité dans l'HE de type 'Bourbon' (jusqu'à 70%) qui est la plus prisée. Chez certaines plantes un seul énantiomère est produit, comme chez la vigne où 95 % du citronellol se compose de l'énantiomère (S)-(-)-citronellol (Luan *et al.*, 2005). Cet énantiomère est également la forme prépondérante chez la rose (*Rosa x damascena*) (Ravid *et al.*, 1992). Chez d'autres plantes des mélanges racémiques ou avec un énantiomère majoritaire sont retrouvés. Par exemple, chez la citronnelle de Ceylan, ce sont les énantiomères (R)-(+)- de citronellal et de citronellol qui sont prépondérants (Surburg et Panten, 2006). D'où viennent ces différences de ratio énantiomérique ? Existe-il une autre réductase, de stéréosélectivité différente, impliquée dans la production de citronellol ? Est-ce que la stéréosélectivité varie selon le cofacteur utilisé ?

Étudier l'origine de l'énantiomérisation du citronellol chez le pélagonium présente donc un intérêt biologique et économique. Pour mieux comprendre les mécanismes en jeu, la poursuite de cette étude nécessite de réaliser des analyses chirales sur les HE des pélagoniums utilisés dans nos expériences (cultivés dans nos conditions et dont les transcriptomes sont disponibles). Ainsi, en comparant les ratios de citronellol produit par PhCIR1 et ceux retrouvés dans les HE, il sera possible d'estimer le rôle exact de PhCIR1 dans la production des énantiomères de citronellol. Notamment, si PhCIR1 est énantiospécifique et ne produit donc qu'un des énantiomères de citronellal, cela indiquera automatiquement qu'une autre voie ou une autre enzyme est à l'origine du second énantiomère.

Par ailleurs, *PhCIR1* présente des paralogues dont l'étude fonctionnelle n'a pas encore été réalisée. Ceci mène à penser que PhCIR1 ne pourrait être responsable que de la production d'un seul énantiomère. Dans le chapitre 4, les analyses phylogénétiques ont mis en évidence deux P5 β R bien exprimées chez *P. rosat* 'Grasse' : *PhCIR1* et son paralogue du même orthogroupe (*OT-P5 β R4*). *PhCIR1* présente des orthologues exprimés dans la plupart des accessions tandis que leurs paralogues respectifs sont exprimés uniquement chez les quatre hybrides de *P. rosat*. Les deux paralogues ayant des séquences très similaires, il est envisageable que les deux soient impliqués dans la production de citronellol. Une des perspectives de poursuite de ce projet, est la caractérisation de ce paralogue afin d'étudier son activité enzymatique et de déterminer si ce

paralogue peut effectivement produire du citronellal avec la même stéréosélectivité que PhCIR1. Le paralogue étant spécifique des *P. rosat*, il serait également intéressant de regarder la chiralité du citronellol dans les HE d'autres pélargoniums, tel que *P. x 'Toussaint'*, qui produit beaucoup de citronellol mais chez qui seulement PhCIR1 est exprimé ou *P. capitatum*, parent des *P. rosat* et très probablement à l'origine de leur capacité à produire du géranol et du citronellol.

D'autre part, des analyses structurales et des expériences de mutagenèse dirigée sur AmISY et CrISY indiquent que l'énantiosélectivité est liée à la structure du site actif de l'enzyme et est modifiée selon les acides aminés présents (Kries *et al.*, 2017). Au vu de la forte identité de séquences entre PhCIR1 et son paralogue, si leur énantiosélectivité est différente, des analyses structurales pourront pointer les acides aminés divergents et des expériences de mutagenèse dirigée pourront confirmer leur impact sur les proportions de (R)-(+)- et (S)-(-)-citronellal produites par l'enzyme.

Une autre possibilité serait que l'énantiosélectivité soit influencée par le cofacteur : contrairement à certaines P5 β R (Herl *et al.*, 2009) et aux études de Banthorpe, Long et Pink (1983), PhCIR1 est active aussi bien en présence de NADH que de NADPH. Les analyses tridimensionnelle de ces enzymes s'articulent beaucoup sur les variations conformationnelles autour de la poche catalytique et notamment à l'interface du substrat et du cofacteur. Finalement, une modification de leur position dans le site actif, selon le cofacteur ou selon la séquence de l'enzyme, pourrait être à l'origine d'une attaque nucléophile différente sur le citral.

3 Du citronellol aux oxydes de roses

Si la caractérisation de la voie du citronellol constitue un aspect original de cette thèse, cette voie connaît des prolongements métaboliques présumés conduire aux oxydes de rose. Ces molécules participent à l'odeur de rose de l'HE et offrent une odeur puissante souvent définie comme une odeur métallique de rose (Wüst et Mosandl, 1999 ; Yamamoto *et al.*, 2002) que les parfumeurs apprécient particulièrement. Il existe quatre isomères d'oxydes de rose : le (-)-cis-oxyde de rose, le (+)-cis-oxyde de rose, le (-)-trans-oxyde de rose et le (+)-trans-oxyde de rose (Figure 1) et chacun possède une odeur différente, avec des notes plus ou moins végétales, florales voire fruitées.

Très étudiées chez le raisin et dans le vin, des études de marquage ont mis en évidence leur formation à partir du citronellol (Koslitz *et al.*, 2008 ; Luan *et al.*, 2005) cependant jusqu'à maintenant aucune enzyme impliquée dans leur biosynthèse n'a été caractérisée. Chez les *P. rosat*, les oxydes de roses sont surtout présents dans les feuilles plus âgées et seraient synthétisés à partir du citronellol *via* une cytochrome oxydase (Wüst *et al.*, 1996 ; Wüst, Beck et Mosandl, 1998 ; Wüst *et al.*, 1998). En utilisant l'approche multi-omique ciblée sur les enzymes de la famille des cytochromes P450, la caractérisation de cette enzyme viendrait compléter notre élucidation de la voie du citronellol. Par ailleurs, étant donné que la chiralité des oxydes de rose est héritée de la chiralité du citronellol (Figure 1) (Wüst, Beck et Mosandl, 2002 ; Wüst et Mosandl, 1999), il serait également intéressant d'analyser les proportions des stéréoisomères des oxydes de

rose retrouvés chez les pélargoniums, ainsi que d'étudier la stéréosélectivité des enzymes qui les produisent.

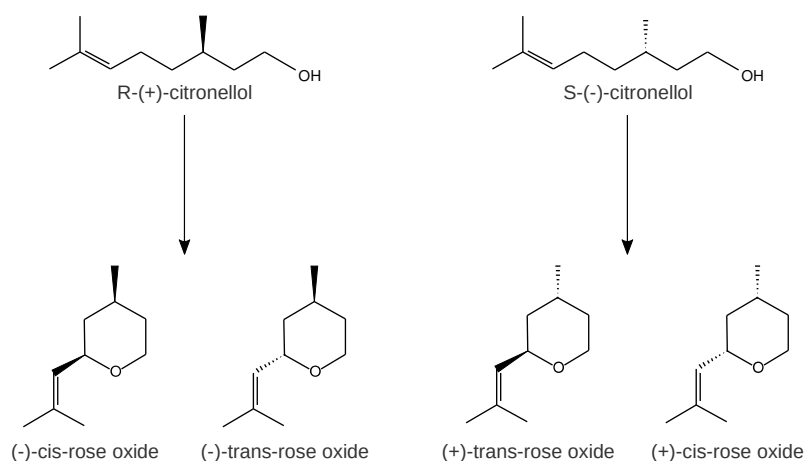


Figure 1 | Stéréoconfiguration des oxydes de roses

4 L'isomenthone chez les pélargoniums, une voie de biosynthèse originale ?

Une autre voie de biosynthèse intéressante à explorer serait celle des *p*-menthanes, correspondant notamment à la voie de production du (+)-isomenthone et de la (-)-menthone. Ces composés sont très présents chez les *P. rosat* et apportent à l'HE une odeur de menthe. D'après Bergman *et al.* (2020), la voie de ces *p*-menthanes chez le pélargonium débute comme chez la menthe : avec la production de limonène par une mTPS (Croteau *et al.*, 2005 ; Davis *et al.*, 2005). Chez la menthe, cette voie implique la formation de (+)-pulégone dont la réduction permet la formation de (+)-isomenthone et de (-)-menthone en mélange racémique (Figure 2A) (Božovic, Pirulli et Ragno, 2015 ; Ringer, Davis et Croteau, 2005). En revanche, chez le pélargonium, la présence majoritaire de (+)-isomenthone et l'absence de pulégone ont conduit à penser que la pipéritone serait l'intermédiaire dont la réduction conduirait à l'isomenthone (Figure 2B) (Bergman *et al.*, 2020). D'un autre côté, Bergman *et al.* (2020) ont montré que deux énantiomères de limonènes ((+) et (-)) sont présents chez le pélargonium. Ces deux énantiomères pourraient donc conduire à la (+)- et à la (-)-pipéritone et, *in fine*, au (+)-isomenthone et à la (-)-menthone. Dans cette hypothèse, étant donné que les limonène synthases déjà connues ont toutes montré une stéréospécificité (Croteau *et al.*, 2005 ; Hyatt *et al.*, 2007 ; Yuba *et al.*, 1996), il est envisageable que deux voies distinctes cohabitent et soient initiées par deux limonène synthases de stéréospécificité opposée.

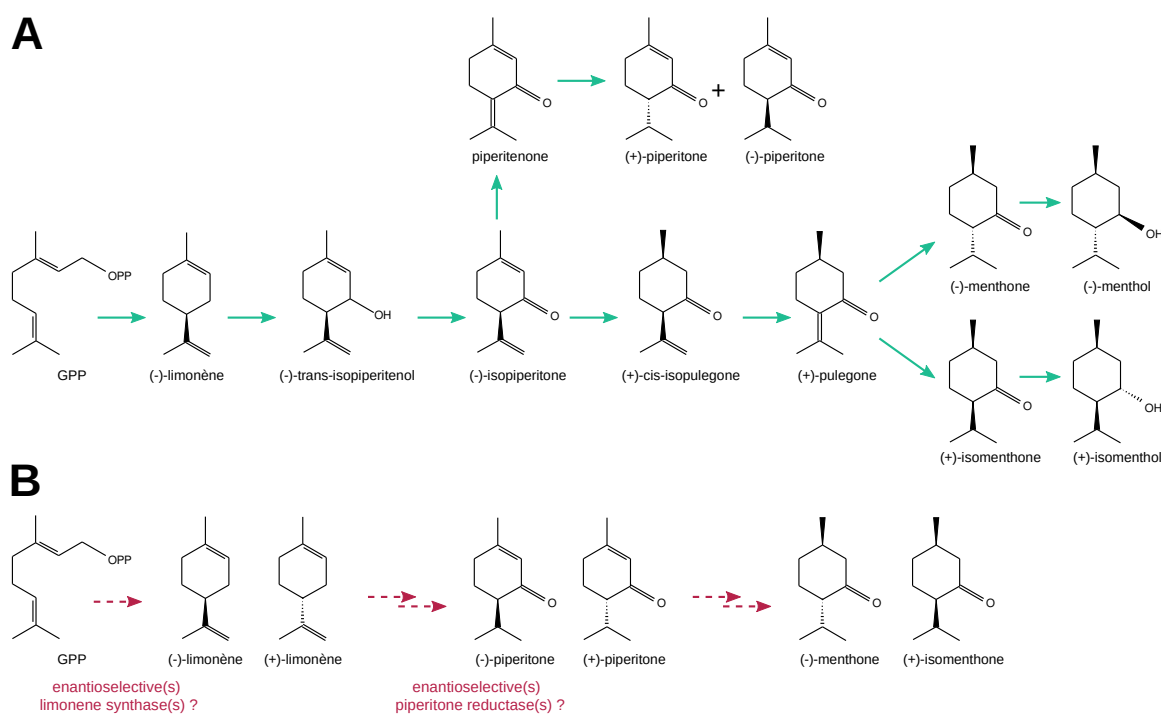


Figure 2 | Voies de *p*-menthanes chez (A) la menthe et (B) le pélagonium

(A) La voie présentée est celle décrite par Božovic *et al.* (2015). Elle correspond à la voie de biosynthèse des menthones et menthols qui débute avec la formation du limonène et *via* la (+)-pulégone. (B) Chez le pélagonium, la production de menthones débute également avec la formation de limonène. Contrairement à la menthe, les deux énantiomères de limonène sont retrouvés dans l'HE et l'intermédiaire présumé est la pipéritone et non la pulégone. Les flèches pleines indiquent les étapes enzymatiques élucidées et les flèches en pointillés indiquent les étapes non caractérisées. Une flèche double indique une succession d'étapes.

La question qui se pose alors est de savoir pourquoi chez le pélagonium le (+)-isomenthone est largement majoritaire par rapport à la (-)-menthone : quelle étape enzymatique est responsable du ratio (+)-isomenthone:(-)-menthone ? Est-ce le résultat du ratio de (+)- / (-)-limonène, du ratio de (+)- / (-)-pipéritone ou bien d'une combinaison des deux ? Le ratio de (+)- / (-)-limonène est-il obtenu *via* une ou deux limonène synthase(s) ? Existe-t-il deux voies énantiospécifiques distinctes, allant du (-)-limonène à la (-)-menthone d'une part et du (+)-limonène au (+)-isomenthone d'autre part ? La formation de la pipéritone est-elle également énantiométrique ? L'énantiométrie est-elle conservée lors de la réduction de la pipéritone ?

Une des perspectives issue de nos travaux est donc d'utiliser la même méthodologie que celle présentée dans le chapitre 1 mais pour les mTPS. À partir des analyses de corrélation obtenues, les mTPS dont l'expression corrèle positivement avec l'accumulation des différents composés de la voies des *p*-menthanes pourront être identifiées afin de caractériser la ou les limonène synthase(s) et d'étudier leur énantiométrie. Dans un second temps, d'autres familles d'enzymes, impliquées dans les étapes suivantes de la voie, pourront être étudiées de la même manière.

5 Stress climatique et données transcriptomiques pour aborder les mécanismes de régulation

Une partie de ma thèse consistait à tester différentes conditions climatiques sur la culture de *P. rosat* et nous avons pu mettre en évidence que le terpénome est affecté par un stress chaud et

sec. En comparant les profils terpéniques obtenus pour les différents cultivars dans deux conditions de stress, nos observations ont permis de confirmer des études préliminaires entreprises par Dr B. Blerot, à savoir que le climat est un des paramètres influençant la production d'HE produite chez les *P. rosat*. Nous avons montré plus précisément que l'influence du climat est cultivar-dépendante. Nous avons pu observer aussi que les modifications de la synthèse terpénique étaient différentes selon l'intensité du stress : un stress modéré a induit une augmentation de la production terpénique alors qu'un stress plus sévère a conduit à une réduction majeure des quantités de terpènes produites. De manière qualitative, les modifications observées dépendaient des voies métaboliques considérées. En particulier, deux voies de biosynthèse sont ressorties lors de nos analyses : la voie du citronellol et la voie des *p*-menthanes, dont les variations suggèrent l'existence de régulations intrinsèques à des voies de biosynthèse spécifiques. Ces résultats nécessitent d'être répétés pour confirmer l'effet différentiel entre stress modéré et sévère. Dans ce cas, ce modèle d'étude permettrait d'aborder à un niveau moléculaire les mécanismes de régulations induits par le stress. Afin de valider nos hypothèses, il serait donc important de réitérer l'expérience en réalisant en parallèle des analyses biochimiques et des extractions d'ARN pour des analyses par RNAseq. Ainsi, avec les données transcriptomiques, les variations d'expression des gènes de la biosynthèse terpénique pourront être étudiées afin d'identifier les points clés de la régulation induite par un stress climatique. Notamment, les *TPS* et les gènes en amont, dans les voies du MEP et du MVA, dont l'implication de la régulation a déjà pu être démontrée dans d'autres modèles, pourront être plus particulièrement ciblés (Majroomi Senji et Abdollahi Mandoulakani, 2018 ; Pateraki et Kanellis, 2010 ; Pazouki et Niinemetst, 2016 ; Zhou *et al.*, 2020).

Au-delà des gènes codant les enzymes des voies de biosynthèse étudiées chez le pélargonium, ces données transcriptomiques pourraient nous permettre de mesurer l'effet du stress sur l'expression spécifique de facteurs de transcription (FT) potentiellement impliqués dans la régulation du métabolisme terpénique. La régulation de la biosynthèse terpénique implique souvent un contrôle au niveau transcriptionnel des gènes codant les *TPS* (Nagegowda, 2010 ; Tholl, 2006). De telles régulations impliquent des FT qui vont venir se fixer sur les promoteurs de gènes cibles et induire ou inhiber l'expression de ces gènes. GaWRKY1 chez le coton (Xu *et al.*, 2004), CrORCA3 chez la pervenche de Madagascar (Van Der Fits et Memelink, 2000 ; Hedhili *et al.*, 2007), AaERF1, AaERF2 et AaYABBY5 chez l'armoise annuelle (Kayani *et al.*, 2019 ; Yu *et al.*, 2012), PAP1 chez la rose (Zvi *et al.*, 2012), MYC2 chez l'arabette des dames (Hong *et al.*, 2012), ZmEREB58 chez le maïs (Li *et al.*, 2015), AaNAC2, AaNAC3 et AaNAC4 chez le kiwi (Nieuwenhuizen *et al.*, 2015) et CitAP2.10 et CitERF71 chez l'oranger (Li *et al.*, 2017), sont autant de FT impliqués dans la régulation des *TPS* qui ont été caractérisés et dont l'expression pourrait être régulée par un stress climatique. L'expression et l'activité de la plupart de ces FT sont modulées en réponse aux jasmonates ou à l'éthylène. De manière plus générale, les FT ont un rôle crucial dans la régulation des gènes impliqués dans la défense de la plante, en réponse aux stress biotiques et abiotiques (Dong, Chen et Chen, 2003 ; Mizoi, Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2012 ; Singh, Foley et Oñate-Sánchez, 2002). Notamment, des FT appartenant aux mêmes familles – à savoir les familles des bHLH (de l'anglais *Basic helix-loop-helix*), des AP2/ERF (pour *APETALA2 / ethylene-responsive element binding factor*) ou encore des protéines MYB – sont sensibles à la température

(Dutta, Sen et Deswal, 2007 ; El-kereamy *et al.*, 2012 ; Kawoosa *et al.*, 2010 ; Koini *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 2012 ; Xie *et al.*, 2012b). Certains se sont d'ailleurs avérés avoir un impact sur la régulation de la synthèse de dérivés terpéniques (Dutta, Sen et Deswal, 2007 ; Kawoosa *et al.*, 2010). Dès lors, à partir de données transcriptomiques obtenues dans différentes conditions climatiques, les différents *FT* exprimés chez le pélagonium pourraient être mis en évidence. Étant donné que les fonctions des *FT* sont relativement conservées d'une espèce à l'autre (Gantet et Memelink, 2002), en utilisant les *FT* déjà caractérisés et par comparaison des profils d'expression des *FT*, des *TPS* et des profils d'accumulation des terpénoïdes, il sera possible d'identifier des candidats impliqués dans la régulation des *TPS*.

6 La purification de trichomes, un outil pour répondre à des questions biologiques

En parallèle des études fonctionnelles et structurales réalisées sur les différentes enzymes caractérisées au cours de nos travaux, nous avons aussi étudié la localisation subcellulaire de l'expression des gènes correspondants. En revanche, aucune localisation tissulaire n'a été réalisée afin de déterminer si ces gènes sont exprimés spécifiquement dans les trichomes, dans les feuilles ou bien dans les deux. Les TG sont des structures spécialisées dans le stockage et l'émission des COV mais également dans leur biosynthèse (Huchelmann, Boutry et Hachez, 2017 ; Tissier, 2018). La présence d'une activité de biosynthèse des terpènes dans les TG isolés a été démontrée chez de nombreuses espèces comme le tabac (Guo, Severson et Wagner, 1994 ; Kandra et Wagner, 1988 ; Keene et Wagner, 1985), la menthe (Alonso *et al.*, 1992 ; Gershenzon, Maffei et Croteau, 1989 ; McConkey, Gershenzon et Croteau, 2000 ; Turner, Gershenzon et Croteau, 2000), le basilic (Iijima, Davidovich-Rikanati *et al.*, 2004 ; Iijima, Gang *et al.*, 2004), la sauge (Lattoo *et al.*, 2006), l'armoise (Olofsson *et al.*, 2011 ; Olsson *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009) ou encore la tomate (van der Hoeven *et al.*, 2000 ; McDowell *et al.*, 2011). Des techniques mises au point pour la purification de TG intacts (Gershenzon *et al.*, 1992) ont très vite permis d'extraire les ARN et de produire des données transcriptomiques (banque d'ANDc, d'EST ou données de RNAseq) spécifiques des gènes exprimés dans les TG (van der Hoeven *et al.*, 2000 ; McDowell *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2009). *Via* cette méthodologie, la localisation de l'expression de *TPS* dans les TG peut être démontrée (Wang, Gan et Wagner, 2002 ; Wang *et al.*, 2011) et de nouvelles *TPS* trichome-spécifiques peuvent être caractérisées (Sallaud *et al.*, 2009 ; Schillmiller *et al.*, 2009). Par comparaison des niveaux d'expression dans les TG et dans d'autres organes (tige, racine, feuilles, feuilles sans trichomes) (Olofsson *et al.*, 2011) la spécificité de leur activité enzymatique peut-être démontrée.

Chez le pélagonium, la densité de TG présents sur les feuilles se prête à cette expérimentation. De premiers essais de purification ont été conduits en collaboration avec l'Université de Louvain-la-Neuve³⁸. La maîtrise de cette technique au laboratoire permettrait de mieux cibler nos recherches de gènes candidats. En particulier, comme les ADH sont des enzymes très ubiquistes et que nombreuses d'entre elles peuvent présenter une activité *in vitro* avec le géraniol et le citronellal,

³⁸ Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve en Belgique

l'expression discriminante d'une *ADH* validerait son implication *in vivo* dans la voie de biosynthèse du citronellol.

Par ailleurs, les TG sont parfois qualifiés d'usine à métabolites spécialisés : comparés à des feuilles totales, les TG ont un métabolisme spécialisé plus actif. Par conséquent, les transcriptomes de TG isolés présentent un plus grand nombre de transcrits relatifs aux gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des métabolites spécialisés. Chez la menthe poivrée, des analyses de banque d'EST de TG isolés ont mis en évidence que 25 % des séquences obtenues correspondent à des gènes impliqués dans la production d'HE, que 7 % codent pour des protéines liées aux transports cellulaires et que le métabolisme spécialisé représente 35 % du métabolisme globale des trichomes (Lange *et al.*, 2000). Ainsi, cela facilite l'étude de ces gènes ; aussi bien les gènes codant les enzymes que ceux impliqués dans le transport des composés et la régulation de ce métabolisme. Chez la menthe par exemple, une étude comparative des transcriptomes de feuilles, de trichomes et de feuilles dépourvues de trichomes a permis une description complète des gènes exprimés différemment dans les trichomes. Cette étude a conduit à l'identification de 16 TPS, 18 cytochrome P450, 5 protéines de transfert de lipides et au moins 20 FT préférentiellement exprimés dans les trichomes (Jin *et al.*, 2014).

Par ailleurs, plusieurs questions relatives au transport des métabolites spécialisés à l'intérieur des TG subsistent (Tissier, Morgan et Dudareva, 2017). Bien que le transfert des terpènes puisse se faire par diffusion simple à travers les membranes, les gradients de concentrations entre les cellules sécrétrices et la cavité de stockage suggèrent des mécanismes plus complexes, vouer à maintenir une concentration faible en terpènes dans les cellules sécrétrices et à éviter une toxicité cellulaire. Plusieurs théories quant aux mécanismes en place ont été avancées et sont encore sujettes à controverses (Tissier, Morgan et Dudareva, 2017 ; Widhalm *et al.*, 2015).

