



HAL
open science

Biosynthèse et sécrétion du parfum chez *Rosa x hybrida* L.

Véronique Bergounoux

► **To cite this version:**

Véronique Bergounoux. Biosynthèse et sécrétion du parfum chez *Rosa x hybrida* L.. Biologie végétale. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2005. Français. NNT : . tel-00083760

HAL Id: tel-00083760

<https://theses.hal.science/tel-00083760>

Submitted on 4 Jul 2006

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° attribué par la bibliothèque : □□□□□□□□□□

ACADEMIE DE LYON

UNIVERSITE JEAN MONNET

THESE

Pour obtenir le grade de DOCTEUR

Discipline : Biologie Végétale

**Biosynthèse et sécrétion du parfum
chez *Rosa x hybrida* L.**

par

Véronique BERGOUGNOUX

Soutenue le 22 novembre 2005, devant le jury composé de :

Mme HOSSAERT-MCKEY	Directeur de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
M. GANTET	Professeur à l'Université de Montpellier II	Rapporteur
M. HUGUENEY	Maître de conférences à l'ENS de Lyon	Examineur
M. LEGENDRE	Professeur à l'UJM – Saint-Etienne	Directeur
Mme BAUDINO	Maître de conférences à l'UJM – Saint-Etienne	Co-directrice

ACADEMIE DE LYON

UNIVERSITE JEAN MONNET

THESE

Pour obtenir le grade de DOCTEUR

Discipline : Biologie Végétale

**Biosynthèse et sécrétion du parfum
chez *Rosa x hybrida* L.**

par

Véronique BERGOUGNOUX

Soutenue le 22 novembre 2005, devant le jury composé de :

Mme HOSSAERT-MCKEY	Directeur de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
M. GANTET	Professeur à l'Université de Montpellier II	Rapporteur
M. HUGUENEY	Maître de conférences à l'ENS de Lyon	Examineur
M. LEGENDRE	Professeur à l'UJM – Saint-Etienne	Directeur
Mme BAUDINO	Maître de conférences à l'UJM – Saint-Etienne	Co-directrice

Remerciements

Ma thèse a été réalisée au sein du laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales de l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne, sous la direction de Sylvie Baudino que je tiens à remercier pour l'encadrement et les conseils qu'elle a su m'apporter tout au long de ces années de coopération. Je tiens également à la remercier de toute la patience dont elle a su faire preuve au cours de la rédaction de mon mémoire de doctorat.

Je remercie également Laurent Legendre, directeur du laboratoire, pour m'avoir apporté quelques conseils techniques et surtout son aide dans la recherche d'un poste ATER.

Je souhaite remercier le professeur Martine Hossaert-McKey et le professeur Pascal Gantet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Philippe Hugueney, maître de conférences à l'ENS de Lyon, qui a accepté d'en être examinateur.

Je tiens à remercier plus particulièrement Philippe Hugueney pour toutes les techniques auxquelles il m'a formé, son aide et ses conseils. J'associe Gabriel Scalliet à ces remerciements pour les résultats que nous avons obtenus ensemble.

Je remercie tout spécialement Jean-Louis Magnard qui m'a donné les clés des techniques de biologie moléculaire. Je le remercie également pour l'amitié et le soutien qu'il m'a apporté au cours de ces quatre années.

L'analyse des molécules volatiles du parfum n'aurait pas pu se faire sans l'aide précieuse et les conseils de Frédéric Jullien. Au-delà d'un soutien technique, c'est bien souvent un soutien moral qu'il m'a apporté. Je remercie également Magali Martin qui a réalisé pour moi des analyses GC-MS. Si nous avons surtout collaboré dans le cadre de la recherche, nous avons aussi établi un lien d'entraide et de soutien entre doctorantes.

La microscopie serait restée un mystère pour moi, si je n'avais pas bénéficié de l'aide et de l'expérience de Jean-Claude Caissard. Il a également contribué à l'acquisition de données concernant l'analyse des composés volatils de rose.

Pour l'aspect microscopie, je voudrais également remercier Isabelle Anselme-Bertrand du Centre Stéphanois de Microscopie et Claire Lionnet de la plateforme PLATIM (Lyon) qui m'ont apporté leur aide.

Au sein du laboratoire, je tiens à remercier David Roujol, Caroline Joly et Florence Gros qui m'ont apporté ponctuellement leur aide au cours de ces années de thèse.

Il me reste à remercier Sandrine Moja, Françoise Berger, Corinne Marcon et Caroline Hernould pour leur sympathie. Je n'oublie pas tous les stagiaires qui ont fait partie de la vie du laboratoire.

Une grande pensée à Mélanie Mauriat, thésarde colocataire de bureau, qui a partagé ces années de thèse. Un grand merci pour le soutien moral, les éclats de rire et les galères partagées ... bref son amitié. J'ai également pu faire la connaissance de Cécile Micheau et Magali Soria qui ont partagé également des moments inoubliables.

Je n'oublie pas mes parents et ma famille qui ont toujours cru en moi et qui ont su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur. Merci de votre amour.

Pour finir, je tiens à préciser que ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'un programme région, financé par la Région Rhône-Alpes que je remercie. De plus, ce travail n'aurait jamais pu se faire sans le Collectif des Rosiéristes de la région Rhône-Alpes qui a mis à ma disposition tout le matériel végétal nécessaire à mon étude.

Sommaire

Remerciements	iii
Sommaire.....	5
Abréviations	8
Avant-Propos	10
I- La rose, histoire et importance économique	13
A- La généalogie des Roses	13
B. Les utilisations des Roses	18
C. Le parfum des roses	21
II. Le rôle des composés volatils et les structures sécrétrices	25
A. Huiles essentielles, parfums et insectes.....	25
B. Les structures sécrétrices	33
III. La biosynthèse des composés volatils	41
A. Les terpènes, composés majoritaires des roses.....	42
B. Les autres composés volatils.....	57
C. L'ingénierie des composés volatils.....	64
IV. Conclusion.....	75
Matériels et Méthodes	80
I. Matériel végétal, souches et plasmides	80
A. Matériel végétal	80
B. Souches bactériennes	82
C. Plasmides	82
II. Techniques d'analyse du parfum	87
A. Extraction par solvant.....	87
B. Headspace dynamique	89
C. Solid Phase Micro Extraction ou SPME.....	89
D. Analyse des composés volatils par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	91
E. Identification des composés	91
III. Techniques cytologiques	92
A. Microscopie optique et microscopie électronique à transmission.....	92
B. Microscopie électronique à balayage environnementale et microscopie confocale	93

C. Mise en évidence des lipides et des terpènes sur matériel non fixé.....	93
IV. Techniques de dosage de l'amidon et du D-glucose	94
A. Principe du dosage.....	94
B. Détermination des quantités d'amidon et de D-glucose libre	94
V. Techniques de biologie moléculaire	95
A. Extraction d'acides nucléiques	95
B. Obtention d'ADN complémentaire.....	97
C. Construction de la banque d'ADNc double brin pour la RACE-PCR..	98
D. Techniques d'amplification d'ADN par PCR	99
E. Techniques de clonage	102
F. Expression de protéines recombinantes	105
G. Techniques d'étude des protéines.....	108
H. Analyse par SDS-PAGE et Western-blot	110
I. Tests d'activité	113
J. Obtention de plantes transgéniques de tabac	114
Résultats	116
I. La production du parfum chez les roses.....	116
A. La production du parfum au sein de la fleur.....	116
B. Les pétales : organes producteurs de parfum.....	123
C. Les différences entre les roses parfumées et les roses non parfumées	132
II. Isolement de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des monoterpènes	
.....	139
A. La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ou DXR	141
B. La géranyl diphosphate synthase ou GPPS.....	159
Discussion.....	165
I. Développement floral et sécrétion du parfum.....	165
A. Les organes floraux des roses Hybrides de Thé produisent des bouquets de	
composés spécifiques	165
B. Le parfum évolue au cours de l'épanouissement de la fleur.....	167
II. Structure du pétale, production et sécrétion des composés volatils	169
A. L'organisation générale du pétale.....	169
B. Les deux épidermes du pétale sont sécréteurs	170
C. L'évolution des plastes dans le pétale.....	171
D. Les mécanismes de sécrétion.....	173

III. L'absence de parfum chez les roses sélectionnées pour la fleur coupée	176
A. Le parfum des roses non parfumées	176
B. La structure des pétales des roses non parfumées est identique à celle des roses parfumées	177
C. L'hypothèse de la cuticule	177
D. Les ressources carbonées chez les roses non parfumées	178
IV. La DXR est impliquée dans la synthèse des terpènes chez la rose.	178
V. Une GPPS homodimérique ou hétéromérique chez la rose ?	182
Références bibliographiques	185

Abréviations

ADH	Alcool déshydrogénase
BA2H	benzoïque acide 2-hydroxylase
BAMT	S-adenosyl-L-méthionine:benzoïque acide carboxylméthyltransférase
BEAT	Benzylalcool acétyltransférase
BF	Bouton fermé
BJO	Bouton juste ouvert
BO	Bouton ouvert
BSMT	S-adenosyl-L-méthyl:benzoïque acide/salicylique acide carboxylméthyltransférase
BTO	Bouton très ouvert
BZL	benzoate:CoA ligase
C4H	cinnamique acide 4-hydroxylase
CaMV35S	Promoteur 35S du virus de la mosaïque de tabac
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CDP-ME	4-diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol
CDP-MEP	4-diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol 2-phosphate
CMK	CDP-ME kinase
CMS	CDP-ME synthase
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
DMT	3,5-diméthoxytoluène
DXP	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate
DXR	1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase
DXR	DXP réductoisomérase
DXS	DXP synthase
ESTs	Expressed Sequence Tags
FE	Fleur épanouie
FPP	Farnésyl diphosphate
FPPS	FPP synthase
FS	Fleur sénescence
GFP	Green Fluorescent Protein
GGPP	Géranylgéranyl diphosphate
GGPPS	GGPP synthase
GPP	Géranyl diphosphate
GPPS	GPP synthase
HDS	HMBPP synthase
HMBPP	1-hydroxy-2-méthyl-2E-butényl 4-diphosphate
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HPLS	Hydroperoxyde lyase
IDI	IPP isomérase
IDS	IPP synthase

IF	Facteur d'isomérisation
IPP	Isopentényl diphosphate
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galactopyranoside
LIS	Linalol synthase
LOX	Lipoxygénase
LSU	Large subunit
MCS	ME-cPP synthase
MEB	Microscopie électronique environnementale à balayage
ME-cPP	2C-méthyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate
MEP	2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate
MET	Microscopie électronique à transmission
MEV	Mévalonate
MFS	Menthofurane synthase
MVK	MEV kinase
MVP	5-phosphomévalonate
MVPP	5-diphosphomévalonate
OOMT	Orcinol-O-méthyltransférase
PINS	Pinène synthase
PMD	MVPP décarboxylase
PMK	MVP kinase
POMT	Phloroglucinol-O-méthylétransférase
ppb	partie par billion (1 ppb = 1 µl dans 100 m ³)
SA GTase	UDP-Glc:salicylique acide glucosyltransférase
SAMT	S-adénosyl-L-méthyl:salicylique acide carboxyl méthyltransférase
SPME	Solid Phase Micro Extraction
SSU	Small subunit
TIA	Alcaloïdes indoles terpéniques
TMB	1,3,5-triméthoxybenzène
TPS	Terpène synthases
VOCs	Volatiles Organic Compounds (ou Composés Organique Volatils)

Avant-Propos

Les espèces du genre *Rosa* constituent l'un des groupes ornementaux les plus importants au niveau économique à cause de leur popularité en tant que fleurs de jardin, fleurs paysagères, plantes en pots, fleurs coupées, mais également à cause de leur utilisation comme source d'huile essentielle pour l'industrie de la parfumerie (Gudin, 2000). Au niveau mondial, la superficie des cultures de roses pour la fleur coupée est supérieure à 5000 ha, ce qui correspond à 25 % des surfaces de l'ensemble des fleurs coupées. Plus de 120 espèces botaniques, organisées en 10 sections composent ce genre (Rajapakse *et al.*, 2001), mais malgré cette richesse potentielle, seules sept à dix espèces appartenant à trois sections ont été utilisées pour créer les 20000 cultivars commerciaux qui constituent la rose moderne (Martin *et al.*, 2001 ; Crespel *et al.*, 2002).

Les roses sont aussi diverses par leurs formes que par leurs parfums et, depuis quelques années, le parfum bénéficie d'un regain d'intérêt de la part du public. Pour répondre à cette demande, le caractère parfumé est un critère de sélection largement pris en compte par les obtenteurs, comme en témoignent leurs catalogues. En plus des parfums de roses classiques, les rosiéristes développent des fragrances originales et l'on peut aujourd'hui trouver des roses qui sentent les fruits (pomme, framboise etc...), l'anis ou la myrrhe. Cependant, si le parfum est souvent bien présent chez les rosiers de jardin, il est beaucoup plus discret, voire absent, chez les roses destinées à la production de fleurs coupées. En effet, les roses modernes sont issues d'un long processus de sélection basé sur des critères comme la résistance au froid et aux maladies, la forme des fleurs, la remontance et, pour les roses à fleurs coupées, la tenue en vase. Chez ces dernières, la sélection de ces critères s'est souvent accompagnée d'une perte du caractère parfumé. Les causes de cette disparition sont actuellement inconnues, et cette méconnaissance rend ce caractère particulièrement difficile à manipuler dans les schémas de sélection. D'après l'expérience des obtenteurs, le parfum se caractérise par une héritabilité complexe, et ils constatent que, lors d'un croisement de rosiers parfumés, seuls 10% de leurs descendants le sont. De plus, le parfum semble incompatible avec d'autres caractéristiques comme, par exemple, une couleur rouge intense et la résistance au botrytis (Gudin, 1995).

La région Rhône-Alpes est l'un des pôles mondial de création de nouvelles variétés de rose pour les jardins et la fleur coupée. Depuis 1999, trois laboratoires français se sont regroupés pour initier un programme de recherche sur le parfum des roses, soutenu par la

région Rhône-Alpes. Il s'agit du laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes (RDP, UMR 5667 CNRS/INRA/ENS/UCB Lyon 1) de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, dirigé par C. Dumas, du laboratoire Génome et Evolution des Plantes Supérieures de l'Université Claude Bernard Lyon I (GEPS, EA632), avec l'équipe de P. Heizmann et du laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales (BVpam, EA 3061), dirigé actuellement par L. Legendre. L'objectif de ce programme, mené en collaboration avec le Collectif des Rosiéristes de la Région Rhône-Alpes, est de mettre en œuvre différents outils moléculaires pour identifier des marqueurs du caractère parfumé des roses. Le parfum apparaissant comme un caractère particulièrement difficile à cerner dans les schémas d'hybridation traditionnels, ces marqueurs devraient à terme fournir aux obtenteurs des outils de sélection raisonnée du caractère parfumé. Lorsque ce programme a débuté, aucun gène impliqué dans les voies de biosynthèse des composés du parfum n'était connu chez la rose et aucune étude structurale récente du pétale de rose n'avait été menée, en relation avec la sécrétion de composés volatils.

Ainsi, le laboratoire GEPS a travaillé sur la généalogie du parfum afin de comprendre comment ce caractère se transmet lors des croisements (thèse M. Martin, dirigée par P. Heizmann). Le laboratoire RDP, après avoir obtenu une banque d'EST de pétales de rose, a développé une thématique de recherche sur la biosynthèse des composés aromatiques et des dérivés des caroténoïdes (thèse G. Scalliet, dirigée par P. Hugueney), ainsi que sur l'étude des gènes qui gouvernent le développement du pétale de rose. Le laboratoire BVpam s'est, quant à lui, intéressé à la production du parfum.

Dans ce contexte, ma thèse, financée par la Région Rhône-Alpes, avait deux objectifs principaux :

- Etudier le pétale de rose en tant qu'organe producteur et émetteur de composés volatils,
- isoler et caractériser des gènes impliqués dans la production des composés majoritaires du parfum des roses Hybrides de Thé, les monoterpènes.

Dans un premier volet, nous avons souhaité réaliser une « cartographie » de la fleur de rose pour répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les organes floraux producteurs de parfum chez les roses Hybrides de Thé ?
- Est-ce que l'ensemble du pétale produit du parfum ?
- Quels sont les tissus qui produisent le parfum au sein du pétale ?

- Peut-on identifier des structures cellulaires liées à la production du parfum ?

Pour cela, nous avons mis en œuvre des techniques cytologiques et chromatographiques. Nous avons utilisé des roses considérées comme très parfumées et d'autres inodores, afin de trouver des pistes expliquant l'absence de parfum chez ces dernières.

Dans une deuxième partie des travaux, nous avons recherché des gènes impliqués dans la biosynthèse des monoterpènes. Deux gènes ont retenu notre attention : le gène de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase et le gène de la géranyl diphosphate synthase. Le premier gène intervient très précocement dans la voie de biosynthèse des terpènes et des travaux chez la menthe ont montré que sa surexpression permettait d'augmenter la quantité d'huile essentielle produite. Ce gène nous paraît donc un bon candidat pour l'amélioration des variétés de rose utilisées pour la production de composés destinés à l'industrie de la parfumerie. Le deuxième gène permet la formation du premier squelette de base des monoterpènes. C'est donc un gène clé, potentiellement régulateur de la biosynthèse de ces composés volatils.

Il y a 5000 ans, les roses étaient déjà cultivées en Chine, à l'ouest de l'Asie et en Afrique du Nord. La plus vieille représentation d'une rose a été découverte à Knossos, en Crète, sur une fresque datant probablement du 18^{ème} siècle avant J.-C. Elle correspondrait peut-être à l'espèce *Rosa x richardii* (Testu, 1984). Dans la littérature et la poésie antiques, il est souvent fait mention du rosier, sans qu'il soit toujours possible de préciser l'espèce avec certitude. Pendant l'Antiquité, la rose décorait les tombes de Grèce et de Chine et avait une haute valeur symbolique. Ainsi, elle symbolisait la discrétion à Rome, la vertu en Extrême-Orient et le silence en Egypte. Avant d'être la plante de jardin la plus populaire, la rose était utilisée pour son parfum et ses propriétés comestibles. De nombreuses informations sur les utilisations des roses dans l'Antiquité nous sont fournies par les écrits de l'historien grec Hérodote (490-420 av. J.-C.), du philosophe grec Théophraste (372-287 av. J.-C.) et du naturaliste romain Pline l'ancien (23-79 av. J.-C.) (Testu, 1984). Par exemple, selon Pline, les Romains cultivaient déjà les roses sous des serres chauffées en hiver par de l'eau chaude (Testu, 1984). Ils utilisaient plus de 32 remèdes à base de différentes parties du rosier (Gudin, 2000). Le rosier est donc utilisé à des fins médicinales et décoratives depuis des temps immémoriaux. Cependant, la popularité de la rose en tant que plante horticole a vraiment pris son essor au 19^{ème} siècle et s'est encore amplifiée au 20^{ème} siècle. La rose est aujourd'hui la première espèce ornementale par ordre d'importance économique (Gudin, 2000).

I- La rose, histoire et importance économique

A- La généalogie des Roses

1. Le genre *Rosa*

Les premiers fossiles du genre *Rosa* identifiés avec certitude ont été trouvés aux USA et datent de 35 à 40 millions d'années (Weiss, 1997). Les Rosiers appartiennent à la famille des Rosacées qui compte près de 115 genres et 3200 espèces. Ils sont répandus à travers toutes les régions froides et tempérées de l'hémisphère Nord, depuis le cercle arctique jusqu'aux sous-tropiques, dans des régions incluant les Etats-Unis, l'Iraq, l'Éthiopie, le Bengale et le sud de la Chine (Gudin, 2000). Le genre *Rosa* regroupe près de 150 espèces et près de 20 000 cultivars commerciaux (Rajapakse *et al.*, 2001). La classification traditionnelle du genre *Rosa* est celle de Rehder (1940). Elle est encore actuellement utilisée, avec quelques

remaniements (Wissemann, 2003). Le genre *Rosa* est divisé en quatre sous-genres :

– Le sous-genre *Hulthemia* n'est représenté que par une seule espèce diploïde, *Rosa persica*, qui occupe une vaste zone subdésertique d'Asie centrale et se caractérise notamment par des feuilles entières sans stipules. Elle est souvent considérée comme une forme primitive des rosiers.

– Le sous-genre *Platyrhodon*, représenté par l'espèce *Rosa roxburghii*, s'étend du Sud Laos à l'île d'Hokhaïdo. Cette espèce est diploïde et remarquable pour sa souplesse d'adaptation. On l'utilise dans les jardins pour l'originalité de ses cynorrhodons couverts d'aiguillons, qui ressemblent aux bogues de la chataîgne.

– Le sous-genre *Hesperhodos*, représenté principalement par l'espèce *Rosa stellata*, apparaît comme un isolat occupant la zone côtière du Pacifique du Sud des Etats-Unis.

– Le sous-genre *Eurosa* ou *Rosa* regroupe la plupart des espèces de roses et est divisé en 10 sections (Redher, 1949) dont quelques caractéristiques sont données dans le tableau 1 (Wissemann, 2003 ; Tarbouriech, 2001).

Le nombre de chromosomes des rosiers varie de $2n = 2x = 14$ à $2n = 8x = 56$, mais la plupart des espèces du sous-genre *Eurosa* sont diploïdes ou tétraploïdes (Rout *et al.*, 1999). La quantité d'ADN 2C dans les roses diploïdes varie entre les sous-genres, les sections et les cultivars. Elle va de 0,78 pg chez *Rosa xanthina* et *Rosa sericea* (section *Pimpinellifoliae*) à 1,29 pg chez 'Félicité et Perpétue' (hybride moderne). Néanmoins, à l'intérieur d'une même section, les quantités d'ADN sont très similaires (Yokoya *et al.*, 2000). Les rosiers représentent un matériel difficile pour les études génétiques à cause de leur forte hétérozygotie, leur niveau de ploïdie, en plus des difficultés liées à la reproduction (Crespel *et al.*, 2002).