La participation de certains transporteurs ABC (de l'anglais, *ATP Binding Cassette*) au transport de métabolites spécialisés (dont des terpénoïdes) (Hwang *et al.*, 2016) et la caractérisation chez le tabac et l'armoise annuelle d'un transporteur ABC (NtPDR1 et AaPDR3 respectivement) capable de réaliser le transport de di- et sesqui-terpènes (Crouzet *et al.*, 2013 ; Fu *et al.*, 2017) suggèrent un mécanisme de transport actif. Parallèlement, il a été démontré que des protéines de transfert de lipides (LTP) sont capables d'exporter des cires lipidiques et des diterpènes à travers la paroi cellulaire, de la membrane plasmique à la cuticule (Choi *et al.*, 2012 ; DeBono *et al.*, 2009). Notamment, NtLTP1, caractérisé chez le tabac, est impliqué dans le transport de terpénoïdes dans les TG (Choi *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2016). La sécrétion des terpènes pourrait également reposer sur les transports vésiculaires des cellules : les terpènes présents dans les membranes intracellulaires (telles que les membranes chloroplastiques), en raison de leur caractère lipophile, pourraient être transportés jusqu'à la membrane plasmique *via* des vésicules membranaires (Mehrshahi, Johnny et DellaPenna, 2014 ; Tissier, Morgan et Dudareva, 2017). En revanche, les transports vésiculaires sont méconnus chez les plantes et leur implication dans le transport de COV reste incertaine. Une dernière hypothèse suggère une diffusion simple des terpènes, *via* les sites de contact membranaires (MCS, de l'anglais *membrane contact-site*) qui existent entre le réticulum

endoplasmique (RE) lisse et les organites ou la membrane plasmique (Widhalm *et al.*, 2015). Chez les TG, le RE est très présent dans les cellules sécrétrices et des MCS ont été observés entre le RE et les chloroplastes, le RE et les mitochondries et le RE et la membrane plasmique (Markus Lange et Turner, 2013). Pour autant, il n'existe aucune confirmation de leur implication dans le transport des terpénoïdes.

L'existence de ces différents mécanismes chez les TG est encore floue : les différents types de transport peuvent cohabiter ou être différents selon les espèces. Pour palier à cela, des analyses de protéomes complets de TG isolés sont utilisées afin d'évaluer les protéines présentes dans ces tissus et potentiellement impliquées dans le transport de terpénoïdes (Champagne et Boutry, 2016 ; Champagne et Boutry, 2013a ; Kryvych *et al.*, 2011). Cela a notamment permis de mettre en évidence différents transporteurs ABC, LTP et protéines liées au transport vésiculaire chez la menthe et le houblon (Champagne et Boutry, 2013b ; Champagne et Boutry, 2017). De la même manière, l'analyse de transcriptomes complets de TG isolés offre la possibilité d'identifier les différents gènes codant pour ces familles de protéines.

7 De la génomique pour compléter la transcriptomique

Au cours de ma thèse, nous avons mis en place une base de données regroupant les données biochimiques et transcriptomiques de dix accessions de pélargoniums odorants. Cette base de données nouvellement en place a été utilisée pour la caractérisation d'une citral réductase (PhCIR1) et de quatre de ses paralogues, pour la réalisation d'une étude phylogénique et multi-omique de l'ensemble des *sTPS* de la famille des *TPS-a* et, comme nous l'avons évoqué, elle pourra être utilisée dans de nombreuses analyses par la suite. En revanche, la ploïdie élevée de la majorité des accessions étudiées, combinée à l'absence de référence commune pour l'assemblage des transcrits, a conduit à l'obtention de données très fragmentées en particulier pour des gènes peu exprimés.

Afin d'exploiter au mieux ces données, un séquençage génomique ou/et transcriptomique « *long reads* » d'une espèce diploïde (par exemple grâce au MinION (Oxford Nanopore Technologies)), permettrait d'obtenir des reads plus longs sur lesquels aligner nos données transcriptomiques. Avec cette référence commune, un assemblage moins fragmenté et plus contigu serait obtenu. Par ailleurs, dans le cas d'un génome, cela offrirait la possibilité de nouvelles perspectives telle que la recherche d'un promoteur trichome-spécifique, localisé en amont du gène codant une enzyme elle-même trichome-spécifique. La caractérisation de ce type de promoteur chez d'autres espèces a conduit au développement d'applications biotechnologiques pour la recherche de facteurs de transcription ou l'expression de voies de biosynthèse exogènes dans des TG (Tissier, 2012). Certains promoteurs ont déjà été caractérisés chez le tabac (Wang, Gan et Wagner, 2002), la tomate (Spyropoulou, Haring et Schuurink, 2014), l'arabette (Ni *et al.*, 2008) et l'armoise annuelle (Jiang *et al.*, 2014).

La caractérisation d'un promoteur trichome-spécifique constituerait un outil biotechnologique pour les expériences de transformation de pélargonium. En effet, la transformation végétale permet

l'expression de gène dans la plante afin de vérifier leur activité *in vivo*. Généralement, l'expression de ces séquences exogènes se fait sous le contrôle d'un promoteur fort, tel que le promoteur 35S, isolé du virus de la mosaïque du tabac (CaMV, de l'anglais *Cauliflower Mosaic Virus*), afin d'avoir une surexpression marquée et significativement supérieure à celle du gène endogène. Or, il s'agit d'un promoteur ubiquiste qui induit l'expression du gène dans l'ensemble de la plante, sans spécificité de tissu. Dans le cas des gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse des terpénoïdes, la forte production de ces composés induit souvent une toxicité cellulaire qui empêche l'obtention de plantes transformées viables. En remplaçant le promoteur 35S par un promoteur trichome-spécifique, l'expression ciblée dans les trichomes permettrait d'éviter la toxicité du composé produit par l'enzyme surexprimée. La caractérisation d'un promoteur trichome-spécifique de pélargonium permettrait donc l'optimisation du protocole de transformation de ces plantes et nous permettrait d'utiliser cette méthode afin de vérifier l'activité *in vivo* de nos enzymes et notamment de PhCIR1 (et à terme de l'ADH de la voie du citronellol), dont le rôle métabolique est difficile à établir en raison de sa promiscuité.

Références Bibliographiques

- Abbas F., Ke Y., Yu R., Yue Y., Amanullah S., Jahangir M. M., Fan Y. « Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering ». *Planta* [En ligne]. 2017. Vol. 246, n°5, p. 803-816. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2749-x> >
- Adams R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, ed. 4.1.* [s.l.] : [s.n.], 2017. ISBN : 9781932633214.
- Adams S. R., Heinsteinst P. F. « Evidence for trans-trans and cis-cis farnesyl pyrophosphate synthesis in *Gossypium hirsutum* ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1973. Vol. 12, n°9, p. 2167-2172. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)85115-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)85115-5) >
- Agrawal A. A., Petschenka G., Bingham R. A., Weber M. G., Rasmann S. *Toxic cardenolides: Chemical ecology and coevolution of specialized plant-herbivore interactions* [En ligne]. *New Phytol.* 2012. Vol. 194, n°1, p. 28-45. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04049.x> >
- Akhila A. « Biosynthesis of monoterpenes in *cymbopogon winterianus* ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1986. Vol. 25, n°2, p. 421-424. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85493-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85493-X) >
- Alagna F., Geu-Flores F., Kries H., Panara F., Baldoni L., O'Connor S. E., Osbourn A. « Identification and characterization of the iridoid synthase involved in oleuropein biosynthesis in olive (*Olea europaea*) fruits ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 2016. Vol. 291, n°11, p. 5542-5554. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701276> >
- Albers F., Van der Walt J. J. A. « Geraniaceae ». In : *Flower. Plants · Eudicots* [En ligne]. [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 157-167. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/978-3-540-32219-1_19 >
- Albers F., Van der Walt J. J. A. « Untersuchungen zur Karyologie und Mikrosporogenese von *Pelargonium* sect. *Pelargonium* (Geraniaceae) ». *Plant Syst. Evol.* [En ligne]. septembre 1984. Vol. 147, n°3-4, p. 177-188. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF00989382> >
- Albers F., Van Der Walt J. J. A. « Karyological and chemotaxonomical studies of the hybrid *Pelargonium incarnatum* × *P. patulum* (Geraniaceae) and its parents ». *Plant Syst. Evol.* [En ligne]. 1992. Vol. 183, n°1-2, p. 161-167. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF00937740> >
- Albers F., Van der Walt J. J. A., Gibby M., Marschewski D. E., Price R. A., Du Preez G. « A biosystematic study of *Pelargonium* section *Ligularia*: 2. Reappraisal of section *Chorisma* ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 1995. Vol. 61, n°6, p. 339-346. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30556-1](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30556-1) >
- Ali A., Murphy C. C., Demirci B., Wedge D. E., Sampson B. J., Khan I. A., Baser K. H. C., Tabanca N. « Insecticidal and biting deterrent activity of rose-scented geranium (*Pelargonium* spp.) essential oils and individual compounds against *Stephanitis pyrioides* and *Aedes aegypti* ». *Pest Manag. Sci.* [En ligne]. 2013. Vol. 69, n°12, p. 1385-1392. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ps.3518> >
- Ali M. Ben, Allouche N., Ben Slima A., Barkallah M., Boudawara T., Traore A. I., Gdoura R. « Antioxidant 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.* [En ligne]. 2013. Vol. 12, n°1, p. 30. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1476-511x-12-30> >
- Allen K. D., McKernan K., Pauli C., Roe J., Torres A., Gaudino R. « Genomic characterization of the complete terpene synthase gene family from *Cannabis sativa*. » *PLoS One* [En ligne]. 12 septembre 2019. Vol. 14, n°9, p. e0222363. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222363> >
- Alonso W. R., Rajaonarivony J. I. M., Gershenzon J., Croteau R. « Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*) ». *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, n°11, p. 7582-7587.
- Alquézar B., Rodríguez A., De La Peña M., Peña L. « Genomic analysis of terpene synthase family and functional characterization of seven sesquiterpene synthases from *citrus sinensis* ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 2017. Vol. 8, n°August, p. 1-20. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01481> >
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs* [En ligne]. *Nucleic Acids Res.* 1997. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389> >
- Amin L. P., Pangarkar V. G., Beenackers A. A. C. M. « Recovery of valuable perfumery compounds from a geranium steam distillation condensate using polymeric adsorbents ». *Sep. Sci. Technol.* [En ligne]. 2001. Vol. 36, n°16, p. 3639-3655. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1081/SS-100108353> >
- Andersen C. L., Jensen J. L., Ørntoft T. F. « 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.* [En ligne]. 2004. Vol. 64, n°15, p. 5245-5250. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496> >
- Anderson M. S., Muehlbacher M., Street I. P., Proffitt J., Poulter C. D. « Isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. An improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*. » *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, n°32, p. 19169-19175.

- Andrews S. *FastQC* [En ligne]. 2010. Disponible sur : < <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> >
- Asgarpanah J., Ramezanloo F. « An overview on phytopharmacology of *Pelargonium graveolens* L ». *Indian J. Tradit. Knowl.* 2015. Vol. 14, n°4, p. 558-563.
- Aubourg S., Lecharny A., Bohlmann J. « Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana* ». *Mol. Genet. Genomics* [En ligne]. 2002. Vol. 267, n°6, p. 730-745. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0709-y> >
- Babu K. G. D., Kaul V. K., Ahuja P. S. « Portable mini essential oil distillation apparatus ». *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 2002. Vol. 61, n°11, p. 952-960.
- Bach T. J. « Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants-A review ». *Lipids* [En ligne]. 1995. Vol. 30, n°3, p. 191-202. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF02537822> >
- Back K. W., Yin S. H., Chappell J. *Expression of a plant sesquiterpene cyclase gene in Escherichia coli* [En ligne]. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. Vol. 315, n°2, p. 527-532. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1533> >
- Baden C. U., Geier T., Franke S., Dobler S. « Sequestered iridoid glycosides - Highly effective deterrents against ant predators? ». *Biochem. Syst. Ecol.* [En ligne]. 2011. Vol. 39, n°4-6, p. 897-901. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.07.014> >
- Bakker F. T., Breman F., Merckx V. « DNA sequence evolution in fast evolving mitochondrial DNA nad1 exons in Geraniaceae and Plantaginaceae ». *Taxon* [En ligne]. 2006. Vol. 55, n°4, p. 887-896. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2307/25065683> >
- Bakker F. T., Culham A., Daugherty L. C., Gibby M. « A trnL-F based phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosomes ». *Plant Syst. Evol.* [En ligne]. 1999. Vol. 216, n°3-4, p. 309-324. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF01084405> >
- Bakker F. T., Culham A., Hettiarachi P., Touloumenidou T., Gibby M. « Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes ». *Taxon*. 2004. n°February, p. 17-28.
- Bakker F. T., Culham A., Marais E. M., Gibby M. « Nested radiation in Cape *Pelargonium* ». In : *Plant species-level Syst. new Perspect. pattern Process.* [s.l.] : [s.n.], 2005. p. 75-100.
- Bakker F. T., Culham A., Pankhurst C. E., Gibby M. « Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) ». *Am. J. Bot.* [En ligne]. 2000. Vol. 87, n°5, p. 727-734. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2307/2656859> >
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S., Lesin V. M., Nikolenko S. I., Pham S., Pribelski A. D., Pyshkin A. V., Sirotkin A. V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M. A., Pevzner P. A. « SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing ». *J. Comput. Biol.* [En ligne]. avril 2012. Vol. 19, n°5, p. 455-477. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021> >
- Banthorpe D.V., Le Patourel G. « Biosynthesis of Geraniol ». 1972. Vol. 130, p. 1045-1054.
- Banthorpe D.V., Long D. R. S., Pink C. R. « Biosynthesis of geraniol and related monoterpenes in *Pelargonium graveolens* ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1983. Vol. 22, n°11, p. 2459-2463. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80140-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80140-X) >
- Banthorpe D. V., Poots I. « Redox interconversion of geraniol and nerol in *Rosa damascena* ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1 janvier 1979. Vol. 18, n°8, p. 1297-1299. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)83011-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)83011-3) >
- Barbour J. D., Farrar R. R., Kennedy G. G. « Interaction of fertilizer regime with host-plant resistance in tomato ». *Entomol. Exp. Appl.* [En ligne]. 1991. Vol. 60, n°3, p. 289-300. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1991.tb01549.x> >
- Barton D. *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids* [En ligne]. Amsterdam : Elsevier, 1999. 1-400 p. Disponible sur : < <https://doi.org/10.5860/choice.37-0939> > ISBN : 0-08-043154-2.
- Batoko H., Zheng H. Q., Hawes C., Moore I. « A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants ». *Plant Cell* [En ligne]. 2000. Vol. 12, n°11, p. 2201-2217. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2201> >
- Baudino S., Caissard J. C., Bergougnoux V., Jullien F., Magnard J. L., Scalliet G., Cock J. M., Huguency P. « Production and emission of volatile compounds by petal cells ». *Plant Signal. Behav.* [En ligne]. 2007. Vol. 2, n°6, p. 525-526. Disponible sur : < <https://doi.org/10.4161/psb.2.6.4659> >
- Bauer P., Munkert J., Brydziun M., Burda E., Müller-Uri F., Gröger H., Muller Y. A., Kreis W. « Highly conserved progesterone 5 β -reductase genes (P5 β R) from 5 β -cardenolide-free and 5 β -cardenolide-producing angiosperms ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2010. Vol. 71, n°13, p. 1495-1505. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.004> >
- Benabdelkader T., Guitton Y., Pasquier B., Magnard J. L., Jullien F., Kameli A., Legendre L. « Functional characterization of terpene synthases and chemotypic variation in three lavender species of section *Stoechas* ». *Physiol. Plant.* [En ligne]. janvier 2015. Vol. 153, n°1, p. 43-57. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/ppl.12241> >
- Benedict C. R., Lu J. L., Pettigrew D. W., Liu J., Stipanovic R. D., Williams H. J. « The cyclization of farnesyl diphosphate and nerolidyl diphosphate by a purified recombinant δ -cadinene synthase ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2001. Vol. 125, n°4, p. 1754-1765. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1754> >

- Beninger C. W., Cloutier R. R., Grodzinski B. « The iridoid glucoside, antirrhinoside, from *Antirrhinum majus* L. has differential effects on two generalist insect herbivores ». *J. Chem. Ecol.* [En ligne]. 2008. Vol. 34, n°5, p. 591-600. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9445-z> >
- Bennett R. N., Wallsgrave R. M. « Secondary metabolites in plant defence mechanisms ». *New Phytol.* [En ligne]. 1994. Vol. 127, n°4, p. 617-633. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x> >
- Bergman M. E., Chávez Á., Ferrer A., Phillips M. A., Napier R. « Distinct metabolic pathways drive monoterpenoid biosynthesis in a natural population of *Pelargonium graveolens* ». *J. Exp. Bot.* [En ligne]. 2020. Vol. 71, n°1, p. 258-271. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/jxb/erz397> >
- Betray G., Vömel A. *Influence of Temperature on Yield and Active Principles of Chamomilla Recutita (L.) Rausch. Under Controlled Conditions* [En ligne]. *Acta Hortic.* 1992. n°306, p. 83-87. Disponible sur : < <https://doi.org/10.17660/actahortic.1992.306.6> >
- Bhattacharya A. K., Kaul P. N., Rajeswara Rao B. R., Ramesh S. I., Mallavarapu G. R. « Composition of the oil of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) grown under the semiarid tropical climate of South India ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1993. Vol. 5, n°2, p. 229-231. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698209> >
- Blanc V. M., Pichersky E. « Nucleotide sequence of a *Clarkia breweri* cDNA clone of Ipi1, a gene encoding isopentenyl pyrophosphate isomerase ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1995. Vol. 108, n°2, p. 855-856. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.108.2.855> >
- Blerot B., Baudino S., Prunier C., Demarne F.-E., Toulemonde B., Caissard J. C. *Botany, agronomy and biotechnology of Pelargonium used for essential oil production* [En ligne]. *Phytochem. Rev.* 31 octobre 2016. Vol. 15, n°5, p. 935-960. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9441-1> >
- Blerot B., Martinelli L., Prunier C., Saint-Marcoux D., Legrand S., Bony A., Sarrabère L., Gros F., Boyer N., Caissard J.-C., Baudino S., Jullien F. « Functional Analysis of Four Terpene Synthases in Rose-Scented *Pelargonium* Cultivars (*Pelargonium* × *hybridum*) and Evolution of Scent in the *Pelargonium* Genus ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 2018. Vol. 9, Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01435> >
- Bloch K., Chaykin S., Phillips A. H., De Waard A. « Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 1959. Vol. 234, n°10, p. 2595-2604. Disponible sur : < <https://www.jbc.org/content/234/10/2595.short> >
- Boachon B., Burdloff Y., Ruan J. X., Rojo R., Junker R. R., Vincent B., Nicolè F., Bringel F., Lesot A., Henry L., Bassard J. E., Mathieu S., Allouche L., Kaplan I., Dudareva N., Vuilleumier S., Miesch L., André F., Navrot N., Chen X. Y., Werck-Reichhart D. « A Promiscuous CYP706A3 Reduces Terpene Volatile Emission from *Arabidopsis* Flowers, Affecting Florivores and the Floral Microbiome ». *Plant Cell* [En ligne]. 2019. Vol. 31, n°12, p. 2947-2972. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00320> >
- Boachon B., Junker R. R., Miesch L., Bassard J. E., Höfer R., Caillieudeaux R., Seidel D. E., Lesot A., Heinrich C., Ginglinger J. F., Allouche L., Vincent B., Wahyuni D. S. C., Paetz C., Beran F., Miesch M., Schneider B., Leiss K., Werck-Reichhart D. « CYP76C1 (Cytochrome P450)-mediated linalool metabolism and the formation of volatile and soluble linalool oxides in *Arabidopsis* flowers: A strategy for defense against floral antagonists ». *Plant Cell* [En ligne]. 2015. Vol. 27, n°10, p. 2972-2990. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00399> >
- Boetzer M., Henkel C. V., Jansen H. J., Butler D., Pirovano W. « Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE ». *Bioinformatics* [En ligne]. février 2011. Vol. 27, n°4, p. 578-579. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683> >
- Bohlmann J., Meyer-Gauen G., Croteau R. « Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 14 avril 1998. Vol. 95, n°8, p. 4126-4133. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4126> >
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. « Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data ». *Bioinformatics* [En ligne]. août 2014. Vol. 30, n°15, p. 2114-2120. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170> >
- Bonnot C., Proust H., Pinson B., Colbalchini F. P. L., Lesly-Veillard A., Breuninger H., Champion C., Hetherington A. J., Kelly S., Dolan L. « Functional PTB phosphate transporters are present in streptophyte algae and early diverging land plants ». *New Phytol.* [En ligne]. 2017. Vol. 214, n°3, p. 1158-1171. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/nph.14431> >
- Bosch M., Wright L. P., Gershenzon J., Wasternack C., Hause B., Schaller A., Stintzi A. « Jasmonic acid and its precursor 12-Oxophytodienoic acid control different aspects of constitutive and induced herbivore defenses in tomato ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2014. Vol. 166, n°1, p. 396-410. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.114.237388> >
- Bose S. K., Yadav R. K., Mishra S., Sangwan R. S., Singh A. K., Mishra B., Srivastava A. K., Sangwan N. S. « Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L ». *Plant Physiol. Biochem.* [En ligne]. 2013. Vol. 66, p. 150-158. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.011> >
- Boukhris M., Simmonds M. S. J., Sayadi S., Bouaziz M. « Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *pelargonium graveolens* ». *Phyther. Res.* [En ligne]. 2012. Vol. 27, n°8, p. 1206-1213. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ptr.4853> >
- Boukhris M., Ben Nasri-Ayachi M., Mezghani I., Bouaziz M., Boukhris Makki, Sayadi S. « Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae) ». *Ind. Crops Prod.* [En ligne]. 2013. Vol. 50, p. 604-610. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.029> >

- Bowers M. D. « Chemistry and Coevolution: Iridoid Glycosides, Plants, and Herbivorous Insects ». In : Spencer KC (éd.). *Chem. Mediat. Coevol.* [En ligne]. San Diego : Academic Press, 1988. p. 133-165. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-656855-4.50010-3> > ISBN : 978-0-12-656855-4.
- Bowers M. D. « The role of iridoid glycosides in host-plant specificity of checkerspot butterflies ». *J. Chem. Ecol.* [En ligne]. 1983. Vol. 9, n°4, p. 475–493. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/jzo.12106> >
- Božovic M., Pirolli A., Ragno R. « *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry ». *Molecules* [En ligne]. 2015. Vol. 20, n°5, p. 8605-8633. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3390/molecules20058605> >
- Brade W. P. « Critical Review of Pharmacology, Toxicology, Pharmacokinetics of Vincristine, Vindesine, Vinblastine ». 1981. p. 95-123. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1159/000428623> >
- Bradford M. M. « A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding ». *Anal. Biochem.* [En ligne]. 7 mai 1976. Vol. 72, n°1-2, p. 248-254. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3) >
- Burda E., Kraußner M., Fischer G., Hummel W., Müller-Uri F., Kreis W., Gröger H. « Recombinant Δ 4,5-steroid 5 β -reductases as biocatalysts for the reduction of activated C=C-double bonds in monocyclic and acyclic molecules ». *Adv. Synth. Catal.* [En ligne]. novembre 2009. Vol. 351, n°17, p. 2787-2790. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/adsc.200900024> >
- Burkhardt I., Siemon T., Henrot M., Studt L., Rösler S., Tudzynski B., Christmann M., Dickschat J. S. « Mechanistic Characterisation of Two Sesquiterpene Cyclases from the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium fujikuroi* ». *Angew. Chemie - Int. Ed.* [En ligne]. 2016. Vol. 55, n°30, p. 8748-8751. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/anie.201603782> >
- Busso D., Delagoutte-Busso B., Moras D. « Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli* ». *Anal. Biochem.* [En ligne]. 15 août 2005. Vol. 343, n°2, p. 313-321. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.05.015> >
- Caissard J. C., Olivier T., Delbecq C., Palle S., Garry P. P., Audran A., Valot N., Moja S., Nicolé F., Magnard J. L., Legrand S., Baudino S., Jullien F. « Extracellular Localization of the Diterpene Sclareol in Clary Sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae) ». *PLoS One* [En ligne]. 2012. Vol. 7, n°10, p. 1-8. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048253> >
- De Candolle A. P. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* [En ligne]. Paris : Sumptibus Sociorum Treuttel et Würtz, 1824. 1-758 p. Disponible sur : < <https://www.biodiversitylibrary.org/item/7150> >
- Cane D. E. « Sesquiterpene Biosynthesis: Cyclization Mechanisms ». *Compr. Nat. Prod. Chem.* [En ligne]. 1999. p. 155-200. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091283-7.00039-4> >
- Cane D. E. « Enzymatic Formation of Sesquiterpenes ». *Chem. Rev.* [En ligne]. 1990. Vol. 90, n°7, p. 1089-1103. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/cr00105a002> >
- Cane D. E., Xue Q., Fitzsimons B. C. « Trichodiene synthase. Probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis ». *Biochemistry* [En ligne]. 1996. Vol. 35, n°38, p. 12369-12376. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/bi961344y> >
- Cao R., Zhang Y., Mann F. M., Huang C., Mukkamala D., Hudock M. P., Mead M. E., Pristic S., Wang K., Lin F. Y., Chang T. K., Peters R. J., Oldfield E. « Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold ». *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* [En ligne]. 2010. Vol. 78, n°11, p. 2417-2432. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/prot.22751> >
- Champagne A., Boutry M. « Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species ». *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* [En ligne]. août 2016. Vol. 1864, n°8, p. 1039-1049. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.02.010> >
- Champagne A., Boutry M. « Proteomics of nonmodel plant species ». *Proteomics* [En ligne]. 2013a. Vol. 13, n°3-4, p. 663-673. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/pmic.201200312> >
- Champagne A., Boutry M. « Proteomic snapshot of spearmint (*Mentha spicata* L.) leaf trichomes: A genuine terpenoid factory ». *Proteomics* [En ligne]. novembre 2013b. Vol. 13, n°22, p. 3327-3332. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/pmic.201300280> >
- Champagne A., Boutry M. « A comprehensive proteome map of glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.) female cones: Identification of biosynthetic pathways of the major terpenoid-related compounds and possible transport proteins ». *Proteomics* [En ligne]. 2017. Vol. 17, n°8,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/pmic.201600411> >
- Chang S., Puryear J., Cairney J. « A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees ». *Plant Mol. Biol. Report.* [En ligne]. juin 1993. Vol. 11, n°2, p. 113-116. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF02670468> >
- Chappell J., Wolf F., Proulx J., Cuellar R., Saunders C. « Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1995. Vol. 109, n°4, p. 1337-1343. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1337> >
- Charlwood B. V., Charlwood K. A. « *Pelargonium* spp. (Geranium): In Vitro Culture and the Production of Aromatic Compounds ». 1991. Vol. 15, p. 339-352. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/978-3-642-84071-5_20 >
- Chauhan A., Verma R. S. « Cultivation potential of three rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*) cultivars in the Kumaon region of western Himalayas ». *Med. Arom. Plant Sci. Biotech.* 2010. Vol. 4, p. 77-79.