2. domestication des Roses

Les roses modernes résultent d'un processus de domestication qui s'est développé au cours du 19^{ème} siècle et qui s'est poursuivi au 20^{ème} siècle. De nombreux croisements et hybridations ont été réalisés entre les roses d'origine européenne et les roses d'origine chinoise (Fig.1). Plusieurs études sont menées pour préciser les étapes de cette domestication et les relations phylogénétiques entre les différents groupes de rosiers (Martin *et al.*, 2001). La domestication a permis l'introduction dans les roses modernes de caractères horticoles

Tableau 1 : Caractéristiques des 10 sections du sous-genre *Eurosa* (d'après Tarbouriech, 2001)

Section	Exemples d'espèces
<p><i>CANINAE</i> Arbustes, fleurs roses ou blanches, feuilles à 5 ou 7 folioles, aiguillons gros, recourbés</p>	<p><i>Rosa canina</i> L. ou rosier des chiens <i>R. rubiginosa</i> L. (à feuilles odorantes) <i>R. villosa</i> L. (dont les fruits sont riches en vitamine C) <i>R. montana</i> Chaix ou rosier des montagnes</p>
<p><i>GALLICANAE</i> Buissons dressés, pas très élevés ; aiguillons recourbés de taille variable, généralement mêlés de cils ; grandes fleurs roses. Aptitude au drageonnage</p>	<p><i>R. gallica</i> L. ou rose de France (protégée par la loi) <i>R. x damascena</i> L. ou rose de Damas <i>R. x centifolia</i> Miller ou rose Cent-feuille <i>R. x centifolia f. muscosa</i> (Mill.) ou rosier mousseux</p>
<p><i>PIMPINELLIFOLIAE</i> Rosiers à de feuilles de pimprenelle. Feuilles à nombreuses folioles (plus de 9) faisant penser à celles de la pimprenelle. Buisson bas. Aiguillons droits de taille variée. Aptitude au drageonnage</p>	<p><i>R. pimpinellifolia</i> L. : rosier à feuilles de pimprenelle qui a colonisé un grand nombre de milieux, du littoral aux pelouses alpines <i>R. foetida</i> Herm (fleur d'un jaune vif très lumineux) qui a donné la belle couleur jaune des roses cultivées <i>R. foetida f. bicolor</i> (Jacq.) E. Wilm : fleurs dont la face supérieure des pétales est orange et la face inférieure est jaune cuivre <i>R. omeiensis f. pteracantha</i> (Franch.) Redh & E.M. Wils. , avec des aiguillons très larges, rouges, translucides</p>
<p><i>SYNSTYLAE</i> Pistil au centre de la fleur ressemble à une petite colonne (styles soudés) contrairement aux autres sections où le pistil est en forme de coussinet. Rosiers grimpants ou rampants</p>	<p><i>R. arvensis</i> Huds. : rosier des champs à petites fleurs blanches qui s'hybrident facilement avec <i>R. gallica</i> L. <i>R. sempervirens</i> L.: rosier au feuillage toujours vert des régions méridionales, sensible au gel. Deux espèces originaires de l'Extrême-Orient, <i>R. multiflora</i> Thunb. et <i>R. wichuraiana</i> Crep. sont à l'origine de la plupart des variétés de rosiers grimpants</p>
<p><i>CINNAMONEAE</i> Rosiers cannelle. Buissons dressés assez hauts, souvent drageonnant Aiguillons droits avec des gradients de densité sur la tige. Fruits en général allongés</p>	<p><i>R. majalis</i> Herm. ou rose de mai dont la floraison est très précoce <i>R. pendulina</i> L. ou <i>R. alpina</i> L. ou rose des Alpes : pratiquement dépourvue d'aiguillons, aux fruits allongés pendant aux rameaux <i>R. rugosa</i> Thunb. ou rosier rugueux du Japon aux feuilles gaufrées, pouvant pousser sur des sols salés <i>R. acicularis</i> Lindl. : seule espèce de rosier à dépasser le cercle polaire</p>
<p><i>CAROLINAE</i> Regroupe quelques espèces d'Amérique du Nord. Feuillage souvent brillant. Diffère de la section précédente par la forme des fruits, habituellement globuleux aplatis, avec des akènes insérés seulement au fond du réceptacle</p>	<p><i>R. carolina</i> L. ou rose de Caroline <i>R. palustris</i> Marsh. ou rose des Marais <i>R. virginiana</i> Mill. ou rose de Virginie</p>
<p><i>INDICAE</i> Roses de Chine Des espèces de cette section, trouvées en Extrême-Orient, ont été ramenées en Europe à la fin du XVIIIème siècle; par croisements, elles ont permis d'obtenir des variétés remontantes, à la floraison continue</p>	<p><i>R. chinensis</i> Jacquin ou rose du Bengale <i>R. x odorata</i> (Andr.) Sweet ou rosier à odeur de thé <i>R. gigantea</i> Colett. grimpant <i>R. chinensis</i> var. <i>viridiflora</i> Dipp. ou rose verte <i>R. chinensis f. mutabilis</i> (Correv.) Rehd. ou rosier à couleur variable</p>
<p><i>BANKSIANAE</i> Très longues tiges internes pouvant atteindre 10 cm; originaire de Chine</p>	<p><i>R. banksiae</i> Ait. Ou rosier de Banks <i>R. cymosa</i> Tratt. A fleur en grappe et tout petit fruit</p>
<p><i>LAEVIGATAE</i> Originaire de Chine, contient une espèce et ses hybrides ; grimpante à grandes fleurs blanches, tiges à aiguillons recourbés, feuilles à 3 folioles luisantes. Peu rustique</p>	<p><i>R. laevigata</i> Mich. ou rose des Cheerokees <i>R. x anemonoïdes</i> Rehd ou rose anémone à fleurs pourpres</p>
<p><i>BRACTEATAE</i> Contient une espèce et ses hybrides. Feuillage persistant et brillant. Fleurs blanches</p>	<p><i>R. bracteata</i> JC Wendl. ou rose de Maccartney <i>R. x leonida</i> Moldenke ou Maria leonida</p>

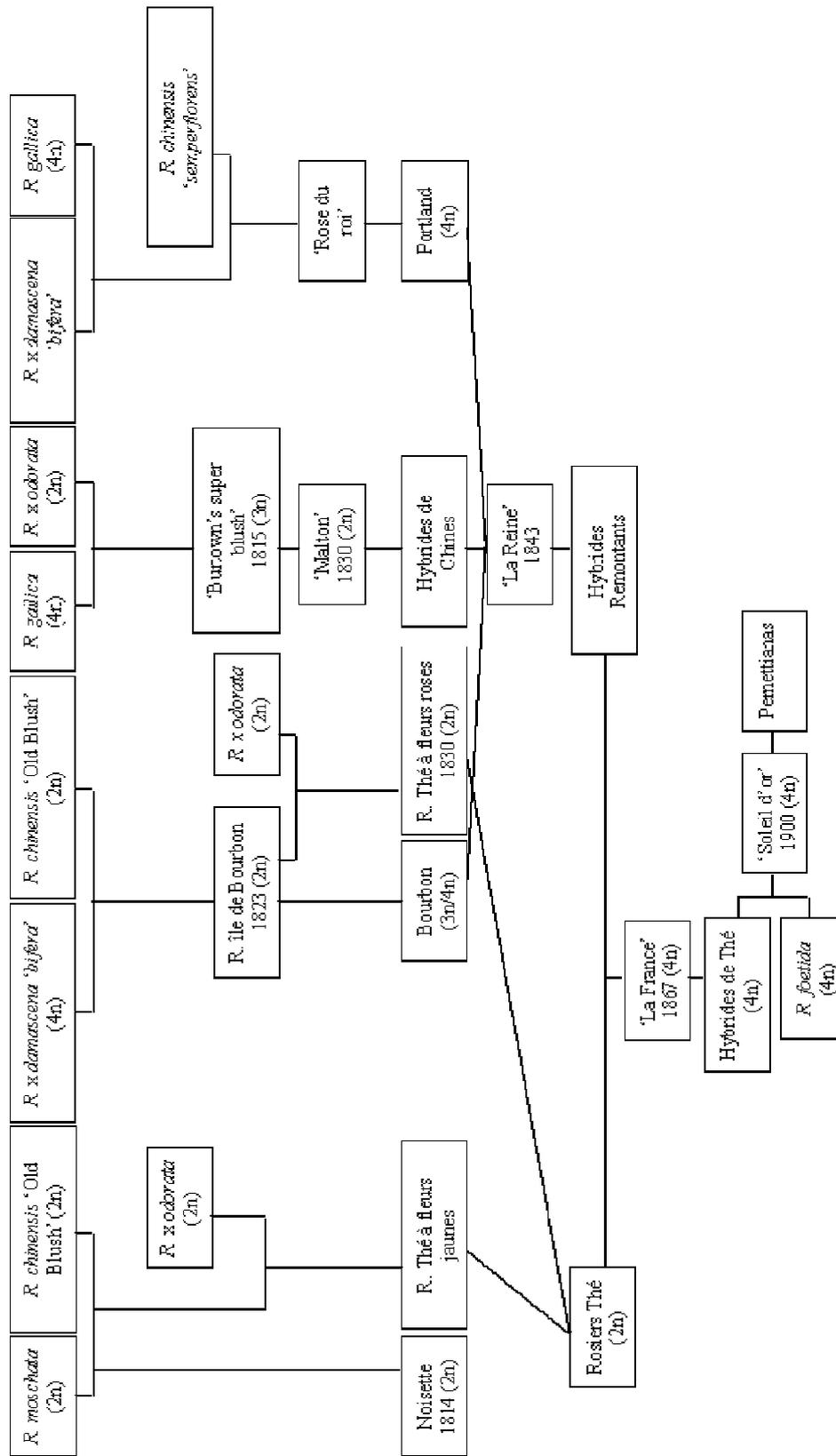


Figure 1 : Généalogie simplifiée des rosiers modernes (d'après Maia and Vénard, 1976)

importants, comme la résistance au froid, la résistance aux maladies, la duplication florale et la remontance de la floraison (Maia et Venard, 1976).

Jusqu'au début du 19^{ème} siècle, la plupart des roses appartenaient au groupe des rosiers galliques d'origine européenne, qui sont souvent bien parfumés mais ont une floraison non remontante. Seule *Rosa x damascena* 'bifera', connue dans le sud de l'Europe depuis le 14^{ème} siècle, présentait un caractère remontant.

L'introduction en Angleterre des roses de Chine au début du 19^{ème} siècle a constitué une étape importante dans l'évolution des roses de jardin. En fait, les premières roses de Chine furent importées en Europe au 16^{ème} siècle mais leur culture resta confinée au Sud de l'Europe, principalement en Italie, en raison de leur sensibilité au froid. Quatre clones fondateurs, issus probablement de croisements entre *Rosa chinensis* et *Rosa gigantea* et introduits successivement au début du 19^{ème} siècle donnèrent naissance aux roses modernes, par hybridation avec les roses anciennes galliques (Maia and Vénard, 1976). Les premiers groupes horticoles issus de ces croisements sont les rosiers Thé comme *Rosa x hybrida* 'Lady Hillingdon', remontants mais assez sensibles au froid. Parallèlement à la création des rosiers Thé, les hybrideurs avaient donné naissance à un autre groupe de rosiers horticoles, les Hybrides Remontants, là encore par des croisements complexes entre des rosiers chinois et des rosiers européens comme *Rosa gallica*. Malheureusement, si ces hybrides remontants étaient bien rustiques, leur floraison était parcimonieuse. Des croisements de ces rosiers Hybrides Remontants avec des rosiers Thé donna naissance aux rosiers modernes que l'on appelle les Hybrides de Thé. Ces rosiers possèdent le caractère de floraison continue et parfois le parfum de thé des roses de Chine, associés à la rusticité et à la résistance au froid des roses galliques européennes. Toutes les variétés Hybrides de Thé actuelles sont tétraploïdes. Classiquement, la variété 'La France' est considérée comme la rose fondatrice de la lignée des Hybrides de Thé. Elle fut créée en 1867 par l'obtenteur lyonnais Jean-Baptiste Guillot. En 1897, un autre horticulteur lyonnais, Joseph Pernet-Ducher, croisa un Hybride de Thé avec la rose sauvage *Rosa foetida* à fleurs d'un jaune très intense. La sélection des hybrides obtenus donna naissance à la variété 'Soleil d'or', une rose possédant une couleur jaune inédite, ce qui permit d'élargir la palette de couleurs disponible chez les rosiers.

Depuis la seconde guerre mondiale, les sélectionneurs exploitent les immenses ressources génétiques que leur offrent les espèces botaniques du genre *Rosa*. On assiste à la création de rosiers de plus en plus variés et adaptés à de multiples usages. Ainsi, des croisements des Hybrides de Thé ont été réalisés avec plusieurs rosiers sauvages, par exemple *Rosa multiflora*. Ceci a abouti à la constitution du groupe des Hybrides de Polyantha, ou

rosiers à fleurs groupées. On peut citer également l'essor récent des rosiers miniatures, adaptés à la culture en pots, ou les rosiers robustes, résistants aux maladies, qui décorent les bordures d'autoroute.

B. Les utilisations des Roses

Le genre *Rosa* est le genre économiquement le plus important de l'horticulture ornementale. La production en serre de roses coupées représente un investissement variable selon les zones de production. Ainsi, dans les pays tropicaux en voie de développement (Colombie, Equateur, Kenya et Zimbabwe), cet investissement est de l'ordre de 20 à 50 \$.m⁻² d'exploitation alors qu'il est de 200 à 300 \$.m⁻² dans les pays développés de l'hémisphère Nord (Pays-Bas, Scandinavie, Amérique du Nord). Pour les producteurs, il est donc plus intéressant de délocaliser la production dans les pays de l'hémisphère Sud. Il existe un marché substantiel du rosier dans les pays développés. Environ 20 millions de plants de rosiers de jardin sont commercialisés uniquement au Royaume-Uni et des millions de rosiers miniatures sont vendus chaque année dans le monde. Outre leur intérêt pour le jardin d'agrément, les roses sont également utilisées dans l'industrie du parfum et de façon plus mineure dans l'industrie agro-alimentaire.

1. La création de rosiers de jardin

Il existe peu de données concernant la production et la commercialisation des rosiers de jardin et des rosiers miniatures.

La production française, répartie sur 3 grandes régions, estimée à plus de 15 millions de plantes, est assurée par 150 rosieristes sur 600 ha et correspond à 1000 variétés environ (Delbard, 2002). L'achat de rosiers de jardin et de rosiers miniatures représente 40 % du total des plantes ornementales. Au niveau européen, la commercialisation dépasse 100 millions de plantes, dont 16 millions en Allemagne et 20 millions en Grande-Bretagne. La production européenne est assurée en partie par les pays de l'Europe de l'Est. Ainsi, près de la moitié des rosiers vendus en Allemagne sont issus de la production de la Pologne et de la Hongrie.

Un flux régulier de nouvelles variétés est également assuré. Ainsi, plus de 400 demandes de Certificats d'Obtentions Végétales ont été déposées depuis 1995. Les objectifs de la sélection concernent bien sûr la forme et la beauté de la fleur mais également le port de la plante, le parfum et surtout la résistance aux maladies. Des formes et un parfum rappelant les roses anciennes comme *R. x centifolia*, sont recherchés par les consommateurs. Ceci

explique le succès des « roses anglaises » commercialisées par l'obteneur David Austin, par exemple. On assiste également à un engouement pour les rosiers dits 'paysagers', peu exigeants sur les conditions de culture. La durée moyenne de la sélection varie de 6 à 8 ans.

2. La production de fleurs coupées

Les surfaces totales cultivées en roses pour la fleur coupée représentent une superficie de 5000 ha, ce qui correspond à 25 % des surfaces dévolues à l'ensemble de la culture des fleurs coupées. La création de variétés et de porte-greffes adaptés aux différentes conditions climatiques de production, ainsi qu'à la conservation et au transport sur des longues distances, a permis une adaptation de l'offre à la demande (Delbard, 2002).

La production, essentiellement européenne à l'origine, a été profondément bousculée par l'augmentation du coût des ressources énergétiques. La part élevée des coûts de main-d'œuvre dans les pays européens et aux Etats-Unis a également participé à la délocalisation de la production vers d'autres pays. Les principales zones de production sont aujourd'hui concentrées en Hollande, en Amérique latine pour 30 % (Colombie, Equateur et Mexique), en Afrique de l'Est pour 15 % (Kenya, Zimbabwe, Tanzanie, Ouganda et Éthiopie). La production sud-américaine est destinée à l'exportation vers les Etats-Unis à 80 % et vers l'Europe et la Russie à 20 %. La production africaine est destinée à 90 % à l'exportation vers l'Europe.

Le nombre de variétés cultivées pour la fleur coupée est en forte augmentation. En effet, en 2001, 420 variétés étaient cultivées, contre 230 en 1991 (Delbard, 2002). L'essor de cette production de fleurs coupées implique des variétés adaptées ayant une croissance rapide, une floraison abondante en toutes saisons (même avec un chauffage hivernal des serres limité), une production de fleurs de grande valeur esthétique, présentant une bonne longévité en vase et supportant bien le conditionnement et le transport (Meynet, 2001). A côté de ces critères de sélection classique, d'autres sont maintenant pris en compte par les sélectionneurs : parfums, formes et couleurs originales.

3. La production d'huiles essentielles

Depuis l'Antiquité, la parfumerie a toujours fait un grand usage de la rose, soit en soliflore (la rose constitue l'essentiel du parfum), soit comme note de cœur associée à d'autres essences dans les parfums dits 'floraux'. Elle est encore actuellement utilisée dans de nombreux parfums féminins.

Les roses anciennement utilisées pour l'industrie des arômes et parfums sont la rose de Damas (*Rosa x damascena*), la rose de mai (*Rosa x centifolia*) longtemps cultivée de façon intensive à Grasse, la rose des apothicaires (*Rosa gallica*), la rose blanche (*Rosa alba*) et la rose de Chine (*Rosa rugosa*) (Lawrence, 1991). Actuellement, seules *Rosa x damascena* et *Rosa x centifolia* sont encore cultivées sur des surfaces importantes, principalement en Bulgarie, en Tunisie et au Maroc. En France, il ne reste qu'une production de quelques hectares de *Rosa x centifolia* à Grasse, destinée à la fabrication des parfums de luxe comme Chanel N°5.

Plusieurs produits sont obtenus à partir des roses. Par distillation à la vapeur de fleurs entières, on obtient l'huile essentielle et l'eau de rose qui contient les composés les plus hydrosolubles, comme le 2-phényléthanol. La Bulgarie, producteur principal d'huile essentielle de rose, en exporte 1400 kg par an. Le rendement se situe entre 1 et 3 tonnes de fleurs par hectare. Environ trois tonnes de roses sont par ailleurs nécessaires pour obtenir 1 kg d'huile essentielle. En conséquence, le prix de l'huile essentielle est assez élevé, de 2000 à 7000 €.kg⁻¹ en fonction des provenances (Schulz, 2003). La concrète est obtenue par une extraction des pétales ou des fleurs entières par un solvant comme l'hexane ; c'est un produit semi-solide qui contient des cires. Pour éliminer ces cires, la concrète est solubilisée par de l'alcool, puis refroidie, ce qui fait précipiter les cires, et enfin filtrée. L'alcool est ensuite évaporé sous vide : on obtient alors le produit le plus concentré en molécules odorantes et le plus cher, l'absolu de rose. Il faut approximativement 400 kg de roses pour obtenir 1 kg de concrète et 0,5 kg d'absolu (Weiss, 1997). Selon les parfumeurs, ces deux produits, l'huile et l'absolu, ont des propriétés olfactives différentes. Une des différences dans la composition de l'huile essentielle et de l'absolu de rose est la concentration en 2-phényléthanol. Il est très présent dans l'absolu (60 à 75 %) et beaucoup moins dans l'huile (1 à 2 %) à cause de sa solubilité dans l'eau (Kurkcuoglu et Baser, 2003).

Si l'on regroupe l'huile essentielle de rose et la concrète, la production annuelle mondiale est estimée à environ 20 tonnes, les principaux producteurs étant la Bulgarie et la Turquie (Schulz, 2003). Au niveau du chiffre d'affaires, l'huile essentielle de rose occupe la troisième place avec 40 000 millions \$ derrière l'huile de *Mentha x piperita* (96 000 millions \$), et de *Mentha arvensis* (57 600 millions \$). Les huiles essentielles produites peuvent être, soit consommées sur place, soit exportées, puis mélangées à différents produits de synthèse. Près de 75 % de la production d'huile essentielle est importée en Europe, aux Etats-Unis, au Japon, en Suisse et au Canada. L'huile essentielle de rose est utilisée par la France, les Etats-Unis, l'Angleterre et le Japon, pour les produits cosmétiques et les parfums.

C. Le parfum des roses

1. Les grandes catégories de composés volatils

Les composés odorants sont de petites molécules organiques qui s'évaporent facilement (VOCs, Volatile Organic Compounds) et interagissent avec les récepteurs olfactifs des animaux. En général, les odeurs des plantes, et en particulier la fragrance des fleurs, sont formées par le mélange de plusieurs molécules volatiles. Chez la rose, ce mélange est particulièrement riche et complexe puisqu'on a pu décrire plus de 275 composés volatils dans l'huile essentielle de *Rosa x damascena* (Ohloff et Demole, 1987). Pour ordonner cette diversité chez les plantes et chez la rose en particulier, trois catégories de VOCs peuvent être distinguées (Fig. 2) :

- Les terpènes sont des composés qui dérivent tous d'un même précurseur, l'isoprène. Chez la plupart des roses, ce sont les composés les plus abondants. On trouve en grandes quantités les alcools monoterpéniques comme le géraniol, le citronellol, le nérol et leurs dérivés. Les alcools monoterpéniques donnent aux fleurs une odeur typique de rose. On note également la présence de sesquiterpènes, plus lourds, comme le germacrène D. A côté de ces composés majeurs, il existe chez la rose des dérivés de terpènes présents en quantités infimes mais qui contribuent significativement à la fragrance de la fleur, à cause de leur pouvoir olfactif élevé (Ohloff et Demole, 1987). C'est le cas des cétones de rose comme le dihydro- β -ionol et la β -ionone (0,007 ppb).

- Les dérivés d'acide gras proviennent de la coupure des acides gras par des lipoxygénases. Ils sont synthétisés abondamment par les feuilles et les sépales, souvent à la suite d'une blessure, c'est pourquoi ils sont aussi appelés « green leaf volatiles ». Ils jouent un rôle dans la défense directe.

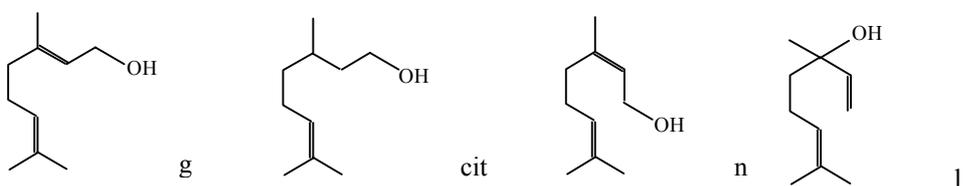
Les composés aromatiques dérivent tous de la phénylalanine. Certains sont présents en quantités très importantes chez certaines roses. C'est le cas du 2-phényléthanol, qui a une odeur typique de rose dite odeur rosée. D'autres, comme le DMT (3,5-diméthoxytoluène) et le TMB (1,3,5-triméthoxybenzène), donnent aux roses qui en possèdent en grandes quantités une odeur qualifiée d'odeur de thé.

2. Les variétés parfumées

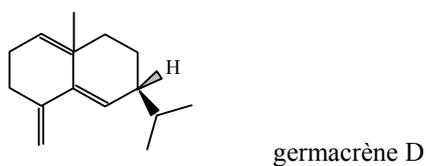
Chaque variété de rose synthétise donc un mélange complexe et unique de produits volatils, ce qui fait que pour un nez exercé, aucune rose n'a exactement le même parfum. Bien qu'aucune d'étude exhaustive n'ait été menée, le parfum est souvent bien présent chez les

Terpènes

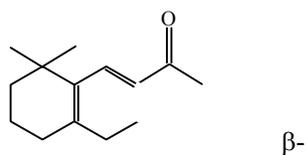
Monoterpènes



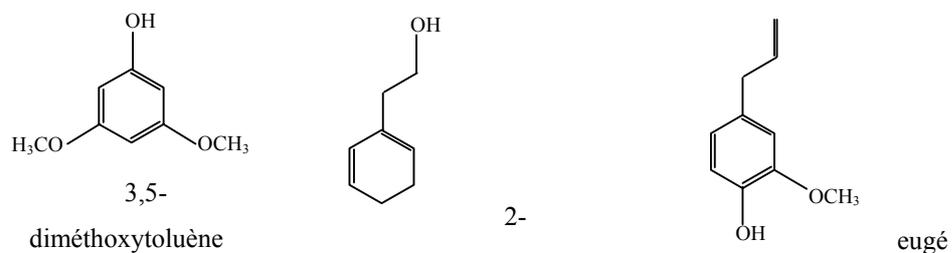
Sesquiterpènes



Cétones de rose



Composés



Dérivés d'acide

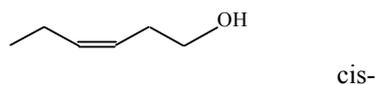


Figure 2 : Composés volatils du parfum de rose appartenant à trois classes de composés.

roses botaniques. Il a ainsi été étudié chez *Rosa brunonii* (Kaul *et al.*, 1999), *Rosa canina* (Ozel et Clifford, 2004), *Rosa chinensis* (Joichi *et al.*, 2005) et surtout *Rosa rugosa* (Dobson *et al.*, 1990, 1999) pour tester la possibilité d'en extraire commercialement de l'huile essentielle.

A tous les stades de la domestication, le parfum a constitué un caractère extrêmement important chez la rose cultivée. Les roses botaniques étant le plus souvent à fleurs simples avec cinq pétales, et la fragrance se trouvant concentrée dans les pétales, le processus qui conduit à la duplication de la fleur, entraîne de fait une augmentation du caractère parfumé des fleurs. Ainsi, *Rosa gallica* 'officinalis', variété de *Rosa gallica* à fleurs doubles (plus de 10 pétales) utilisée pour ses propriétés médicinales depuis le moyen-âge, est plus parfumée que son ancêtre à fleurs simples.