- Chen F., Tholl D., Bohlmann J., Pichersky E. « The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom ». *Plant J.* [En ligne]. mars 2011. Vol. 66, n°1, p. 212-229. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04520.x> >
- Chen H., Li G., Köllner T. G., Jia Q., Gershenzon J., Chen F. « Positive Darwinian selection is a driving force for the diversification of terpenoid biosynthesis in the genus *Oryza* ». *BMC Plant Biol.* [En ligne]. 16 septembre 2014. Vol. 14, n°1. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0239-x> >
- Chen J. W., Bai K. D., Cao K. F. « Inhibition of monoterpene biosynthesis accelerates oxidative stress and leads to enhancement of antioxidant defenses in leaves of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) ». *Acta Physiol. Plant.* [En ligne]. 2009. Vol. 31, n°1, p. 95-101. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0205-z> >
- Chen W., Viljoen A. M. « Geraniol - A review of a commercially important fragrance material ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 2010. Vol. 76, n°4, p. 643-651. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008> >
- Cheng A. X., Lou Y. G., Mao Y. B., Lu S., Wang L. J., Chen X. Y. « Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions ». *J. Integr. Plant Biol.* [En ligne]. 2007. Vol. 49, n°2, p. 179-186. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x> >
- Chenge-Espinosa M., Cordoba E., Romero-Guido C., Toledo-Ortiz G., León P. « Shedding light on the methylerythritol phosphate (MEP)-pathway: long hypocotyl 5 (HY5)/phytochrome-interacting factors (PIFs) transcription factors modulating key limiting steps ». *Plant J.* [En ligne]. 2018. Vol. 96, n°4, p. 828-841. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/tpj.14071> >
- Choi Y. E., Lim S., Kim H. J., Han J. Y., Lee M. H., Yang Y., Kim J. A., Kim Y. S. « Tobacco NtLTP1, a glandular-specific lipid transfer protein, is required for lipid secretion from glandular trichomes ». *Plant J.* [En ligne]. 2012. Vol. 70, n°3, p. 480-491. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04886.x> >
- Christensen D. J., Poulter C. D. « Enzymatic synthesis of isotopically labeled isoprenoid diphosphates ». *Bioorganic Med. Chem.* [En ligne]. 1994. Vol. 2, n°7, p. 631-637. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(94\)85011-9](https://doi.org/10.1016/0968-0896(94)85011-9) >
- Christianson D. W. « Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases ». *Chem. Rev.* [En ligne]. 2017. Vol. 117, n°17, p. 11570-11648. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287> >
- Christianson D. W. *Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2006. 3412-3442 p. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/cr050286w> > ISBN : 2155732201.
- Christianson D. W. *Unearthing the roots of the terpenome* [En ligne]. *Curr. Opin. Chem. Biol.* avril 2008. Vol. 12, n°2, p. 141-150. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.12.008> >
- Chumley T. W., Palmer J. D., Mower J. P., Fourcade H. M., Calie P. J., Boore J. L., Jansen R. K. « The complete chloroplast genome sequence of *Pelargonium x hortorum*: Organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants ». *Mol. Biol. Evol.* [En ligne]. 2006. Vol. 23, n°11, p. 2175-2190. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/molbev/msl089> >
- Cock J. M., Swarup R., Dumas C. « Natural antisense transcripts of the S locus receptor kinase gene and related sequences in *Brassica oleracea* ». *Mol. Gen. Genet.* [En ligne]. 1997. Vol. 255, n°5, p. 514-524. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s004380050524> >
- Collu G., Unver N., Peltenburg-Looman A. M. G., Van der Heijden R., Verpoorte R., Memelink J. « Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis ». *FEBS Lett.* [En ligne]. 2001. Vol. 508, n°2, p. 215-220. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03045-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03045-9) >
- Contin A., Van Der Heijden R., Lefeber A. W. M., Verpoorte R. « The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture ». *FEBS Lett.* [En ligne]. 1998. Vol. 434, n°3, p. 413-416. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01022-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01022-9) >
- Copley S. D. « An evolutionary biochemist's perspective on promiscuity ». *Trends Biochem. Sci.* [En ligne]. 2015. Vol. 40, n°2, p. 72-78. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.12.004> >
- Copolovici L. O., Kännaste A., Pazouki L., Niinemets Ü. « Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments ». *J. Plant Physiol.* [En ligne]. 2012. Vol. 169, n°7, p. 664-672. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.019> >
- Copolovici L. O., Filella I., Llusà J., Niinemets Ü., Peñuelas J. « The Capacity for Thermal Protection of Photosynthetic Electron Transport Varies for Different Monoterpenes in *Quercus ilex* ». *Plant Physiol.* [En ligne]. septembre 2005. Vol. 139, n°1, p. 485-496. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.105.065995> >
- Cordell G. A. *The biosynthesis of indole alkaloids*. [En ligne]. *Lloydia*. 1 juin 1974. Vol. 37, n°2, p. 219-298. Disponible sur : < <https://europepmc.org/article/med/4605222> >
- Crococoll C., Asbach J., Novak J., Gershenzon J., Degenhardt J. « Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis ». *Plant Mol. Biol.* [En ligne]. 2010. Vol. 73, n°6, p. 587-603. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9636-1> >
- Croteau R. B., Davis E. M., Ringer K. L., Wildung M. R. *(-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics* [En ligne]. *Naturwissenschaften*. 15 décembre 2005. Vol. 92, n°12, p. 562-577. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0055-0> >
- Crouzet J., Roland J., Peeters E., Trombik T., Ducos E., Nader J., Boutry M. « NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport ». *Plant Mol. Biol.* [En ligne]. 2013. Vol. 82, n°1-2, p. 181-192. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0053-0> >

- Crusoe M. R., Alameldin H. F., Awad S., Boucher E., Caldwell A., Cartwright R., Charbonneau A., Constantinides B., Edvenson G., Fay S., Fenton J., Fenzl T., Fish J., Garcia-Gutierrez L., Garland P., Gluck J., González I., Guermond S., Guo J., Gupta A., Herr J. R., Howe A., Hyer A., Härpfer A., Irber L., Kidd R., Lin D., Lippi J., Mansour T., McANulty P., McDonald E., Mizzi J., Murray K. D., Nahum J. R., Nanlohy K., Nederbragt A. J., Ortiz-Zuazaga H., Ory J., Pell J., Peperanney C., Russ Z. N., Schwarz E., Scott C., Seaman J., Sievert S., Simpson J., Skenneron C. T., Spencer J., Srinivasan R., Standage D., Stapleton J. A., Steinman S. R., Stein J., Taylor B., Trimble W., Wiencko H. L., Wright M., Wyss B., Zhang Q., Zyme En, Brown C. T. « The khmer software package: enabling efficient nucleotide sequence analysis ». *F1000Research* [En ligne]. septembre 2015. Vol. 4, p. 900. Disponible sur : < <https://doi.org/10.12688/f1000research.6924.1> >
- Cseke L., Dudareva N., Pichersky E. « Structure and evolution of linalool synthase ». *Mol. Biol. Evol.* [En ligne]. 1998. Vol. 15, n°11, p. 1491-1498. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025876> >
- Curtis M. D., Grossniklaus U. « A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1 octobre 2003. Vol. 133, n°2, p. 462-469. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979> >
- Daker M. G. *Chromosome numbers of Pelargonium species and cultivars*. *J Roy Hort Soc J.* 1969.
- Darriba D., Posada D., Kozlov A. M., Stamatakis A., Morel B., Flouri T. « ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models ». *Mol. Biol. Evol.* [En ligne]. 2019. Vol. 37, n°1, p. 291-294. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189> >
- Das A., Lee S. H., Hyun T. K., Kim S. W., Kim J. Y. « Plant volatiles as method of communication ». *Plant Biotechnol. Rep.* [En ligne]. 2013. Vol. 7, n°1, p. 9-26. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0236-1> >
- Davidovich-Rikanati R., Sitrit Y., Tadmor Y., Iijima Y., Bilenko N., Bar E., Carmona B., Fallik E., Dudai N., Simon J. E., Pichersky E., Lewinsohn E., Sitrit Y., Iijima Y., Pichersky E., Bilenko N., Fallik E., Simon J. E. « Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway ». *Nat. Biotechnol.* [En ligne]. 24 août 2007. Vol. 25, n°8, p. 899-901. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nbt1312> >
- Davis E. M., Croteau R. « Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes ». *Top. Curr. Chem.* 2000. Vol. 209,.
- Davis E. M., Ringer K. L., McConkey M. E., Croteau R. « Monoterpene Metabolism. Cloning, Expression, and Characterization of Menthone Reductases from Peppermint ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1 mars 2005. Vol. 137, n°3, p. 873-881. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.104.053306> >
- DeBono A., Yeats T. H., Rose J. K. C., Bird D., Jetter R., Kunst L., Samuels L. « Arabidopsis LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface ». *Plant Cell* [En ligne]. 2009. Vol. 21, n°4, p. 1230-1238. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064451> >
- Degenhardt J., Köllner T. G., Gershenzon J. « Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1 octobre 2009. Vol. 70, n°15-16, p. 1621-1637. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030> >
- Deguerry F., Pastore L., Wu S., Clark A., Chappell J., Schalk M. « The diverse sesquiterpene profile of patchouli, Pogostemon cablin, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 15 octobre 2006. Vol. 454, n°2, p. 123-136. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2006.08.006> >
- Delfine S., Csiky O., Seufert G., Loreto F. « Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): Monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures ». *New Phytol.* [En ligne]. 2000. Vol. 146, n°1, p. 27-36. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00612.x> >
- Demarne F.-E. « 'Rose-scented geranium' a *Pelargonium* grown for the perfume industry ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002. p. 205-223. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-23> >
- Demarne F.-E., Viljoen A. M., Van der Walt J. J. A. « 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.* [En ligne]. 1993. Vol. 5, n°5, p. 493-499. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698269> >
- Demarne F.-E., Van der Walt J. J. A. « Composition of the Essential Oil of *Pelargonium citronellum* (Geraniaceae) ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. mai 1993. Vol. 5, n°3, p. 233-238. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698214> >
- Demarne F.-E., Van der Walt J. J. A. « Origin of the rose-scented *Pelargonium* cultivar grown on Réunion Island ». *South African J. Bot.* [En ligne]. avril 1989. Vol. 55, n°2, p. 184-191. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(16\)31205-4](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)31205-4) >
- Dinda B. *Pharmacology and Applications of Naturally Occurring Iridoids* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2019. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/978-3-030-05575-2> > ISBN : 9783030055745.
- Dinda B., Debnath S., Banik R. « Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4 ». *Chem. Pharm. Bull.* [En ligne]. 2011. Vol. 59, n°7, p. 803-833. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1248/cpb.59.803> >
- Dinda B., Debnath S., Harigaya Y. « Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2 ». *Chem. Pharm. Bull.* [En ligne]. 2007a. Vol. 55, n°5, p. 689-728. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1248/cpb.55.689> >

- Dinda B., Debnath S., Harigaya Y. « Naturally occurring iridoids. A Review, part 1 ». *Chem. Pharm. Bull.* [En ligne]. 2007b. Vol. 55, n°2, p. 159-222. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1248/cpb.55.159> >
- Dinda B., Roy Chowdhury D., Mohanta B. C. « Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3 ». *Chem. Pharm. Bull.* [En ligne]. 2009. Vol. 57, n°8, p. 765-796. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1248/cpb.57.765> >
- Dobler S., Petschenka G., Pankoke H. « Coping with toxic plant compounds - The insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2011. Vol. 72, n°13, p. 1593-1604. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.015> >
- Doimo L., Mackay D. C., Rintoul G. B., D'Arcy B. R., Fletcher R. J., D'Arcy B. R., Doimo L., Rintoul G. B., Fletcher R. J., Mackay D. C., Rintoul G. B., D'Arcy B. R., Fletcher R. J. « Citronellol: Geraniol ratios and temperature in geranium (Pelargonium hybrid) ». *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* [En ligne]. 1999. Vol. 74, n°4, p. 528-530. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/14620316.1999.11511147> >
- Dong J., Chen C., Chen C. « Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response ». *Plant Mol. Biol.* 2003. Vol. 51, n°1, p. 21-37.
- Dong L., Miettinen K., Goedbloed M., Verstappen F. W. A., Voster A., Jongsma M. A., Memelink J., Krol S. Van der, Bouwmeester H. J. « Characterization of two geraniol synthases from *Valeriana officinalis* and *Lippia dulcis*: Similar activity but difference in subcellular localization ». *Metab. Eng.* [En ligne]. novembre 2013. Vol. 20, p. 198-211. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.09.002> >
- Van Den Dool H., Kratz P. D. « A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography ». *J. Chromatogr.* [En ligne]. 1963. Disponible sur : < <https://worldveg.tind.io/record/1766/> >
- Dorman H. J. D., Deans S. G., Noble R. C., Surai P. « Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1995. Vol. 7, n°6, p. 645-651. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9700520> >
- Dreyer L. L., Albers F., Van der Walt J. J. A., Marschewski D. E. « Subdivision of *Pelargonium* sect. *Cortusina* (Geraniaceae) ». *Plant Syst. Evol.* 1992. Vol. 183, n°1-2, p. 83-97.
- Dudareva N., Diane M., Christine M. K., Natalia K., Nina G., Jenny F., Barbara M., Jörg B. « (E)-B-Ocimene and Myrcene Synthase Genes of Floral Scent Biosynthesis in Snapdragon: Function and Expression of Three Terpene Synthase Genes of a New Terpene Synthase Subfamily ». *Plant Cell* [En ligne]. 2003. Vol. 15, n°May, p. 1227-1241. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.011015.2> >
- Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. « Biochemistry of plant volatiles ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1 mai 2004. Vol. 135, n°4, p. 1893-1902. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.104.049981> >
- Dueholm B., Drew D. P., Sweetman C., Simonsen H. T. « In planta and in silico characterization of five sesquiterpene synthases from *Vitis vinifera* (cv. Shiraz) berries ». *Planta* [En ligne]. 22 janvier 2019. Vol. 249, n°1, p. 59-70. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2986-7> >
- Dunphy P. J., Allcock C. « Isolation and properties of a monoterpene reductase from rose petals ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1 juin 1972. Vol. 11, n°6, p. 1887-1891. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90148-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90148-1) >
- Duplais C., Papon N., Courdavault V. « Trends in Plant Science Spotlight Tracking the Origin and Evolution of Plant Metabolites Trends in Plant Science ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2020. Vol. xx, n°xx, p. 1-3. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.08.010> >
- Durairaj J., Di Girolamo A., Bouwmeester H. J., De Ridder D., Beekwilder J., Van Dijk A. D. « An analysis of characterized plant sesquiterpene synthases ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1 février 2019. Vol. 158, p. 157-165. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.020> >
- Durchschein K., Wallner S., MacHeroux P., Schwab W., Winkler T., Kreis W., Faber K. « Nicotinamide-dependent Ene reductases as alternative biocatalysts for the reduction of activated alkenes ». *European J. Org. Chem.* [En ligne]. 2012. n°26, p. 4963-4968. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200776> >
- Dutta A., Sen J., Deswal R. « Downregulation of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway by low temperature and cloning of a AP2 type C-repeat binding factor (CBF) from *Catharanthus roseus* (L). G. Don ». *Plant Cell Rep.* [En ligne]. 2007. Vol. 26, n°10, p. 1869-1878. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0383-y> >
- Eddy S. R. « A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. » In : *Genome Inform.* [En ligne]. [s.l.] : PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., 2009. p. 205-211. Disponible sur : < https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9781848165632_0019 > ISBN : 978-1-84816-562-5.
- Edgar R. C. « MUSCLE: Multiple sequence alignment with improved accuracy and speed ». In : *Proc. - 2004 IEEE Comput. Syst. Bioinforma. Conf. CSB 2004.* [s.l.] : [s.n.], 2004a. ISBN : 0769521940.
- Edgar R. C. « MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity ». *BMC Bioinformatics* [En ligne]. 2004b. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113> >
- Egerer-Sieber C., Herl V., Müller-Uri F., Kreis W., Müller Y. A. « Crystallization and preliminary crystallographic analysis of selenomethionine-labelled progesterone 5 β -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh ». *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* [En ligne]. 2006. Vol. 62, n°3, p. 186-188. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1107/S1744309106001916> >

- El-kereamy A., Bi Y. M., Ranathunge K., Beatty P. H., Good A. G., Rothstein S. J. « The Rice R2R3-MYB Transcription Factor OsMYB55 Is Involved in the Tolerance to High Temperature and Modulates Amino Acid Metabolism ». *PLoS One* [En ligne]. 2012. Vol. 7, n°12. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052030> >
- Emms D. M., Kelly S. « OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy ». *Genome Biol.* [En ligne]. 2015. Vol. 16, n°1, p. 157. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0721-2> >
- Epstein W. W., Klobus M. A., Edison A. S. « Irregular Monoterpene Constituents of *Artemisia tridentata* cana. The Isolation, Characterization, and Synthesis of Two New Chrysanthemyl Derivatives ». *J. Org. Chem.* [En ligne]. 1991. Vol. 56, n°14, p. 4451-4456. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/jo00014a023> >
- Epstein W. W., Poulter C. D. *A survey of some irregular monoterpenes and their biogenetic analogies to presqualene alcohol* [En ligne]. *Phytochemistry*. 1973. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80670-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80670-3) >
- Ernst M., Munkert J., Campa M., Malnoy M., Martens S., Müller-Uri F. « Steroid 5 β -Reductase from Leaves of *Vitis vinifera*: Molecular Cloning, Expression, and Modeling ». *J. Agric. Food Chem.* [En ligne]. 2015. Vol. 63, n°46, p. 10112-10120. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04261> >
- Fahlén A., Welander M., Wennersten R. « Effects of Light-Temperature Regimes on Plant Growth and Essential Oil Yield of Selected Aromatic Plants ». *J. Sci. Food Agric.* [En ligne]. 1997. Vol. 73, n°1, p. 111-119. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199701\)73:1<111::aid-jsfa686>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199701)73:1<111::aid-jsfa686>3.0.co;2-2) >
- Fahn A. « Structure and function of secretory cells ». *Adv. Bot. Res.* [En ligne]. 2000. Vol. 31, p. 37-75. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0065-2296\(00\)31006-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2296(00)31006-0) >
- Falara V., Akhtar T. A., Nguyen T. T. H., Spyropoulou E. A., Bleeker P. M., Schauvinhold I., Matsuba Y., Bonini M. E., Schillmiller A. L., Last R. L., Schuurink R. C., Pichersky E. « The Tomato Terpene Synthase Gene Family ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2011. Vol. 157, n°2, p. 770-789. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.111.179648> >
- Farré-Armengol G., Filella I., Llusà J., Peñuelas J. « Pollination mode determines floral scent ». *Biochem. Syst. Ecol.* [En ligne]. 2015. Vol. 61, p. 44-53. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.05.007> >
- Fayed S. A. « Antioxidant and anticancer activities of Citrus reticulata (petitgrain mandarin) and Pelargonium graveolens (geranium) essential oils ». *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2009. Vol. 5, n°5, p. 740-747.
- Feger W., Brandauer H., Ziegler H. « Germacrenes in Citrus Peel Oils ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. juillet 2001. Vol. 13, n°4, p. 274-277. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.2001.9699692> >
- Fellows R., Russo C. M., Silva C. S., Lee S. G., Jez J. M., Chisholm J. D., Zubieta C., Nanao M. H. « A multisubstrate reductase from *Plantago major*: structure-function in the short chain reductase superfamily ». *Sci. Rep.* [En ligne]. 4 décembre 2018. Vol. 8, n°1, p. 14796. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32967-1> >
- Fischer M. J. C., Meyer S., Claudel P., Perrin M., Ginglinger J. F., Gertz C., Masson J. E., Werck-Reinhardt D., Huguency P., Karst F. « Specificity of Ocimum basilicum geraniol synthase modified by its expression in different heterologous systems ». *J. Biotechnol.* [En ligne]. 2013. Vol. 163, n°1, p. 24-29. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.012> >
- Van Der Fits L., Memelink J. « ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism ». *Science* (80-). [En ligne]. 2000. Vol. 289, n°5477, p. 295-297. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1126/science.289.5477.295> >
- Flament I., Debonneville C., Furrer A. « Volatile Constituents of Roses ». In : Teranishi R, Buttery RG, And Sugisawa H (éd.). *Bioact. Volatile Compd. Plants* [En ligne]. Washington DC : [s.n.], 1993. p. 269-281. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0525.ch019> > ISBN : 9780841226395.
- Flesh G., Rohmer M. « 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 a triterpene and d-ribose ». *Eur. J. Biochem.* [En ligne]. 1988. Vol. 175, n°2, p. 405-411. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14210.x> >
- Foucq de Cambiaire E. *Étude 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*. [s.l.] : [s.n.], 1986. 1 vol. (142-VIII f.) p.
- Fraga B. M. « Natural sesquiterpenoids. » *Nat. Prod. Rep.* [En ligne]. 2007. Vol. 24, n°6, p. 1350-81. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/b706427f> >
- Fraisse D., Scharff C., Vernin G., Metzger J. « SPECMA Bank Applications to the study of Geranium essential oils of various origins. » In : *IXth Int. Congr. Essent. Oils (Singapore, 1983)*. [s.l.] : [s.n.], 1983.
- Franzyk H. *Synthetic aspects of iridoid chemistry*. [En ligne]. *Fortschritte der Chemie Org. Naturstoffe. Prog. Chem. Org. Nat. Prod. Progrès dans la Chim. des Subst. Org. Nat.* 2000. Vol. 79, p. 1-114. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6341-2_1 >
- Fu X., Shi P., He Q., Shen Q., Tang Y., Pan Q., Ma Y., Yan T., Chen M., Hao X., Liu P., Li L., Wang Y., Sun X., Tang K. « AaPDR3, a PDR transporter 3, is involved in sesquiterpene β -caryophyllene transport in *Artemisia annua* ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 2017. Vol. 8, n°May, p. 1-12. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00723> >
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. « Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks ».

- Gibby M., Westfold J. « A Cytological Study of Pelargonium sect. Eumorpha (Geraniaceae) ». 1986. Vol. 153, n°3, p. 205-222.
- Gildemeister E., Hoffmann F. *Les Huiles essentielles*. Leipzig & Paris : Brockhaus & Tognol, 1900.
- Gnerre S., MacCallum I., Przybylski D., Ribeiro F. J., Burton J. N., Walker B. J., Sharpe T., Hall G., Shea T. P., Sykes S., Berlin A. M., Aird D., Costello M., Daza R., Williams L., Nicol R., Gnrirke A., Nusbaum C., Lander E. S., Jaffe D. B. « High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. janvier 2011. Vol. 108, n°4, p. 1513-1518. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.1017351108> >
- Goldblatt P., Manning J. *Cape plants: a conspectus of the Cape flora of South Africa*. [En ligne]. Pretoria : National Botanical Institute, 2000. 743 pp. p. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2002\)056\[0213:scpaco\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2002)056[0213:scpaco]2.0.co;2) > ISBN : 0620262362.
- Gomi K. « Jasmonic acid: An essential plant hormone ». *Int. J. Mol. Sci.* [En ligne]. 2020. Vol. 21, n°4,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3390/ijms21041261> >
- González V., Grundy D. J., Faraldos J. A., Allemann R. K. « The amino-terminal segment in the β -domain of δ -cadinene synthase is essential for catalysis ». *Org. Biomol. Chem.* [En ligne]. 2016. Vol. 14, n°31, p. 7451-7454. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/c6ob01398h> >
- Göpfert J. C., MacNevin G., Ro D. K., Spring O. « Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitata glandular trichomes ». *BMC Plant Biol.* [En ligne]. 6 juillet 2009. Vol. 9, n°1, p. 86. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-86> >
- Greenhagen B. T., O'Maille P. E., Noel J. P., Chappell J. « Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* [En ligne]. 2006. Vol. 103, n°26, p. 9826-9831. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.0601605103> >
- Guenther E. « Essential oils of the plant family Geraniaceae: oil of geranium ». In : Van D (éd.). *Essent. oils (chap. 6), vol IV*. Toronto, New-York, London : Nostrand Company, 1977. p. 671–737.
- Guisinger M. M., Kuehl J. V., Boore J. L., Jansen R. K. « Extreme reconfiguration of plastid genomes in the angiosperm family Geraniaceae: Rearrangements, repeats, and codon usage ». *Mol. Biol. Evol.* [En ligne]. 2011. Vol. 28, n°1, p. 583-600. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/molbev/msq229> >
- Guisinger M. M., Kuehl J. V., Boore J. L., Jansen R. K. « Genome-wide analyses of Geraniaceae plastid DNA reveal unprecedented patterns of increased nucleotide substitutions ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* [En ligne]. 2008. Vol. 105, n°47, p. 18424-18429. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.0806759105> >
- Guo Z., Severson R. F., Wagner G. J. *Biosynthesis of the Diterpene cis-Abienol in Cell-Free Extracts of Tobacco Trichomes* [En ligne]. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. Vol. 308, n°1, p. 103-108. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1015> >
- Gupta R., Banerjee S., Mallavarapu G. R., Sharma S., Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Kumar S. « Development of a superior somaclone of rose-scented geranium and a protocol for inducing variants ». *HortScience*. 2002. Vol. 37, n°4, p. 632-636.
- Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P. « The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation ». *Plant Mol. Biol.* [En ligne]. septembre 1994. Vol. 25, n°6, p. 989-994. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF00014672> >
- Hall M., Stueckler C., Ehammer H., Pointner E., Oberdorfer G., Gruber K., Hauer B., Stuermer R., Kroutil W., Macheroux P., Faber K. « Asymmetric bioreduction of C=C bonds using enoate reductases OPR1, OPR3 and YqjM: Enzyme-based stereocontrol ». *Adv. Synth. Catal.* [En ligne]. 2008. Vol. 350, n°3, p. 411-418. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/adsc.200700458> >
- Hamann T., Møller B. L. « Improved cloning and expression of cytochrome P450s and cytochrome P450 reductase in yeast ». *Protein Expr. Purif.* [En ligne]. 2007. Vol. 56, n°1, p. 121-127. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.06.007> >
- Hansen K. D., Brenner S. E., Dudoit S. « Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. juillet 2010. Vol. 38, n°12, p. e131. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/nar/gkq224> >
- Hart S., Lis-Balchin M., Lis-Balchin M. « Pharmacology of Pelargonium essential oils and extracts in vitro and in vivo ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002. p. 128-143. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-17> >
- Hayashi K. ichiro, Kawaide H., Notomi M., Sakigi Y., Matsuo A., Nozaki H. « Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss Physcomitrella patens ». *FEBS Lett.* [En ligne]. octobre 2006. Vol. 580, n°26, p. 6175-6181. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.018> >
- He X., Cane D. E. « Mechanism and Stereochemistry of the Germacradienol/Germacrene D Synthase of Streptomyces coelicolor A3(2) ». *J. Am. Chem. Soc.* [En ligne]. 2004. Vol. 126, n°9, p. 2678-2679. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/ja039929k> >
- Hedden P., Thomas S. G. « Gibberellin biosynthesis and its regulation ». *Biochem. J.* [En ligne]. 2012. Vol. 444, n°1, p. 11-25. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1042/BJ20120245> >

- Hedhili S., Courdavault V., Giglioli-Guivarc'h N., Gantet P. « Regulation of the terpene moiety biosynthesis of *Catharanthus roseus* terpene indole alkaloids ». *Phytochem. Rev.* [En ligne]. 2007. Vol. 6, n°2-3, p. 341-351. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9021-5> >
- Helmig D., Klinger L. F., Guenther A., Vierling L., Geron C., Zimmerman P. « Biogenic volatile organic compound emissions (BVOCs) I. Identifications from three continental sites in the U.S. » *Chemosphere* [En ligne]. avril 1999. Vol. 38, n°9, p. 2163-2187. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00425-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00425-1) >
- Helmig D., Ortega J., Guenther A., Herrick J. D., Geron C. « Sesquiterpene emissions from loblolly pine and their potential contribution to biogenic aerosol formation in the Southeastern US ». *Atmos. Environ.* [En ligne]. 2006. Vol. 40, n°22, p. 4150-4157. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.02.035> >
- Hemmerlin A., Harwood J. L., Bach T. J. « A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? » *Prog. Lipid Res.* [En ligne]. 2012. Vol. 51, n°2, p. 95-148. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.001> >
- Herl V., Fischer G., Müller-Uri F., Kreis W. « Molecular cloning and heterologous expression of progesterone 5 β -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh. » *Phytochemistry* [En ligne]. 1 février 2006. Vol. 67, n°3, p. 225-231. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.013> >
- Herl V., Fischer G., Reva V. A., Stiebritz M., Müller Y. A., Müller-Uri F., Kreis W. « The VEP1 gene (At4g24220) encodes a short-chain dehydrogenase/reductase with 3-oxo- Δ 4,5-steroid 5 β -reductase activity in *Arabidopsis thaliana* L. » *Biochimie* [En ligne]. 1 avril 2009. Vol. 91, n°4, p. 517-525. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.005> >
- Hervé M. R., Nicolè F., Lê Cao K. A. « Multivariate Analysis of Multiple Datasets: a Practical Guide for Chemical Ecology ». *J. Chem. Ecol.* [En ligne]. 2018. Vol. 44, n°3, p. 215-234. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0932-6> >
- Van der Hoeven R. S., Monforte A. J., Breeden D., Tanksley S. D., Steffens J. C. « Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum* ». *Plant Cell* [En ligne]. 2000. Vol. 12, n°11, p. 2283-2294. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2283> >
- Höfer R., Boachon B., Renault H., Gavira C., Miesch L., Iglesias J., Ginglinger J. F., Allouche L., Miesch M., Grec S., Larbat R., Werck-Reichhart D. « Dual function of the cytochrome p450 cyp76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2014. Vol. 166, n°3, p. 1149-1161. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.114.244814> >
- Höfer R., Dong L., André F., Ginglinger J. F., Lukan R., Gavira C., Grec S., Lang G., Memelink J., Van Der Krol S., Bouwmeester H., Werck-Reichhart D. « Geraniol hydroxylase and hydroxygeraniol oxidase activities of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes and potential for engineering the early steps of the (seco)iridoid pathway ». *Metab. Eng.* [En ligne]. 1 novembre 2013. Vol. 20, p. 221-232. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.001> >
- Hong G. J., Xue X. Y., Mao Y. B., Wang L. J., Chen X. Y. « *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression ». *Plant Cell* [En ligne]. 2012. Vol. 24, n°6, p. 2635-2648. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098749> >
- Hong S. B., Hughes E. H., Shanks J. V., San K. Y., Gibson S. I. « Role of the non-mevalonate pathway in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots ». *Biotechnol. Prog.* [En ligne]. 2003. Vol. 19, n°3, p. 1105-1108. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/bp034031k> >
- Houghton P., Lis-Balchin M. « Chemotaxonomy of *Pelargonium* based on alkaloids and essential oils ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002. p. 178-185. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-20> >
- Huang S. S., Kirchoff B. K., Liao J. P. « The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): Histochemistry, ultrastructure, and secretion1 ». *J. Torrey Bot. Soc.* [En ligne]. 2008. Vol. 135, n°2, p. 155-167. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3159/07-RA-045.1> >
- Huang X., Madan A. « CAP3: A DNA sequence assembly program ». *Genome Res.* [En ligne]. janvier 1999. Vol. 9, n°9, p. 868-877. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868> >
- Huber D. P. W., Philippe R. N., Godard K. A., Sturrock R. N., Bohlmann J. « Characterization of four terpene synthase cDNAs from methyl jasmonate-induced Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2005. Vol. 66, n°12, p. 1427-1439. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.030> >
- Huchelmann A., Boutry M., Hachez C. « Plant glandular trichomes: Natural cell factories of high biotechnological interest ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2017. Vol. 175, n°1, p. 6-22. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.17.00727> >
- Hult K., Berglund P. « Enzyme promiscuity: mechanism and applications ». *Trends Biotechnol.* [En ligne]. 2007. Vol. 25, n°5, p. 231-238. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.002> >
- Hussain H., Nazir M., Green I. R., Saleem M., Raza M. L. « Therapeutic potential of iridoid derivatives: Patent review ». *Inventions* [En ligne]. 2019. Vol. 4, n°2, p. 1-15. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3390/inventions4020029> >
- Hüve K., Bichele I., Ivanova H., Keerberg O., Pärnik T., Rasulov B., Tobias M., Niinemets Ü. « Temperature responses of dark respiration in relation to leaf sugar concentration ». *Physiol. Plant.* [En ligne]. 2012. Vol. 144, n°4, p. 320-334. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01562.x> >
- Hüve K., Bichele I., Rasulov B., Niinemets Ü. « When it is too hot for photosynthesis: Heat-induced instability of photosynthesis in relation to respiratory burst, cell permeability changes and H₂O₂ formation ». *Plant, Cell Environ.* [En ligne]. 2011. Vol. 34, n°1, p. 113-126. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02229.x> >

- Hwang J. U., Song W. Y., Hong D., Ko D., Yamaoka Y., Jang S., Yim S., Lee E., Khare D., Kim K., Palmgren M., Yoon H. S., Martinoia E., Lee Y. « Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle ». *Mol. Plant* [En ligne]. 2016. Vol. 9, n°3, p. 338-355. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.02.003> >
- Hyatt D. C., Croteau R. « Mutational analysis of a monoterpene synthase reaction: Altered catalysis through directed mutagenesis of (-)-pinene synthase from *Abies grandis* ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 2005. Vol. 439, n°2, p. 222-233. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.05.017> >
- Hyatt D. C., Youn B., Zhao Y., Santhamma B., Coates R. M., Croteau R. B., Kang C. « Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* [En ligne]. 2007. Vol. 104, n°13, p. 5360-5365. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.0700915104> >
- Hyatt David C., Youn B., Zhao Y., Santhamma B., Coates R. M., Croteau R. B., Kang C. « Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 2007. Vol. 104, n°13, p. 5360-5365. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.0700915104> >
- Ibdah M., Muchlinski A., Yahyaa M., Nawade B., Tholl D. « Carrot Volatile Terpene Metabolism: Terpene Diversity and Biosynthetic Genes ». [s.l.] : Springer, Cham, 2019. p. 279-293. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/978-3-030-03389-7_16 >
- Iijima M., Kenmoku H., Takahashi H., Lee J. B., Toyota M., Asakawa Y., Kurosaki F., Taura F. « Characterization of 12-oxophytodienoic acid reductases from rose-scented geranium (*pelargonium graveolens*) ». *Nat. Prod. Commun.* [En ligne]. 2016. Vol. 11, n°12, p. 1775-1782. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/1934578x1601101201> >
- Iijima Y., Davidovich-Rikanati R., Fridman E., Gang D. R., Bar E., Lewinsohn E., Pichersky E. « 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.* [En ligne]. 2004b. Vol. 136, n°3, p. 3724-3736. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.104.051318> >
- Iijima Y., Gang D. R., Fridman E., Lewinsohn E., Pichersky E. « Characterization of Geraniol Synthase from the Peltate Glands of Sweet Basil ». *Plant Physiol.* [En ligne]. janvier 2004a. Vol. 134, n°1, p. 370-379. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.103.032946> >
- Iijima Y., Koeduka T., Suzuki H., Kubota K. « Biosynthesis of geranial, a potent aroma compound in ginger rhizome (*Zingiber officinale*): Molecular cloning and characterization of geraniol dehydrogenase ». *Plant Biotechnol.* [En ligne]. 2014. Vol. 31, n°5, p. 525-534. Disponible sur : < <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.1020a> >
- Iijima Y., Wang G., Fridman E., Pichersky E. « Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 2006. Vol. 448, n°1-2, p. 141-149. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.026> >
- Inouye H., Inouye S. « Biosynthesis of iridoid- and ceceiroidoid glucosides ». *Pharmacogn. Phytochem.* [En ligne]. 1971. p. 290-313. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/978-3-642-65136-6_13 >
- Irmisch S., Jiang Y., Chen F., Gershenzon J., Köllner T. G. « Terpene synthases and their contribution to herbivore-induced volatile emission in western balsam poplar (*Populus trichocarpa*) ». *BMC Plant Biol.* [En ligne]. 2014. Vol. 14, n°1, p. 270. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0270-y> >
- Ishida T., Kurata T., Okada K., Wada T. « A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs ». *Annu. Rev. Plant Biol.* [En ligne]. 2008. Vol. 59, p. 365-386. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092949> >
- Ito M., Honda G. « Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance ». *Phytochemistry* [En ligne]. février 2007. Vol. 68, n°4, p. 446-453. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.006> >
- Jacob F. « Evolution and tinkering ». *Science (80-)*. [En ligne]. 1977. Vol. 196, n°4295, p. 1161-1166. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1126/science.860134> >
- Jain N., Aggarwal K. K., Syamasundar K. V., Srivastava S. K., Kumar S. « Essential oil composition of geranium (*Pelargonium* sp.) from the plains of Northern India ». *Flavour Fragr. J.* [En ligne]. janvier 2001. Vol. 16, n°1, p. 44-46. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1002/1099-1026\(200101/02\)16:1<44::AID-FFJ943>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1099-1026(200101/02)16:1<44::AID-FFJ943>3.0.CO;2-X) >
- James J. « Cultivation and sales of *Pelargonium* plants for ornamental use in the UK and worldwide ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002. p. 92-103. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-14> >
- Jensen S. R. « Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms ». *Ecol. Chem. Biochem. Plant Terpenoids* [En ligne]. 1991. p. 133-158. Disponible sur : < <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Plant+iridoids,+their+biosynthesis+and+distribution+in+angiosperms.#0> >
- Jensen S. R., Nielsen B. J., Dahlgren R. « Iridoid compounds, their occurrence and systematic importance in the angiosperms. » 1975. Vol. 128, p. 148-180.
- Jeon J. H., Lee C. H., Lee H. S. « Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites ». *J. Food Prot.* [En ligne]. 2009. Vol. 72, n°7, p. 1468-1471. Disponible sur : < <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1468> >
- Jia Q., Köllner T. G., Gershenzon J., Chen F. « MTPSLs: New Terpene Synthases in Nonseed Plants ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. février 2018. Vol. 23, n°2, p. 121-128. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.014> >
- Jia Q., Li G., Köllner T. G., Fu J., Chen X., Xiong W., Crandall-Stotler B. J., Bowman J. L., Weston D. J., Zhang Y., Chen L., Xie Y., Li F. W., Rothfels C. J., Larsson A., Graham S. W., Stevenson D. W., Wong G. K. S., Gershenzon J., Chen F. « Microbial-type terpene synthase genes occur widely in nonseed land plants, but not in seed plants ». *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A. [En ligne]. 2016. Vol. 113, n°43, p. 12328-12333. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.1607973113> >
- Jiang S.-Y., Jin J., Sarojam R., Ramachandran S. « A Comprehensive Survey on the Terpene Synthase Gene Family Provides New Insight into Its Evolutionary Patterns ». *Genome Biol. Evol.* [En ligne]. 2019. Vol. 11, n°8, p. 2078-2098. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/gbe/evz142> >
- Jiang W., Lu X., Qiu B., Zhang F., Shen Q., Lv Z., Fu X., Yan T., Gao E., Zhu M., Chen L., Zhang L., Wang G., Sun X., Tang K. « Molecular Cloning and Characterization of a Trichome-Specific Promoter of Artemisinic Aldehyde Δ 11(13) Reductase (DBR2) in *Artemisia annua* ». *Plant Mol. Biol. Report.* [En ligne]. 2014. Vol. 32, n°1, p. 82-91. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0603-2> >
- Jin J., Panicker D., Wang Q., Kim M. J., Liu J., Yin J. L., Wong L., Jang I. C., Chua N. H., Sarojam R. « Next generation sequencing unravels the biosynthetic ability of Spearmint (*Mentha spicata*) peltate glandular trichomes through comparative transcriptomics ». *BMC Plant Biol.* [En ligne]. 2014. Vol. 14, n°1, p. 1-11. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0292-5> >
- Jones C. S., Bakker F. T., Schlichting C. D., Nicotra A. B. « Leaf shape evolution in the South African genus *Pelargonium* l' hér. (Geraniaceae) ». *Evolution (N. Y.)*. [En ligne]. 2009. Vol. 63, n°2, p. 479-497. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00552.x> >
- Jörnvall H., Krook M., Persson B., Atrian S., González-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D. « Short-Chain Dehydrogenases/Reductases (SDR) ». *Biochemistry* [En ligne]. 1995. Vol. 34, n°18, p. 6003-6013. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/bi00018a001> >
- Juliani H. R., Koroch A., Simon J. E., Hitimana N., Daka A., Ranarivelo L., Langenhoven P. « Quality of geranium oils (*Pelargonium* Species) : Case studies in southern and Eastern Africa ». *J. Essent. oil Res.* [En ligne]. 2006. Vol. 18, p. 116-121. Disponible sur : < <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=18019093> >
- Jullien F., Moja S., Bony A., Legrand S., Petit C., Benabdelkader T., Poirot K., Fiorucci S., Guitton Y., Nicolè F., Baudino S., Magnard J. L. « Isolation and functional characterization of a τ -cadinol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia* ». *Plant Mol. Biol.* [En ligne]. 2014. Vol. 84, n°1-2, p. 227-241. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0131-3> >
- Jun J. H., Ha C. M., Nam H. G. « Involvement of the VEP1 Gene in Vascular Strand Development in *Arabidopsis thaliana* ». *Plant Cell Physiol.* [En ligne]. 15 mars 2002. Vol. 43, n°3, p. 323-330. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf042> >
- Kandra L., Wagner G. J. « Studies of the site and mode of biosynthesis of tobacco trichome exudate components ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 1988. Vol. 265, n°2, p. 425-432. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90145-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90145-2) >
- Karimi M., Inzé D., Depicker A. *GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation* [En ligne]. *Trends Plant Sci.* 1 mai 2002. Vol. 7, n°5, p. 193-195. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3) >
- Karunanithi P. S., Zerbe P. « Terpene Synthases as Metabolic Gatekeepers in the Evolution of Plant Terpenoid Chemical Diversity ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 2019. Vol. 10, n°October, p. 1-23. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01166> >
- Kaul A. P., Ahmad J., Sastry K. P., Kumars S. « Improved technology for distillation of geranium oil ». *Fafai J.* 2001. Vol. 3, n°1, p. 33-39.
- Kaul P. N., Rajeshwara Rao B. R., Bhattacharya A. K., Singh C. P., Singh K. « Volatile constituents of three cultivars of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) as influenced by method of distillation ». *Fafai J.* 1995. Vol. 17, p. 21-26.
- Kaul P. N., Rajeshwara Rao B. R. « Quality variations in the essential oils of young and old leaves of three varieties of rose-scented geranium (*Pelargonium* species). » *Fafai J.* 1999. Vol. 1, n°1, p. 35-37.
- Kaul P. N., Rajeshwara Rao B. R., Bhattacharya A. K., Ramesh S. I. « Changes in Chemical Composition of Rose-Scented Geranium (*Pelargonium* sp.) Oil during Storage ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. janvier 1997. Vol. 9, n°1, p. 115-117. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700729> >
- Kaul P. N., Rajeshwara Rao B. R., Bhattacharya A. K., Singh K. « Relationship between Crop Age , Essential Oil Concentration and its Composition in Rose-Scented Geranium (*Pelargonium* species) ». *J. Essent. Oil-Bearing Plants.* 1998. Vol. 1, p. 88-92.
- Kavanagh K. L., Jörnvall H., Persson B., Oppermann U. « Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The SDR superfamily: Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes ». *Cell. Mol. Life Sci.* [En ligne]. 2008. Vol. 65, n°24, p. 3895-3906. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8588-y> >
- Kawoosa T., Singh H., Kumar A., Sharma S. K., Devi K., Dutt S., Vats S. K., Sharma M., Ahuja P. S., Kumar S. « Light and temperature regulated terpene biosynthesis: Hepatoprotective monoterpenic picroside accumulation in *Picrorhiza kurroa* ». *Funct. Integr. Genomics* [En ligne]. 2010. Vol. 10, n°3, p. 393-404. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0152-9> >
- Kayani S.-I., Shen Q., Ma Y., Fu X., Xie L., Zhong Y., Tiantian C., Pan Q., Li L., Rahman S.-U., Sun X., Tang K. « The YABBY Family Transcription Factor AaYABBY5 Directly Targets Cytochrome P450 Monooxygenase (CYP71AV1) and Double-Bond Reductase 2 (DBR2) Involved in Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia Annua* ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 10 septembre 2019. Vol. 10, p. 1084. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01084> >