Les roses les plus étudiées pour leur parfum sont *Rosa x damascena* et *Rosa x centifolia* utilisées de façon intensive pour la production d'huile essentielle et d'absolu (Kovats, 1987 ; Lawrence, 1997 ; Oka *et al.*, 1999 ; Jirovetz *et al.*, 2002). Ce sont des roses européennes qui ont donc une odeur de rose classique. Cette odeur est due aux grandes quantités d'alcools monoterpéniques et de 2-phényléthanol qu'elles renferment. A titre d'exemple, le tableau 2 présente les principaux composés de l'huile essentielle de *Rosa x damascena* ainsi qu'une description de l'impression olfactive qui leur est associée.

Chez les roses modernes du groupe des Hybrides de Thé, les parfums sont très variés et s'écartent bien souvent de ce que l'on considère comme le parfum de rose typique. De plus, ces dernières années, les obtenteurs ont développé chez les roses des fragrances originales comme des odeurs de fruit (framboise chez 'Prestige de Lyon' et anis chez 'Paul Ricard' par exemple). De nombreuses études ont également été réalisées sur le parfum de ces Hybrides de Thé, avec souvent pour but une tentative de classification du parfum en plusieurs catégories (tableau 3 ; Nakamura, 1987 ; Flament *et al.*, 1993). Certains auteurs ont également essayé de trouver des composés spécifiques de tel ou tel groupe horticole et de bâtir une généalogie du parfum. Des composés aromatiques particuliers, le DMT et le TMB ont retenu l'attention de ces auteurs (Nakamura, 1987 ; Joichi *et al.*, 2005).

Il s'agit de composés spécifiques des roses chinoises comme *Rosa gigantea* dont le parfum est constitué à 50 % de DMT. Certaines roses Thé comme 'Lady Hillingdon' ont hérité de ce parfum de type chinois (70 % de DMT). Leur fragrance, qualifiée d'odeur de thé, est bien due à ces composés originaux, même si la signification de la référence au thé est peu claire. Le DMT est décrit comme ayant une odeur poudrée, épicée, additionnée d'une odeur verte et humide. De nombreux Hybrides de Thé modernes renferment une faible quantité de

Tableau 2 : Quelques composés identifiés dans l'huile essentielle de *Rosa x damascena* de Bulgarie et les impressions aromatiques correspondantes (d'après Jirovetz *et al.*, 2002).

Composé	Impression aromatique
α -pinène	Boisée, odeur de pin
β -myrcène	Balsamique doux, note de plastique
cis-3-hexénol	Note verte ('alcool de feuille'), herbe fraîche
cis-rose oxyde	Florale, note de rose et de géranium, verte
citronellal	Fraîche, note d'agrumes, verte
linalol	Florale rafraîchissante, note d'agrumes
β -caryophyllène	Odeur de terpène, boisée, épicée
géraniol	Douce, odeur de rose, florale, chaude
trans- β -damascénone	Florale, odeur de rose
citronellol	Florale, odeur intense de rose, légèrement fruitée
géraniol	Odeur de rose, florale sucrée, fruitée, laiteuse
acétate de géranyl	Odeur de rose et de lavande, doucement fruitée
nérol	Florale, odeur de rose, légèrement fruitée
β -ionone	Balsamique, odeur de violette diluée
méthyleugénol	Epicée, odeur de clou de girofle
2-phényléthanol	Florale, odeur de rose, notes de miel

Tableau 3 : Classification du parfum des roses (d'après Nakamura, 1987)

Classification du parfum	Variété de roses
Damas (classique)	<i>Rosa x damascena</i> <i>R. x centifolia</i>
Damas (moderne)	<i>R. x hybrida</i> 'Papa Meilland'
Thé	<i>R. x hybrida</i> 'Lady Hillingdon'
Fruité	<i>R. x hybrida</i> 'Harmonie' <i>R. x hybrida</i> 'Double Delight'
Bleu	<i>R. x hybrida</i> 'Blue perfume' <i>R. x hybrida</i> 'Blue Moon'
Épicé	<i>R. moschata</i> <i>R. rugosa</i>
Divers	<i>R. multiflora</i> <i>R. x hybrida</i> 'Diana'

DMT, souvent en mélange avec des composés à odeur de rose classique.

Lorsque ces composés manquent, la faible quantité de DMT présente n'est généralement pas perceptible par l'odorat humain et ces roses sont décrites comme dépourvues de parfum (Shalit *et al.*, 2004). La fragrance de nombreux rosiers semble n'avoir été perdue qu'au cours des étapes récentes de la domestication, lors de la création des rosiers Hybrides de Thé destinés à être cultivés en serre et à fournir les fleurs coupées, et pour lesquelles le parfum aurait été considéré comme peu prioritaire en comparaison de caractères comme le port, la forme, la couleur et la tenue en vase (Van de Pol, 1986). Certains auteurs supposent l'existence d'une liaison génétique entre l'absence de parfum et certains caractères agronomiques comme la résistance au Botrytis, à la maladie des taches noires, et la tenue en vase (Gudin, 1995). Cependant, un parfum anisé est bien présent chez certaines variétés destinées à la fleur coupée comme 'Daikiri' (obtention Meilland), à longue tenue en vase. La ou les causes de l'absence de parfum de rose typique chez les variétés pour la fleur coupée reste à déterminer.

Enfin, une des difficultés dans l'étude des fragrances des fleurs et des roses en particulier est la présence de très nombreux composés à l'état de traces qui ont souvent une incidence importante sur le caractère parfumé, à cause de leur seuil de détection olfactif très bas. Ces composés (ionones, oxydes de roses etc...) font l'objet de toute l'attention des parfumeurs qui les isolent puis les synthétisent chimiquement afin de les utiliser dans leurs compositions parfumées (Shizuki *et al.*, 2002).

II. Le rôle des composés volatils et les structures sécrétrices

A. Huiles essentielles, parfums et insectes

1. L'attraction des pollinisateurs

La fonction généralement attribuée aux parfums floraux est l'attraction des insectes pollinisateurs. Cependant, les cas où ce rôle a été formellement démontré sont paradoxalement assez rares (Pichersky et Gershenzon, 2002). Dans certains cas, les composés volatils émis sont spécifiques d'un insecte pollinisateur ou d'un groupe de pollinisateurs. Par exemple, les esters benzéniques, comme le benzylacétate, sont émis par une majorité de fleurs pollinisées par les papillons. Raguso *et al.* (1996) ont testé l'hypothèse selon laquelle ces papillons sont attirés préférentiellement par ces composés. Des individus capturés de *Hyles*

lineata, papillon de nuit pollinisateur de *Clarkia breweri*, ont été exposés à différents composés volatils et les réponses électro-antennographiques ont été enregistrées. Les plus fortes réponses sont obtenues après une exposition au benzylacétate et au méthylsalicylate. La relation entre la nature des composés volatils et l'insecte pollinisateur a été également mise en évidence chez *Cimicifuga simplex*. En effet, deux sous-espèces non odorantes de *C. simplex* sont pollinisées par des bourdons, tandis qu'une troisième émet du méthyl-anthranilate et de l'isoeugénol qui attirent spécifiquement des papillons pollinisateurs (Piechulla et Pott, 2003).

Il a été montré, notamment chez l'orchidée *Ophrys sphegodes* (Schiestl *et al.*, 1999), que la nature des composés volatils émis évolue au cours de la pollinisation. Les fleurs d'*O. sphegodes* sont visitées par des abeilles mâles solitaires (*Andrena nigroaenea*) qui confondent la fleur avec la forme du corps de l'abeille femelle. Les abeilles mâles présentent alors un comportement pseudocopulatoire (Fig. 3). Des analyses des composés volatils associées à la détection électroantennographique ont révélé que la fleur émet des alcanes et des alcènes (C₂₁-C₂₉), responsables de ce comportement. Ces composés sont normalement émis par les abeilles femelles réceptives à l'accouplement. Il est étonnant de noter que les fleurs d'*O. sphegodes* produisent et émettent ces composés dans des proportions identiques à celles des abeilles femelles réceptives. Une fois pollinisées, les fleurs émettent du farnésyl hexanoate, composé normalement émis par les abeilles femelles non réceptives. Ceci a pour conséquence de repousser les insectes mâles qui se dirigent vers les fleurs adjacentes non pollinisées et cela limite les dommages sur les graines en développement.

La relation entre *O. sphegodes* et *A. nigroaenea* révèle une pollinisation active, c'est-à-dire que fleurs et insectes pollinisateurs ont acquis des caractères comportementaux et/ou morphologiques assurant la pollinisation (Thompson, 1989). Dans le genre *Ficus*, 2/3 des 750 espèces sont pollinisées de façon active (Jousselin *et al.*, 2003) et les guêpes pollinisatrices se reproduisent à l'intérieur des inflorescences. La relation *Ficus*/guêpe est une relation obligatoire dont dépend la survie des deux espèces.

En effet, il s'agit d'un mutualisme espèce-spécifique dans lequel chaque partenaire a besoin de l'autre pour se reproduire (Grison-Pigé *et al.*, 2002a). Lorsque les figues sont réceptives à la pollinisation, elles émettent des composés volatils (Grison *et al.*, 1999) attirant les insectes (Ware et Compton, 1994 ; Gibernau *et al.*, 1998). Les travaux de Grison-Pigé *et al.* (2002a) montrent qu'il existe une spécificité étroite entre figuier et guêpes pollinisatrices. Par ailleurs, la réponse de l'insecte n'est pas dépendante d'un composé spécifique produit par le figuier. Les effluves florales de différentes variétés de *Ficus* se composent toujours des mêmes composés, mais dans des proportions différentes (Grison-Pigé *et al.*, 2002b).

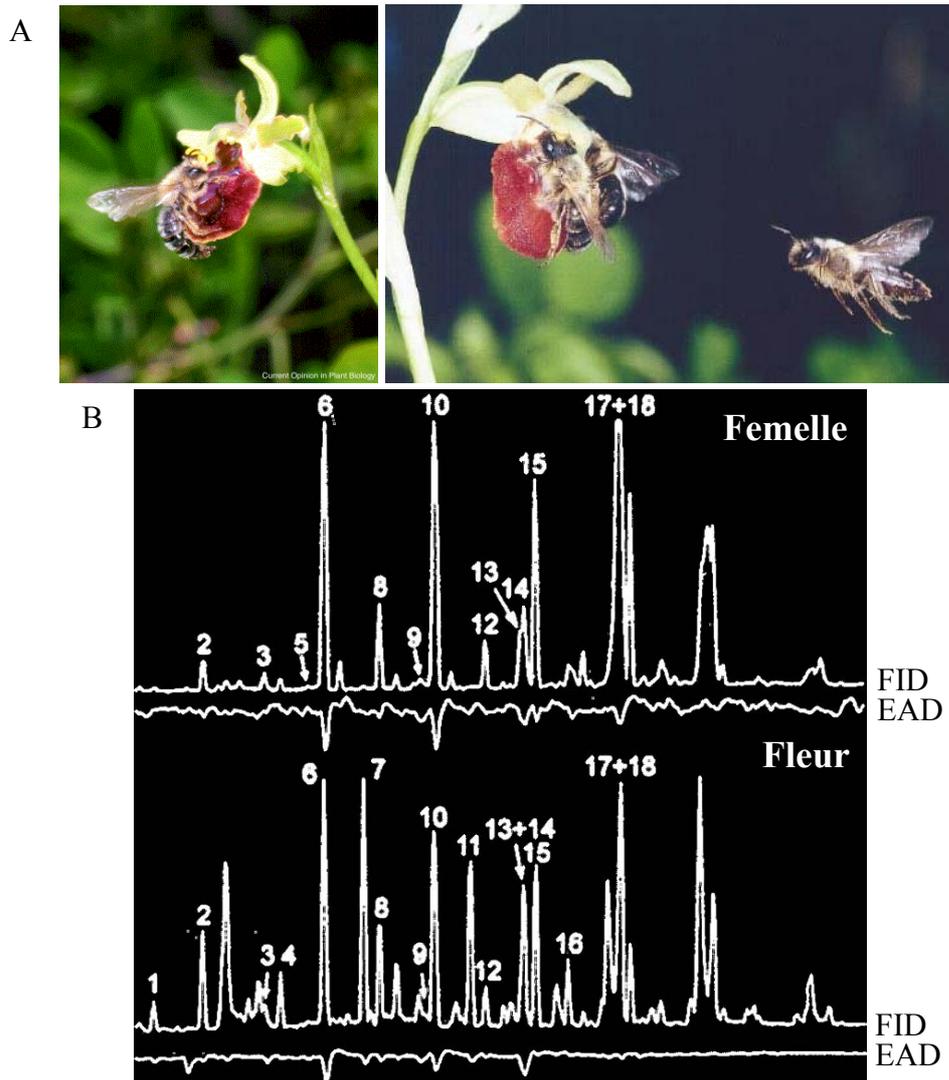


Figure 3 : Relation entre la fleur de l'orchidée *Ophrys sphegodes* et son pollinisateur, un mâle de l'espèce solitaire d'abeille *Andrena nigroaenea* (Schiestl *et al.*, 1999). A, la fleur mime l'apparence et les odeurs d'une femelle réceptive, induisant chez le mâle un comportement pseudocopulatoire. B, Chromatogrammes obtenus après analyse des composés volatils par CPG (FID) émis par une femelle réceptive et la fleur et détection électroantennographique (EAD). La majorité des composés sont émis par la femelle réceptive et par la fleur prête à être pollinisée.

Le rôle des composés volatils dans la pollinisation a été démontré indirectement chez *Antirrhinum majus*. En effet, les fleurs de muflier émettent majoritairement du méthylbenzoate, synthétisé à partir de l'acide benzoïque grâce à une réaction catalysée par la S-adénosyl-L-méthionine : benzoïque acide carboxyl méthyltransférase (BAMT). Negre *et al.* (2003) ont montré que l'émission de méthylbenzoate diminue de 70 % après la pollinisation. Ce phénomène est associé à une diminution de l'activité BAMT, parallèlement à la diminution des niveaux de transcrits du gène *BAMT*. Cette diminution de l'activité BAMT ne commence que lorsque les tubes polliniques ont atteint l'ovaire.

Dobson et Bergström (2000) ont également étudié l'odeur du pollen produit par les fleurs. Ils ont ainsi montré que cette odeur est plus prononcée chez les plantes pollinisées par les insectes que chez les plantes pollinisées par les oiseaux ou le vent. Les insectes qui se nourrissent du pollen peuvent discriminer entre différents types de pollen et différentes plantes hôtes, sur la base de l'odeur du pollen. De plus, les composés volatils émis pourraient avoir un rôle dans la protection du pollen grâce à leurs propriétés antimicrobiennes.

De nombreux terpènes sont produits et émis à la fois par les feuilles et les fleurs, repoussant ou attirant les insectes. Les feuilles produisent généralement les composés volatils à l'intérieur de structures spécialisées, alors que les composés volatils floraux sont produits par des osmophores ou les cellules coniques épidermiques des pétales. Récemment, Dufaÿ *et al.* (2003) ont rapporté une localisation atypique de la production des composés volatils impliqués dans la pollinisation. En effet, chez *Chamaerops humilis*, palmier nain de Méditerranée, les feuilles produisent des composés volatils qui attirent des charançons pollinisateurs (*Derelomus chamaeropsis*), alors que les fleurs sont sans odeur. La production d'odeur est limitée à l'anthèse et pourrait avoir la même fonction que les parfums floraux. Cet exemple offre la première opportunité d'étudier la transition entre la production de parfum foliaire et floral. En effet, chez d'autres espèces de palmiers phylogénétiquement proches de *C. humilis*, le parfum est produit uniquement par les fleurs, comme chez *Guithaia grossefibrosa*, ou à la fois par les feuilles et par les fleurs, comme chez *Serenoa repens* (Dufaÿ, 2003).

Certains composés volatils floraux, comme le linalol, sont produits également par les trichomes présents à la surface des sépales (Caissard *et al.*, article soumis) et des feuilles. Le linalol émis par les fleurs a un rôle hypothétique dans l'attraction des insectes pollinisateurs alors que celui qui est produit par les feuilles interviendrait dans les mécanismes de défense en empêchant l'oviposition des insectes ou la prédation des feuilles (Kessler et Baldwin, 2001). Au niveau des fleurs, ces molécules volatiles produites par les sépales pourraient

empêcher la prédation du bouton floral ou le vol de nectar, obligeant l'insecte à passer par l'intérieur de la corolle.

2. La défense contre les herbivores

Lorsqu'une plante est soumise à l'attaque d'insectes herbivores, les quantités de composés volatils émis par ses feuilles augmentent de façon significative. La nature de ces composés varie avec le couple espèce végétale/insecte herbivore (Paré et Tumlinson, 1999). Ils sont non seulement impliqués dans les mécanismes de défense directe par leurs propriétés fongicides, bactéricides et insecticides, mais également dans les mécanismes de défense indirecte en attirant les parasites ou les prédateurs des phytophages.

a. Les réactions de défense directe

Chez les Gymnospermes, la réaction de défense directe est basée sur la production d'une résine, appelée oléorésine (Phillips et Croteau, 1999 ; Nagy *et al.*, 2000). Cette oléorésine est toxique, répulsive et susceptible d'engluer les xylophages. Elle peut également inhiber la croissance des champignons pathogènes qui vivent en symbiose avec les xylophages à la surface de leurs élytres (Nagy *et al.*, 2000 ; Phillips et Croteau, 1999). L'oléorésine est un mélange complexe de terpènes, avec une fraction térébenthine volatile (monoterpènes en C₁₀ et sesquiterpènes en C₁₅) et une fraction résineuse non volatile (diterpènes en C₂₀). La térébenthine permet le transport des molécules plus lourdes de la résine jusqu'au site de blessure. Au contact de l'atmosphère, les composés volatils de la térébenthine s'évaporent, ne laissant qu'une masse semi-cristalline d'acides de résine qui polymérisent. Ceci forme une barrière très dure qui scelle la blessure et piège les insectes prédateurs et les agents microbiens (Phillips et Croteau, 1999 ; Trapp et Croteau, 2001a). L'oléorésine est synthétisée et accumulée dans des structures sécrétrices spécialisées, les cellules des canaux résinifères. En réponse à une attaque de xylophage, le sapin de Norvège met en place un réseau de canaux résinifères traumatiques qui s'accompagne de l'induction de l'activité des terpène synthases, assurant ainsi une synthèse *de novo* de composés terpéniques. De plus, la composition de l'oléorésine induite est différente de celle de l'oléorésine produite de façon constitutive (Martin *et al.*, 2002).

Chez les Angiospermes, des plantes saines émettent une faible quantité de composés volatils à partir de la surface de la feuille et/ou à partir de sites de stockage présents à la surface des feuilles (Paré et Tumlinson, 1999). Dans certains cas, ces composés volatils défensifs sont émis en réponse l'herbivorie, lorsque les structures sécrétrices internes ou

externes sont rompues. Certains composés volatils, comme les aldéhydes en C6 appelés « green leaf volatiles », peuvent également être synthétisés lors de l'attaque : ils dérivent de la coupure des acides gras sous l'action de la lipoxygénase qui a lieu dans la seconde qui suit la blessure. Enfin, d'autres composés comme le trans- β -ocimène, l'indole ou encore l'acétate d'hexényl, sont synthétisés *de novo* des heures ou des jours après la blessure (Paré et Tumlinson, 1997 ; 1999). Certains composés volatils comme le β -farnésène, produits après une attaque d'herbivores, ont un effet sur le comportement de l'insecte phytophage. En effet, ce composé, sesquiterpène acyclique largement répandu chez les végétaux et les animaux, est utilisé comme une phéromone d'alarme : des pucerons exposés au β -farnésène deviennent agressifs et se dispersent. L'implication de ce composé dans les mécanismes de défense vis-à-vis des insectes herbivores a été étudiée chez plusieurs espèces comme *Mentha x piperita* (Crock *et al.*, 1997) et *Trifolium repens* (Mostafavi *et al.*, 1996).

b. Les réactions de défense indirecte.

Outre leur rôle direct dans la défense, les composés volatils peuvent avoir un rôle de défense indirecte en attirant les prédateurs et/ou les parasites des insectes herbivores. Ainsi, certains composés émis par les feuilles soumises à un insecte phytophage fournissent des informations pour guider les femelles parasites des chenilles de Lépidoptères jusqu'au lieu d'émission et les aident ainsi à trouver leur cible (Paré et Tumlinson, 1999). Par exemple, l'analyse des composés volatils émis par *Nicotiana attenuata* après une attaque par des insectes herbivores montre que trois composés (*cis*-3-hexénol, linalol et *cis*- α -bergamotène) augmentent le taux de prédation des œufs de papillon par un prédateur généraliste. De plus, le linalol diminue le taux d'oviposition du Lépidoptère. De cette façon, le nombre d'insectes phytophages est réduit de plus de 90 % (Kessler et Baldwin, 2001).

Les réactions de défense indirecte peuvent avoir une composante systémique. En plus d'une émission de composés volatils au niveau du site d'alimentation des herbivores, les feuilles saines voisines présentent une augmentation de l'émission des composés volatils chez le maïs (Turlings et Tumlinson, 1992) et chez le coton (Röse *et al.*, 1996). Les expériences de marquage chimique montrent que les composés volatils systémiques sont produits sur leur site d'émission, c'est-à-dire par les cellules de feuilles intactes. Ceci suggère qu'un messenger chimique est transporté depuis le site de blessure jusqu'aux feuilles saines pour initier la synthèse et l'émission des composés volatils (Paré et Tumlinson, 1999).

Outre cette communication entre les différents étages d'une plante soumise à une attaque de phytophages, les composés volatils émis par ces plantes sont capables d'influencer

les plantes situées dans leur voisinage proche. Des travaux récents montrent que des plants de *Nicotiana attenuata*, cultivés à proximité de plants de sauges (*Artemisia tridentata*) blessés artificiellement, présentent moins de dommages liés aux herbivores que des plants de *N. attenuata* cultivés à proximité de sauges non blessées (Kessler et Baldwin, 2001).

En conclusion, les plantes possèdent donc à la fois des défenses directes et indirectes très actives contre les attaques des insectes phytophages (Fig. 4). Néanmoins, ces deux modes de défense peuvent être antagonistes si les insectes phytophages, tolérants vis-à-vis des toxines, les utilisent comme mécanisme de défense contre leurs propres prédateurs. Par exemple, la larve du ver à cornes du tabac accumule suffisamment de nicotine dans son hémolymphe lors de son alimentation sur *Nicotiana tabacum* pour réduire la croissance et la survie de guêpes endoparasites. En conséquence, *Nicotiana attenuata* a une production de nicotine réduite quand elle est attaquée par le ver à cornes et émet des composés terpéniques qui attirent les prédateurs de l'insecte herbivore (Degenhardt *et al.*, 2003).

3. Le cas des Roses

La rose étant avant tout une plante sélectionnée par l'homme, très peu d'études ont été consacrées à son mode de pollinisation en conditions naturelles. Cependant, il est généralement admis que la pollinisation dans le genre *Rosa* n'est pas due à un insecte spécifique mais à un ensemble de pollinisateurs généralistes comme les abeilles (Proctor *et al.*, 1996). Yeboah Gyan et Woodell (1987) ont montré que *R. canina* est partiellement autoincompatible et qu'elle est pollinisée, entre autre, par des bourdons. Les études portant sur l'émission des composés volatils au cours de la journée décrivent toutes un rythme circadien d'émission, suggérant là encore une pollinisation des roses sauvages par des insectes à activité diurne (Helsper *et al.*, 1998, Picone *et al.*, 2004).

Chez de nombreuses espèces d'Angiospermes, les pétales sont généralement la source majeure de composés volatils (Dobson *et al.*, 1990). Les composés émis par les pétales de rose sont présents à des degrés divers chez d'autres fleurs. Il a été montré pour certains d'entre eux une action sur les pollinisateurs. Par exemple, le méthyleugenol est connu pour ses propriétés attractives sur les papillons pollinisateurs et les scarabées (Shukla et Prasad, 1985).

La plupart des constituants identifiés chez les Hybrides de Thé cultivés sont déjà présents, en quantités variables, chez les roses sauvages (Kaul *et al.*, 1999 ; Ozel *et al.*, 2004 ; Joichi *et al.*, 2005 ; Dobson *et al.*, 1990).

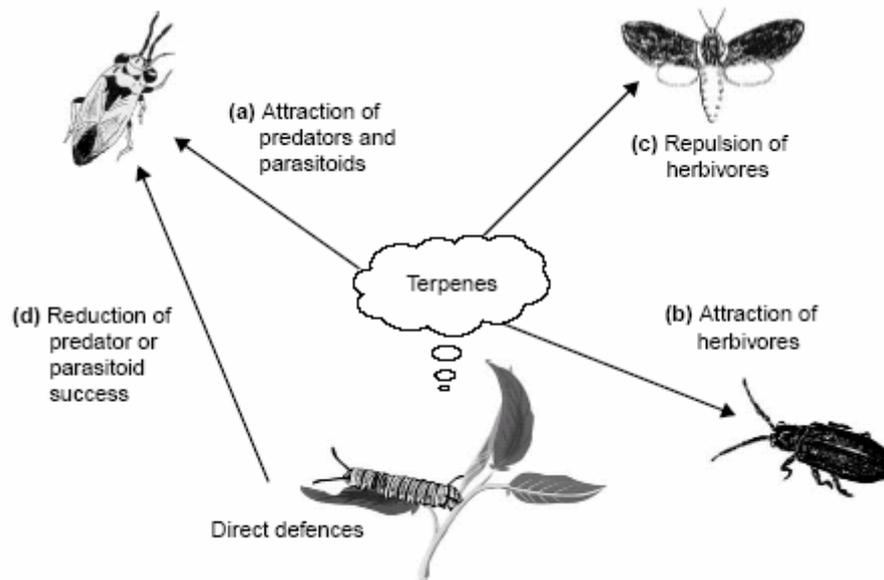


Figure 4 : Interactions entre les plantes, les herbivores et les ennemis des herbivores, sous le contrôle des terpènes volatils (d'après Degenhardt *et al.*, 2003). (a) une attaque d'herbivores induit une libération de terpènes, qui attirent les prédateurs et les parasites qui pondent sur l'herbivore et l'utilisent pour leur larve. Les mêmes terpènes peuvent également affecter d'autres herbivores, aussi bien en les attirant pour de la nourriture (b) qu'en les repoussant pour la nourriture ou l'oviposition (c). De plus, les caractères impliqués dans la défense indirecte peuvent affecter négativement le succès des prédateurs ou des parasites (d). Les tentatives d'améliorer l'émission des terpènes chez les plantes cultivées doivent favoriser les avantages (a et c) et défavoriser les désavantages (b et d).

Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée chez la rose, il est probable que chez ces roses sauvages, les composés volatils de la fragrance jouent pleinement leur rôle d'attraction des pollinisateurs. Une étude récente portant sur le DMT (Shalit *et al.*, 2004) a d'ailleurs montré que les abeilles étaient capables de détecter ce composé et d'apprendre à l'associer à une récompense, presque aussi rapidement que le géraniole.

En plus des pétales, d'autres parties de la fleur participent à l'émission de composés volatils, parfois différents de ceux des pétales, et jouent leur rôle de signaux à destination des insectes (Dobson *et al.*, 1999). Il a par exemple été montré que chez *Rosa rugosa*, les odeurs du pollen pourraient avoir un rôle dans la protection de ce pollen vis-à-vis des bourdons à cause de leurs propriétés répulsives. L'eugénol, abondamment présent dans les organes mâles des fleurs de nombreuses variétés de roses, possède une activité nématocide et sert d'inhibiteur de l'herbivorie (Obeng-Ofori et Reichmuth, 1997).

Quelques études portent aussi sur les composés volatils émis par les sépales des roses. Ces molécules volatiles, souvent différentes de celles des pétales et des étamines, sont produites par des trichomes sécréteurs identiques à ceux des feuilles. Il s'agit de dérivés d'acides gras (*cis*-3-hexénol), de monoterpènes (linalol) et de sesquiterpènes (Caissard *et al.*, article soumis). Chez d'autres espèces, ces molécules ont été impliquées dans des mécanismes de défense (Kessler et Baldwin, 2001).

B. Les structures sécrétrices

Les terpènes, et plus généralement les composés volatils, sont produits et sécrétés par un grand nombre de structures anatomiques (Caissard *et al.*, 2004 ; Fig. 5) : cellules isolées ou idioblastes, cellules épidermiques des pétales, osmophores des Orchidacées, cavités des Rutacées, trichomes des Lamiacées et canaux à résine des Gymnospermes (Fahn, 2000).

1. Les cellules sécrétrices des pétales

Contrairement à d'autres organes, les cellules sécrétrices des pétales n'ont été localisées que de façon indirecte. Par exemple, l'absorption de rouge neutre dans des territoires cellulaires particuliers, leur a fait attribuer la fonction d'osmophores (Vogel, 1962 ; Stern *et al.*, 1986), c'est-à-dire de territoires floraux émettant des odeurs. Selon les espèces, les osmophores sont constitués de cellules coniques ou non (Stern *et al.*, 1986 ; 1987). Lorsqu'elles sont coniques, ces cellules ressemblent beaucoup aux cellules de l'épiderme supérieur de très nombreux pétales (Fig. 5H à J). Très souvent, ces épidermes à cellules coniques sont décrits comme sécréteurs même si certains auteurs ne leur attribuent qu'un rôle

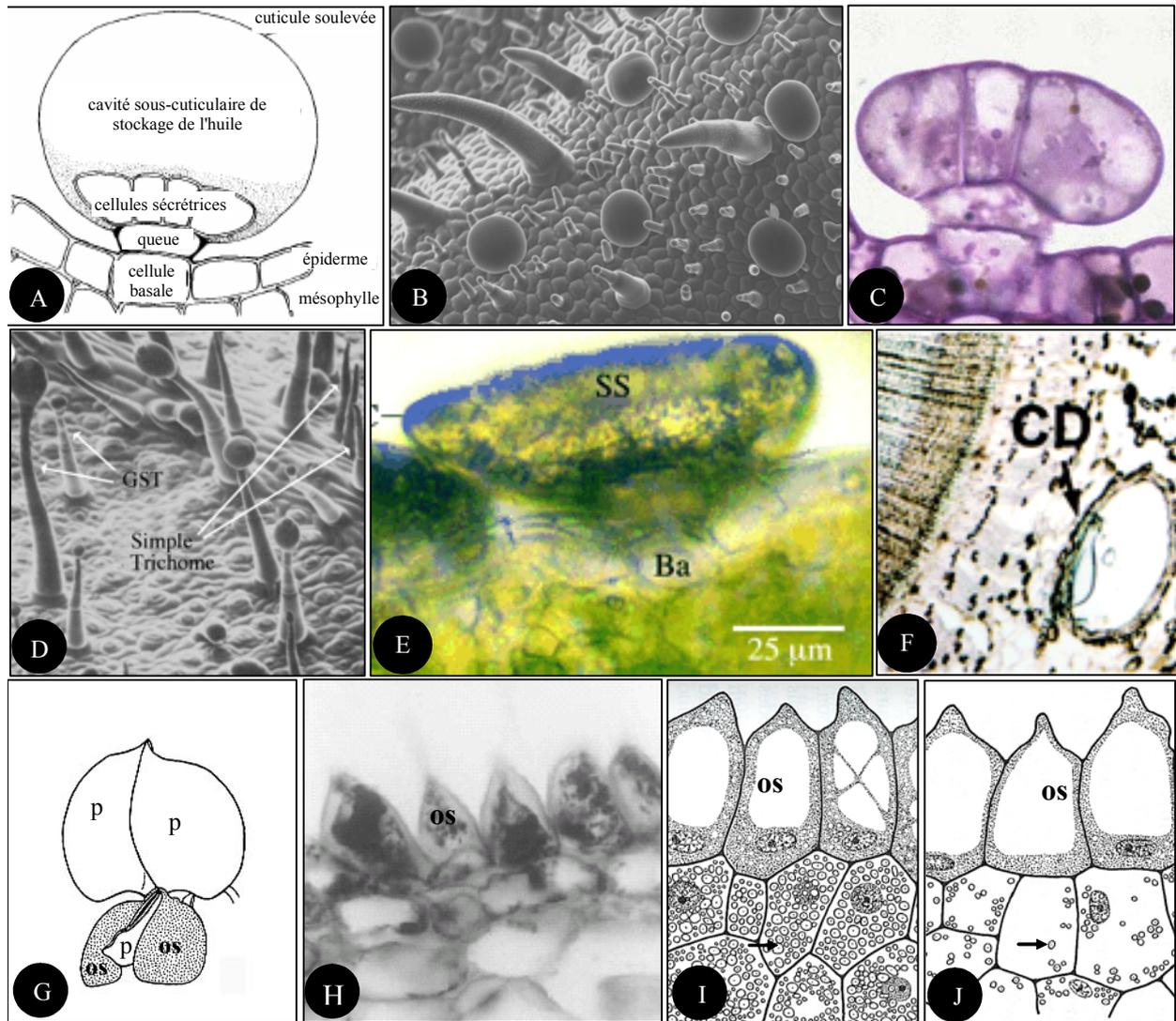


Figure 5 : Diversité des structures de sécrétion. A, schéma d'un trichome glandulaire pelté de menthe poivrée (Turner *et al.*, 2000); B, surface de l'épiderme supérieur de feuille de menthe (photographie : J.C. Caissard) ; C, trichomes glandulaires peltés de *Mentha x piperita* (photographie : J.C. Caissard); D, trichomes de *Nicotiana tabacum* (Wagner *et al.*, 2004) ; E, trichome de *Prostanthera ovalifolia* (Gersbach, 2002) ; F, canal résinifère d'*Abies grandis* (Martin *et al.*, 2002) ; G, fleur de genêt d'Espagne (*Spartium junceum*) traitées au rouge neutre pour localiser les osmophores (Esau, 1965); H, osmophores de *Bulbophyllum involutum*, Orchidaceae (Teixeira *et al.*, 2004); I et J, schémas d'une section à travers les tissus sécréteurs d'osmophores d'une fleur de *Ceropegia stapeliaeformis* avant (I) et après (J) émission de la fragrance : noter la diminution du nombre de grains d'amidon après l'émission dans les cellules du tissu sous l'épiderme sécréteur (Esau, 1965). Ss, espace sous-cuticulaire ; Ba, cellule basale ; cd, canal résinifère ; GST, trichome glandulaire sécréteur ; os, osmophore ; p, pétale ; flèche, amidon.

dans la réflexion de la lumière (Kay *et al.*, 1981).

L'inventaire des cellules sécrétrices des pétales est donc souvent basé sur l'aspect des cellules plus que sur la réelle caractérisation d'un phénomène de sécrétion, par ailleurs difficilement observable en dehors de glandes accumulatrices. Certaines espèces, comme *Plectranthus ornatus*, arborent des glandes peltées et capitées à la surface de leurs organes reproducteurs (Ascensao *et al.*, 1999). Chez *Antirrhinum majus*, on trouve également des trichomes clairement sécréteurs sur les épidermes des pétales. Néanmoins, ceux-ci ne semblent pas impliqués dans la production de parfum (Kolosova *et al.*, 2001a). Toutefois, chez de nombreuses espèces, les pétales ne possèdent pas de glandes sécrétrices mais bien des cellules épidermiques coniques.

Les cellules coniques ont une forme caractéristique en papille. Elles ont été observées chez plus de 200 espèces d'Angiospermes (Kay *et al.*, 1981), y compris dans le genre *Rosa* (Stubbs et Francis, 1971 ; Kay *et al.*, 1981). Cette forme conique papillée est connue pour offrir une très grande surface d'évaporation et pour participer à la réflexion de la lumière. Le gène *MIXTA*, responsable de cette forme, a été cloné chez *Antirrhinum majus* (Noda *et al.*, 1994). De façon surprenante, sa surexpression chez *Nicotiana tabacum*, sous le contrôle du promoteur 35S, aboutit à la formation de trichomes sécréteurs ectopiques sur la plante dans sa totalité, suggérant une relation entre la différenciation des cellules coniques papillées et des trichomes sécréteurs (Glover *et al.*, 1998).

Depuis ce travail, un des gènes impliqués dans la différenciation des trichomes sécréteurs de la corolle d'*A. majus* a été cloné. Il s'agit d'un gène codant pour un facteur MYB très proche du gène *MIXTA* (Perez-Rodriguez *et al.*, 2005) : les mêmes types de gènes réguleraient donc la différenciation des cellules coniques et des trichomes sécréteurs dans la fleur d'*A. majus*. Par ailleurs, toujours chez *A. majus*, il a été montré que le gène *BAMT* (S-Adenosyl-L-Méthionine : Benzoic Acid Carboxyl Méthyltransférase) responsable de la biosynthèse du méthylbenzoate s'exprime spécifiquement dans l'épiderme supérieur des pétales (Kolosova *et al.*, 2001a). Ces résultats fournissent des arguments supplémentaires sur la nature supposée sécrétrice des cellules coniques. Malheureusement, aucune preuve directe n'a jamais été fournie comme dans les études de trichomes sécréteurs, par exemple.

2. L'exemple des trichomes sécréteurs

Les trichomes sécréteurs sont les structures sécrétrices les plus étudiées dans la littérature. En effet, elles sont présentes chez de nombreuses familles végétales, comme, par exemple, les Lamiacées, les Astéracées, les Géraniacées, les Solanacées et les Cannabinacées.

La morphologie des trichomes est très variée, avec des pieds longs ou courts, des têtes et des pieds uni- ou pluricellulaires, ramifiés ou non et des têtes capitées ou peltées (Fig. 5A à E). Cependant, de très nombreuses études ont montré que seules les cellules de tête étaient sécrétrice. Selon les familles, ces cellules de tête sont recouvertes ou non d'une cuticule imperméable. Ainsi, chez les Solanacées et les Rosacées, les sécrétions sont directement émises dans l'environnement et la partie la plus visqueuse coule le long du pied du trichome. Il n'est pas rare d'y voir des insectes englués. Chez, les Lamiacées, les trichomes sont recouverts d'une cuticule. Très souvent, lors de la maturation des trichomes, celle-ci se détache de la paroi pecto-cellulosique et l'huile essentielle s'accumule dans l'espace sous-cuticulaire ainsi généré. Les composés sont relâchés lors de la rupture de la cuticule. Chez la menthe, le taux d'évaporation des composés à travers la cuticule des glandes peltées est très faible (moins de 5% sur une période de 6 mois) (Gershenzon *et al.*, 2000). Ceci peut être mis en relation avec la fonction de défense : en cas d'attaque, les composés répulsifs stockés sont libérés immédiatement. Ce type de stockage a été observé chez de très nombreuses espèces comme *Salvia aurea* (Serrato-Valenti *et al.*, 1997) et *Achillea millefolium* (Figueiredo et Pais, 1994).

Au niveau ultrastructural, les glandes peltées productrices de composés terpéniques se caractérisent par une prolifération intense du réticulum endoplasmique et par un très grand nombre de leucoplastes (Ascensao *et al.*, 1997 ; Turner *et al.*, 2000a). Chez *Leonotis leonurus*, les trichomes peltés sécrètent une oléorésine contenant des terpènes et des flavonoïdes aglycones (Ascensao *et al.*, 1997) alors que les trichomes capités sécrètent des protéines et des polysaccharides acides et neutres, en plus des terpènes et flavonoïdes aglycones (Ascensao and Pais, 1998). Dans les glandes capitées, qui sécrètent peu d'huiles essentielles, les corps de Golgi sont très nombreux (Ascensao et Pais, 1998). Chez la même espèce, deux types différents de trichomes sécrètent donc des composés différents. Cette spécialisation dans les produits de sécrétion est également rapportée pour les trichomes glandulaires présents à la surface des feuilles et des fleurs de *Plectranthus ornatus* (Ascensao *et al.*, 1999). La fonction précise des sécrétions produites par chaque type de trichomes est mal connue, même s'il est généralement admis qu'elles sont impliquées dans la défense chimique de la plante ou considérées comme une récompense florale pour les pollinisateurs (Bottega et Corsi, 2000).

La présence de trichomes est connue chez les roses. Ainsi, la face inférieure des feuilles de la rose botanique *Rosa rugosa* présente des trichomes glandulaires en forme de

champignon qui produisent et sécrètent des sesquiterpènes sous la forme de gouttelettes (Hashidoko *et al.*, 2001). Les sépales de certaines roses comme *Rosa gallica*, *Rosa x damascena* et *Rosa x centifolia* présentent aussi des trichomes. La mutation « moussue », décrite chez certaines roses est en fait due à une prolifération de ces trichomes les uns sur les autres (Caissard *et al.*, article soumis). Comme nous l'avons déjà vu, ces trichomes n'ont pas du tout la même composition en produits volatils que les pétales et rien n'est connu sur les mécanismes de leur sécrétion au niveau cellulaire.

3. Les mécanismes cellulaires de la sécrétion

Les mécanismes cellulaires de la sécrétion sont très mal connus. Il est généralement admis qu'il existe deux mécanismes fondamentaux (Fahn, 2000). Dans le premier cas, la sécrétion granulocrine, des vésicules de pinocytose inverse fusionnent directement avec la membrane plasmique ou sont entourées et détachées du cytoplasme par des invaginations de la membrane. Dans le second cas, la sécrétion écrine, le transport des molécules se fait directement au travers de la membrane plasmique (Fig. 6).

Le problème principal rencontré lors de l'étude d'une sécrétion granulocrine de composés volatils est la localisation de ces composés dans la cellule. Aucun produit spécifique de chaque type de composé n'existant, les colorations utilisées (réactif de Nadi, Nile blue A etc...) sont généralement basées sur la nature lipidique des sécrétions. Elles sont donc inutilisables dans le cas de sécrétions non lipidiques. De plus, les procédés de fixation et d'inclusion employés pour la microscopie conduisent parfois à la disparition des vésicules observées sur échantillons frais (Vassilyev, 2000). Ces restrictions sur les techniques mentionnées, de nombreuses vésicules de sécrétion ont été mises en évidence dans des contextes très variés, suggérant l'existence d'un système de sécrétion granulocrine.

Dans les trichomes sécréteurs, les mécanismes décrits n'ont pas toujours été reliés à l'un ou l'autre des types de sécrétion, granulocrine ou écrine :

- sécrétion écrine chez *Origanum dictamnus* (Bosabalidis et Tsekos, 1982),
- transport actif du réticulum endoplasmique lisse jusqu'à la membrane plasmique chez la menthe, *Mentha x piperita* (Turner *et al.*, 2000a),
- bourgeonnement de la membrane plasmique chez *Nepeta racemosa* et *Artemisia annua* (Bourett *et al.*, 1994),
- sécrétion typiquement granulocrine chez *Prostanthera ovalifolia* par fusion de vésicules à la membrane plasmique (Gersbach, 2002).

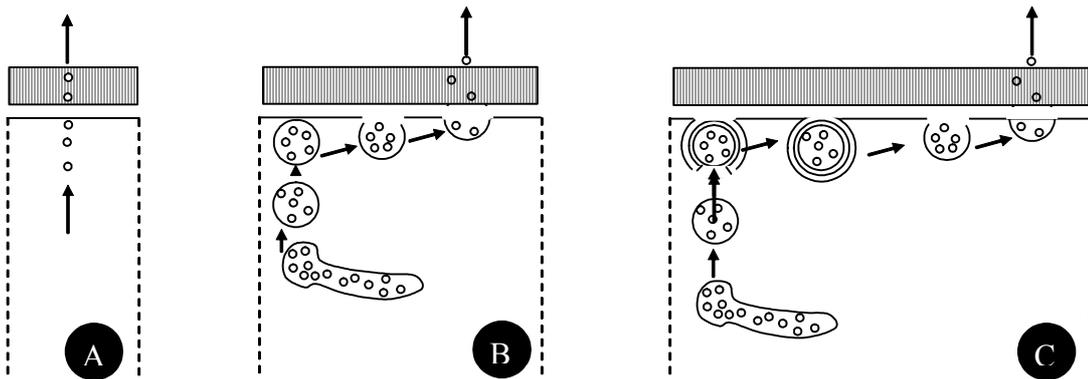


Figure 6 : Schéma montrant les mécanismes possibles de sécrétion (d'après Fahn, 1979).
 A, sécrétion écrine de molécules volatiles ; B et C, sécrétion granulocrine.

Dans les autres structures sécrétrices, les osmophores, les canaux et les cavités, c'est un processus granulocrine qui est le plus souvent suspecté (Pridgeon *et al.*, 1985 ; Bosabalidis, 1996 ; Brundrett *et al.*, 1991 ; Bosabalidis et Tsekos, 1982). Dans toutes ces études, les gouttelettes lipidiques proviennent souvent des plastes, du réticulum périplastidial et du réticulum lisse mais aussi parfois des dictyosomes et d'autres organites.

Dans les canaux de *Pinus halepensis*, deux voies de sécrétion ont été détaillées (Fahn et Benayoun, 1976 ; Benayoun et Fahn, 1979). Dans la première voie, des gouttes de résine sont entourées et détachées par des invaginations de la membrane plasmique, au cours d'un processus granulocrine. Dans la seconde voie, le réticulum et la membrane plasmique fusionnent pour libérer directement les gouttes de résine dans la matrice extracellulaire.

Dans les osmophores de l'Arum, *Sauromatum gutatum*, un autre processus granulocrine a été démontré (Skubatz *et al.*, 1995). Chez cette espèce, les sesquiterpènes volatils sont émis par le spadice le jour de la thermogenèse. Cependant, quelques jours avant l'émission, des structures de réticulum endoplasmique rugueux, en forme de poches, au contenu densément osmiophile, sont observées dans le cytoplasme ou en fusion avec la membrane plasmique. Le jour de l'émission, ces poches sont vides. C'est l'un des exemples de sécrétion granulocrine les plus clairs (Fig. 7).

La plupart des études concernant la structure des pétales portent sur la localisation des pigments gouvernant la couleur des fleurs (Markham *et al.*, 2000 ; Weston et Pyke, 1999). La sécrétion des composés du parfum dans les cellules épidermiques du pétale est mal connue. Sans que cela soit formellement démontré, on considère généralement que l'huile essentielle dans ces cellules se présente sous la forme de gouttelettes dans le cytoplasme qui diffusent sous forme gazeuse à travers la paroi cellulaire et la cuticule lorsqu'une certaine température est atteinte (Esau, 1965 ; Fahn, 2000).

Des gouttelettes d'huile sont constamment produites pour remplacer celles qui se sont évaporées (Kisser, 1958, cité par Fahn, 1979). Une étude assez ancienne sur l'ultrastructure du pétale de rose (Stubbs et Francis, 1971) met en évidence la présence de corps cytoplasmiques de nature inconnue et de structures fortement enroulées ressemblant à des figures de myéline, de nature peut-être lipidiques. Ces structures pourraient être reliées à la sécrétion des monoterpènes dans les cellules épidermiques.