- Kazama H., Dan H., Imaseki H., Wasteneys G. O. « Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2004. Vol. 134, n°4, p. 1614-1623. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.103.031088> >
- Keene C. K., Wagner G. J. « Direct Demonstration of Duvatrienediol Biosynthesis in Glandular Heads of Tobacco Trichomes ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1985. Vol. 79, n°4, p. 1026-1032. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.79.4.1026> >
- Keilwagen J., Lehnert H., Berner T., Budahn H., Nothnagel T., Ulrich D., Dunemann F. « The terpene synthase gene family of carrot (*Daucus carota* L.): Identification of QTLs and candidate genes associated with terpenoid volatile compounds ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 2017. Vol. 8, n°November, p. 1-18. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01930> >
- Kellogg B. A., Poulter C. D. « Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway ». *Curr. Opin. Chem. Biol.* [En ligne]. décembre 1997. Vol. 1, n°4, p. 570-578. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(97\)80054-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(97)80054-3) >
- Kennedy G. G., Yamamoto R. T., Dimock M. B., Williams W. G., Bordner J. « Effect of day length and light intensity on 2-tridecanone levels and resistance in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *Manduca sexta* ». *J. Chem. Ecol.* [En ligne]. 1981. Vol. 7, n°4, p. 707-716. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF00990303> >
- Ker D.-S., Chan K. G., Othman R., Hassan M., Ng C. L. « Site-directed mutagenesis of β sesquiphellandrene synthase enhances enzyme promiscuity ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2020. Vol. 173, n°June 2019, p. 112286. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112286> >
- Van de Kerke S. J., Shrestha B., Ruhlman T. A., Weng M. L., Jansen R. K., Jones C. S., Schlichting C. D., Hosseini S., Mohammadin S., Schranz M. E., Bakker F. T. « Plastome based phylogenetics and younger crown node age in *Pelargonium* ». *Mol. Phylogenet. Evol.* [En ligne]. 2019. Vol. 137, n°July 2018, p. 33-43. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.03.021> >
- Kleinwächter M., Paulsen J., Bloem E., Schnug E., Selmar D. « 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.* [En ligne]. 2015. Vol. 64, n°1, p. 158-166. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.062> >
- Knudsen J. T., Eriksson R., Gershenzon J., Ståhl B. « Diversity and Distribution of Floral Scent ». *Bot. Rev.* [En ligne]. 2006. Vol. 72, n°1, p. 1-120. Disponible sur : < <https://link.springer.com/article/10.1663/0006-8101%282006%2972%5B1:DADOFJ%2D0.CO%3A2> >
- Knuth R. « Geraniaceae ». In : Engler A (éd.). *Das Pflanzenreich IV*. Leipzig : Engelmann, 1912. p. 640.
- Koini M. A., Alvey L., Allen T., Tilley C. A., Harberd N. P., Whitelam G. C., Franklin K. A. « High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4 ». *Curr. Biol.* [En ligne]. 2009. Vol. 19, n°5, p. 408-413. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.046> >
- Köksal M., Jin Y., Coates R. M., Croteau R., Christianson D. W. « Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis ». *Nature* [En ligne]. 2011. Vol. 469, n°7328, p. 116-122. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nature09628> >
- Köksal M., Potter K., Peters R. J., Christianson D. W. « 1.55 Å-Resolution Structure of Ent-Copalyl Diphosphate Synthase and Exploration of General Acid Function By Site-Directed Mutagenesis ». *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* [En ligne]. 2014. Vol. 1840, n°1, p. 184-190. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.004> >
- Köllner T. G., Gershenzon J., Degenhardt J. « Molecular and biochemical evolution of maize terpene synthase 10, an enzyme of indirect defense ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2009. Vol. 70, n°9, p. 1139-1145. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.011> >
- Köllner T. G., O'Maille P. E., Gatto N., Boland W., Gershenzon J., Degenhardt J. « Two pockets in the active site of maize sesquiterpene synthase TPS4 carry out sequential parts of the reaction scheme resulting in multiple products ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 15 avril 2006. Vol. 448, n°1-2, p. 83-92. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.011> >
- Köllner T. G., Schnee C., Gershenzon J., Degenhardt J. « The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes ». *Plant Cell* [En ligne]. mai 2004. Vol. 16, n°5, p. 1115-1131. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.019877> >
- Koncz C., Schell J. « The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector ». *MGG Mol. Gen. Genet.* [En ligne]. septembre 1986. Vol. 204, n°3, p. 383-396. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF00331014> >
- Koo A. J. K., Howe G. A. « The wound hormone jasmonate ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2009. Vol. 70, n°13-14, p. 1571-1580. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.018> >
- Kopylova E., Noé L., Touzet H. « SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data ». *Bioinformatics* [En ligne]. 2012. Vol. 28, n°24, p. 3211-3217. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611> >
- Koslitz S., Renaud L., Kohler M., Wüst M. « Stereoselective formation of the varietal aroma compound rose oxide during alcoholic fermentation ». *J. Agric. Food Chem.* [En ligne]. 2008. Vol. 56, n°4, p. 1371-1375. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/jf072518t> >

- Kovats E. « Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system ». In : *Adv. Chromatography* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 1965. p. 229-247. Disponible sur : < <http://garfield.library.upenn.edu/classics1988/A1988M801800001.pdf> >
- De Kraker J. W., Franssen M. C. R., De Groot A., König W. A., Bouwmeester H. J. « (+)-Germacrene A biosynthesis - The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1 août 1998. Vol. 117, n°4, p. 1381-1392. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1381> >
- Kreis W., Hensel A., Stuhlemmer U. « Cardenolide biosynthesis in foxglove ». *Planta Med.* [En ligne]. 1998. Vol. 64, n°6, p. 491-499. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1055/s-2006-957500> >
- Kries H., Caputi L., Stevenson C. E. M. M., Kamileen M. O., Sherden N. H., Geu-Flores F., Lawson D. M., O'Connor S. E. « Structural determinants of reductive terpene cyclization in iridoid biosynthesis ». *Nat. Chem. Biol.* [En ligne]. 9 janvier 2016. Vol. 12, n°1, p. 6-8. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nchembio.1955> >
- Kries H., Kellner F., Kamileen M. O., O'Connor S. E. « Inverted stereocontrol of iridoid synthase in snapdragon ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 2017. Vol. 292, n°35, p. 14659-14667. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800979> >
- Krstic L., Malencic D., Anackov G. « Structural investigations of trichomes and essential oil composition of *Salvia verticillata* ». *Bot. Helv.* [En ligne]. 2006. Vol. 116, n°2, p. 159-168. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00035-006-0767-6> >
- Kryvych S., Kleessen S., Ebert B., Kersten B., Fisahn J. « Proteomics - The key to understanding systems biology of *Arabidopsis* trichomes ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2011. Vol. 72, n°10, p. 1061-1070. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.09.003> >
- Külheim C., Padovan A., Hefer C., Krause S. T., Köllner T. G., Myburg A. A., Degenhardt J., Foley W. J. « The Eucalyptus terpene synthase gene family ». *BMC Genomics* [En ligne]. 11 juin 2015. Vol. 16, n°1, p. 450. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1598-x> >
- Kulkarni R. N. « Composition of the essential oils of two isomenthone-rich variants of geranium (*Pelargonium* sp.) ». *Flavour Fragr. J.* [En ligne]. 1998. Vol. 13, n°6, p. 389-392. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199811/12\)13:6<389::AID-FFJ757>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6<389::AID-FFJ757>3.0.CO;2-2) >
- Kumar S. V., Lucyshyn D., Jaeger K. E., Alós E., Alvey E., Harberd N. P., Wigge P. A. « Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering ». *Nature* [En ligne]. 2012. Vol. 484, n°7393, p. 242-245. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nature10928> >
- Kumeta Y., Ito M. « Characterization of δ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2010. Vol. 154, n°4, p. 1998-2007. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.110.161828> >
- Kumeta Y., Ito M. « Characterization of α -humulene synthases responsible for the production of sesquiterpenes induced by methyl jasmonate in *Aquilaria* cell culture ». *J. Nat. Med.* [En ligne]. 2016. Vol. 70, n°3, p. 452-459. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11418-016-0999-8> >
- Lalli J. Y. Y., Viljoen A. M., Başer K. H. C., Demirci B., Özek T. « The essential oil composition and chemotaxonomical appraisal of South African pelargoniums (geraniaceae) ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 2006. Vol. 18, n°SPEC. ISS., p. 89-105. Disponible sur : < https://www.researchgate.net/profile/K_Husnu_Can_Baser/publication/221716729_The_essential_oil_composition_and_chemotaxonomical_appraisal_of_South_African_Pelargoniums_Geraniaceae/links/5511dee10cf268a4aae930bf/The-essential-oil-composition-and-chemotaxon >
- Landmann C., Fink B., Festner M., Dregus M., Engel K. H., Schwab W. « Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*) ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 2007. Vol. 465, n°2, p. 417-429. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.06.011> >
- Landy A. « Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination ». *Annu. Rev. Biochem.* [En ligne]. 28 juin 1989. Vol. 58, n°1, p. 913-941. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004405> >
- Lange B. M. « Biosynthesis and biotechnology of high-value P-menthane monoterpenes, including menthol, carvone, and limonene ». In : *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* [En ligne]. [s.l.] : Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2015. p. 319-353. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/10_2014_289 >
- Lange B. M., Wildung M. R., Stauber E. J., Sanchez C., Pouchnik D., Croteau R. « Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 2000. Vol. 97, n°6, p. 2934-2939. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2934> >
- Langmead B., Salzberg S. L. « Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 ». *Nat. Methods* [En ligne]. avril 2012. Vol. 9, n°4, p. 357-359. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923> >
- Lantz A. T., Allman J., Weraduwege S. M., Sharkey T. D. « Isoprene: New insights into the control of emission and mediation of stress tolerance by gene expression ». *Plant Cell Environ.* [En ligne]. 2019. Vol. 42, n°10, p. 2808-2826. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/pce.13629> >
- Lattoo S. K., Dhar R. S., Dhar A. K., Sharma P. R., Agarwal S. G. « Dynamics of essential oil biosynthesis in relation to inflorescence and glandular ontogeny in *Salvia sclarea* ». *Flavour Fragr. J.* [En ligne]. 2006. Vol. 21, n°5, p. 817-821. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ffj.1733> >
- Lee G. W., Lee S., Chung M. S., Jeong Y. S., Chung B. Y. « Rice terpene synthase 20 (OsTPS20) plays an important role in producing terpene volatiles in response to abiotic stresses ». *Protoplasma* [En ligne]. 2015. Vol. 252, n°4, p. 997-1007. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0735-8> >

- Lenardão E. J., Botteselle G. V., De Azambuja F., Perin G., Jacob R. G. « Citronellal as key compound in organic synthesis ». *Tetrahedron* [En ligne]. 2007. Vol. 63, n°29, p. 6671-6712. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.03.159> >
- Lesburg C. A., Zhai G., Cane D. E., Christianson D. W. « Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology ». *Science* (80-). [En ligne]. 1997. Vol. 277, n°5333, p. 1820-1824. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1820> >
- Lewinsohn E., Gijzen M. « Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism ». *Plant Sci.* [En ligne]. 2009. Vol. 176, n°2, p. 161-169. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.018> >
- Lewinsohn E., Savage T. J., Gijzen M., Croteau R. « Simultaneous analysis of monoterpenes and diterpenoids of conifer oleoresin ». *Phytochem. Anal.* [En ligne]. 1993. Vol. 4, n°5, p. 220-225. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/pca.2800040506> >
- Li B., Dewey C. N. « RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome ». *Bioinforma. Impact Accurate Quantif. Proteomic Genet. Anal. Res.* [En ligne]. août 2014. Vol. 12, n°1, p. 41-74. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/b16589> >
- Li G., Köllner T. G., Yin Y., Jiang Y., Chen H., Xu Y., Gershenzon J., Pichersky E., Chen F. « Nonseed plant *Selaginella moellendorffii* has both seed plant and microbial types of terpene synthases ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 2012. Vol. 109, n°36, p. 14711-14715. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.1204300109> >
- Li L., Zhao Y., McCaig B. C., Wingerd B. A., Wang J., Whalon M. E., Pichersky E., Howe G. A. « 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 (2004) 16 (126-143)) ». *Plant Cell* [En ligne]. 2004. Vol. 16, n°3, p. 783. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.cor650> >
- Li S., Wang H., Li F., Chen Z., Li X., Zhu L., Wang G., Yu J., Huang D., Lang Z. « The maize transcription factor EREB58 mediates the jasmonate-induced production of sesquiterpene volatiles ». *Plant J.* [En ligne]. 2015. Vol. 84, n°2, p. 296-308. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/tpj.12994> >
- Li W., Lybrand D. B., Xu H., Zhou F., Last R. L., Pichersky E. « A Trichome-Specific, Plastid-Localized Tanacetum cinerariifolium Nudix Protein Hydrolyzes the Natural Pyrethrin Pesticide Biosynthetic Intermediate trans-Chrysanthemyl Diphosphate ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 2020. Vol. 11, n°April, p. 1-9. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00482> >
- Li X., Xu Y., Shen S., Yin X., Klee H., Zhang B., Chen K. « Transcription factor CitERF71 activates the terpene synthase gene CitTPS16 involved in the synthesis of e -geraniol in sweet orange fruit ». *J. Exp. Bot.* [En ligne]. 2017. Vol. 68, n°17, p. 4929-4938. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/jxb/erx316> >
- Lin X., Kaul S., Rounsley S., Shea T. P., Benito M. I., Town C. D., Fujii C. Y., Mason T., Bowman C. L., Barnstead M., Feldblyum T. V., Buell C. R., Ketchum K. A., Lee J., Ronning C. M., Koo H. L., Moffat K. S., Cronin L. A., Shen M., Pal G., Van Aken S., Umayam L., Tallon L. J., Gill J. E., Adams M. D., Carrera A. J., Creasy T. H., Goodman H. M., Somerville C. R., Copenhaver G. P., Preuss D., Nierman W. C., White O., Elsen J. A., Salzberg S. L., Fraser C. M., Venter J. C. « Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana* ». *Nature* [En ligne]. 1999. Vol. 402, n°6763, p. 761-765. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/45471> >
- Linder H. P. « Flora Cape Town ». *Biol. Rev.* 2003. Vol. 78, p. 597-638.
- Lindner S., Geu-Flores F., Bräse S., Sherden N. H., O'Connor S. E. « Conversion of substrate analogs suggests a michael cyclization in iridoid biosynthesis ». *Chem. Biol.* [En ligne]. 2014. Vol. 21, n°11, p. 1452-1456. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.010> >
- Lis-Balchin M. « A chemotaxonomic study of the Pelargonium (Geraniaceae) species and their modern cultivars ». *J. Hortic. Sci.* [En ligne]. 1997. Vol. 72, n°5, p. 791-795. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/14620316.1997.11515572> >
- Lis-Balchin M. « History of nomenclature, usage and cultivation of Geranium and Pelargonium species ». In : *Geranium Pelargonium. Med. Aromat. plant - Ind. profiles* [En ligne]. London : [s.n.], 2002a. p. 5-10. Disponible sur : < [https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=-bR8GxQ6BU0C&oi=fnd&pg=PA5&dq=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+pla](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=-bR8GxQ6BU0C&oi=fnd&pg=PA5&dq=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+pla) >
- Lis-Balchin M. « New research: possible uses of various Pelargonium leaf oils and extracts as food preservatives ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002b. p. 263-273. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-28> >
- Lis-Balchin M. « Geranium oil and its use in aromatherapy ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002c. p. 246-258. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-26> >
- Lis-Balchin M. « 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 (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002d. p. 159-177. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-19> >
- Lis-Balchin M. « Essential oil profiles and their possible use in hybridization of some common scented geraniums ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1991. Vol. 3, n°2, p. 99-105. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1991.9697917> >
- Lis-Balchin M., Deans S. G., Hart S. « Bioactivity of geranium oils from different commercial sources ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1996. Vol. 8, n°3, p. 281-290. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700614> >

- Little D. B., Croteau R. B. *Biochemistry of essential oil terpenes* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 1999. 239-253 p. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004> > ISBN : 9788578110796.
- Little D. B., Croteau R. B. « Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases δ -selinene synthase and γ -humulene synthase ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 2002. Vol. 402, n°1, p. 120-135. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00068-1) >
- Liu C.-I., Liu G. Y., Song Y., Yin F., Hensler M. E., Jeng W.-Y., Nizet V., Wang A. H.-J., Oldfield E. « A Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks *Staphylococcus aureus* Virulence ». *Science* (80-.). [En ligne]. 7 mars 2008. Vol. 319, n°5868, p. 1391-1394. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1126/science.1153018> >
- Liu H., Cao X., Liu X., Xin R., Wang J., Gao J., Wu B., Gao L., Xu C., Zhang B., Grierson D., Chen K. « UV-B irradiation differentially regulates terpene synthases and terpene content of peach ». *Plant Cell Environ.* [En ligne]. 2017. Vol. 40, n°10, p. 2261-2275. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/pce.13029> >
- Liu J., Zhu J., Tang L., Wen W., Lv S., Yu R. « Enhancement of vindoline and vinblastine production in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* by artemisinic acid elicitation ». *World J. Microbiol. Biotechnol.* [En ligne]. 2014. Vol. 30, n°1, p. 175-180. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1432-z> >
- Liu Y., Liu D., Hu R., Hua C., Ali I., Zhang A., Liu B., Wu M., Huang L., Gan Y. « AtGIS, a C2H2 zinc-finger transcription factor from *Arabidopsis* regulates glandular trichome development through GA signaling in tobacco ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [En ligne]. 2017. Vol. 483, n°1, p. 209-215. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.164> >
- Livak K. J., Schmittgen T. D. « Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method ». *Methods* [En ligne]. 1 décembre 2001. Vol. 25, n°4, p. 402-408. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> >
- Livingston S. J., Quilichini T. D., Booth J. K., Wong D. C. J., Rensing K. H., Laflamme-Yonkman J., Castellarin S. D., Bohlmann J., Page J. E., Samuels A. L. « Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation ». *Plant J.* [En ligne]. 2020. Vol. 101, n°1, p. 37-56. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/tpj.14516> >
- Llusià J., Peñuelas J. « Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions ». *Am. J. Bot.* [En ligne]. janvier 2000. Vol. 87, n°1, p. 133-140. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2307/2656691> >
- Lodewyk M. W., Gutta P., Tantillo D. J. « Computational studies on biosynthetic carbocation rearrangements leading to sativene, cyclosativene, α -ylangene, and β -ylangene ». *J. Org. Chem.* [En ligne]. septembre 2008. Vol. 73, n°17, p. 6570-6579. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/jo800868r> >
- Lois L. M., Rodríguez-Concepción M., Gallego F., Campos N., Boronat A. « Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ». *Plant J.* [En ligne]. 2000. Vol. 22, n°6, p. 503-513. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00764.x> >
- Loizzi M., González V., Miller D. J., Allemann R. K. « Nucleophilic Water Capture or Proton Loss: Single Amino Acid Switch Converts δ -Cadinene Synthase into Germacradien-4-ol Synthase ». *ChemBioChem* [En ligne]. 2018. Vol. 19, n°1, p. 100-105. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/cbic.201700531> >
- Loizzi M., Miller D. J., Allemann R. K. « Silent catalytic promiscuity in the high-fidelity terpene cyclase δ -cadinene synthase ». *Org. Biomol. Chem.* [En ligne]. 2019. Vol. 17, n°5, p. 1206-1214. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/c8ob02821d> >
- Loreto F., Barta C., Brilli F., Nogues I. « On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature ». *Plant, Cell Environ.* [En ligne]. 2006. Vol. 29, n°9, p. 1820-1828. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01561.x> >
- Loreto F., Förster A., Dürr M., Csiky O., Seufert G. « On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes ». *Plant, Cell Environ.* [En ligne]. 1998. Vol. 21, n°1, p. 101-107. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00268.x> >
- Loreto F., Schnitzler J. P. « Abiotic stresses and induced BVOCs ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2010. Vol. 15, n°3, p. 154-166. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.006> >
- Luan F., Mosandl A., Münch A., Wüst M. « Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: Demonstration of stereoselective reduction, E/Z-isomerization, oxidation and glycosylation ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1 février 2005. Vol. 66, n°3, p. 295-303. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.12.017> >
- Luck K., Chen X., Norris A. M., Chen F., Gershenzon J., Köllner T. G. « The reconstruction and biochemical characterization of ancestral genes furnish insights into the evolution of terpene synthase function in the Poaceae ». *Plant Mol. Biol.* [En ligne]. 2020. n°0123456789,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01037-4> >
- Lynen F. « Biosynthetic pathways from acetate to natural products ». *Pure Appl. Chem.* [En ligne]. 1967. Vol. 14, n°1, p. 137-168. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1351/pac196714010137> >
- MacMillan J., Beale M. H. « Diterpene Biosynthesis ». In : *Compr. Nat. Prod. Chem.* [En ligne]. [s.l.] : Elsevier Science, 1999. p. 217-243. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091283-7.00042-4> >
- Maggs G. L., Vorster P., Van der Walt J. J. A. « Taxonomy of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae): The section *Polyactium*. 1. Circumscription and intrasectional classification ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 1995. Vol. 61, n°2, p. 53-59. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30479-8](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30479-8) >

- Magnard J. L., Rocchia A., Caissard J. C., Vergne P., Sun P., Hecquet R., Dubois A., Oyant L. H. Saint, Jullien F., Nicolè F., Raymond O., Huguet S., Baltenweck R., Meyer S., Claudel P., Jeauffre J., Rohmer M., Foucher F., Huguency P., Bendahmane M., Baudino S. « Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses ». *Science* (80-.). [En ligne]. 3 juillet 2015. Vol. 349, n°6243, p. 81-83. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1126/science.aab0696> >
- Mahdavi A., Moradi P., Mastinu A. « Variation in Terpene profiles of thymus vulgaris in water deficit stress response ». *Molecules* [En ligne]. 2020. Vol. 25, n°5, p. 1-17. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3390/molecules25051091> >
- Major D. T., Weitman M. « Electrostatically guided dynamics-the root of fidelity in a promiscuous terpene synthase? ». *J. Am. Chem. Soc.* [En ligne]. 2012. Vol. 134, n°47, p. 19454-19462. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/ja308295p> >
- Majroomi Senji B., Abdollahi Mandoulakani B. « The impact of cold stress on genes expression pattern of mono- and sesquiterpene biosynthesis and their contents in *Ocimum basilicum* L. ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2018. Vol. 156, n°September, p. 250-256. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.09.006> >
- Marak H. B., Biere A., Van Damme J. M. M. « Systemic, genotype-specific induction of two herbivore-deterrent iridoid glycosides in *Plantago lanceolata* L. in response to fungal infection by *Diaporthe adunca* (ROB.) niessel ». *J. Chem. Ecol.* [En ligne]. 2002. Vol. 28, n°12, p. 2429-2448. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1023/A:1021475800765> >
- Markus Lange B., Turner G. W. « Terpenoid biosynthesis in trichomes-current status and future opportunities ». *Plant Biotechnol. J.* [En ligne]. 1 janvier 2013. Vol. 11, n°1, p. 2-22. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00737.x> >
- Martin D. M., Aubourg S., Schouwey M. B., Daviet L., Schalk M., Toub O., Lund S. T., Bohlmann J. « 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.* [En ligne]. octobre 2010. Vol. 10, n°1, p. 226. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-226> >
- Martin D. M., Fäldt J., Bohlmann J. « Functional Characterization of Nine Norway Spruce TPS Genes and Evolution of Gymnosperm Terpene Synthases of the TPS-d Subfamily ». *Plant Physiol.* [En ligne]. août 2004. Vol. 135, n°4, p. 1908-1927. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.104.042028> >
- Martin D. M., Gershenzon J., Bohlmann J. « Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce ». *Plant Physiol.* [En ligne]. juillet 2003. Vol. 132, n°3, p. 1586-1599. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.103.021196> >
- Masimirembwa C. M., Otter C., Berg M., Jönsson M., Leidvik B., Jonsson E., Johansson T., Bäckman A., Edlund A., Andersson T. B. « Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes p-450: Validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research ». *Drug Metab. Dispos.* 1999. Vol. 27, n°10, p. 1117-1122.
- Mau C. J. D., West C. A. « Cloning of casbene synthase cDNA: Evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 1994. Vol. 91, n°18, p. 8497-8501. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8497> >
- McConkey M. E., Gershenzon J., Croteau R. B. « Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2000. Vol. 122, n°1, p. 215-223. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.215> >
- McDowell E. T., Kapteyn J., Schmidt A., Li C., Kang J.-H., Descour A., Shi F., Larson M., Schillmiller A., An L., Jones A. D., Pichersky E., Soderlund C. A., Gang D. R. « Comparative Functional Genomic Analysis of *Solanum* Glandular Trichome Types ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2011. Vol. 155, n°1, p. 524-539. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.110.167114> >
- McGeedy P., Croteau R. « Isolation and characterization of an active-site peptide from a monoterpene cyclase labeled with a mechanism-based inhibitor ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 20 février 1995. Vol. 317, n°1, p. 149-155. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1147> >
- Mehrshahi P., Johnny C., DellaPenna D. « Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2014. Vol. 19, n°8, p. 501-507. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.013> >
- Mendoza-Poudereux I., Kutzner E., Huber C., Segura J., Eisenreich W., Arrillaga I. « Metabolic cross-talk between pathways of terpenoid backbone biosynthesis in spike lavender ». *Plant Physiol. Biochem.* [En ligne]. 2015. Vol. 95, p. 113-120. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.029> >
- Mersereau M., Pazour G. J., Das A. « Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation ». *Gene* [En ligne]. 31 mai 1990. Vol. 90, n°1, p. 149-151. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90452-W](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90452-W) >
- Michael R., Ranjan A., Kumar R. S., Pathak P. K., Trivedi P. K. « Light-regulated expression of terpene synthase gene, ATTPS03, is controlled by the bZIP transcription factor, HY5, in *Arabidopsis thaliana* ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [En ligne]. 2020. Vol. 529, n°2, p. 437-443. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.222> >
- Michellon R. « Le géranium rosat à La Réunion: l'intensification de sa culture et les perspectives d'amélioration génétique ». 1978.
- Miettinen K., Dong L., Navrot N., Schneider T., Burlat V., Pollier J., Woittiez L., Van Der Krol S., Lugan R., Ilc T., Verpoorte R., Oksman-Caldentey K. M., Martinoia E., Bouwmeester H., Goossens A., Memelink J., Werck-Reichhart D. « The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* ». *Nat. Commun.* [En ligne]. 2014. Vol. 5, n°1. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/ncomms4606> >
- Miller D. M. « The taxonomy of *Pelargonium* species and cultivars, their origins and growth in the wild ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002. p. 61-91. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-13> >

- Mittler R. « Abiotic stress, the field environment and stress combination ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2006. Vol. 11, n°1, p. 15-19. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002> >
- Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. « AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses ». *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* [En ligne]. 2012. Vol. 1819, n°2, p. 86-96. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.08.004> >
- Modi V. V., Patwa D. K. « Occurrence of mevalonic acid in carrots ». *Nature* [En ligne]. 1961. Vol. 191, n°4794, p. 1202. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/1911202a0> >
- Morris K. V., Mattick J. S. « The rise of regulatory RNA ». *Nat. Rev. Genet.* [En ligne]. juin 2014. Vol. 15, n°6, p. 423-437. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nrg3722> >
- Motsa N. M. N. M., Soundy P., Steyn J. M. M., Learmonth R. A., Mojela N., Teubes C. « 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.* [En ligne]. 2006. Vol. 18, n°SPEC. ISS., p. 106-110. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.12067129> >
- Mower J. P., Touzet P., Gummow J. S., Delph L. F., Palmer J. D. « Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants ». *BMC Evol. Biol.* [En ligne]. 2007. Vol. 7, p. 1-14. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-135> >
- Muangphrom P., Seki H., Suzuki M., Komori A., Nishiwaki M., Mikawa R., Fukushima E. O., Muranaka T. « Functional analysis of amorpho-4,11-diene synthase (ADS) homologs from non-artemisinin-producing artemisia species: The discovery of novel koidzumiol and (+)- α -Bisabolol synthases ». *Plant Cell Physiol.* [En ligne]. 2016. Vol. 57, n°8, p. 1678-1688. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw094> >
- Munkert J., Bauer P., Burda E., Müller-Uri F., Kreis W. « Progesterone 5 β -reductase of *Erysimum crepidifolium*: cDNA cloning, expression in *Escherichia coli*, and reduction of enones with the recombinant protein ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2011. Vol. 72, n°14-15, p. 1710-1717. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.06.007> >
- Munkert J., Costa C., Budeanu O., Petersen J., Bertolucci S., Fischer G., Müller-Uri F., Kreis W. « Progesterone 5 β -reductase genes of the Brassicaceae family as function-associated molecular markers ». *Plant Biol.* [En ligne]. 2015a. Vol. 17, n°6, p. 1113-1122. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/plb.12361> >
- Munkert J., Pollier J., Miettinen K., Van Moerkercke A., Payne R., Müller-Uri F., Burlat V., O'Connor S. E., Memelink J., Kreis W., Goossens A. « Iridoid synthase activity is common among the plant progesterone 5 β -reductase family ». *Mol. Plant* [En ligne]. 2015b. Vol. 8, n°1, p. 136-152. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.005> >
- Munné-Bosch S., Alegre L. « Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2003. Vol. 131, n°4, p. 1816-1825. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.102.019265> >
- Nagegowda D. A. « Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation ». *FEBS Lett.* [En ligne]. 2010. Vol. 584, n°14, p. 2965-2973. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.045> >
- Narnoliya L. K., Kaushal G., Singh S. P., Sangwan R. S. « De novo transcriptome analysis of rose-scented geranium provides insights into the metabolic specificity of terpene and tartaric acid biosynthesis ». *BMC Genomics* [En ligne]. 2017. Vol. 18, n°1, p. 1-14. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3437-0> >
- Newman R. A., Yang P., Pawlus A. D., Block K. I. « Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents ». *Mol. Interv.* [En ligne]. 2008. Vol. 8, n°1, p. 36-49. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1124/mi.8.1.8> >
- Nguyen T.-D., O'Connor S. E. « The progesterone 5 β -reductase/iridoid synthase family is a catalytic reservoir for specialized metabolism across land plants ». *ACS Chem. Biol.* [En ligne]. 5 juin 2020. p. acschembio.0c00220. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00220> >
- Ni S., Meng L., Zhao J., Wang X., Chen J. « Isolation and characterization of the trichome-specific AtTSG1 promoter from *Arabidopsis thaliana* ». *Plant Mol. Biol. Report.* [En ligne]. 2008. Vol. 26, n°4, p. 263-276. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0036-5> >
- Nieuwenhuizen N. J., Chen X., Wang M. Y., Matich A. J., Perez R. L., Allan A. C., Green S. A., Atkinson R. G. « Natural variation in monoterpene synthesis in kiwifruit: Transcriptional regulation of terpene synthases by NAC and ETHYLENE-INSENSITIVE3-like transcription factors ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2015. Vol. 167, n°4, p. 1243-1258. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.114.254367> >
- Nieuwenhuizen N. J., Green S. A., Chen X., Bailleul E. J. D., Matich A. J., Wang M. Y., Atkinson R. G. « Functional genomics reveals that a compact terpene synthase gene family can account for terpene volatile production in apple ». *Plant Physiol.* [En ligne]. février 2013. Vol. 161, n°2, p. 787-804. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.112.208249> >
- Niinemets Ü. « Mild versus severe stress and BVOCs: thresholds, priming and consequences ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2010. Vol. 15, n°3, p. 145-153. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.008> >
- Niinemets U., Hauff K., Bertin N., Tenhunen J. D., Steinbrecher R., Seufert G. « Monoterpene emissions in relation to foliar photosynthetic and structural variables in Mediterranean evergreen *Quercus* species ». *New Phytol.* [En ligne]. février 2002. Vol. 153, n°2, p. 243-256. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00323.x> >
- Niino Y. S., Chakraborty S., Brown B. J., Massey V. « A new old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 3 février 1995. Vol. 270, n°5, p. 1983-1991. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.270.5.1983> >

- Nour-Eldin H. H., Hansen B. G., Nørholm M. H. H., Jensen J. K., Halkier B. A. « Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. 2006. Vol. 34, n°18,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/nar/gkl635> >
- O'Connor S. E., Maresh J. J. « Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis ». *Nat. Prod. Rep.* [En ligne]. 2006. Vol. 23, n°4, p. 532-547. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/b512615k> >
- O'Maille P. E., Malone A., Dellas N., Andes Hess B., Smentek L., Sheehan I., Greenhagen B. T., Chappell J., Manning G., Noel J. P. « Quantitative exploration of the catalytic landscape separating divergent plant sesquiterpene synthases ». *Nat. Chem. Biol.* [En ligne]. 7 septembre 2008. Vol. 4, n°10, p. 617-623. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nchembio.113> >
- Ochocka J. R., Bogdan A., Bogdan A. « Phylogenetical relationship within the genus *Pelargonium* based on the RAPD-PCR method of DNA analysis correlated with the essential oil composition ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002. p. 186-195. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-21> >
- Oldfield E., Lin F. Y. « Terpene biosynthesis: Modularity rules ». *Angew. Chemie - Int. Ed.* [En ligne]. 2012. Vol. 51, n°5, p. 1124-1137. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/anie.201103110> >
- De Oliveira Pereira F., Mendes J. M., Lima I. O., De Lira Mota K. S., De Oliveira W. A., De Oliveira Lima E. « Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis ». *Pharm. Biol.* [En ligne]. 2015. Vol. 53, n°2, p. 228-234. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.913299> >
- Olofsson L., Engström A., Lundgren A., Brodelius P. E. « Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L ». *BMC Plant Biol.* [En ligne]. 2011. Vol. 11,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-45> >
- Olsson M. E., Olofsson L. M., Lindahl A. L., Lundgren A., Brodelius M., Brodelius P. E. « Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2009. Vol. 70, n°9, p. 1123-1128. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.009> >
- Oosthuizen L.-M., Coetzee J. « Trichome initiation during leaf growth in *Pelargonium scabrum* ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 1984. Vol. 3, n°1, p. 50-54. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0022-4618\(16\)30080-8](https://doi.org/10.1016/s0022-4618(16)30080-8) >
- Oosthuizen L.-M., Coetzee J. « Morphogenesis of trichomes of *Pelargonium scabrum* ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 1983a. Vol. 2, n°4, p. 305-310. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0022-4618\(16\)30094-8](https://doi.org/10.1016/s0022-4618(16)30094-8) >
- Oosthuizen L.-M. « The taxonomic value of trichomes in *pelargonium* l'hérit. (Geraniaceae) ». *South African J. Bot.* 1983b. Vol. 49, n°3, p. 221-242.
- Opitz S., Nes W. D., Gershenzon J. « Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2014. Vol. 98, p. 110-119. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.11.010> >
- Ormeño E., Gentner D. R., Fares S., Karlik J., Park J. H., Goldstein A. H. « Sesquiterpenoid emissions from agricultural crops: Correlations to monoterpene emissions and leaf terpene content ». *Environ. Sci. Technol.* [En ligne]. 2010. Vol. 44, n°10, p. 3758-3764. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/es903674m> >
- Oudin A., Mahroug S., Courdavault V., Hervouet N., Zelwer C., Rodríguez-Concepción M., St-Pierre B., Burlat V. « Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus* ». *Plant Mol. Biol.* [En ligne]. 2007. Vol. 65, n°1-2, p. 13-30. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9190-7> >
- Pan J. J., Solbiati J. O., Ramamoorthy G., Hillerich B. S., Seidel R. D., Cronan J. E., Almo S. C., Poulter C. D. « Biosynthesis of squalene from farnesyl diphosphate in Bacteria: Three steps catalyzed by three enzymes ». *ACS Cent. Sci.* [En ligne]. 2015. Vol. 1, n°2, p. 77-82. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/acscentsci.5b00115> >
- Pare P. W., Tumlinson J. H. « Update on Plant-Insect Interactions Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores ». *Plant Physiol.* 1999. Vol. 121, n°October, p. 325-331.
- Park S., Grewe F., Zhu A., Ruhlman T. A., Sabir J., Mower J. P., Jansen R. K. « Dynamic evolution of *Geranium* mitochondrial genomes through multiple horizontal and intracellular gene transfers ». *New Phytol.* [En ligne]. 2015. Vol. 208, n°2, p. 570-583. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/nph.13467> >
- Parkinson C. L., Mower J. P., Qiu Y. L., Shirk A. J., Song K., Young N. D., DePamphilis C. W., Palmer J. D. « Multiple major increases and decreases in mitochondrial substitution rates in the plant family Geraniaceae ». *BMC Evol. Biol.* [En ligne]. 2005. Vol. 5, p. 1-12. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-73> >
- Pateraki I., Kanellis A. K. « Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus* ». *Plant Cell Rep.* [En ligne]. 2010. Vol. 29, n°6, p. 629-641. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0849-1> >
- Paterson A. H., Bowers J. E., Bruggmann R., Dubchak I., Grimwood J., Gundlach H., Haberler G., Hellsten U., Mitros T., Poliakov A., Schmutz J., Spannagl M., Tang H., Wang X., Wicker T., Bharti A. K., Chapman J., Feltus F. A., Gowik U., Grigoriev I. V., Lyons E., Maher C. A., Martis M., Narechania A., Otiillar R. P., Penning B. W., Salamov A. A., Wang Y., Zhang L., Carpita N. C., Freeling M., Gingle A. R., Hash C. T., Keller B., Klein P., Kresovich S., McCann M. C., Ming R., Peterson D. G., Mehboob-Ur-Rahman, Ware D., Westhoff P., Mayer K. F. X., Messing J., Rokhsar D. S. « The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses ». *Nature* [En ligne]. 2009. Vol. 457, n°7229, p. 551-556. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nature07723> >

- Pazouki L., Kanagendran A., Li S., Kännaste A., Rajabi Memari H., Bichele R., Niinemets Ü. « Mono- and sesquiterpene release from tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves upon mild and severe heat stress and through recovery: From gene expression to emission responses ». *Environ. Exp. Bot.* [En ligne]. 2016. Vol. 132, p. 1-15. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.08.003> >
- Pazouki L., Niinemets U. *Multi-substrate terpene synthases: Their occurrence and physiological significance* [En ligne]. *Front. Plant Sci.* 12 juillet 2016. Vol. 7, n°JULY2016, p. 1019. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01019> >
- Peñuelas J., Staudt M. « BVOCs and global change ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2010. Vol. 15, n°3, p. 133-144. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.005> >
- Pereyra P. C., Bowers M. D. « Iridoid glycosides as oviposition stimulants for the buckeye butterfly, *Junonia coenia* (Nymphalidae) ». *J. Chem. Ecol.* [En ligne]. 1988. Vol. 14, n°3, p. 917-928. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF01018783> >
- Pérez-Bermúdez P., Moya García A. A., Tuñón I., Gavidia I. « *Digitalis purpurea* P5βR2, encoding steroid 5β-reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis ». *New Phytol.* [En ligne]. 2010. Vol. 185, n°3, p. 687-700. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03080.x> >
- Persson B., Y K., Oppermann U., Jorvall H. « Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) ». *Chem. Biol. Interact.* 2003. Vol. 143-144, p. 271-278.
- Peters R. J. « Two rings in them all: The labdane-related diterpenoids ». *Nat. Prod. Rep.* [En ligne]. 2010. Vol. 27, n°11, p. 1521-1530. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/c0np00019a> >
- Peters R. J., Flory J. E., Jetter R., Ravn M. M., Lee H. J., Coates R. M., Croteau R. B. « Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*): Characterization and mechanism of action of the "pseudomature" recombinant enzyme ». *Biochemistry* [En ligne]. 2000. Vol. 39, n°50, p. 15592-15602. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/bi001997i> >
- Petersen J., Lanig H., Munkert J., Bauer P., Müller-Uri F., Kreis W. « Progesterone 5β-reductases/iridoid synthases (PRISE): gatekeeper role of highly conserved phenylalanines in substrate preference and trapping is supported by molecular dynamics simulations ». *J. Biomol. Struct. Dyn.* [En ligne]. 2016. Vol. 34, n°8, p. 1667-1680. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1088797> >
- Petschenka G., Agrawal A. A. « How herbivores coopt plant defenses: Natural selection, specialization, and sequestration ». *Curr. Opin. Insect Sci.* [En ligne]. 2016. Vol. 14, p. 17-24. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.12.004> >
- Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. « Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. 1 mai 2002. Vol. 30, n°9, p. 36e - 36. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36> >
- Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. « Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations ». *Biotechnol. Lett.* [En ligne]. 2004. Vol. 26, n°6, p. 509-515. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47> >
- Phillips M. A., Savage T. J., Croteau R. « Monoterpene synthases of loblolly pine (*Pinus taeda*) produce pinene isomers and enantiomers ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 1999. Vol. 372, n°1, p. 197-204. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1467> >
- Phillips M. A., Wildung M. R., Williams D. C., Hyatt D. C., Croteau R. « cDNA isolation, functional expression, and characterization of (+)-α-pinene synthase and (-)-α-pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): Stereocontrol in pinene biosynthesis ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 2003. Vol. 411, n°2, p. 267-276. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00746-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00746-4) >
- Pichersky E., Gershenzon J. « The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense ». *Curr. Opin. Plant Biol.* [En ligne]. 2002. Vol. 5, n°3, p. 237-243. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00251-0) >
- Pichersky E., Noel J. P., Dudareva N. *Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity* [En ligne]. *Science* (80-). 10 mai 2006. Vol. 311, n°5762, p. 808-811. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1126/science.1118510> >
- Pichersky E., Raguso R. A. *Why do plants produce so many terpenoid compounds?* [En ligne]. *New Phytol.* 1 novembre 2018. Vol. 220, n°3, p. 692-702. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/nph.14178> >
- Pompon D., Louerat B., Bronine A., Urban P. « Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments ». *Methods Enzymol.* [En ligne]. 1996. Vol. 272, n°li, p. 51-64. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)72008-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)72008-6) >
- Potty V. H., Bruemmer J. H. « Oxidation of geraniol by an enzyme system from orange ». *Phytochemistry* [En ligne]. mai 1970. Vol. 9, n°5, p. 1003-1007. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85218-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85218-8) >
- Poulter C. D., Rilling H. C. « Biosynthesis of Isoprenoid Compounds ». In : Porter JW, Spurgeon SL (éd.). *Biosynth. Isoprenoid Compd.* New York : Wiley, 1981. p. 209-219. ISBN : 0471048070.
- Price R. a., Jeffrey D. Palmer. *Phylogenetic relationships of the Geraniaceae and Geranials from rbcL sequence comparisons* [En ligne]. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1993. Vol. 80, n°3, p. 661-671. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2307/2399852> >
- Pybus D., Sell C. *The Chemistry of Fragrances* [En ligne]. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2007. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/9781847555342> > ISBN : 978-0-85404-824-3.

- Qin L., Zhu Y., Ding Z., Zhang X., Ye S., Zhang R. « Structure of iridoid synthase in complex with NADP⁺/8-oxogeraniol reveals the structural basis of its substrate specificity ». *J. Struct. Biol.* [En ligne]. 1 mai 2016. Vol. 194, n°2, p. 224-230. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.02.010> >
- Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R., Lopez R. « InterProScan: Protein domains identifier ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. juillet 2005. Vol. 33, n°SUPPL. 2, p. W116-W120. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/nar/gki442> >
- Rabe P., Schmitz T., Dickschat J. S. « Mechanistic investigations on six bacterial terpene cyclases ». *Beilstein J. Org. Chem.* [En ligne]. 2016. Vol. 12, p. 1839-1850. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.173> >
- Rajeswara Rao B. R. « Rose-scented geranium (Pelargonium species)-cultivation and chemical composition of the essential oil ». In : Baruah A, Nath SC (éd.). *Nat. Essent. Oils-fragrances Flavours*. Jaipur, India : Aavishkar Publishers, Distributors, 2013. p. 12-41.
- Rajeswara Rao B. R. « Biomass yield , essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (Pelargonium species) as influenced by row spacings and intercropping with coriander (Mentha arvensis L . f . piperascens Malin . ex Holmes) ». *Ind. Crops Prod.* 2002a. Vol. 16, p. 133-144.
- Rajeswara Rao B. R. « Cultivation and distillation of Geranium oil from Pelargonium species in India ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002b. p. 224-229. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-24> >
- Rajeswara Rao B. R., Kaul P. N., Mallavarapu G. R., Ramesh S., Rao B. « Effect of Seasonal Climatic Changes on Biomass Yield and Terpenoid Composition of Rose-scented Geranium (Pelargonium species) ». *Biochem. Syst. Ecol.* [En ligne]. 1996. Vol. 24, n°7-8, p. 627-635. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0305-1978\(97\)81206-9](https://doi.org/10.1016/s0305-1978(97)81206-9) >
- Rajeswara Rao B. R., Sastry K. P., Prakasa Rao E. V. S., Ramesh S. I. « Variation in yields and quality of geranium (Pelargonium graveolens L' Hér. ex Aiton) under varied climatic and fertility conditions ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1990. Vol. 2, n°2, p. 73-79. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1990.9697827> >
- Rajeswara Rao B. R., Sastry K. P., Saleem S. M., Prakasa Rao E. V. S., Syamasundar K. V., Ramesh S. « Volatile flower oils of three genotypes of rose-scented geranium (Pelargonium sp.) ». *Flavour Fragr. J.* [En ligne]. 2000. Vol. 15, n°2, p. 105-107. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(200003/04\)15:2<105::AID-FFJ875>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(200003/04)15:2<105::AID-FFJ875>3.0.CO;2-G) >
- Ram M., Singh R., Naqvi A. A., Kumar S. « Effect of planting time on the yield and quality of essential oil in geranium Pelargonium graveolens ». *J. Hortic. Sci.* [En ligne]. 1997. Vol. 72, n°5, p. 807-810. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/14620316.1997.11515574> >
- Ram P., Kumar B., Naqvi A. A., Verma R. S., Patra N. K. « Post-harvest storage effect on quantity and quality of rose-scented geranium (Pelargonium sp. cv. 'Bourbon') oil in Uttaranchal ». *Flavour Fragr. J.* [En ligne]. 2005. Vol. 20, n°6, p. 666-668. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ffj.1544> >
- Rasulov B., Hüve K., Vålbe M., Laisk A., Niinemets Ü. « Evidence that light, carbon dioxide, and oxygen dependencies of leaf isoprene emission are driven by energy status in hybrid aspen ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2009. Vol. 151, n°1, p. 448-460. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.109.141978> >
- Ravid U., Putievsky E., Katzir I., Ikan R., Weinstein V. « Determination of the enantiomeric composition of citronellol in essential oils by chiral GC analysis on a modified γ -cyclodextrin phase ». *Flavour Fragr. J.* [En ligne]. 1992. Vol. 7, n°4, p. 235-238. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ffj.2730070413> >
- Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R. « Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties - An overview ». *Forsch. Komplementarmed.* [En ligne]. 2009. Vol. 16, n°2, p. 79-90. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1159/000207196> >
- Richter N., Gröger H., Hummel W. « Asymmetric reduction of activated alkenes using an enoate reductase from *Gluconobacter oxydans* ». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [En ligne]. 2011. Vol. 89, n°1, p. 79-89. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2793-y> >
- Ringer K. L., Davis E. M., Croteau R. « Monoterpene Metabolism. Cloning, Expression, and Characterization of (-)-Isopiperitenol/(-)-Carveol Dehydrogenase of Peppermint and Spearmint ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1 janvier 2005. Vol. 137, n°3, p. 863-872. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.104.053298> >
- Ringer K. L., McConkey M. E., Davis E. M., Rushing G. W., Croteau R. « Monoterpene double-bond reductases of the (-)-menthol biosynthetic pathway: Isolation and characterization of cDNAs encoding (-)-isopiperitenone reductase and (+)-pulegone reductase of peppermint ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. 2003. Vol. 418, n°1, p. 80-92. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00390-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00390-4) >
- Rios-Esteva R., Turner G. W., Lee J. M., Croteau R. B., Lange B. M. « A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpene essential oil composition in peppermint ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 2008. Vol. 105, n°8, p. 2818-2823. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.0712314105> >
- Rising K. A., Starks C. M., Noel J. P., Chappell J. « Demonstration of germacrene A as an intermediate in 5-Epi-aristolochene synthase catalysis ». *J. Am. Chem. Soc.* [En ligne]. 2000. Vol. 122, n°9, p. 1861-1866. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/ja993584h> >
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. « VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics ». *PeerJ* [En ligne]. octobre 2016. Vol. 2016, n°10, p. e2584. Disponible sur : < <https://doi.org/10.7717/peerj.2584> >
- Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahn H. « Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis ». *J. Am. Chem. Soc.* [En ligne]. 1996. Vol. 118, n°11, p. 2564-2566. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/ja953834a> >