Une étude sur les pétales de l'oeillet, *Dianthus caryophyllus*, a montré que certains métabolites secondaires lipidiques, incluant des composés volatils de la fragrance comme les dérivés d'acides gras pourraient être formés à l'intérieur de membranes dans les tissus du



Jour J-2/J-1

Jour J :
production de chaleur et
émission de composés volatils

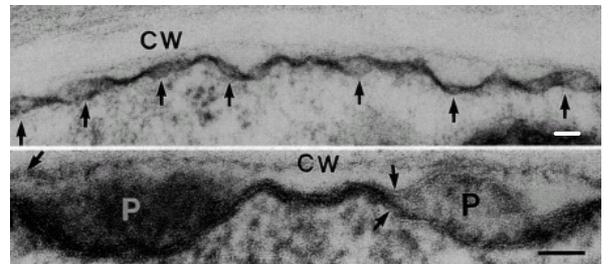
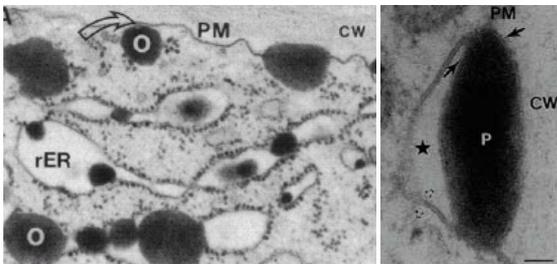
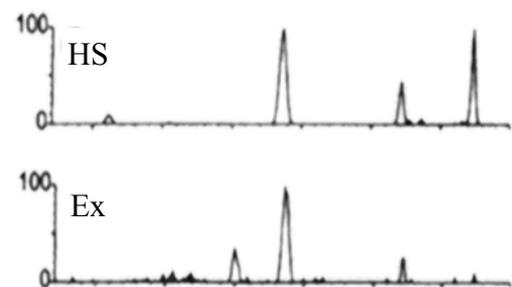
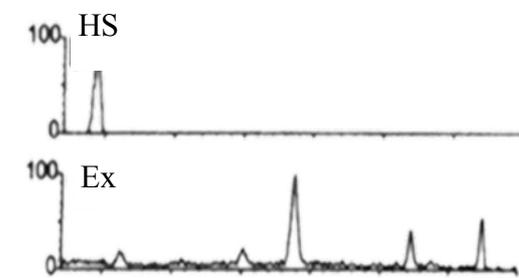


Figure 7 : Sécrétion granulocrine par l'appendice de *Sauromatum guttatum* (d'après Skubatz *et al.*, 1995). Deux jours avant la production de chaleur et l'émission de composés volatils, du matériel osmiophile s'accumule dans des poches de réticulum qui fusionnent avec la membrane plasmique. Le jour J, les poches de RE, fusionnées à la membrane plasmique, se vident de leur matériel osmiophile. HS, headspace ; Ex, extraction ; o, matériel osmiophile ; rER, réticulum endoplasmique rugueux ; PM, membrane plasmique ; CW, paroi cellulaire ; P, poche de rER remplie de matériel osmiophile ; *, lumen de citerne de rER ; flèches pleines, membrane plasmique ; flèches vides, membrane du rER.

pétale (Hudak et Thompson, 1996 ; 1997). Ces composés pourraient ensuite être libérés par bourgeonnement de vésicules ressemblant à des corps lipidiques ou oléosomes. Ces vésicules particulières, possédant une membrane à une seule couche de phospholipides, sont généralement associées au stockage des triacylglycérols dans les graines.

Cependant, elles ont été décrites dans d'autres organes comme les feuilles et les anthères (Wang *et al.*, 1997 ; Wahlroos *et al.*, 2003 ; Hsieh et Huang, 2005). Parallèlement, de nombreux organites issus du réticulum ont été récemment décrits (Hara-Nishimura et Matsushima, 2003 ; Matsushima *et al.*, 2003). Certains de ces compartiments, de fonction souvent inconnue, pourraient jouer un rôle dans les processus de sécrétion. Il a même été prouvé que, chez *Marchantia polymorpha*, des corps lipidiques bien spécifiques contiennent toutes les enzymes de la voie de biosynthèse des monoterpènes (Suire *et al.*, 2000).

Récemment, un gène *NpABCI* a été isolé chez *Nicotiana plumbaginifolia*. Il code pour un transporteur ATP dépendant particulier (ATP binding cassette transporter) (Jasinski *et al.*, 2001). La protéine correspondante a été localisée dans la membrane plasmique par immunomarquage. Son expression dans les feuilles est augmentée par le sclaréol, un diterpène toxique sécrété par les trichomes foliaires du tabac et elle est capable de transporter ce composé à l'extérieur des cellules. La découverte de ce transporteur de terpènes relance la discussion sur l'existence des mécanismes de sécrétion écrine et granulocrine. Il est vraisemblable, à l'examen de la littérature, que les deux mécanismes existent chez les plantes et peut-être même coexistent au sein d'une même cellule pour la sécrétion de composés différents.

III. La biosynthèse des composés volatils

L'élucidation des voies de biosynthèse des composés volatils des fleurs a débuté assez récemment par les travaux pionniers des équipes de Pichersky et de Dudareva portant sur les espèces *Clarkia breweri* et *Antirrhinum majus* (Pichersky *et al.*, 1994 ; Raguso et Pichersky, 1995 ; Wang *et al.*, 1997 ; Nam *et al.*, 1999). Chez la rose, très peu de gènes impliqués dans la synthèse du parfum ont été isolés (Channelière *et al.*, 2002 ; Scalliet *et al.*, 2002 ; Shalit *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2004) mais d'autres espèces peuvent servir de modèles, soit parce que les VOCs sont identiques, soit parce que les voies de biosynthèse présentent de nombreuses similitudes. Par exemple, la plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des monoterpènes par les trichomes de menthe ont été clonés (Lange et Croteau, 1999a ; Davis *et*

al., 2005 ; Ringer *et al.*, 2005).

A. Les terpènes, composés majoritaires des roses

Les terpènes sont des composés qui dérivent tous d'une molécule unique à cinq atomes de carbone, l'isopentényl diphosphate, ou IPP, et de son isomère le diméthylallyl diphosphate, ou DMAPP. La synthèse des monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes peut être résumée en quatre étapes. La première étape est la synthèse de l'IPP et son isomérisation en DMAPP. La deuxième est la condensation de ces molécules par les prényltransférases pour donner le GPP (géranyl diphosphate), le FPP (farnésyl diphosphate) et le GGPP (géranylgéranyl diphosphate), précurseurs des mono-, sesqui- et diterpènes, respectivement. Dans une troisième étape, les prényl diphosphates subissent des réactions de cyclisation catalysées par un ensemble d'enzymes appelées terpène synthases (TPS) pour produire les squelettes de base. Enfin, dans une quatrième étape, ces squelettes sont remaniés par des enzymes de maturation des terpènes, ce qui aboutit à la formation de centaines de composés différents.

1. La biosynthèse du précurseur, l'IPP

L'IPP et le DMAPP sont formés par deux voies biosynthétiques distinctes : la voie dite classique du mévalonate/acétate, ou voie MEV qui se déroule dans le cytoplasme ou les mitochondries, et la voie dite alternative indépendante du mévalonate, ou voie MEP (2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate) qui a lieu dans les plastes.

a. La voie du mévalonate

La voie MEV a été découverte dans les années 1950 (Fig. 8). Le rôle du mévalonate comme intermédiaire spécifique de la synthèse de l'IPP a été démontré de très nombreuses fois chez les mammifères et les champignons, de même que chez les plantes et les archéobactéries. De ce fait, pendant de nombreuses années, on a pensé que cette voie de biosynthèse était la seule voie de biosynthèse de l'IPP. La voie MEV a été largement décrite par de nombreux auteurs (pour revue, voir Lichtenthaler *et al.*, 1997).

Elle met en œuvre la condensation de trois unités d'acétyl-CoA pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (ou HMG-CoA) qui, après réduction par deux molécules de NADPH, forme l'acide mévalonique (MEV). Le MEV est phosphorylé par la

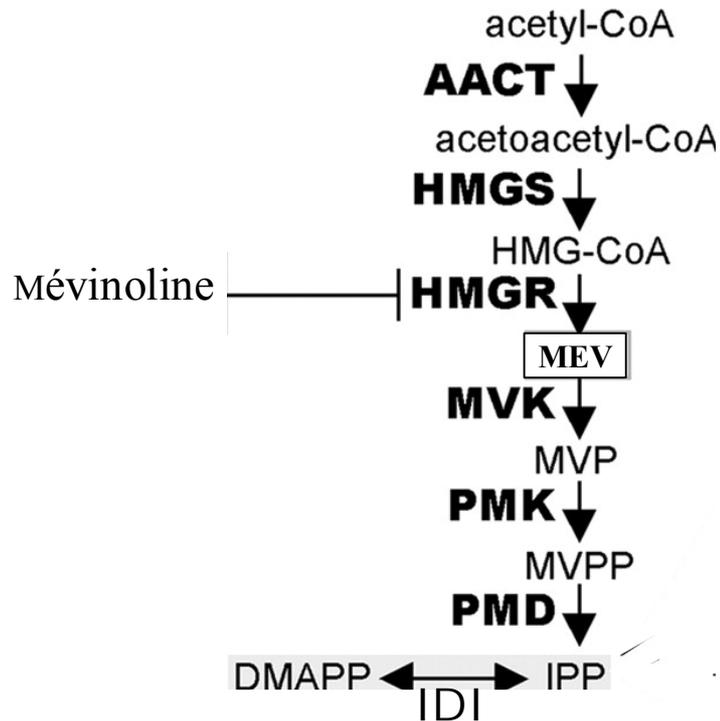


Figure 8 : Voie du mévalonate (MEV) de biosynthèse de l'IPP (d'après Rodriguez-Concepcion et Boronat, 2002). HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoenzymeA ; MEV, mévalonate ; MVP, 5-phosphomévalonate ; MVPP, 5-diphosphomévalonate ; IPP, isopentényl diphosphate ; DMAPP, diméthylallyldiphosphate ; AACT, acétoacétyl-CoA thiolase ; HMGS, HMG-CoA synthase ; HMGR, HMG-CoA réductase ; MVK, MEV kinase ; PMK, MVPkinase ; PMD, MVPP décarboxylase ; IDI, IPP/DMAPP synthase.

MEV kinase (MVK) pour donner le 5-phosphomévalonate. Ce composé est alors phosphorylé par la MVP kinase (PMK) pour donner le 5-diphosphomévalonate, décarboxylé par la MVPP décarboxylase (PMD) pour donner l'IPP (Fig. 8 ; Rodriguez-Concepcion et Boronat, 2002).

b. La voie du 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

Des expériences de marquage radioactif ont montré que chez certains organismes, comme les eubactéries, les algues vertes et dans les chloroplastes des plantes supérieures, la formation de l'IPP passe par une voie alternative indépendante du mévalonate (Kuzuyama *et al.*, 1998). Cette voie alternative de biosynthèse de l'IPP a été découverte pour la première fois par Rohmer *et al.* en 1993 chez *E. coli*. Elle a été nommée voie MEP car elle met en jeu le 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate.

→ L'élucidation de la voie chez les bactéries

Les eubactéries ne possèdent pas la voie MEV et la synthèse de l'IPP se fait via la voie MEP. L'identification des gènes impliqués dans cette voie a été réalisée grâce à des expériences utilisant des mutants pour la voie MEP d'*E. coli*. Aujourd'hui, toutes les étapes de cette voie sont caractérisées chez cette bactérie (Fig. 9).

L'étape initiale de la voie MEP est la formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) par la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate. Cette réaction est catalysée par la protéine DXP synthase (ou DXS). Pour la deuxième étape, Rohmer *et al.* (1996) ont proposé une réaction de réarrangement intramoléculaire du DXP, suivie d'une réaction de réduction qui conduit au 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP). L'enzyme responsable de cette biosynthèse a été isolée chez des mutants d'*E. coli* dont le métabolisme était bloqué entre le DXP et le MEP (Kuzuyama *et al.*, 1998 ; Takahashi *et al.*, 1998) : de tels mutants sont incapables de se multiplier sur un milieu de base et leur survie est assurée grâce à l'apport de MEP dans le milieu de culture. L'enzyme correspondant au gène muté *yaeM* est la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ou DXR.

Il est à noter que le DXP est non seulement un intermédiaire de la voie MEP mais également un intermédiaire des voies de synthèse de la thiamine, ou vitamine B1 (Julliard et Douce, 1991), et du pyridoxol, ou vitamine B6 (Hill *et al.*, 1989). Ainsi, la réaction catalysée par la DXR est la première étape spécifique de la voie conduisant aux terpènes.

Le MEP est transformé en 4-diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol (CDP-ME) en présence de CTP (Rohdich *et al.*, 1999) par l'enzyme CDP-ME synthase (CMS). Le CDP-ME est ensuite phosphorylé sur le carbone 2 pour donner le 4-diphosphocytidyl-2C-

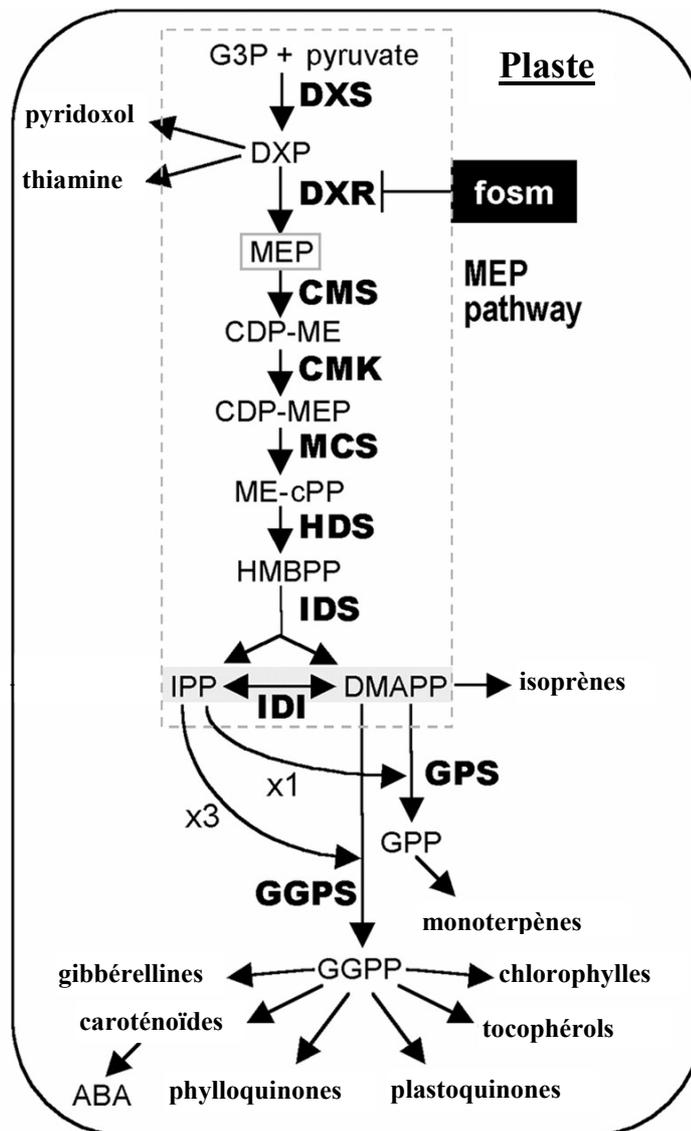


Figure 9 : Voie MEP plastidiale de synthèse de l'IPP (d'après Rodriguez-Concepcion et Boronat, 2002). G3P, glycéraldéhyde 3-phosphate ; DXP, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate ; MEP, 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate ; CDP-ME, 4-diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol ; CDP-MEP, 4-diphosphocytidyl-2C-méthylérythritol 2-phosphate ; ME-cPP, 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate ; HMBPP, 1-hydroxy-2-méthyl-2E-butényl 4-diphosphate ; IPP, isopentényl diphosphate ; DMAPP, diméthylallyl diphosphate ; DXS, DXP synthase ; DXR, DXP réductoisomérase ; CMS, CDP-ME synthase ; CMK, CDP-ME kinase ; MCS, ME-cPP synthase ; HDS, HMBPP synthase ; IDS, IPP synthase ; IDI, IPP/DMAPP synthase ; fosm, fosmidomycine ; ABA, acide abscissique ; GPP, géranyl diphosphate ; GPS, GPP synthase ; GGPP, géranylgéranyl diphosphate ; GGPPS, GGPP synthase.

méthylérythritol 2-phosphate (CDP-MEP) (Lüttgen *et al.*, 2000). Cette réaction est catalysée par l'enzyme CDP-ME kinase (CMK). L'étude cristallographique de la CMK a permis de définir les sites impliqués dans la réaction et pourrait donner des clés nécessaires à la définition d'agents anti-microbiens (Miailau *et al.*, 2003).

Chez *E. coli* le gène *ygbP*, codant pour la CDP-ME synthase, est étroitement lié sur le chromosome à un autre gène, *ygbB*. Herz *et al.* (2000) ont montré que l'enzyme codée par ce gène permet, en présence d'ions métalliques divalents (Mn^{2+} ou Mg^{2+}), la formation du 2C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (ME-cPP). Cette enzyme est appelée la ME-cPP synthase (MCS). L'étape suivante, catalysée par l'enzyme HMBPP synthase ou HDS, convertit le ME-cPP en 1-hydroxy-2-méthyl-2E-butényl 4-diphosphate (HMBPP) (Hecht *et al.* 2001).

La dernière étape de la voie MEP de biosynthèse de l'IPP est la formation de l'IPP et du DMAPP par conversion du HMBPP. Cette réaction est catalysée par la protéine IDS (IPP synthase) qui est capable de produire, à partir de HMBPP, de l'IPP et du DMAPP dans un rapport de 5 : 1, respectivement (Altincicek *et al.*, 2002). Avant l'obtention de ces résultats, il était admis, à cause de la présence de l'IPP isomérase, que le DMAPP était produit uniquement à partir de l'IPP, par une réaction d'isomérisation. Le fait que la protéine IDS soit capable de produire une certaine quantité de DMAPP, en plus de l'IPP, explique pourquoi l'absence d'IPP isomérase n'est pas létale pour les cellules.

Le séquençage complet de différents microorganismes a révélé une organisation «en cluster» des gènes impliqués d'une part dans la voie MVA et d'autre part dans la voie MEP de biosynthèse de l'IPP. Cependant, il n'existe pas de «cluster mixte», c'est-à-dire regroupant des gènes des deux voies (Hecht *et al.*, 2001).

Certains gènes de la voie MEP ont été isolés et caractérisés chez un grand nombre de plantes, néanmoins tous les orthologues végétaux n'ont pas encore été identifiés (Tableau 4).

→ Le fonctionnement de la DXR

La DXR, protéine que nous avons choisi d'étudier chez la rose, permet un réarrangement intramoléculaire du DXP pour donner le composé intermédiaire MEP par un processus de réduction aspécifique (Takahashi *et al.*, 1998). Cette réaction se fait en présence de NADPH et de cations divalents qui peuvent être indifféremment du Mn^{2+} , Co^{2+} ou Mg^{2+} . En 2000, un gène codant pour la DXR a été isolé chez la cyanobactérie *Synechococcus leopoliensis* (Miller *et al.*, 2000) Les cyanobactéries, à l'origine des chloroplastes des cellules végétales via l'endosymbiose primaire, auraient donc apporté aux plantes la synthèse des

Tableau 4 : Gènes de la voie MEP identifiés chez les végétaux

Gène	Espèce	Référence bibliographique
DXS	<i>Oryza sativa</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Araki <i>et al.</i> , 2000
	<i>Capsicum annuum</i>	Bouvier <i>et al.</i> , 1998
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Lois <i>et al.</i> , 2000
	<i>Mentha x piperita</i>	Lange <i>et al.</i> , 1998
DXR	<i>A. thaliana</i>	Schwender <i>et al.</i> , 1999
	<i>M. x piperita</i>	Lange et Croteau, 1999a
	<i>L. esculentum</i>	Rodriguez-Concepcion <i>et al.</i> , 2001
	<i>Ginkgo biloba</i>	Gong <i>et al.</i> , 2005
CDP-MEP synthase	<i>A. thaliana</i>	Rohdich <i>et al.</i> , 2000a
CDP-ME kinase	<i>L. esculentum</i>	Rohdich <i>et al.</i> , 2000b
HDS	<i>A. thaliana</i>	Gutiérrez-Nava <i>et al.</i> , 2004
IDS	<i>L. esculentum</i>	Botella-Pavía <i>et al.</i> , 2004
	<i>A. thaliana</i>	Guevara-García <i>et al.</i> , 2005

isoprénoïdes par la voie MEP. Cette enzyme est une cible potentielle pour l'obtention de médicaments contre la malaria (Jomaa *et al.*, 1999) ainsi que pour le développement de nouvelles classes d'herbicides et d'antibiotiques (Kuzuyama *et al.*, 1998).

Kuzuyama *et al.* (2000a) ont identifié, chez *E. coli*, les acides aminés impliqués dans la réaction enzymatique. Ainsi deux acides aminés sont importants dans la conversion du DXP en MEP : le Glu²³¹ et la Gly¹⁴. Ce dernier acide aminé est non seulement localisé dans le site de liaison au NADPH mais jouerait également un rôle dans le maintien de la structure secondaire ou tertiaire de la protéine. Par ailleurs, l'alignement des séquences protéiques de DXR d'*E. coli*, de bactéries et de plantes révèle l'existence de trois résidus histidine conservés (His¹⁵³, His²⁰⁹ et His²⁵⁷). Néanmoins, seule l'histidine en position 153 serait impliquée dans la catalyse.

La structure cristallographique de la DXR (Yajima *et al.*, 2002) a montré que la protéine est composée de trois domaines : un domaine N-terminal de liaison au NADPH, un domaine central et un domaine d'hélices α dans la partie C-terminale. Les résidus His¹⁵³, His²⁰⁹, Glu²³¹ et His²⁵⁷ sont localisés dans le domaine central de la protéine, leur chaîne tournée vers la poche catalytique. La portion de séquence située entre His²⁰⁹ et Met²¹⁴ pourrait jouer le rôle d'une écoutille qui fermerait le site actif quand le substrat est entré dans la poche catalytique. La fonction phosphate du DXP se fixe au résidu His²⁰⁹ via une liaison hydrogène qui pourrait fermer 'l'écouille' pour fixer le substrat de façon efficace. En effet, lorsqu'il n'y a pas de fonction phosphate au 1-désoxy-D-xylulose, l'oxydation du NADPH n'est pas observée. Les réactions d'isomérisation et de réduction nécessitent deux cations divalents. Ceux-ci interagissent avec les résidus Asp¹⁵⁰, Glu¹⁵², Glu²³¹ et Glu²³⁴. Enfin, les résidus Thr¹⁰ et Lys³⁷ sont importants dans la liaison du NADPH.

→ La DXR chez les plantes

La DXR a été caractérisée chez de nombreuses espèces végétales : *Arabidopsis thaliana* (Schwender *et al.*, 1999), *Mentha x piperita* (Lange et Croteau, 1999a), *Catharanthus roseus* (Veau *et al.*, 2000) et *Lycopersicon esculentum* (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001).

Le premier gène *Dxr* de plante a été isolé chez *A. thaliana* par une recherche dans des banques de données de séquences végétales présentant des homologies avec la DXR d'*E. coli* (Schwender *et al.*, 1999). Les analyses de Southern blot montrent que ce gène est présent en une seule copie dans le génome d'*A. thaliana* et qu'il contient 12 introns et 11 exons. Chez la tomate et le maïs, la DXR est également un gène unique (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001 ;

Hans *et al.*, 2004). Contrairement aux DXR bactériennes, les DXR de plantes ont une séquence d'adressage aux plastes située en position N-terminale (Lange et Croteau, 1999a). Par fusion avec la GFP, il a été montré que la DXR est importée dans les plastes des feuilles chez *A. thaliana*. Les DXR de plantes présentent aussi un domaine riche en proline proche de l'extrémité N-terminale de la protéine mature, absent des DXR bactériennes. Chez *A. thaliana*, le gène est exprimé dans la plupart des organes de la plante, y compris les racines, avec un niveau d'expression plus élevé dans les germinations et les inflorescences (Carretero-Paulet *et al.*, 2002).

De nombreux auteurs ont essayé de déterminer quelles sont les enzymes régulatrices de la voie MEP. Par exemple, lors du mûrissement du fruit de tomates, l'accumulation des caroténoïdes est inhibée par un traitement à la fosmidomycine, inhibiteur spécifique de la DXR. Cependant, cette augmentation de la production de caroténoïdes n'est pas le résultat de la surexpression du gène *DXR*, mais celui de la surexpression du gène *DXS*, situé en amont et qui code pour l'enzyme qui permet la synthèse du substrat de la DXR (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001). Chez *C. roseus*, les deux gènes, *CrDXR* et *CrDXS*, sont fortement surexprimés dans des cultures de cellules induites pour la production d'alcaloïdes monoterpéniques par rapport à des cultures non induites (Veau *et al.*, 2000). Chez le maïs, le gène *ZmDXR* est surexprimé dans les racines lors de l'infection par les champignons des mycorhizes arbusculaires. La protéine DXR est localisée dans les plastes qui sont connectés en réseau par de nombreux stromules, autour des arbuscules. La surexpression a pour conséquence l'accumulation d'apocaroténoïdes dans les cellules racinaires, dont le rôle dans la mycorhization n'est pas connu (Hans *et al.*, 2004). Chez la menthe poivrée, des plantes transformées avec l'ADNc de *MpDXR*, sous le contrôle du promoteur CaMV35S ont été obtenues. La surexpression du gène *DXR* chez la menthe a permis d'augmenter la production d'huile essentielle d'environ 50 %, sans en changer la composition (Mahmoud et Croteau, 2001).