- Röschenbleck J., Albers F., Müller K., Weinl S., Kudla J. « Phylogenetics, character evolution and a subgeneric revision of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae) ». *Phytotaxa* [En ligne]. 2014. Vol. 159, n°2, p. 31-76. Disponible sur : < <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.159.2.1> >
- Roth L. M., Eisner T. « Chemical Defenses of Arthropods ». *Annu. Rev. Entomol.* [En ligne]. 1962. Vol. 7, n°1, p. 107-136. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1146/annurev.en.07.010162.000543> >
- Ruan J., Zhou Y., Zhou M., Yan J., Khurshid M., Weng W., Cheng J., Zhang K. « Jasmonic acid signaling pathway in plants ». *Int. J. Mol. Sci.* [En ligne]. 2019. Vol. 20, n°10. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3390/ijms20102479> >
- Rudolph K., Wiegert T., Schubert R., Müller-Uri F. « The occurrence of progesterone 5 β -reductase is not limited to the angiosperms: a functional gene was identified in *Picea sitchensis* and expressed in *Escherichia coli* ». *New Zeal. J. For. Sci.* [En ligne]. 2016. Vol. 46, n°1, p. 1-9. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s40490-016-0063-1> >
- Ruhlman T. A., Jansen R. K. *Aberration or Analogy? The Atypical Plastomes of Geraniaceae* [En ligne]. 1^{re} éd.[s.l.] : Elsevier Ltd., 2018. 223-262 p. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.11.017> >
- Ruzicka L. « The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds ». *Experientia* [En ligne]. octobre 1953. Vol. 9, n°10, p. 357-367. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF02167631> >
- Ryšlavá H., Doubnerová V., Kavan D., Vaněk O. « Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly ». *J. Proteomics* [En ligne]. 2013. Vol. 92, p. 80-109. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.025> >
- Saddiq A. A., Khayyat S. A. « Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral ». *Pestic. Biochem. Physiol.* [En ligne]. 1 septembre 2010. Vol. 98, n°1, p. 89-93. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.05.004> >
- Sakamoto T., Miyura K., Itoh H., Tatsumi T., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Agrawal G. K., Takeda S., Abe K., Miyao A., Hirochika H., Kitano H., Ahikari M., Matsuoka M. « An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2004. Vol. 135, n°3, p. 1863. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.104.900115> >
- Sales E., Müller-Uri F., Nebauer S. G., Segura J., Kreis W., Arrillaga I. « *Digitalis* ». In : *Wild Crop Relat. Genomic Breed. Resour.* [En ligne]. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 73-112. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/978-3-642-21201-7_5 >
- Sallaud C., Rontein D., Onillon S., Jabès F., Duffé P., Giacalone C., Thoraval S., Escoffier C., Herbette G., Leonhardt N., Causse M., Tissiera A. « A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites* ». *Plant Cell* [En ligne]. 2009. Vol. 21, n°1, p. 301-317. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057885> >
- Salvucci M. E., Crafts-Brandner S. J. « Inhibition of photosynthesis by heat stress: The activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis ». *Physiol. Plant.* [En ligne]. 2004. Vol. 120, n°2, p. 179-186. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x> >
- Sandholu A. S., Mohole M., Duax W. L., Thulasiram H. V., Sengupta D., Kulkarni K. « Dynamics of loops at the substrate entry channel determine the specificity of iridoid synthases ». *FEBS Lett.* [En ligne]. 10 août 2018. Vol. 592, n°15, p. 2624-2635. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13174> >
- Saraswathi J., Baburao N., Hameed Hilal M., Roja Rani A. « Phytopharmacological importance of *Pelargonium* species ». *J. Med. Plants Res.* [En ligne]. 2011. Vol. 5, n°13, p. 2587-2598. Disponible sur : < <http://www.academicjournals.org/JMPR> >
- Sastry K. P., Krishnan K. R., Radha K. « Differences in the quality of the essential oil hydrodistilled from leaves from different positions on the growing branches of rose scented geranium *Pelargonium graveolens*. » *J. Med. Arom. Plant. Sci.* 2001. Vol. 23, p. 34-36.
- Sato-Masumoto N., Ito M. « Two types of alcohol dehydrogenase from *Perilla* can form citral and perillaldehyde ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2014. Vol. 104, p. 12-20. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.04.019> >
- Schillmiller A. L., Miner D. P., Larson M., McDowell E., Gang D. R., Wilkerson C., Last R. L. « Studies of a Biochemical Factory: Tomato Trichome Deep Expressed Sequence Tag Sequencing and Proteomics ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2010. Vol. 153, n°3, p. 1212-1223. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.110.157214> >
- Schillmiller A. L., Pichersky E., Last R. L. « Taming the hydra of specialized metabolism: How systems biology and comparative approaches are revolutionizing plant biochemistry ». *Curr. Opin. Plant Biol.* [En ligne]. 2012. Vol. 15, n°3, p. 338-344. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.12.005> >
- Schillmiller A. L., Chauvinhold I., Larson M., Xu R., Charbonneau A. L., Schmidt A., Wilkerson C., Last R. L., Pichersky E. « Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 2009. Vol. 106, n°26, p. 10865-10870. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.0904113106> >
- Schmiderer C., Grassi P., Novak J., Franz C. « Diversity of Essential Oil Glands of Spanish Sage (*Salvia Lavandulifolia* Vahl, Lamiaceae) ». *Nat. Prod. Commun.* [En ligne]. juillet 2008. Vol. 3, n°7, p. 1934578X0800300. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300723> >
- Schmidt K., Petersen J., Munkert J., Egerer-Sieber C., Hornig M., Müller Y. A., Kreis W. « PRISEs (progesterone 5 β -reductase and/or iridoid synthase-like 1,4-enone reductases): Catalytic and substrate promiscuity allows for realization of multiple pathways in plant metabolism ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2018. Vol. 156, n°August, p. 9-19. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.08.012> >

- Schoner W., Scheiner-Bobis G. « Endogenous and exogenous cardiac glycosides: Their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth ». *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* [En ligne]. 2007. Vol. 293, n°2,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00098.2007> >
- Schönfeld W., Weiland J., Lindig C., Masnyk M., Kabat M. M., Kurek A., Wicha J., Repke K. R. H. « The lead structure in cardiac glycosides is 5 β ,14 β -androstande-3 β ,14-diol ». *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* [En ligne]. 1985. Vol. 329, n°4, p. 414-426. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF00496377> >
- Schwab W., Wüst M. *Understanding the Constitutive and Induced Biosynthesis of Mono- and Sesquiterpenes in Grapes (Vitis vinifera): A Key to Unlocking the Biochemical Secrets of Unique Grape Aroma Profiles* [En ligne]. *J. Agric. Food Chem.* 16 décembre 2015. Vol. 63, n°49, p. 10591-10603. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04398> >
- Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. C. « SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. 1 juillet 2003. Vol. 31, n°13, p. 3381-3385. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520> >
- Selmar D., Kleinwächter M. « Stress enhances the synthesis of secondary plant products: The impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products ». *Plant Cell Physiol.* [En ligne]. 2013. Vol. 54, n°6, p. 817-826. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/pcp/pct054> >
- Senthil Kumar K. J., Gokila Vani M., Wang C.-S., Chen C.-C., Chen Y.-C., Lu L.-P., Huang C.-H., Lai C.-S., Wang S.-Y. « Geranium and Lemon Essential Oils and Their Active Compounds Downregulate Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain, in Epithelial Cells ». *Plants* [En ligne]. 2020. Vol. 9, n°6, p. 770. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3390/plants9060770> >
- Sharkey T. D. « Effects of moderate heat stress on photosynthesis: Importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene ». *Plant, Cell Environ.* [En ligne]. 2005. Vol. 28, n°3, p. 269-277. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01324.x> >
- Shellie R. A., Marriott P. J. « Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of Pelargonium graveolens essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry ». *Analyst* [En ligne]. 2003. Vol. 128, n°7, p. 879-883. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/b304371a> >
- Shen W.-J., Forde B. G. « Efficient transformation of Agrobacterium spp. by high voltage electroporation ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. 25 octobre 1989. Vol. 17, n°20, p. 8385. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/nar/17.20.8385> >
- Sherden N. H., Lichman B., Caputi L., Zhao D., Kamileen M. O., Buell C. R., O'Connor S. E. « Identification of iridoid synthases from Nepeta species: Iridoid cyclization does not determine nepetalactone stereochemistry ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2018. Vol. 145, p. 48-56. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.10.004> >
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D., Higgins D. G. « Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega ». *Mol. Syst. Biol.* [En ligne]. janvier 2011. Vol. 7, n°1, p. 539. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75> >
- Simkin A. J., Miettinen K., Claudel P., Burlat V., Guirimand G., Courdavault V., Papon N., Meyer S., Godet S., St-Pierre B., Giglioli-Guivarc'h N., Fischer M. J. C., Memelink J., Clastre M. « Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma ». *Phytochemistry* [En ligne]. janvier 2013. Vol. 85, p. 36-43. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.09.014> >
- Simmons A. T., Gurr G. M. « Trichomes of Lycopersicon species and their hybrids: Effects on pests and natural enemies ». *Agric. For. Entomol.* [En ligne]. 2005. Vol. 7, n°4, p. 265-276. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1461-9555.2005.00271.x> >
- Simon J. E., Reiss-Bubenheim D., Joly R. J., Charles D. J. « Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1992. Vol. 4, n°1, p. 71-75. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1992.9698013> >
- Simpson J. T., Durbin R. « Efficient construction of an assembly string graph using the FM-index ». *Bioinformatics* [En ligne]. juin 2010. Vol. 26, n°12, p. i367-i373. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq217> >
- Singh K. B., Foley R. C., Oñate-Sánchez L. « Transcription factors in plant defense and stress responses ». *Curr. Opin. Plant Biol.* [En ligne]. 2002. Vol. 5, n°5, p. 430-436. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00289-3) >
- Singh M., Singh U. B., Ram M., Yadav A., Chantotiya C. S. « 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. Crops Prod.* [En ligne]. 2013. Vol. 46, p. 234-237. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.032> >
- Singh V., Ambia L. K., Kaul V. K., Acharya R. « Effect of plant density and multiple harvesting on productivity and quality of scented geranium ». *Indian Perfum.* 2007. Vol. 51, n°1, p. 42.
- Snow M. D., Bard R. R., Olszyk D. M., Minster L. M., Hager A. N., Tingey D. T. « Monoterpene levels in needles of Douglas fir exposed to elevated CO₂ and temperature ». *Physiol. Plant.* [En ligne]. 2003. Vol. 117, n°3, p. 352-358. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00035.x> >
- Southwell I. A., Stiff I. A. « Chemical composition of an Australian geranium oil ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1995. Vol. 7, n°5, p. 545-547. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698582> >

- Spyropoulou E. A., Haring M. A., Schuurink R. C. « Expression of Terpenoids 1, a glandular trichome-specific transcription factor from tomato that activates the terpene synthase 5 promoter ». *Plant Mol. Biol.* [En ligne]. 2014. Vol. 84, n°3, p. 345-357. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0142-0> >
- Srividya N., Davis E. M., Croteau R. B., Lange B. M. « Functional analysis of (4S)-limonene synthase mutants reveals determinants of catalytic outcome in a model monoterpene synthase ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 2015. Vol. 112, n°11, p. 3332-3337. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.1501203112> >
- Stafford P. J., Gibby M. « Pollen morphology of the genus *Pelargonium* (Geraniaceae) ». *Rev. Palaeobot. Palynol.* [En ligne]. 1992. Vol. 71, n°1-4, p. 79-109. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(92\)90158-D](https://doi.org/10.1016/0034-6667(92)90158-D) >
- Stamatakis A. « RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies ». *Bioinformatics* [En ligne]. janvier 2014. Vol. 30, n°9, p. 1312-1313. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033> >
- Standen M. D., Connellan P. A., Leach D. N. « Natural killer cell activity and lymphocyte activation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components in vitro ». *Int. J. Aromather.* [En ligne]. 2006. Vol. 16, n°3-4, p. 133-139. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2006.09.006> >
- Starks C. M., Back K., Chappell J., Noel J. P. « Structural Basis for Cyclic Terpene Biosynthesis by Tobacco 5-Epi-Aristolochene Synthase ». *Science* (80-.). 1997. Vol. 277, n°September, p. 1815-1820.
- Staudt M., Bertin N. « Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves ». *Plant, Cell Environ.* [En ligne]. 1998. Vol. 21, n°4, p. 385-395. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00288.x> >
- Staudt M., Bertin N., Frenzel B., Seufert G. « Seasonal variation in amount and composition of monoterpenes emitted by young *Pinus pinea* trees - Implications for emission modeling ». *J. Atmos. Chem.* [En ligne]. 2000. Vol. 35, n°1, p. 77-99. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1023/A:1006233010748> >
- Steele C. L., Crock J., Bohlmann J., Croteau R. « Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*): Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of δ -selinene synthase and γ -humulene synthase ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 23 janvier 1998. Vol. 273, n°4, p. 2078-2089. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2078> >
- Stöckigt J., Ruppert M. « Strictosidine — The Biosynthetic Key to Monoterpenoid Indole Alkaloids ». In : Barton D, Meth-Cohn O (éd.). *Compr. Nat. Prod. Chem. 1st Ed.* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 1999. p. 8500. Disponible sur : < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080912837000928> > ISBN : 9780080912837.
- Suga T., Shishibori T. *The Biosynthesis of Geraniol and Citronellol in Pelargonium roseum Bourbon* [En ligne]. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1973. Vol. 46, n°11, p. 3545-3548. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1246/bcsj.46.3545> >
- Surburg H., Panten J. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2006. 1-318 p. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/3527608214> > ISBN : 3L52731315X.
- Swain R. « Aromatic pelargoniums ». *Arnoldia* [En ligne]. 1974. Vol. 34, n°3, p. 97-124. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2307/42962527> >
- Sweet R. *Geraniaceae*. London : Ridgway, 1820. 1-100 p.
- Takahashi S., Koyama T. « Structure and function of cis-prenyl chain elongating enzymes ». *Chem. Rec.* [En ligne]. 2006. Vol. 6, n°4, p. 194-205. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/tcr.20083> >
- Tantillo D. J. « Biosynthesis via carbocations: Theoretical studies on terpene formation ». *Nat. Prod. Rep.* [En ligne]. 2011. Vol. 28, n°6, p. 1035-1053. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/c1np00006c> >
- Tarrío R., Ayala F. J., Rodríguez-Trelles F. « The VEIn Patterning 1 (VEP1) gene family laterally spread through an ecological network ». *PLoS One* [En ligne]. 2011. Vol. 6, n°7, p. 22-25. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022279> >
- Tarshis L. C., Proteau P. J., Kellogg B. A., Sacchetti J. C., Poulter C. D. « Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 1996. Vol. 93, n°26, p. 15018-15023. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15018> >
- Tarshis L. C., Sacchetti J. C., Yan M., Poulter C. D. « Crystal Structure of Recombinant Farnesyl Diphosphate Synthase at 2.6-Å Resolution ». *Biochemistry* [En ligne]. 1994. Vol. 33, n°36, p. 10871-10877. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/bi00202a004> >
- Tembe R. P., Deodhar M. A. « Chemical and molecular fingerprinting of different cultivars of *Pelargonium graveolens* (L'Herit.) viz., Reunion, Bourbon and Egyptian ». *Biotechnology* [En ligne]. 2010. Vol. 9, n°4, p. 485-491. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.485.491> >
- Theologis A., Ecker J. R., Palm C. J., Federspiel N. A., Kaul S., White O., Alonso J., Altafi H., Araujo R., Bowman C. L., Brooks S. Y., Buehler E., Chan A., Chao Q., Chen H., Cheuk R. F., Chin C. W., Chung M. K., Conn L., Conway A. B. A. R., Conway A. B. A. R., Creasy T. H., Dewar K., Dunn P., Etgu P., Feldblyum T. V., Feng J. D., Fong B., Fujii C. Y., Gill J. E., Goldsmith A. D., Haas B., Hansen N. F., Hughes B., Huizar L., Hunter J. L., Jenkins J., Johnson-Hopson C., Khan S., Khaykin E., Kim C. J., Koo H. L., Kremenetskaia I., Kurtz D. B., Kwan A., Lam B., Langin-Hooper S., Lee A., Lee J. M., Lenz C. A., Li J. H., Li Y. P., Lin X., Liu S. X., Liu Z. A., Luros J. S., Maiti R., Marziali A., Militscher J., Miranda M., Nguyen M., Nierman W. C., Osborne B. I., Pai G., Peterson J., Pham P. K., Rizzo M., Rooney T., Rowley D., Sakano H., Salzberg S. L., Schwartz J. R., Shinn P., Southwick A. M., Sun H., Tallon L. J., Tambunga G., Toriumi M. J., Town C. D., Utterback T., Van Aken S., Vaysberg M., Vysotskaia V. S., Walker M., Wu D., Yu G., Fraser C. M., Venter J. C., Davis R. W. « Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana* ». *Nature* [En ligne]. 2000. Vol. 408, n°6814, p. 816-820. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/35048500> >

- Thimmappa D. K., Bhattacharjee S. K. « Standardisation of propagation of scented geranium from stem cuttings. » *Indian Perfum.* [En ligne]. 1990. Vol. 34, n°1, p. 56-60. Disponible sur : < <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19910304639> >
- Tholl D. « Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants ». In : *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2015. p. 63-106. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/10_2014_295 > ISBN : 0724-6145 (Print)r0724-6145 (Linking).
- Tholl D. « Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism ». *Curr. Opin. Plant Biol.* [En ligne]. juin 2006. Vol. 9, n°3, p. 297-304. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.014> >
- Tholl D., Chen F., Petri J., Gershenzon J., Pichersky E. « Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from Arabidopsis flowers ». *Plant J.* [En ligne]. juin 2005. Vol. 42, n°5, p. 757-771. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02417.x> >
- Thorn A., Egerer-Sieber C., Jäger C. M., Herl V., Müller-Uri F., Kreis W., Müller Y. A. « The crystal structure of progesterone 5 β -reductase from *Digitalis lanata* defines a novel class of short chain dehydrogenases/reductases ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 2008. Vol. 283, n°25, p. 17260-17269. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.M706185200> >
- Tian D., Peiffer M., De Moraes C. M., Felton G. W. « Roles of ethylene and jasmonic acid in systemic induced defense in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Helicoverpa zea* ». *Planta* [En ligne]. 2014. Vol. 239, n°3, p. 577-589. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1997-7> >
- Tiiva P., Faubert P., Michelsen A., Holopainen T., Holopainen J. K., Rinnan R. « Climatic warming increases isoprene emission from a subarctic heath ». *New Phytol.* [En ligne]. 2008. Vol. 180, n°4, p. 853-863. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02587.x> >
- Tingey D. T., Manning M., Grothaus L. C., Burns W. F. « Influence of Light and Temperature on Monoterpene Emission Rates from Slash Pine ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1 mai 1980. Vol. 65, n°5, p. 797-801. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.65.5.797> >
- Tissier A. *Plant secretory structures: more than just reaction bags* [En ligne]. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1 février 2018. Vol. 49, p. 73-79. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.003> >
- Tissier A. « Trichome Specific Expression: Promoters and Their Applications ». *Transgenic Plants - Adv. Limitations* [En ligne]. 2012. Disponible sur : < <https://doi.org/10.5772/32101> >
- Tissier A., Morgan J. A., Dudareva N. « Plant Volatiles: Going 'In' but not 'Out' of Trichome Cavities ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2017. Vol. 22, n°11, p. 930-938. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.001> >
- Trapp S. C., Croteau R. B. « Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications ». *Genetics* [En ligne]. 1 juin 2001. Vol. 158, n°2, p. 811-822. Disponible sur : < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9584109> >
- Tschesche R., Hombach R., Scholten H., Peters M. « Neue beiträge zur biogenese der cardenolide in *Digitalis lanata* ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1970. Vol. 9, n°7, p. 1505-1515. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85268-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85268-1) >
- Tundis R., Loizzo M., Menichini Federica, Statti G., Menichini Francesco. « Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments ». *Mini-Reviews Med. Chem.* [En ligne]. 2008. Vol. 8, n°4, p. 399-420. Disponible sur : < <https://doi.org/10.2174/138955708783955926> >
- Turner G. W., Gershenzon J., Croteau R. B. « Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2000. Vol. 124, n°2, p. 655-663. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.655> >
- Uesato S., Ikeda H., Fujita T., Inouye H., Zenk H. « Elucidation of Iridodial formation mechanism - partial purification and characterization of the novel monoterpene cyclase from *Rauwolfia serpentina* cell suspension cultures ». *Tetrahedron Lett.* 1987. Vol. 28, n°38, p. 4431-4434.
- Uesato S., Matsuda S., Inouye H. « Mechanism for iridane skeleton formation from acyclic monoterpene in the biosynthesis of secologanin and vindoline in *Catharanthus roseus* and *Lonicera morrowii*. » *Chem. Pharm. Bull.* 1984. Vol. 32, n°4, p. 1671-1674.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. « Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. » *Genome Biol.* [En ligne]. 2002. Vol. 3, n°7, p. 465-469. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034> >
- Vattekatte A., Boland W. « Natural Products Chemistry & Research Biosynthetic Origin of Complex Terpenoid Mixtures by Multiproduct Enzymes, Metal Cofactors, and Substrate Isomers ». *Nat. Prod. Chem. Res.* [En ligne]. 2020. Vol. 8, n°372, p. 1-13. Disponible sur : < <https://doi.org/10.35248/2329-6836.20.8.372> >
- Vattekatte A., Garms S., Brandt W., Boland W. « Enhanced structural diversity in terpenoid biosynthesis: Enzymes, substrates and cofactors ». *Org. Biomol. Chem.* [En ligne]. 17 janvier 2018. Vol. 16, n°3, p. 348-362. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1039/c7ob02040f> >
- Vedula L. S., Jiang J., Zakharian T., Cane D. E., Christianson D. W. « Structural and mechanistic analysis of trichodiene synthase using site-directed mutagenesis: Probing the catalytic function of tyrosine-295 and the asparagine-225/serine-229/glutamate-233-Mg²⁺ +B motif ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. janvier 2008. Vol. 469, n°2, p. 184-194. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.10.015> >