Les étapes de la régulation de la voie MEP commencent tout juste à être élucidées. D'après les travaux décrits ci-dessus, suivant les modèles biologiques étudiés, les deux enzymes DXR et DXS sont potentiellement limitantes pour la synthèse de l'IPP. De plus, aucune étude n'a été menée sur des tissus floraux produisant des grandes quantités de terpènes, comme le pétale de rose. Le gène *DXR*, correspondant à la première étape spécifique de la voie de biosynthèse des terpènes, semble être un bon candidat pour débiter l'étude de la voie MEP chez la rose. La demande par les industries de la parfumerie et du secteur agro-

alimentaire de produits d'origine naturelle étant croissante, la surexpression de la DXR pourrait permettre une augmentation de la production des composés volatils chez la rose. Enfin, la caractérisation de ce gène pourrait apporter des informations sur l'absence de parfum chez certaines variétés Hybrides de Thé.

2. Les étapes de l'IPP aux terpènes

a. Les prényltransférases et les terpènes synthases

→ Les prényltransférases

Les prényltransférases catalysent la condensation de l'IPP avec un substrat allylique comme le DMAPP, le GPP ou d'autres diphosphates d'isoprénoïdes de plus grande taille (Clastre *et al.*, 1993 ; Sommer *et al.*, 1995).

Il existe trois types de prényltransférases (Fig. 10) :

- La géranyl diphosphate synthase (GPPS) permet d'obtenir un squelette en C10, le GPP, précurseur des monoterpènes.

- La farnésyl diphosphate synthase (FPPS) assure la formation d'un squelette en C15, le FPP précurseur des sesquiterpènes. Deux molécules de FPP peuvent aussi se condenser pour donner des triterpènes en C30 (brassinostéroïdes, phytostérol...).

- La géranylgéranyl diphosphate synthase (GGPPS) donne un squelette en C20, le GGPP, précurseur des diterpènes (gibbérellines, tocophérol...) ; deux molécules de GGPP peuvent aussi se condenser pour donner des tétraterpènes en C40 (caroténoïdes).

Il est admis que la voie MEP plastidiale de synthèse de l'IPP est à l'origine de la synthèse du GPP et GGPP, tandis que le FPP dérive de l'IPP synthétisé par la voie MEV cytoplasmique ou mitochondriale. La nature des terpènes synthétisés par les plantes est donc principalement déterminée par la spécificité des prényltransférases.

La comparaison des séquences des différentes prényltransférases a mis en évidence l'existence de domaines conservés, notamment deux domaines riches en résidus aspartate (DDXXD, avec X représentant n'importe quel résidu aminé) qui sont essentiels pour l'activité catalytique. Les résidus aspartate lieraient le groupement diphosphate de l'IPP et le substrat allylique par l'intermédiaire d'un pont magnésium. Des expériences de mutagenèse ont montré que la tyrosine 81 était en partie responsable de la spécificité de produit. En effet,

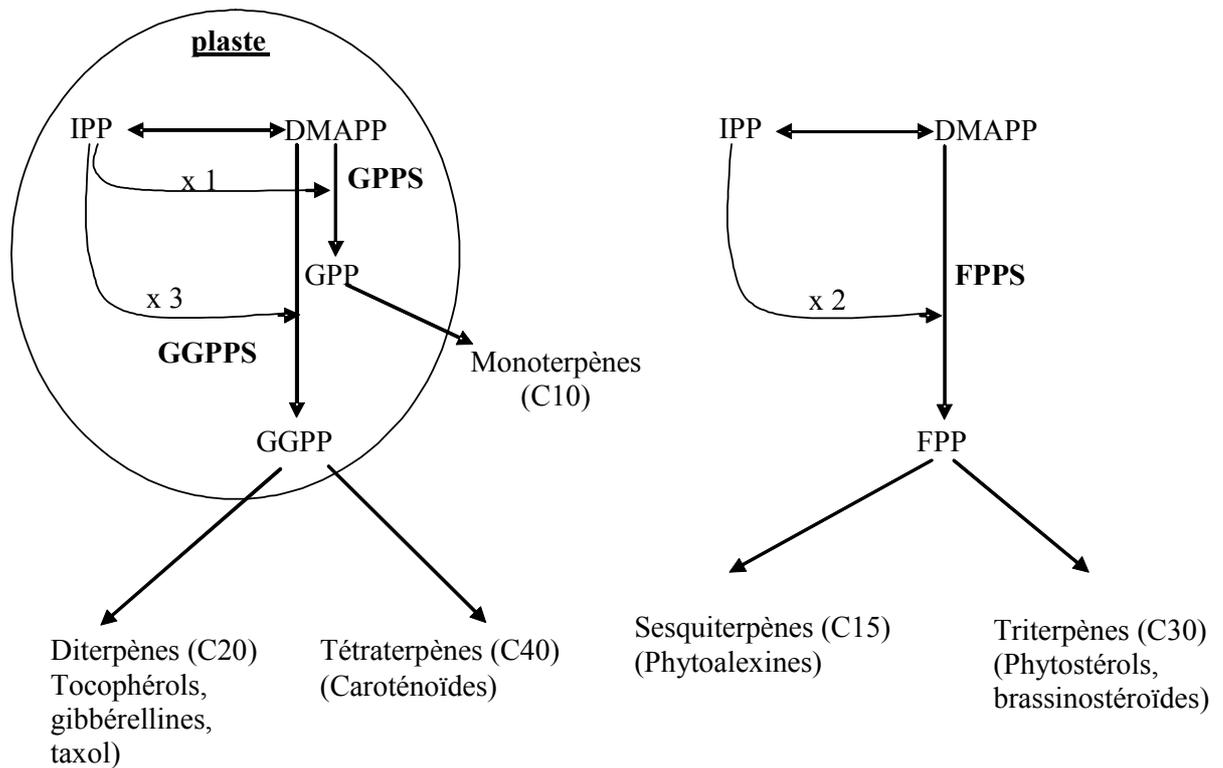


Figure 10 : Différentes classes de terpènes et de prényltransférases. IPP, isopentényl diphosphate ; DMAPP, diméthylallyl diphosphate ; GPP, géranyl diphosphate ; GPPS, GPP synthase ; GGPP, géranylgéranyl diphosphate ; GGPPS, GGPP synthase ; FPP, farnésyl diphosphate ; FPPS, FPP synthase.

lorsque ce résidu est muté en un résidu histidine, la FPPS perd son activité FPPS et acquiert la capacité à produire du GGPP (Ohnuma *et al.*, 1996a ; Ohnuma *et al.*, 1996b).

La GPPS permet la formation du GPP, précurseur de tous les monoterpènes, cycliques ou acycliques. Les premières purifications de GPPS ont été effectuées chez *Salvia officinalis* (Croteau et Purkett, 1989), *Lithospermum erythrorhizon* (Heide et Berger, 1989), *Vitis vinifera* (Clastre *et al.*, 1993) et *Pelargonium roseum* (Suga et Endo, 1991).

La première séquence nucléotidique de GPPS a été obtenue en 1999 chez *Mentha x piperita* (Burke *et al.*, 1999). La purification de la protéine montre qu'elle est en fait constituée de deux sous-unités de taille différente (SSU, small subunit, 28 kDa et LSU, large subunit, 37 kDa). A partir de ces deux séquences protéiques, deux ADNc ont été isolés dans une banque d'EST de glandes sécrétrices de menthe poivrée. La LSU présente jusqu'à 75 % d'identité avec les GGPPS. Cependant, prises individuellement, aucune des deux sous-unités n'est capable de produire du GPP ; il faut co-exprimer les deux protéines pour produire une GPPS fonctionnelle. Chez la menthe, la GPPS est donc un hétérodimère ou un hétérotétramère (Burke et Croteau, 2002).

D'autres séquences de GPPS ont été isolées par la suite. Les études ont abouti à la conclusion qu'il existait deux formes de GPPS :

- une forme hétérodi- ou hétérotétramérique, isolée et caractérisée chez *Mentha piperita* (Burke *et al.*, 1999 ; Burke *et al.*, 2004) et *Antirrhinum majus* (Tholl *et al.*, 2004),
- une forme homodimérique, isolée et caractérisée chez *A. thaliana* (Bouvier *et al.*, 2000) et *Abies grandis* (Tholl *et al.*, 2001 ; Burke et Croteau, 2002) et partiellement isolée chez d'autres espèces (*Citrus sinensis*, accession AJ243739 ; *Quercus robur*, accession AJ298245).

La GPPS d'*A. majus* est un hétérodimère constitué d'une SSU et d'une LSU, voisine des GGPPS (Tholl *et al.*, 2004). Contrairement à ce qui a été décrit chez la menthe, lorsque le gène codant pour la LSU d'*A. majus* est exprimé seul dans des cellules bactériennes, on observe une activité GGPPS. Par contre, la SSU d'*A. majus* n'a aucune activité prényltransférase. Le gène codant pour la LSU d'*A. majus* présente une expression constitutive alors que le gène codant pour la SSU est exprimé spécifiquement dans les pétales et en étroite corrélation avec la production de monoterpènes. Les LSU des GPPS hétéromériques seraient responsables de l'activité catalytique, alors que les SSU seraient responsables de la spécificité de substrat. En effet, la coexpression, chez *E. coli*, de la SSU de

la GPPS de Menthe et de la GGPPS d'*Abies grandis* permet l'obtention d'un hétérotétramère fonctionnel, ayant une activité GPPS (Burke et Croteau, 2002).

Les GPPS homodimériques ont des séquences en commun avec les autres prényltransférases. Par exemple, elles présentent toutes les motifs DDXXD et FQXXDDXD, impliqués dans la liaison des substrats (Bouvier *et al.*, 2000). Chez *Abies grandis*, Burke et Croteau (2002) ont isolé quatre séquences très similaires entre elles (> 69 %). Exprimées chez *E. coli*, trois de ces enzymes ont une activité GPPS alors que la quatrième a une activité GGPPS. Elles présentent un pourcentage d'identité assez bas avec la GPPS d'*A. thaliana* (25 %). Ceci suggère qu'il n'est pas possible, au vu de la seule séquence, de prédire l'activité d'une prényltransférase.

La localisation subcellulaire de la GPPS est controversée. En effet, certaines études montrent qu'elle est cytosolique (Sommer *et al.*, 1995), tandis que d'autres études ont mis en évidence un adressage aux plastes (Clastre *et al.*, 1993 ; Burke *et al.*, 1999). Chez *A. majus* des expériences d'immunomarquage montrent clairement que la SSU de la GPPS est localisée dans les leucoplastes des cellules de l'épiderme du pétale (Tholl *et al.*, 2004). Chez *A. thaliana*, deux isoformes de la GPPS seraient produites en fonction de la méthionine utilisée pour l'initiation de la transcription du gène : la forme la plus longue posséderait un peptide d'adressage aux plastes, contrairement à la forme courte. Ces deux formes seraient impliquées dans des voies de synthèse différentes (Bouvier *et al.*, 2000). Chez *Lithospermum erythrorhizon*, la GPPS est impliquée dans la synthèse de la shikonine qui est un dérivé de monoterpène (Heide et Berger, 1989). Cette synthèse peut être inhibée par la mévinoline, inhibiteur spécifique de la voie cytosolique MEV de synthèse de l'IPP (Sommer *et al.*, 1995). Il pourrait donc exister plusieurs formes différentes de ces enzymes, agissant dans les plastes ou dans le cytosol.

Récemment une GPPS animale a été isolée pour la première fois chez *Ips pini*, le scolyte du pin. Chez cette espèce, la protéine est impliquée dans la synthèse des monoterpènes qui servent de phéromones d'agrégation (Gilg *et al.*, 2005).

→ Les terpène synthases

Toutes les TPS sont assez similaires dans leurs propriétés physiques et chimiques : en effet, elles nécessitent la présence d'un ion métallique divalent comme cofacteur de la catalyse, et toutes opèrent suivant des mécanismes électrophiles inhabituels (Trapp et Croteau, 2001b). Des analyses de phylogénie entre les différents gènes *Tps* isolés chez les

angiospermes et les gymnospermes ont permis de subdiviser cette famille en 6 sous-familles, désignées *Tpsa* jusqu'à *Tpsf*, dans lesquelles chaque membre possède au moins 40 % d'identité (Fig. 11) (Bohlmann *et al.*, 1998).

Les sous-familles *Tpsa* et *Tpsb* regroupent respectivement les sesquiterpène synthases et les monoterpène synthases des angiospermes, tandis que les terpène synthases des gymnospermes sont toutes regroupées au sein de la même famille *Tpsd*. Ceci suggère que les TPS de Gymnospermes ont évolué à partir d'un ancêtre commun, indépendamment des TPS d'Angiospermes.

Croteau *et al.* (1990) ont montré qu'environ 30 à 40 produits cycliques sont formés chez la menthe à partir du GPP grâce à autant de monoterpène synthases. Toutes les monoterpène synthases présentent des domaines conservés :

- Un site putatif d'adressage aux plastes,
- des motifs aspartate DDXXD, communs à toutes les TPS et aux prényltransférases,
- des motifs arginine en tandem (RR), spécifiques des monoterpène synthases, indispensables pour convertir le géranyl diphosphate en linalyl diphosphate (Lücker *et al.*, 2002 ; Shimada *et al.*, 2004).

Chez la rose, la seule TPS caractérisée à ce jour est une germacrène D synthase. L'ADNc correspondant à cette enzyme a été isolé d'une banque d'ESTs de pétales de *Rosa x hybrida* 'Fragrant Cloud', variété très parfumée. Cette sesquiterpène TPS semble assez spécifique puisque le seul produit formé est le Germacrène D, tout au moins *in vitro*. L'expression de ce gène est maximale dans les pétales au moment de l'émission des composés volatils. Il n'est pas exprimé dans les feuilles. Dans les pétales d'une autre variété de rose 'Golden gate', dépourvue de parfum, son expression est indétectable (Gutermann *et al.*, 2002).

b. La maturation des terpènes

Les TPS permettent d'obtenir à partir du GPP, du FPP et du GGPP les squelettes primaires des mono-, sesqui- et diterpènes, respectivement. Pour aboutir aux produits finaux, ces squelettes primaires doivent subir d'autres modifications mettant en jeu des réactions d'hydroxylation, d'oxydation, de réduction de double liaison, d'acylation, de glycosylation ou de méthylation (Lange et Croteau, 1999a). Les enzymes impliquées dans cette maturation sont très diverses.

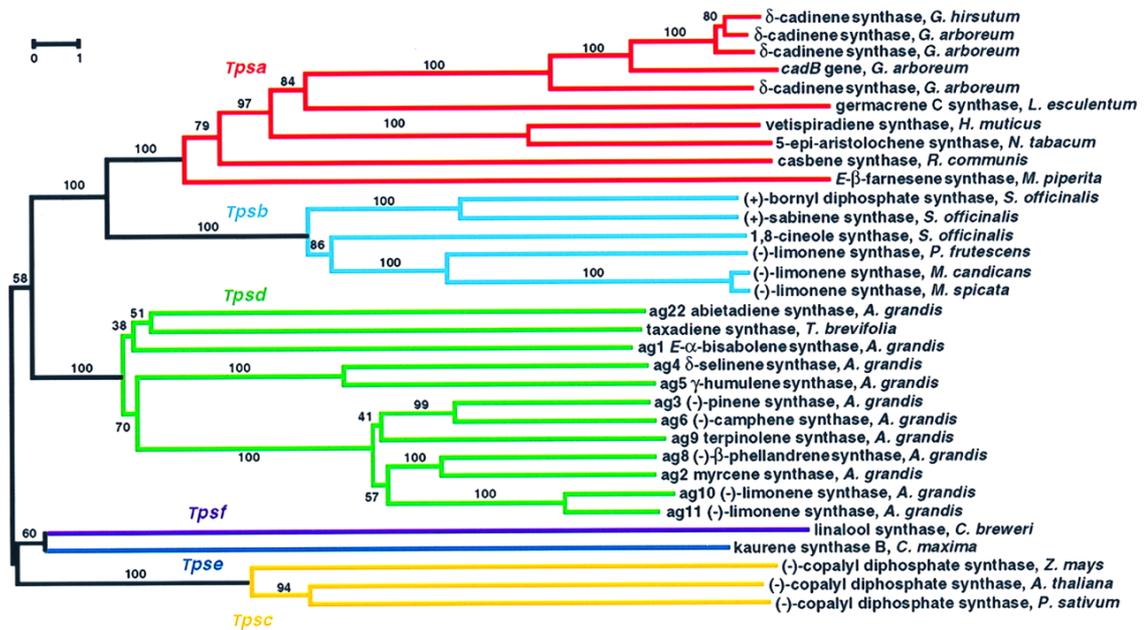


Figure 11 : Arbre phylogénétique des terpène synthases (d'après Bohlmann *et al.*, 1998). Arbre construit selon les distances de Dayhoff et la méthode de 'neighbor-joining'. L'échelle représente une divergence de 1 %. Les nombres représentent les valeurs actuelles de bootstrap des branches.

Chez la menthe, toutes les enzymes de la voie de biosynthèse des monoterpènes ont été isolées et caractérisées et la localisation subcellulaire des enzymes a été étudiée. Il a ainsi été montré que, si les premières étapes de la voie de biosynthèse des monoterpènes (formation de l'IPP, du GPP et des squelettes primaires) sont plastidiales, les étapes ultérieures ont lieu dans des sites très différents. Par exemple, la limonène-3-hydroxylase est une enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique, la (-)-isopipéridone réductase possède un adressage mitochondrial, tandis que la formation de la (-)-menthone a lieu dans le cytoplasme des cellules (Turner et Croteau, 2004 ; Ringer *et al.*, 2005 ; Davis *et al.*, 2005).

Dans les pétales de rose, une Acétyl-Coenzyme A géraniol/citronellol acétyltransférase (RhAAT1) permet à partir du géraniol la formation de l'acétate de géranyl, ester volatil qui contribue à l'arôme de cette fleur (odeur de rose et de lavande, légèrement fruitée). Cette enzyme a une spécificité de substrat peu importante puisqu'elle peut accepter d'autres alcools, comme le citronellol ou le 1-octanol (Shalit *et al.*, 2003). Elle appartient à la famille des acétyltransférases de type BAHD (St-Pierre et De Luca, 2000). Elle est exprimée exclusivement dans les pétales, au moment du pic de l'émission de parfum.

c. L'utilisation des deux voies de biosynthèse

Depuis la découverte de la voie MEP de biosynthèse de l'IPP en 1993, il était admis qu'il existait une compartimentation nette des voies de biosynthèse des différentes classes de terpénoïdes. Ainsi la voie MEV cytosolique et mitochondriale donne le FPP, précurseur des sesqui- et triterpènes, comme les stérols (modulateurs de l'architecture membranaire et des processus de croissance et de développement), les brassinostéroïdes (hormones), le dolichol (impliqué dans la glycosylation protéique) et le groupement prényl utilisé lors de la prénylation protéique et la biosynthèse des cytokinines. L'IPP et le DMAPP produits par la voie MEP plastidiale sont à l'origine d'une part du GGPP, précurseurs des di- et tétraterpènes, associés à la photosynthèse (caroténoïdes et chaînes des chlorophylles, plastoquinones et phylloquinones) et aux hormones (gibbérellines et acide abscissique), et d'autre part du GPP, précurseur des monoterpènes, impliqués dans les mécanismes de défense et d'attraction des pollinisateurs.

Mais la scission des deux voies de biosynthèse de l'IPP n'est pas aussi tranchée. En effet, l'IPP dérivé de la voie MEV peut être utilisé pour la synthèse des terpènes dans les plastes et inversement l'IPP dérivé de la voie MEP peut être exporté dans le cytoplasme (Kasahara *et al.*, 2002). Des flux des autres prényl diphosphates (GPP, FPP ou GGPP) entre le cytoplasme et les plastes peuvent également être envisagés. En effet, des expériences de

marquage et d'inhibition spécifique des voies de biosynthèse ont révélé que certains composés ont une origine mixte, impliquant à la fois la voie MEV et la voie MEP (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2004).

Par exemple, les fleurs de camomille, *Matricaria recutita*, synthétisent des sesquiterpènes, notamment du chamazulène, dont l'origine est mixte (Adam et Zapp, 1998 ; Adam *et al.*, 1999). Des expériences de marquage radioactif ont montré que le GPP et l'IPP produits par la voie MEP étaient transférés dans le cytoplasme et mis en présence de l'IPP dérivé de la voie MEV. Dans le cytoplasme, GPP et IPP plastidiaux, d'une part, et IPP cytoplasmique, d'autre part, sont utilisés par la FPPS pour former le FPP. Une origine mixte MEV/MEP a été démontrée pour d'autres composés terpéniques comme les monoterpènes et sesquiterpènes volatils émis par le haricot de Lima (Piel *et al.*, 1998). L'exemple le plus documenté concerne les sesquiterpènes comme le nérolidol émis par l'épiderme des pétales d'*A. majus* (Dudareva *et al.*, 2005). Dans les pétales des fleurs de cette espèce, seule la voie MEP plastidiale est active pour la formation des terpènes volatils. La circulation de l'IPP se fait de manière unidirectionnelle, des plastes vers le cytoplasme. Il pourrait donc se produire une sous-régulation d'une des voies dans certaines conditions environnementales ou dans des types cellulaires spécifiques.

B. Les autres composés volatils

Le parfum des fleurs est un mélange complexe de composés volatils dont les terpènes ne représentent en général qu'une partie. Suivant les espèces, d'autres composés sont présents ; les principaux sont les dérivés d'acides gras et les composés aromatiques.

1. La biosynthèse des dérivés d'acides gras

De nombreux composés volatils responsables de la 'note verte' dans les fruits et les fleurs, sont des dérivés de l'hexane comme le *cis*-3-hexénol (Jirovetz *et al.*, 2002). Ils sont aussi présents dans les feuilles sous le nom de « green leaf volatiles », où ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les insectes prédateurs. Ils sont produits par la dégradation d'acides gras polyinsaturés par la voie de la lipoxigénase (Fig. 12). Les étapes les plus déterminantes de cette voie sont :

- La peroxydation de l'acide linoléique et linoléique par la lipoxigénase ou LOX,
- la lyse des hydroperoxydes formés grâce à une réaction catalysée par

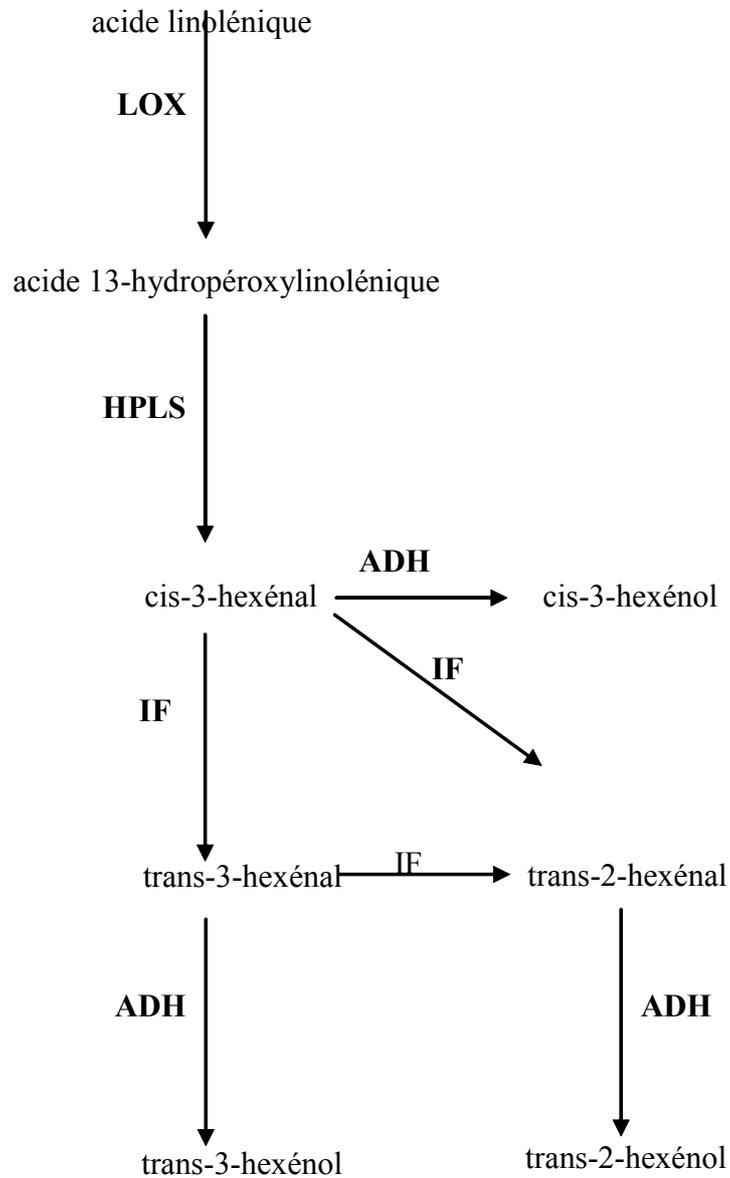


Figure 12 : Voie de biosynthèse des dérivés d'acides gras (d'après Paré et Tumlinson, 1999). LOX, lipoxygénase ; HPLS, hydroperoxyde lyase ; IF, facteur d'isomérisation ; ADH, alcool déshydrogénase.

l'hydroperoxyde lyase ou HPLS.