- Verma R. K., Chauhan A., Verma R. S., Rahman L. U., Bisht A. « Improving production potential and resources use efficiency of peppermint (*Mentha piperita* L.) intercropped with geranium (*Pelargonium graveolens* L. Herit ex Ait) under different plant density ». *Ind. Crops Prod.* [En ligne]. 2013a. Vol. 44, p. 577-582. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.019> >
- Verma R. K., Verma R. S., Chauhan A., Singh A., Rahman A. U., Kalra A. « Biomass yield, essential oil yield and oil quality of rose-scented geranium (*pelargonium graveolens* L.), intercropped with vegetables ». *Int. J. Agric. Res.* [En ligne]. 1 décembre 2011. Vol. 6, n°12, p. 830-839. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3923/ijar.2011.830.839> >
- Verma R. S., Chandra Padalia R., Chauhan A. « Rose-Scented Geranium (*Pelargonium* sp.) oils ». In : *Essent. Oils Food Preserv. Flavor Saf.* [En ligne]. [s.l.] : Elsevier Inc., 2016. p. 697-704. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00079-1> > ISBN : 9780124166448.
- Verma R. S., Rahman L., Verma R. K., Chauhan A., Singh A. *Post Harvest Storage Method for Rose-Scented Geranium (Pelargonium graveolens L' Herit. ex Ait.)* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2013b. 693-698 p. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.862930> >
- Verma Ram S., Ur Rahman L., Verma R. K., Chauhan A., Singh A. « Essential oil composition of *Pelargonium graveolens* L'Herit ex Ait. cultivars harvested in different seasons ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 2013c. Vol. 25, n°5, p. 372-379. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.782476> >
- Verma R. S., Verma R. K., Yadav A. K., Chauhan A. « Changes in the essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Herit. ex Ait.) due to date of transplanting under hill conditions of Uttarakhand ». *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2010. Vol. 1, n°3, p. 367-370.
- Viljoen A. M., Van der Walt J. J. A., Swart J. P. J., Demarne F.-E., Viljoen A. M., Van der Walt J. J. A. J. A., Demame F. E. « A study of the variation in the essential oil of *pelargonium capitatum* (L.) L'Herit. (Geraniaceae). part II. the chemotypes of *P. capitatum* ». *J. Essent. Oil Res.* [En ligne]. 1995. Vol. 7, n°6, p. 605-611. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9700514> >
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe Da. « An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus ». *Plant J.* [En ligne]. 2003. Vol. 33, n°5, p. 949-956. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x> >
- Voirin B., Bayet C. « Developmental changes in the monoterpene composition of *Mentha x piperita* leaves from individual peltate trichomes ». *Phytochemistry* [En ligne]. 1996. Vol. 43, n°3, p. 573-580. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00285-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00285-3) >
- Wagner G. J. « Secreting glandular trichomes: More than just hairs ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 1991. Vol. 96, n°3, p. 675-679. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.675> >
- Wagner G. J., Wang E., Shepherd R. W. « New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome ». *Ann. Bot.* [En ligne]. 2004. Vol. 93, n°1, p. 3-11. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/aob/mch011> >
- Walker B. J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo C. A., Zeng Q., Wortman J., Young S. K., Earl A. M. « Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement ». *PLoS One* [En ligne]. novembre 2014. Vol. 9, n°11,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963> >
- Wallach O. *Terpene und Campher: Zusammenfassung einiger Untersuchungen auf dem Gebiet der ali(cyclischen Kohlenstoffverbindungen.* 2nd éd. Leipzig, Germany : Veit, 1914.
- Van der Walt J. J. A. « A taxonomic revision of the type section of *Pelargonium* L ' Hérít . » *Both.* 1985. Vol. 15, n°3/4, p. 345-385.
- Van der Walt J. J. A., Boucher D. A. « A taxonomic revision of the section Myrrhidium of *Pelargonium* (Geraniaceae) in southern Africa ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 1986. Vol. 52, n°5, p. 438-462. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(16\)31508-3](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(16)31508-3) >
- Van der Walt J. J. A., Demarne F.-E. « *Pelargonium graveolens* and *P. radens*: A comparison of their morphology and essential oils ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 1988. Vol. 54, n°6, p. 617-622. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(16\)31263-7](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(16)31263-7) >
- Van der Walt J. J. A., Ward-Hilhorst E. *Pelargoniums of Southern Africa.* Cape Town : Purnell & Sons, 1977. ISBN : 0868430064.
- Van der Walt J. J. A., Van Zyl L. « A taxonomic revision of *Pelargonium* section *Campylia* (Geraniaceae) ». *South African J. Bot.* [En ligne]. 1988. Vol. 54, n°2, p. 145-171. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(16\)31345-x](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(16)31345-x) >
- Wang B., Kashkooli A. B., Sallets A., Ting H. M., De Ruijter N. C. A., Olofsson L., Brodelius P., Pottier M., Boutry M., Bouwmeester H., Van der Krol A. R. « Transient production of artemisinin in *Nicotiana benthamiana* is boosted by a specific lipid transfer protein from *A. annua* ». *Metab. Eng.* [En ligne]. 2016. Vol. 38, p. 159-169. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.07.004> >
- Wang E., Gan S., Wagner G. J. « Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. » *J. Exp. Bot.* [En ligne]. 2002. Vol. 53, n°376, p. 1891-1897. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/jxb/erf054> >
- Wang G., Tian L., Aziz N., Broun P., Dai X., He J., King A., Zhao P. X., Dixon R. A. « Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2008. Vol. 148, n°3, p. 1254-1266. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.108.125187> >

- Wang H., Olofsson L., Lundgren A., Brodelius P. E. « Trichome-Specific Expression of Amorpha-4,11-Diene Synthase, a Key Enzyme of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L., as Reported by a Promoter-GUS Fusion ». *Am. J. Plant Sci.* [En ligne]. 2011. Vol. 02, n°04, p.619-628. Disponible sur : < <https://doi.org/10.4236/ajps.2011.24073> >
- Wang M., Chittiboyina A. G., Avonto C., Parcher J. F., Khan I. A. « Comparison of current chemical and stereochemical tests for the identification and differentiation of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae) essential oils: Analytical data for (-)-(1S, 4R, 5S)-Guaia-6,9-diene and (-)-(7R,10S)-10-epi- γ -eudesmol ». *Rec. Nat. Prod.* 2014. Vol. 8, n°4, p. 360-372.
- Wang W., Wang Y., Zhang Q., Qi Y., Guo D. « Global characterization of *Artemisia annua* glandular trichome transcriptome using 454 pyrosequencing ». *BMC Genomics* [En ligne]. 2009. Vol. 10, p.465. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-465> >
- Wells R., Lis-Balchin M. « Perfumery and cosmetic products utilising Geranium oil ». In : Lis-Balchin M (éd.). *Geranium Pelarg.* [En ligne]. London : Taylor & Francis, 2002. p. 259-262. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1201/9780203216538-27> >
- Wendt K. U., Schulz G. E. « Isoprenoid biosynthesis: Manifold chemistry catalyzed by similar enzymes ». *Structure* [En ligne]. 1998. Vol. 6, n°2, p. 127-133. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00015-X) >
- Weng M. L., Blazier J. C., Govindu M., Jansen R. K. « Reconstruction of the ancestral plastid genome in geraniaceae reveals a correlation between genome rearrangements, repeats, and nucleotide substitution rates ». *Mol. Biol. Evol.* [En ligne]. 2013. Vol. 31, n°3, p. 645-659. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/molbev/mst257> >
- Weng M. L., Ruhlman T. A., Gibby M., Jansen R. K. « Phylogeny, rate variation, and genome size evolution of *Pelargonium* (Geraniaceae) ». *Mol. Phylogenet. Evol.* [En ligne]. 2012. Vol. 64, n°3, p. 654-670. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.026> >
- Whittington D. A., Wise M. L., Urbansky M., Coates R. M., Croteau R. B., Christianson D. W. « Bornyl diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* [En ligne]. 2002. Vol. 99, n°24, p. 15375-15380. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.232591099> >
- Widhalm J. R., Jaini R., Morgan J. A., Dudareva N. « Rethinking how volatiles are released from plant cells ». *Trends Plant Sci.* [En ligne]. 2015. Vol. 20, n°9, p. 545-550. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.009> >
- Wilkins R. T., Shea G. O., Halbreich S., Stamp N. E. « Resource availability and the trichome defenses of tomato plants ». *Oecologia* [En ligne]. 1996. Vol. 106, n°2, p. 181-191. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/BF00328597> >
- Williams C. A., Newman M., Gibby M. « The application of leaf phenolic evidence for systematic studies within the genus *Pelargonium* (Geraniaceae) ». *Biochem. Syst. Ecol.* [En ligne]. 2000. Vol. 28, n°2, p. 119-132. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00044-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00044-7) >
- Williams D. C., McGarvey D. J., Katahira E. J., Croteau R. « Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active "pseudomature" form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair ». *Biochemistry* [En ligne]. 1998. Vol. 37, n°35, p. 12213-12220. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/bi980854k> >
- Williams R. E., Bruce N. C. « 'New uses for an Old Enzyme' – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes ». *Microbiology* [En ligne]. 2002. Vol. 148, n°6, p. 1607-1614. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1099/00221287-148-6-1607> >
- Wink M. « Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2003. Vol. 64, n°1, p. 3-19. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5) >
- Wise M. L., Savage T. J., Katahira E., Croteau R. « 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.* [En ligne]. 12 juin 1998. Vol. 273, n°24, p. 14891-14899. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14891> >
- Wu B., Cao X., Liu H., Zhu C., Klee H., Zhang B., Chen K. « UDP-glucosyltransferase PpUGT85A2 controls volatile glycosylation in peach ». *J. Exp. Bot.* [En ligne]. 2019. Vol. 70, n°3, p. 985-994. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/jxb/ery419> >
- Wüst M., Beck T., Dietrich A., Mosandl A. « On the biogenesis of rose oxide in *Pelargonium graveolens* L'Heritier and *Pelargonium radens* HE Moore ». *Enantiomer*. 1996. Vol. 1, n°3, p. 167-176.
- Wüst M., Beck T., Mosandl A. « Stable isotope labelling and enantioselective analysis in biosynthetic studies of rose oxide in *Pelargonium* species ». *Nat. Prod. Anal. Chromatogr. Spectrosc. Biol. testing, Ger.* 1998. p. 281-288.
- Wüst M., Beck T., Mosandl A. « Biogenesis of Geranium Oil Compounds: On the Origin of Oxygen in cis -/ trans -Rose Oxide ». *J. Agric. Food Chem.* [En ligne]. 2002. Vol. 46, n°8, p. 3225-3229. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/jf980282a> >
- Wüst M., Mosandl A. « Important chiral monoterpene ethers in flavours and essential oils - Enantioselective analysis and biogenesis ». *Eur. Food Res. Technol.* [En ligne]. 1999. Vol. 209, n°1, p. 3-11. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s002170050447> >
- Wüst M., Rexroth A., Beck T., Mosandl A. « Mechanistic Aspects of the Biogenesis of Rose Oxide in *Pelargonium graveolens* L'Héritier ». 1998. Vol. 10, p. 229-237.

- Xiang B., Li X., Wang Yan, Tian X., Yang Z., Ma L., Liu X., Wang Yong. « Cloning and characterization of two iridoid synthase homologs from *swertia mussotii* ». *Molecules* [En ligne]. 2017. Vol. 22, n°8, p. 1-14. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3390/molecules22081387> >
- Xie X. Bin, Li S., Zhang R. F., Zhao J., Chen Y. C., Zhao Q., Yao Y. X., You C. X., Zhang X. S., Hao Y. J. « The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples ». *Plant, Cell Environ.* [En ligne]. 2012b. Vol. 35, n°11, p. 1884-1897. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02523.x> >
- Xie X., Kirby J., Keasling J. D. « Functional characterization of four sesquiterpene synthases from *Ricinus communis* (Castor bean) ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2012a. Vol. 78, p. 20-28. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.022> >
- Xu H., Bohman B., Wong D. C. J., Rodriguez-Delgado C., Scaffidi A., Flematti G. R., Phillips R. D., Pichersky E., Peakall R., Bohman B., Wong D. C. J., Rodriguez-Delgado C., Phillips R. D., Peakall R., Scaffidi A., Flematti G. R., Phillips R. D., Pichersky E., Peakall R. « Complex Sexual Deception in an Orchid Is Achieved by Co-opting Two Independent Biosynthetic Pathways for Pollinator Attraction ». *Curr. Biol.* [En ligne]. 10 juillet 2017b. Vol. 27, n°13, p. 1867-1877.e5. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.065> >
- Xu J., Ai Y., Wang J., Xu Jingwei, Zhang Y., Yang D. « Converting S-limonene synthase to pinene or phellandrene synthases reveals the plasticity of the active site ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2017a. Vol. 137, p. 34-41. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.017> >
- Xu Y. H., Liao Y. C., Zhang Z., Liu J., Sun P. W., Gao Z. H., Sui C., Wei J. H. « Jasmonic acid is a crucial signal transducer in heat shock induced sesquiterpene formation in *Aquilaria sinensis* ». *Sci. Rep.* [En ligne]. 2016. Vol. 6, n°151, p. 1-9. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/srep21843> >
- Xu Y. H., Wang J. W., Wang S., Wang J. Y., Chen X. Y. « Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A ». *Plant Physiol.* [En ligne]. 2004. Vol. 135, n°1, p. 507-515. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1104/pp.104.038612> >
- Yamada Y., Kuzuyama T., Komatsu M., Shin-ya K., Omura S., Cane D. E., Ikeda H. « Terpene synthases are widely distributed in bacteria ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. janvier 2015. Vol. 112, n°3, p. 857-862. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1073/pnas.1422108112> >
- Yamamoto T., Matsuda H., Utsumi Y., Hagiwara T., Kanisawa T. « Synthesis and odor of optically active rose oxide ». *Tetrahedron Lett.* [En ligne]. 2002. Vol. 43, n°50, p. 9077-9080. Disponible sur : < [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02311-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02311-0) >
- Yamamoto T., Shimada A., Ohmoto T., Matsuda H., Ogura M., Kanisawa T. « Olfactory study on optically active citronellyl derivatives ». *Flavour Fragr. J.* [En ligne]. 2004. Vol. 19, n°2, p. 121-133. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1002/ffj.1280> >
- Yan T., Chen M., Shen Q., Li L., Fu X., Pan Q., Tang Y., Shi P., Lv Z., Jiang W., Ma Y. N., Hao X., Sun X., Tang K. « HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua* ». *New Phytol.* [En ligne]. 2017. Vol. 213, n°3, p. 1145-1155. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/nph.14205> >
- Yang E. H., Shah S., Criley J. M. « Digitalis toxicity: A fading but crucial complication to recognize ». *Am. J. Med.* [En ligne]. 2012. Vol. 125, n°4, p. 337-343. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.09.019> >
- Yang T., Li J., Wang H. X., Zeng Y. « A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum* ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2005. Vol. 66, n°3, p. 285-293. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.12.004> >
- Yoshida T., Tamai T. « Physiological and ecological studies on the secretory function of essential oil in *Pelargonium* species. : I. The relation between the distribution of oil glands and the percentage yield of essential oil. » *Ikushugaku zasshi* [En ligne]. 30 juin 1958. Vol. 7, n°4, p. 235-240. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.7.235> >
- Yu F., Okamoto S., Nakasone K., Adachi K., Matsuda S., Harada H., Misawa N., Utsumi R. « Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith) ». *Planta* [En ligne]. 2008. Vol. 227, n°6, p. 1291-1299. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0700-x> >
- Yu Z. X., Li J. X., Yang C. Q., Hu W. L., Wang L. J., Chen X. Y. « The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. ». *Mol. Plant* [En ligne]. 2012. Vol. 5, n°2, p. 353-365. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1093/mp/ssr087> >
- Yuan T.-T. T., Chen Q.-Q. Q., Zhao P.-J. J., Zeng Y., Liu X.-Z. Z., Lu S. « Identification of enzymes responsible for the reduction of geraniol to citronellol ». *Nat. Products Bioprospect.* [En ligne]. 1 décembre 2011. Vol. 1, n°3, p. 108-111. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s13659-011-0032-6> >
- Yuba A., Yazaki K., Tabata M., Honda G., Croteau R. « cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of 4S-(-)-Limonene Synthase from *Perilla frutescens* ». *Arch. Biochem. Biophys.* [En ligne]. août 1996. Vol. 332, n°2, p. 280-287. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0343> >
- Zeng X., Liu C., Zheng R., Cai X., Luo J., Zou J., Wang C. « Emission and accumulation of monoterpene and the key terpene synthase (TPS) associated with monoterpene biosynthesis in *osmanthus fragrans* Lour ». *Front. Plant Sci.* [En ligne]. 2016. Vol. 6, n°JAN2016, p. 1-16. Disponible sur : < <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01232> >
- Zerbe P., Bohlmann J. « Plant diterpene synthases: Exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering ». *Trends Biotechnol.* [En ligne]. 2015. Vol. 33, n°7, p. 419-428. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.04.006> >

- Zhang F., An T., Tang X., Zi J., Luo H. Bin, Wu R. « Enzyme Promiscuity versus Fidelity in Two Sesquiterpene Cyclases (TEAS versus ATAS) ». *ACS Catal.* [En ligne]. 2020. p. 1470-1484. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b05051> >
- Zhang G. Q., Liu K. W., Li Z., Lohaus R., Hsiao Y. Y., Niu S. C., Wang J. Y., Lin Y. C., Xu Q., Chen L. J., Yoshida K., Fujiwara S., Wang Z. W., Zhang Y. Q., Mitsuda N., Wang M., Liu G. H., Pecoraro L., Huang H. X., Xiao X. J., Lin M., Wu X. Y., Wu W. L., Chen Y. Y., Chang S. Bin, Sakamoto S., Ohme-Takagi M., Yagi M., Zeng S. J., Shen C. Y., Yeh C. M., Luo Y. B., Tsai W. C., Van De Peer Y., Liu Z. J. « The *Apostasia* genome and the evolution of orchids ». *Nature* [En ligne]. 21 septembre 2017. Vol. 549, n°7672, p. 379-383. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/nature23897> >
- Zhang M., Liu J., Li K., Yu D. « Identification and Characterization of a Novel Monoterpene Synthase from Soybean Restricted to Neryl Diphosphate Precursor ». *PLoS One* [En ligne]. 4 octobre 2013. Vol. 8, n°10, p. e75972. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075972> >
- Zhang R., Sharkey T. D. « Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress ». *Photosynth. Res.* [En ligne]. 2009. Vol. 100, n°1, p. 29-43. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s1120-009-9420-8> >
- Zhang X., Niu M., Teixeira Da Silva J. A., Zhang Y., Yuan Y., Jia Y., Xiao Y., Li Y., Fang L., Zeng S., Ma G. « Identification and functional characterization of three new terpene synthase genes involved in chemical defense and abiotic stresses in *Santalum album* ». *BMC Plant Biol.* [En ligne]. 2019. Vol. 19, n°1, p. 1-18. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1720-3> >
- Zhou F., Pichersky E. « More is better : the diversity of terpene metabolism in plants ». *Curr. Opin. Plant Biol.* 2020. Vol. 55, p. 1-10.
- Zhou H. C., Shamala L. F., Yi X. K., Yan Z., Wei S. « Analysis of Terpene Synthase Family Genes in *Camellia sinensis* with an Emphasis on Abiotic Stress Conditions ». *Sci. Rep.* [En ligne]. 2020. Vol. 10, n°1, p. 1-14. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57805-1> >
- Zhou K., Gao Y., Hoy J. A., Mann F. M., Honzatko R. B., Peters R. J. « Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from *Abies grandis* ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 2012. Vol. 287, n°9, p. 6840-6850. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337592> >
- Zhou K., Peters R. J. « Investigating the conservation pattern of a putative second terpene synthase divalent metal binding motif in plants ». *Phytochemistry* [En ligne]. 2009. Vol. 70, n°3, p. 366-369. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.022> >
- Zhou Y., Zeng L., Liu X., Gui J., Mei X., Fu X., Dong F., Tang J., Zhang L., Yang Z. « Formation of (E)-nerolidol in tea (*Camellia sinensis*) leaves exposed to multiple stresses during tea manufacturing ». *Food Chem.* [En ligne]. 2017. Vol. 231, p. 78-86. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.122> >
- Zi J., Mafu S., Peters R. J. « To Gibberellins and Beyond! Surveying the Evolution of (Di)Terpenoid Metabolism ». *Annu. Rev. Plant Biol.* [En ligne]. 29 avril 2014. Vol. 65, n°1, p. 259-286. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035705> >
- Zvi M. M. Ben, Shklarman E., Masci T., Kalev H., Debener T., Shafir S., Ovadis M., Vainstein A. « PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers ». *New Phytol.* [En ligne]. 2012. Vol. 195, n°2, p. 335-345. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04161.x> >

Titre : Étude de la biosynthèse des terpènes et de leur régulation chez *Pelargonium x hybridum*

Mots clés : pélagonium, terpène, huile essentielle, biosynthèse, métabolisme spécialisé

Résumé : Le genre *Pelargonium* fait partie de la famille des *Geraniaceae* et réunit plus de 280 espèces, ainsi que de nombreux hybrides et variétés sélectionnés depuis le 18^e siècle. Ces accessions regroupent notamment de pélagoniums commercialisés en tant que plantes ornementales (comme les *P. x hortorum*) mais également des pélagoniums odorants (comme les *P. x hybridum* cv rosat) qui sont cultivés pour leur huile essentielle (HE). L'HE de *P. rosat* est stockée dans des structures glandulaires (trichomes glandulaires) présentes sur les feuilles et se compose principalement de mono- et sesqui-terpénoïdes. Ces composés organiques volatils sont à l'origine du parfum « géranium », prisé des parfumeurs pour son profil olfactif complexe et rappelant l'odeur de rose. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre la diversité de terpénoïdes présents dans l'HE de pélagonium, de décrypter les mécanismes sous-jacents à la biosynthèse de ces nombreux composés odorants et plus particulièrement d'analyser les enzymes impliquées dans leur production. Afin de répondre à cet objectif, des études biochimiques et transcriptomiques ont été menées. Celles-ci ont permis de mettre en place une approche multi-omique afin d'étudier le terpénome de dix accessions de pélagoniums odorants, de caractériser structurellement et fonctionnellement des enzymes impliquées dans la biosynthèse de ce terpénome et d'analyser l'effet d'un stress climatique sur celui-ci.

Title: Terpene biosynthesis and its regulation in *Pelargonium x hybridum*

Key words: pelargonium, terpene, essential oil, biosynthesis, specialised metabolism

Summary: The *Pelargonium* genus belongs to the *Geraniaceae* family and includes more than 280 species as well as multiple hybrids and varieties, which have been selected by botanists since the 18th century. Among these accessions, several can be found on the market as ornamental plant (e.g. *P. x hortorum*) whereas some are cultivated for essential oil (EO) production (e.g. *P. x hybridum* cv rosat). *P. rosat* EO is stored in glandular trichomes from leaves and is mainly composed of mono- and sesqui-terpenoids. The resulting volatile organic compound mixture offers a characteristic "geranium" scent. Due to its sophisticated odour reminding of the rose scent, this scent is highly pursued by perfumers and fragrance industries. The purpose of this thesis was to improve our understanding of the terpenoid diversity in pelargonium EO and decipher mechanisms underlying their biosynthesis, in particular by characterising enzymes responsible for their production. To this aim, biochemical and transcriptomic studies have been performed. Therefore, a multi-omic approach has been implemented to analyse the terpenome from ten scented-pelargoniums. Moreover, structural and functional analysis of several enzymes involved in terpenoid biosynthesis have been performed and the effect of a climatic stress on the EO composition has been studied.