L'étude de mutants pour ces deux enzymes a été menée chez la pomme de terre (Salas *et al.*, 2005). Les mutants ne produisant pas d'hydroperoxyde lyase ont une activité lipoxigénase augmentée, avec production de nombreux composés en C5. L'extinction de LOX conduit à une réduction très importante des composés volatils des feuilles.

Chez *Mentha viridis* et *Mentha pulegium*, Gargouri *et al.* (2004) ont isolé une hydroperoxyde lyase à partir des feuilles. Cette enzyme est responsable de la formation de l'hexanal à partir de l'acide 13(*S*)-hydroperoxy-linoléique d'une part et de la formation du cis-3-hexénal à partir de l'acide 13(*S*)-hydroperoxy-linolénique d'autre part. Le cis-3-hexénal peut être isomérisé en trans-2-hexénal.

Chez la tomate, il existe au moins cinq isoformes de LOX, TomloxA à E. Les gènes correspondant à ces enzymes ont été récemment clonés (Chen *et al.*, 2004a). Par l'utilisation de plantes transgéniques altérées dans la synthèse de ces protéines, les auteurs ont montré qu'une des isoformes, TomloxC, était impliquée dans la formation des composés parfumés dérivés des acides gras présents dans le fruit. Par des fusions avec la GFP, ils ont également démontré que cette protéine est adressée aux chloroplastes, où elle pourrait utiliser indifféremment l'acide linoléique et l'acide linolénique comme substrats. Dans les germinations de *Cucumis sativus*, au contraire, il semble que certaines formes de LOX soient localisées dans les corps lipidiques (Weichert *et al.*, 2002).

Les produits de l'activité de cette enzyme sont métabolisés par l'hydroperoxyde lyase, conduisant ainsi à la formation d'aldéhydes en C6 comme l'hexanal. Plusieurs formes de LOX, localisées dans des organites différents, pourraient donc être à l'origine de ces composés.

Malgré ces recherches, la voie de biosynthèse des composés volatils dérivés des acides gras est peu étudiée. En particulier, dans les tissus floraux, aucune étude de la synthèse et de la localisation subcellulaire de ces composés n'a jusqu'ici été réalisée (Dudareva *et al.*, 2000).

2. La biosynthèse des composés aromatiques

Le métabolisme des composés aromatiques comprend des séries complexes de voies biochimiques (Fig. 13) qui fournissent aux plantes des centaines de composés, souvent spécifiques d'une espèce végétale. Tous ces composés dérivent du même précurseur, la L-phénylalanine. Classiquement, les composés aromatiques sont divisés en deux catégories (Knudsen *et al.*, 1993) :

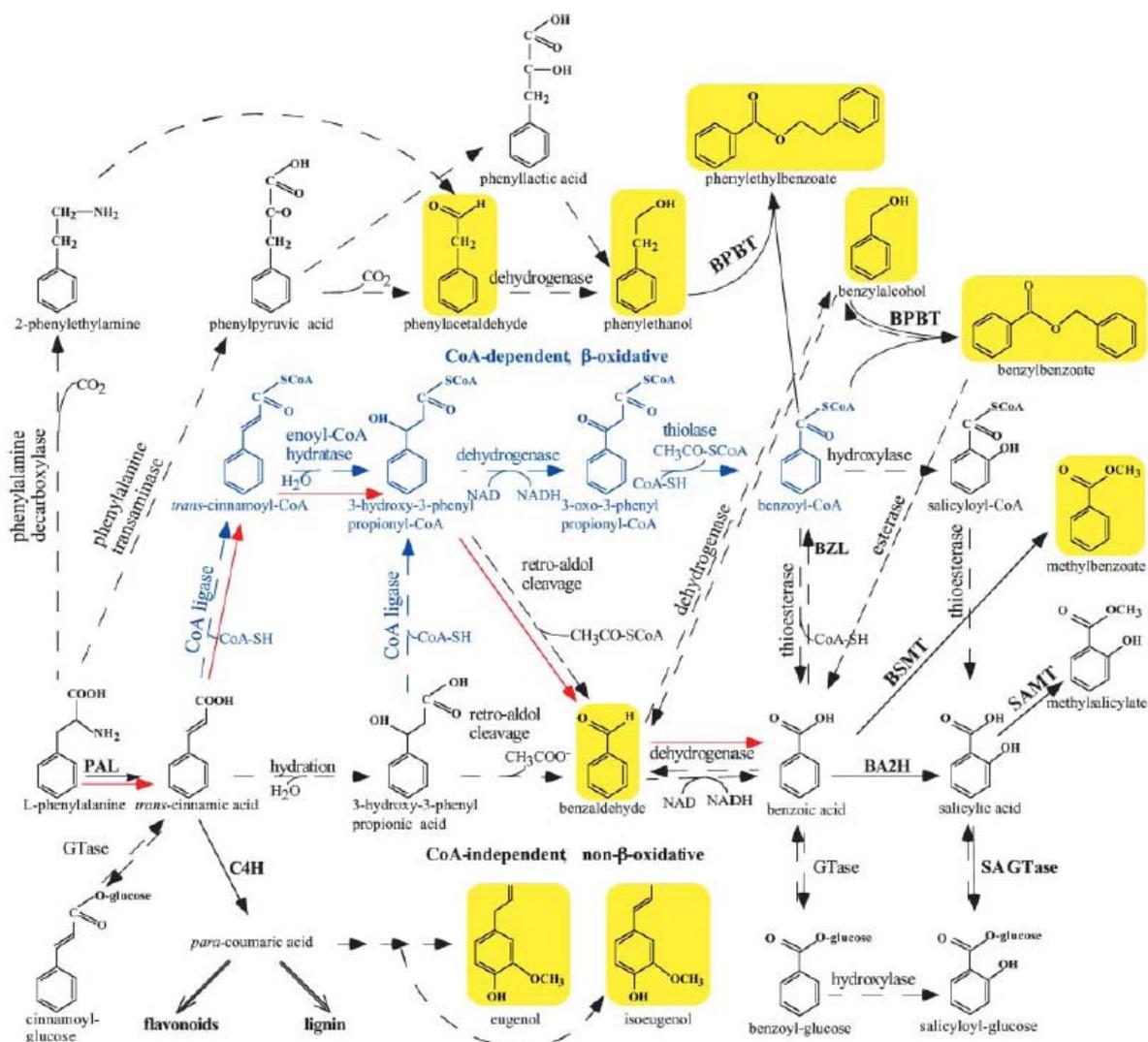


Figure 13 : Voies de biosynthèse des composés aromatiques (d'après Boatright *et al.*, 2004). La voie β -oxydative, dépendante du CoA, de synthèse de réduction des chaînes est en bleue, alors que la voie non β -oxydative, indépendante du CoA est en noir. Les flèches rouges indiquent la voie non β -oxydative dépendante du CoA. Les flèches pleines indiquent les réactions biochimiques caractérisées, alors que les flèches en pointillé indiquent des étapes possibles, non caractérisées. BSMPT et SAMT, S-adenosyl-L-met:benzoïque acide / salicylique acide et salicylique acide carboxyl méthyltransférase, respectivement ; BA2H, benzoïque acide 2-hydroxylase ; BZL, benzoate:CoA ligase ; C4H, cinnamique acide 4-hydroxylase ; SA Gtase, UDP-Glc:salicylique acide glucosyltransférase. Les composés volatils benzénoïdes et phénylpropanoïdes-associés encadrés en jaune sont les composés analysés dans le parfum floral du pétunia et dans les tissus du pétale.

– Les phénylpropanoïdes

La plupart des phénylpropanoïdes ne sont pas volatils. Les plus répandus sont ceux qui interviennent dans la synthèse de la lignine et les pigments comme les anthocyanes. Néanmoins, les phénylpropanoïdes qui sont réduits au niveau du carbone 9 (en aldéhyde, alcool ou alcane/alcène) et/ou présentent des additions alkyl sur les groupes hydroxyl du noyau benzénique ou sur le groupe carboxyl sont volatils. On peut citer l'eugénol et le méthyleugénol.

– Les benzénoïdes

Ils sont dérivés des phénylpropanoïdes par la coupure des carbones C8-C9. Le mécanisme exact de cette coupure n'est pas complètement élucidé (Boatright *et al.*, 2004). Ils forment une branche latérale de la voie générale des phénylpropanoïdes, à partir de l'acide trans-cinnamique. Le benzylalcool ainsi que le 2-phényléthanol et leurs dérivés sont très présents dans les parfums floraux (Knudsen et Tollsten, 1993). Le DMT et le TMB, synthétisés par les roses chinoises appartiennent aussi à cette catégorie de molécules.

a. La synthèse des composés aromatiques chez *Clarkia breweri*

Clarkia breweri et *Antirrhinum majus* sont deux espèces qui font l'objet de nombreuses études afin de comprendre les voies de biosynthèse des benzénoïdes dans les pétales.

Le parfum floral de *C. breweri*, espèce annuelle des côtes californiennes, est un mélange de 8 à 12 composés volatils. Les plus abondants sont le linalol, l'oxyde de linalol et le benzylacétate (Raguso et Pichersky, 1995). Néanmoins, eugénol, isoeugénol, méthyleugénol et isométhyleugénol sont aussi des constituants importants du parfum floral de cette espèce. Eugénol et isoeugénol ont une odeur piquante de clou de girofle, tandis que méthyleugénol et isométhyleugénol ont un parfum doux qui rappelle l'odeur d'herbe fraîchement coupée (Wang et Pichersky, 1998). L'enzyme S-Adénosyl-L-Méthionine:(iso)eugénol O-méthyltransférase (IEMT) catalyse le transfert d'un groupement méthyl sur l'eugénol et l'isoeugénol pour donner le méthyleugénol et l'isométhyleugénol, respectivement. Le gène correspondant à cette enzyme a été isolé et caractérisé (Wang *et al.*, 1997 ; Wang et Pichersky, 1998).

Le benzylacétate constitue jusqu'à 40 % des composés émis par les fleurs de *C. breweri*. Deux autres esters, le benzylbenzoate et le méthylsalicylate, comptent chacun pour environ 5 % des composés volatils totaux (Raguso et Pichersky, 1995). L'enzyme responsable de la formation du méthylsalicylate à partir du salicylate, la SAMT (salicylic acid

méthyltransférase) a été identifiée et caractérisée (Dudareva *et al.*, 1998a ; Ross *et al.*, 1999). de même que l'acétyl-CoA:benzylalcool acétyltransférase (BEAT), responsable de la formation du benzylacétate (Dudareva *et al.*, 1998b).

L'activité de ces deux enzymes est plus importante dans les pétales de *C. breweri* que dans les autres organes de la plante et varie avec le stade de développement. L'expression du gène *BEAT* dans les pétales est maximale au moment de l'anthèse parallèlement à l'évolution de l'activité enzymatique de la protéine BEAT et l'émission du benzylacétate. Néanmoins, trois jours après l'anthèse, les niveaux d'ARNm et l'émission des composés volatils diminuent alors que l'activité BEAT reste élevée pendant encore deux jours. Ceci suggère que l'enzyme est relativement stable (Dudareva *et al.*, 1998b).

b. La synthèse des composés aromatiques chez la rose

Certains composés aromatiques, comme le 2-phényléthanol, le DMT ou le TMB, sont des éléments importants de la fragrance des roses. Les travaux concernant cette classe de composés se sont multipliés au cours des trois dernières années.

Chez *Rosa x damascena*, l'espèce utilisée pour la production d'huile essentielle, le 2-phényléthanol représente 62 à 68 % des composés de l'huile extraite des pétales par solvant. En fournissant de la L-phénylalanine marquée radioactivement à des fleurs de *Rosa x damascena* en cours de développement, Watanabe *et al.* (2002) et Hayashi *et al.* (2004) ont montré que le 2-phényléthanol dérive de la L-phénylalanine selon plusieurs voies possibles (Fig. 8). L'importance respective des différentes voies n'est pas encore clairement établie. Dans les pétales, une grande partie du 2-phényléthanol est présent sous la forme non volatile d'un complexe avec le β -D-glucose, le 2-phényléthyl- β -D-glucopyranoside (Ackermann *et al.*, 1989 ; Oka *et al.*, 1999). Dans les boutons juste ouverts, le β -D-glucoside de phényléthanol est très abondant alors que la forme volatile est présente à l'état de traces. Au cours du développement floral, les quantités de 2-phényléthyl- β -D-glucopyranoside diminuent tandis que les quantités de 2-phényléthanol libre augmentent, parallèlement à une augmentation de l'activité β -glucosidase (Watanabe *et al.*, 2002). Les travaux récents de Hayashi *et al.* (2004) ont confirmé que l'activité β -glucosidase est liée à la production et à l'émission du 2-phényléthanol et que les composés glycosylés sont bien les précurseurs des formes volatiles. Il est à noter que certains monoterpènes comme le géraniol existent également dans la fleur sous forme glycosylée. Cependant, leur implication dans la régulation de l'émission du parfum est beaucoup moins certaine (Oka *et al.*, 1999).

Récemment, une approche génomique a été mise en œuvre par une équipe française

(Channelière *et al.*, 2002) et une équipe israélienne (Guterman *et al.*, 2002) pour isoler des gènes associés à la fragrance florale des roses. Une première banque d'ESTs a été obtenue à partir de pétales de *Rosa chinensis* 'Old blush' (Channelière *et al.*, 2002). 1794 séquences ont été isolées parmi lesquelles 35,8 % correspondent à des séquences de fonctions inconnues ou à des séquences absentes des bases de données. Ces séquences sont tout particulièrement intéressantes car elles pourraient être impliquées dans des fonctions spécifiques du pétale. Des fonctions putatives ont pu être attribuées aux 1151 séquences restantes. De très nombreuses séquences correspondent à des gènes ayant une fonction dans les processus de défense ou de stress ou codent pour des protéines associées aux membranes (protéines de transfert des lipides et métallothionéines par exemple). 9,2 % des séquences correspondent à des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Certaines séquences pourraient intervenir dans la production du parfum ou la synthèse des pigments : GGPPS, IPP isomérase, phytoène synthase, sesquiterpène cyclase, anthocyanidine synthase et protéine ressemblant à une leucoanthocyanidine dioxygénase.

Deux autres banques d'ESTs ont été obtenues à partir de pétales de deux variétés de roses Hybrides de Thé, 'Fragrant Cloud', parfumée, et 'Golden Gate', dépourvue de parfum (Gutermann *et al.*, 2002).

Grâce à ces banques d'ESTs et à une approche de génomique fonctionnelle, des gènes correspondant à des enzymes impliquées dans les dernières étapes de la biosynthèse du 3,5-diméthoxytoluène (DMT) ont été isolés et caractérisés parallèlement par les deux équipes de recherche (Scalliet *et al.*, 2002 ; Lavid *et al.*, 2002). Le DMT représente chez certaines variétés de rose comme 'Lady Hillingdon' jusqu'à 70 % des composés volatils émis par les pétales (Nakamura, 1987). Il est synthétisé à partir de l'orcinol par deux étapes successives de méthylation, catalysées par deux O-méthyltransférases : OOMT1 et OOMT2 (Scalliet *et al.*, 2002 ; Lavid *et al.*, 2002). L'expression des gènes correspondant à ces enzymes est spécifique des pétales et des anthères, sites de production du parfum chez la rose. De plus, elle est plus importante dans les pétales matures que dans les pétales jeunes (Scalliet *et al.*, 2002). Lavid *et al.* (2002) ont montré que l'OOMT1 catalyse préférentiellement la méthylation de l'orcinol, tandis que l'OOMT2 est responsable de la méthylation du 3-méthoxy 5-hydroxytoluène (MHT). La modélisation de la structure de ces deux enzymes montre que le résidu en position 127 dans la séquence de l'OOMT1 et en position 126 dans celle de l'OOMT2 est responsable de la spécificité de substrat (Scalliet, 2003). Des expériences de mutagenèse dirigée, visant à convertir la Tyr¹²⁷ en Phe¹²⁷ dans l'OOMT1 et la Phe¹²⁶ en Tyr¹²⁶ dans l'OOMT2 ont permis d'inverser la spécificité de substrat de chacune des deux enzymes, prouvant ainsi que ce

résidu est responsable de cette spécificité (Scalliet *et al.*, article sous presse). Le DMT est donc synthétisé à partir de l'orcinol par deux étapes successives de méthylation suivant une séquence maintenant bien définie (Fig. 14).

Les deux OOMT de rose sont capables de catalyser les dernières étapes de la synthèse du 1,3,5-triméthoxybenzène ou TMB, autre composé aromatique important de la fragrance florale de certaines variétés chinoises comme *Rosa chinensis* 'Old Blush'. Néanmoins, elles ne sont pas capables d'assurer la première étape de cette synthèse, la méthylation du phloroglucinol (Fig.14). Par une méthode de purification de protéines, Wu *et al.* (2004) ont isolé la protéine responsable de cette réaction, la phloroglucinol-*O*-méthyltransférase (POMT). Comme celui des OOMT, l'ARNm du gène *POMT* est préférentiellement accumulé dans les pétales, site principal de la synthèse des composés volatils.

Après analyse des articles décrits ci-dessus, il est manifeste que les composés aromatiques représentent la classe de composés la plus étudiée chez la rose. Certains composés, comme le DMT et le TMB, ont fait l'objet d'une attention particulière. Néanmoins, il reste que très peu de gènes impliqués dans la synthèse des composés volatils floraux ont été isolés et caractérisés chez cette plante.

C. L'ingénierie des composés volatils

Un des intérêts des composés volatils émis par les fleurs repose sur le fait qu'ils sont impliqués dans des relations plante/insecte, et notamment dans la pollinisation. D'autre part, les plantes aromatiques ont une valeur commerciale très importante. Elles sont la source de parfums, d'arômes pour l'industrie agro-alimentaire et possèdent des propriétés utiles à l'industrie pharmaceutique. La demande en composés aromatiques est légèrement supérieure à l'offre. La chimie a été utilisée pour pallier à ce déficit et produire des molécules de synthèse, mais dans certains cas, il est préférable d'utiliser les molécules naturelles (McCaskill et Croteau, 1997). Sans parler de l'intérêt fondamental évident de telles recherches, l'étude des mécanismes de production des composés volatils et l'identification des gènes impliqués dans leur biosynthèse pourraient être envisagées avec les buts appliqués suivants :

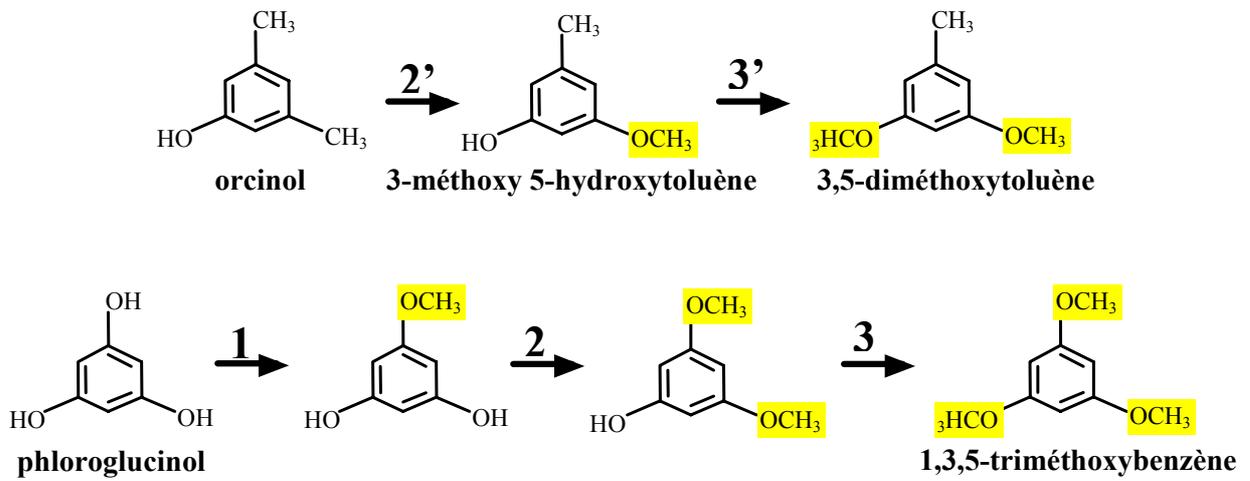


Figure 14 : Voie de biosynthèse du 3,5-diméthoxytoluène et du 1,3,5-triméthoxybenzène.
 1, phloroglucinol O-méthyltransférase ou POMT (Wu *et al.*, 2004) ; 2 et 2', orcinol O-méthyltransférase 1 ou OOMT1 (Scalliet *et al.*, 2002 ; Lavid *et al.*, 2002) ; 3 et 3', orcinol O-méthyltransférase 2 ou OOMT2 (Scalliet *et al.*, 2002 ; Lavid *et al.*, 2002).

- Connaître le rôle des composés individuels dans la pollinisation pour modifier le ‘bouquet floral’ de certaines espèces qui n’acceptent qu’un nombre réduit de pollinisateurs, comme le vanillier ou le cacaoyer, et ne peuvent être cultivées en dehors de leur habitat naturel sans la mise en place de techniques d’hybridation artificielles coûteuses (Dudareva et Nègre, 2005),
- fournir des plantes présentant des caractéristiques nouvelles à l’industrie de la floriculture,
- produire par des cultures de cellules des composés présentant des profils olfactifs recherchés comme les oxydes de rose et dont la synthèse est très coûteuse (Yamamoto *et al.*, 2002). Une telle approche pourrait être appliquée à la production d’huiles essentielles et de composés volatils possédant une valeur thérapeutique ou d’arômes pour l’industrie agro-alimentaire (Dudareva et Negre, 2005) ;
- augmenter la production de composés volatils intéressants, par exemple en inhibant les voies de synthèse des autres composés volatils mineurs ou en augmentant les quantités d’enzymes impliquées dans la voie de synthèse d’intérêt,
- améliorer la qualité des huiles essentielles, par exemple en inhibant l’expression de certains gènes correspondant à des protéines responsables de la synthèse de composés indésirables (Verpoorte et Memelink, 2002) ou allergisants (Chaintreau *et al.*, 2003).

Cependant, la manipulation de la production et de l’émission des composés volatils, nécessite non seulement d’isoler et de caractériser les gènes responsables de leur synthèse, mais également de connaître leur régulation.

1. La régulation de la production des composés volatils

La production et l’émission de composés volatils particuliers dans l’atmosphère dépend à la fois du taux de leur synthèse, mais également de leur libération. Ces deux processus sont contrôlés par des facteurs physiologiques qui déterminent la quantité de composés synthétisés en influençant la disponibilité en intermédiaires de la voie de biosynthèse et l’activité enzymatique. Des facteurs physico-chimiques interviennent en affectant l’émission des composés, de leur site de biosynthèse vers l’air ambiant.

2. Les rythmes de production et d'émission des composés volatils

Généralement, les boutons floraux n'ont pas de parfum et la fragrance caractéristique de la fleur apparaît pendant l'anthèse quand les pétales s'ouvrent (Schade *et al.*, 2001). Il est ainsi possible de produire les composés du parfum floral à partir de composés précurseurs présents dans les boutons floraux de *Jasminum polyanthum*, lorsqu'on les traite avec une préparation d'enzymes extraites de fleurs épanouies (Watanabe *et al.*, 1993). Ceci met en évidence le fait que les dernières réactions de biosynthèse sont régulées au cours du développement et ont lieu uniquement lorsque la fleur commence à s'ouvrir : soit les enzymes sont nouvellement synthétisées, soit elles sont activées au cours de l'épanouissement floral. Chez de nombreuses fleurs, il a été démontré que les composés volatils sont généralement synthétisés *de novo* dans les cellules sécrétrices à partir desquelles ils sont émis. (Dudareva *et al.*, 1996 ; Dudareva et Pichersky, 2000 ; Chen *et al.*, 2004b; Gang *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2002 ; Kolosova *et al.*, 2001b). Il a également été montré que la biosynthèse des composés volatils est bien corrélée à l'émission (Pichersky *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1997 ; Dudareva *et al.*, 2000) et que l'émission est contrôlée par l'activation des voies métaboliques spécifiques à la production de ces molécules. En effet, on observe généralement l'accumulation d'ARNm parallèlement à l'émission des composés volatils (Wang *et al.*, 1997 ; Dudareva *et al.*, 1998a ; Guterma *et al.*, 2002).

Chez de nombreuses espèces végétales, l'émission des composés volatils au cours de la journée suit un rythme cyclique. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de cette émission commencent seulement à être étudiés. Le rythme d'émission des composés volatils est contrôlé par des facteurs exogènes, comme la lumière et la température (Jakobsen et Olsen, 1994), ou par des facteurs endogènes (Loughrin *et al.*, 1991 ; Helsper *et al.*, 1998), ou bien encore par une combinaison des deux types de facteurs (MacTavish *et al.*, 2000). Il est connu depuis de nombreuses années que les composés volatils floraux jouent un rôle dans la pollinisation (Knudsen et Tollsten, 1993, Jurgens *et al.*, 2000). Des rythmes diurnes ou nocturnes ont parfois été reliés à l'activité de l'insecte pollinisateur. Ainsi, les espèces pollinisées le jour par les abeilles ont une émission diurne, alors que les espèces pollinisées la nuit, comme le pétunia (Verdonk *et al.*, 2005), ont une émission nocturne, contrôlée de façon endogène par un rythme circadien (Altenburger et Matile, 1988). Pendant longtemps, on a pensé que la rythmicité de l'émission diurne n'était pas de nature circadienne mais était contrôlée par le niveau d'irradiation (Jakobsen et Olsen, 1994 ; Altenburger et Matile, 1990). Helsper *et al.* ont montré pour la première fois en 1998 que l'émission diurne des composés volatils chez la rose obéissait à un rythme circadien. En effet, chez *Rosa x hybrida* 'Honesty'

les composés volatils, monoterpènes dérivés d'acides gras et composés aromatiques, sont émis au cours du développement floral suivant un rythme diurne, avec un maximum au milieu de la phase de jour. Ce rythme perdure lorsque la plante est maintenue constamment soit à l'obscurité, soit à la lumière et sa période est légèrement supérieure à 24 h : ces caractéristiques définissent un rythme circadien. Toujours chez la rose, Picone *et al.* (2004) ont montré que l'évolution de l'émission de certains composés comme le 2-phényléthanol pourrait être due à des changements rythmiques dans les proportions de formes libres et glycosylées de ces molécules.

Chez d'autres espèces comme *A. majus*, l'émission diurne des composés du parfum est également contrôlée par un rythme circadien (Dudareva *et al.*, 2000 ; Kolosova *et al.*, 2001b). L'émission diurne de méthylbenzoate, composé majoritaire, coïncide avec la période d'activité des bourdons. Il est synthétisé à partir de l'acide benzoïque par une réaction catalysée par la S-adénosyl-L-méthionine:acide benzoïque carboxyl méthyltransférase (BAMT). L'activité BAMT est constante sur une période de 48 h et élevée pendant la nuit, alors que l'émission de méthylbenzoate est maximale le jour. Par contre, les quantités d'acide benzoïque, substrat de l'enzyme BAMT, évoluent de façon rythmique au cours d'une période de 24 h, et ce rythme est maintenu lors d'une période nocturne prolongée. Ceci indique que la rythmicité d'émission du méthylbenzoate est liée, au moins en partie, à la rythmicité de la disponibilité en substrat (Kolosova *et al.*, 2001b).

a. Le contrôle génétique de la production des composés volatils

Au sein d'un même genre, toutes les espèces n'ont pas la même capacité de production. Dans le genre *Clarkia*, les espèces *C. concinna* et *C. breweri* sont apparentées, la première étant l'ancêtre supposé de la seconde. *C. concinna* est inodore, tandis que le parfum de *C. breweri* est puissant, avec une grande quantité de benzylacétate (Raguso et Pichersky, 1995). De nombreuses études ont été menées afin de comprendre la régulation différentielle des gènes du parfum chez ces deux espèces du même genre.

Par exemple, chez *C. concinna*, le gène *BEAT* (benzylalcool acétyltransférase), impliqué dans la synthèse du benzylacétate, est très faiblement exprimé dans les pétales. Ceci est dû au fait que, dans la majorité des cas, l'unique intron du gène n'est pas épissé efficacement, ce qui conduit à la synthèse d'un ARNm non fonctionnel. Dans le cas où l'intron est épissé, l'enzyme synthétisée a une affinité plus importante pour des substrats différant du benzylalcool. Ainsi, la régulation de l'activité *BEAT* chez *Clarkia* implique des mécanismes post-transcriptionnels différents selon les espèces (Nam *et al.*, 1999). Selon les

auteurs, le gène *BEAT* de *C. breweri* pourrait avoir évolué à partir d'un gène codant pour une acétyltransférase dont le substrat serait proche du benzylalcool. Alternativement, il est possible que les fleurs de *C. concinna* aient perdu au cours de l'évolution leur capacité à produire du benzylacétate. Le gène *BEAT* aurait muté, perdant ainsi sa fonction *in vivo*.

En plus de composés aromatiques comme le benzylacétate, les fleurs de *C. breweri* synthétisent aussi un alcool monoterpénique en grande quantité, le linalol. Bien que les fleurs de *Clarkia* soient pollinisées la nuit, aucun rythme d'émission de ce composé n'a été détecté. Le gène responsable de la dernière étape de sa synthèse, *LIS* (linalol synthase) est le premier gène d'une voie de biosynthèse des composés floraux à avoir été cloné (Dudareva *et al.*, 1996). Il est exprimé majoritairement dans les pétales et le pistil de *C. breweri*. Dans cet organe, la majorité du linalol produit est converti en oxyde de linalol. *C. concinna* émet aussi du linalol mais dans des concentrations 1000 fois plus faibles que *C. breweri*. Le gène *LIS* est aussi présent chez cette espèce mais son expression est beaucoup plus faible et restreinte au stigmate de la fleur. Ces résultats montrent que chez *C. breweri*, l'expression de *LIS* a probablement été augmentée et l'éventail de tissus exprimant ce gène a été élargi par rapport à *C. concinna*. Des différences dans les séquences des promoteurs de ce gène chez les deux espèces ont été notées mais on ne sait pas si ces différences sont responsables des différences d'expression observées (Raguso et Pichersky, 1999).

De nombreux auteurs ont étudié les composés volatils produits par les plantes et noté les différences existant entre les profils des espèces sauvages et des espèces cultivées. Chez les fraises cultivées octoploïdes (variétés de *Fragaria x ananassa*), l'arôme est le résultat d'un mélange complexe de 300 composés. Les espèces de fraisier cultivées produisent majoritairement du linalol (monoterpène) et du nérolidol (sesquiterpène), alors que chez les fraises sauvages diploïdes (*F. vesca* par exemple), on trouve essentiellement des monoterpènes variés (α -pinène, β -myrcène...) et de l'acétate de myrtényle.

Chez les espèces cultivées, le gène *FaNES1*, codant pour une nérolidol synthase, a été isolé (Aharoni *et al.*, 2004). Ce gène est absent du génome des espèces sauvages diploïdes. Il code pour une protéine qui est tronquée à son extrémité N-terminale, probablement cytoplasmique. L'enzyme est responsable de la synthèse du linalol et du nérolidol à partir du GPP et du FPP, respectivement. Les auteurs suggèrent que l'implication originale de cette enzyme dans deux voies de synthèse différentes vient de sa localisation dans le cytoplasme, où elle est mise en contact avec le GPP et le FPP.

L'arôme des fraises sauvages est essentiellement monoterpénique. La formation de l' α -

pinène et du β -myrcène est catalysée une pinène synthase, codée par le gène *FvPINS*. Chez les espèces cultivées, le gène *FaPINS* correspondant présente une mutation insertionnelle qui le rend non fonctionnel. Cette mutation affecte grandement l'arôme du fruit. En effet, l' α -pinène n'est plus produit, non plus que les produits qui en dérivent, comme l'acétate de myrténol et le myrténol.

L'évolution de l'arôme des fruits est donc le résultat de mécanismes moléculaires indépendants (perte d'une fonction, acquisition d'une autre), sous des pressions d'évolution et de sélection, probablement influencées par l'homme. En effet, chez les fraises sauvages, l' α -pinène donne au fruit une odeur déplaisante de résine : ce caractère a probablement été contre-sélectionné par l'homme. Par opposition, le linalol apporte au fruit une odeur douce, florale et citronnée et le nérolidol une note verte de pomme et de rose. De plus, ces deux composés améliorent la résistance aux pathogènes du fruit. Toutes ces caractéristiques ont probablement été favorisées la sélection artificielle qui influence parfois favorablement la qualité aromatique des fruits. Chez la tomate, un allèle du gène *malodorous*, présent chez les tomates sauvages (*Lycopersicon penellii*) conduit à la présence d'une quantité importante et indésirable de phénylacétaldéhyde (Tadmor *et al.*, 2002). Il semble qu'au cours de la domestication, ce gène ait été contre-sélectionné, ce qui a permis l'obtention de tomates à l'odeur agréable, moins riche en phénylacétaldéhyde.

b. Le rôle des facteurs de transcription

Nous avons vu ci-dessus que la formation des composés volatils était régulée au cours du développement de la fleur et que cette régulation pouvait être différente selon les variétés au sein d'une même espèce. En effet, l'expression de gènes de une ou plusieurs voies biochimiques est régulée au niveau transcriptionnel de façon orchestrée pour assurer la production d'un mélange de composés volatils (Dudareva et Negre, 2005) qui atteint son maximum lorsque la fleur est prête pour la pollinisation et que l'insecte pollinisateur est actif (Negre *et al.*, 2003 ; Dudareva *et al.*, 2004). Cette régulation existe aussi pour les composés volatils accumulés dans les feuilles et les fruits (Turner *et al.*, 2001b ; Lewinshon *et al.*, 2001). Le contrôle transcriptionnel coordonné de gènes, assuré par des facteurs de transcription, est probablement le mécanisme majeur dictant les niveaux finaux de métabolites secondaires dans les cellules végétales. Jusqu'ici, peu de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la synthèse des métabolites secondaires ont été identifiés. Des facteurs de transcription jouant un rôle dans la régulation des voies de synthèse des flavonoïdes et des alcaloïdes indoles terpéniques (TIA) ont cependant été caractérisés.

Chez de nombreuses espèces végétales, la régulation tissu-spécifique de gènes impliqués dans la synthèse des anthocyanes est sous le contrôle de deux familles distinctes de facteurs de transcription, présentant des homologies avec les protéines c-MYB et bHLH (Mol *et al.*, 1998). L'expression ectopique du gène *PAP1* d'*A. thaliana*, homologue de c-MYB, a pour conséquence l'augmentation très importante de la synthèse des flavonoïdes et une pigmentation pourpre intense dans la plupart des organes de la plante (Borevitz *et al.*, 2000). Certains facteurs MYB peuvent avoir des effets répressifs sur les gènes de cette voie. Ainsi, l'expression chez le tabac des deux facteurs MYB isolés chez l'œillet, AmMYB308 et AmMYB330, a pour conséquence l'inhibition de l'accumulation de l'acide hydroxycinnamique et du monoligol (Tamagnone *et al.*, 1998). Près de 20 % des espèces végétales accumulent des alcaloïdes qui dérivent de certains acides aminés. Les TIA dérivent du tryptophane et de précurseurs terpéniques (Memelink *et al.*, 2001). La production de TIA, chez *Catharanthus roseus*, est finement contrôlée au cours du développement, mais aussi en réponse à un stress ou à une attaque d'un pathogène. Ce contrôle est assuré par l'acide méthyl jasmonique (MeJA), hormone de stress, par l'intermédiaire des facteurs de transcription ORCA appartenant à la classe des domaines AP2-ERF (ORCA2 : Menke *et al.*, 1999 ; ORCA3 : van der Fits et Memelink, 2000). Récemment, trois nouveaux facteurs de transcription (ZCT) ont été identifiés (Pauw *et al.*, 2004). Ils appartiennent à la famille des facteurs de transcription de type IIIA. Ils répriment non seulement l'activité des promoteurs de la tryptophane décarboxylase et de la strictosidine synthase, mais aussi l'action du facteur ORCA2 lorsque celui-ci est fixé sur le promoteur de la STR. L'effet répressif des facteurs ZCT a pour conséquence l'inhibition de la voie de synthèse des TIA.

Bien que de nombreux gènes des voies de biosynthèse du parfum floral aient été identifiés, la régulation de ces voies est encore une énigme. Récemment, des gènes impliqués dans la régulation de la production des composés du parfum du pétunia ont été identifiés (Verdonk *et al.*, 2005). *Petunia hybrida* 'Mitchell' émet la nuit des composés volatils, principalement des benzénoïdes. Le gène *ODORANT1*, membre de la famille MYB de type R2-R3, est un élément régulateur de la production de ces composés. En effet, l'expression de ce gène évolue parallèlement à la production des benzénoïdes. Son extinction se traduit par une réduction importante de leur l'émission parallèlement à une diminution des niveaux de transcripts de certains gènes impliqués dans la synthèse des précurseurs de la voie du shikimate. Ce facteur MYB se lie au promoteur de la 5-énol-pyruvylshikimate synthase, activant ainsi la voie de synthèse des précurseurs des benzénoïdes du parfum. Il est intéressant de noter que la voie du shikimate est également impliquée dans la synthèse des anthocyanes et

que la suppression du gène *ODORANTI* n'affecte pas la production des pigments. Ceci s'explique peut-être par le fait que production de pigments et de composés du parfum sont deux événements dissociés dans le temps.

ODORANTI est le premier facteur de transcription dont le rôle dans la production des composés volatils du parfum a été prouvé. D'autres régulateurs, impliqués par exemple dans les voies de biosynthèse des terpènes et des dérivés d'acides gras seront vraisemblablement bientôt caractérisés. L'élucidation de ces réseaux régulateurs aura sûrement une grande place dans les stratégies d'ingénierie métabolique des composés volatils.

3. Quelques exemples d'ingénierie métabolique

a. L'amélioration de la menthe poivrée

Un exemple réussi de modification de la voie des terpènes est fourni par les travaux sur la menthe poivrée. L'huile essentielle de cette espèce contient en plus du menthol un composé indésirable, le menthofurane, qui contribue à en déprécier la saveur. Chez des plantes soumises à un stress, le menthofurane peut atteindre des quantités inacceptables pour l'industrie.

Mahmoud et Croteau (2001) ont d'une part surexprimé le gène *DXR* et d'autre part supprimé l'expression du gène de la menthofurane synthase (MFS) chez la menthe poivrée.

Deux groupes principaux de plantes ont été obtenus lors de la surexpression du gène *DXR* :

- Le groupe TI est constitué par 42 plantes dont le phénotype n'est pas différent de celui des plantes sauvages.
- Le groupe TII est représenté par 11 plantes dont les feuilles présentent une pigmentation des feuilles très faible. Des analyses de Northern-blot révèlent que l'absence de pigmentation est liée à un phénomène de co-suppression du gène *DXR*.

Dans les plantes du groupe TI, l'activité *DXR* est 2 à 4 fois plus importante que dans les plantes sauvages et la quantité d'huile essentielle est augmentée de près de 50 %. Aucune altération de la composition de l'huile n'est observée. La suppression de l'expression du gène *MFS* n'a pas d'effet sur l'huile essentielle chez la majorité des plantes transformées. Néanmoins, quatre d'entre elles accumulent moins de menthofurane que les plantes sauvages (35 à 55 % en moins) et plus de menthol.

Dans une autre expérience, Mahmoud *et al.* (2004) ont transformé des plantes de

Mentha x piperita indépendamment avec les ADNc de la limonène synthase et de la limonène 3-hydroxylase de menthe. Bien que les deux ADNc soient surexprimés de façon constitutive dans les plantes transgéniques obtenues, aucun changement n'est observé dans le rendement ou la qualité de l'huile. Les auteurs concluent que la limonène synthase n'est pas surexprimée de façon suffisante dans les cellules des trichomes sécréteurs. Dans l'expérience avec la limonène 3-hydroxylase, un nombre anormalement élevé de plantes transgéniques cosupprimées est obtenu, peut-être parce que une surexpression trop importante de cette enzyme est toxique pour la plante. Dans ces plantes cosupprimées, le limonène s'accumule dans l'huile essentielle, jusqu'à 80 % contre 2 % dans les plantes témoins.

Ces expériences d'ingénierie chez la menthe montrent qu'il est parfois possible de modifier la quantité et la qualité des composés volatils produits par les cellules sécrétrices. L'impact positif de la surexpression du gène *DXR* chez la menthe sur la production d'huile essentielle montre que l'étude de la *DXR* chez la rose pourrait être intéressante dans une logique d'amélioration du parfum chez cette espèce.

b. Les premières expériences d'ingénierie des composés volatils floraux

L'ADNc correspondant à la linalol synthase de *C. breweri* a été introduite dans les fleurs de pétunia (Lücker *et al.*, 2001) et d'œillet (Lavy *et al.*, 2001). Chez le pétunia, l'introduction de ce gène se traduit par une accumulation, non pas de linalol, mais de linalyl- β -D-glucopyranoside, qui pourrait être une forme de stockage du linalol, non volatile. En effet, les monoterpènes sont toxiques pour les cellules s'ils ne sont pas émis ou stockés dans des structures spécialisées. La présence du conjugué β -D-glucosidé pourrait suggérer que le pétunia ne possède ni structure spécialisée de stockage, ni mécanisme de sécrétion adapté au linalol (Lücker *et al.*, 2001). Chez l'œillet sauvage qui ne produit pas de monoterpènes, la surexpression de la linalol synthase de *C. breweri* entraîne bien une émission de linalol (jusqu'à 6% des composés émis) et d'oxyde de linalol. Cependant, l'odorat humain n'est pas capable de détecter le linalol émis. Il se peut que les quantités émises soient trop faibles, peut-être à cause d'une quantité limitante de GPP disponible (Lavy *et al.*, 2002).

Une expérience réalisée chez le pétunia montre également comment, en augmentant la quantité de substrat disponible, on peut augmenter la fragrance florale. Des plantes de Pétunia transformées avec une construction antisense de la flavanone 3-hydroxylase ont été obtenues dans le but de modifier la couleur des fleurs (Zucker *et al.*, 2002). Comme cela était attendu, chez les plantes transgéniques présentant une très faible expression de ce gène, des

modifications variées de la couleur des fleurs sont obtenues, jusqu'à une suppression totale de la couleur rouge/orangée d'origine. De plus, les fleurs dont la couleur est très altérée sont également plus odorantes que les fleurs non transformées, résultat qui n'était pas attendu. Ces plantes émettent en effet des quantités de méthylbenzoate plus importantes que les plantes non transformées. Dudareva et Pichersky (2000) ont montré que la production de ce composé était régulée en partie par la quantité de substrat disponible, l'acide benzoïque. Il est donc probable que le blocage de la voie des anthocyanes ait redirigé le flux de métabolites vers les voies de biosynthèse des composés aromatiques, entraînant une surproduction d'acide benzoïque (Zucker *et al.*, 2002).

c. La production de composés volatils nouveaux chez le tabac

L'introduction d'un gène unique impliqué dans les voies de biosynthèse des composés volatils a été rapportée de nombreuses fois (Lewinsohn *et al.*, 2001 ; Lückner *et al.*, 2001 ; Lavy *et al.*, 2002). Chez le tabac, trois enzymes utilisant le même substrat ont été introduites dans la même plante (Lückner *et al.*, 2004a). Il s'agit de trois monoterpène synthases, adressées aux plastides, isolées chez le citron, utilisées seules ou en combinaison : la limonène synthase, la terpinène synthase et la pinène synthase. L'introduction de ces trois enzymes dans des plantes transgéniques a pour conséquence une production de monoterpènes en quantités 10 à 20 fois plus importantes que chez les plantes non transformées, avec de nombreux monoterpènes absents des tabacs non transformés (limonène, γ -terpinène, β -pinène...). Le profil des composés émis par les fleurs et par les feuilles de tabac est donc profondément modifié et ce changement est détectable par l'odorat humain (Lückner *et al.*, 2004a).

Parallèlement, la limonène 3-hydroxylase de *Mentha spicata*, adressée au réticulum endoplasmique (RE), a été introduite dans la lignée de tabac TERLIMPIN exprimant les trois monoterpène synthases de citron (Lückner *et al.*, 2004a). L'analyse des composés volatils émis par les fleurs des plantes obtenues révèle que, malgré une localisation différente des enzymes impliquées (plastides et RE), les fleurs produisent du (+)-trans-isopipériténol à partir du limonène, contrairement aux fleurs de la lignée TERLIMPIN témoin (Lückner *et al.*, 2004b). Ceci implique que certains monoterpènes sont transportés, activement ou passivement, des plastides au RE.

Ces expériences montrent qu'il est possible de faire produire à certaines espèces végétales des composés volatils qui leur sont étrangers, à condition que le substrat soit disponible (Lückner *et al.*, 2004b). Le tabac semble être tout à fait adapté aux expériences de bioingénierie dans l'idée d'augmenter les quantités de composés volatils de rose utiles à

l'industrie du parfum.

d. L'amélioration de l'arôme des fruits

Les arômes des fruits sont, comme les arômes floraux, des mélanges de composés volatils perçus par l'odorat humain à des seuils très bas, jusqu'à $0,007 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans l'eau (Buttery *et al.*, 1971). Les obtenteurs de variétés de fruits et légumes sont de plus en plus attentifs à la qualité gustative et aromatique des fruits. Chez la tomate, l'amélioration des propriétés gustatives par les techniques conventionnelles d'hybridation est limitée par la multitude des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des composés volatils des arômes. Le linalol est l'un des dix composés volatils les plus importants influençant le goût des tomates (Buttery *et al.*, 1971, 1990). Dans les tomates fraîches, il est présent à hauteur de 1 à $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Buttery *et al.*, 1988). L'ADNc de la LIS de *C. breweri* a été introduit chez la tomate sous le contrôle d'un promoteur spécifique de fruit (Lewinsohn *et al.*, 2001). Toutes les plantes exprimant la LIS accumulent du linalol et ses dérivés oxygénés, sans effets défavorables sur les autres composés, comme le lycopène et les tocophérols, qui ont également une importance nutritionnelle.

Toujours chez la tomate, des plantes transformées avec les ADNc d'une alcool déshydrogénase (ADH) ont un profil de dérivés d'acides gras modifié. Par exemple, les quantités d'hexanol et de cis-3 hexénol sont plus élevées dans les plantes ayant une activité ADH élevée. Dans une expérience de test en aveugle, ces fruits transgéniques ont été jugés comme ayant une odeur de « fruit mûr » plus intense que les fruits non transformés.

D'autres expériences portant sur des alcool acétyltransférases isolées chez la fraise et la banane ont mis l'accent une nouvelle fois sur l'importance de la disponibilité en substrat (Beekwilder *et al.*, 2004).

En conclusion, les travaux récents mentionnés ci-dessus font état du succès de certaines expériences d'ingénierie métabolique (Mahmoud et Croteau, 2001 ; Lewinsohn *et al.*, 2001 ; Lückner *et al.*, 2004a, 2004b). Ils soulignent surtout combien les résultats obtenus sont encore imprévisibles (Lückner *et al.*, 2001 ; Lavy *et al.*, 2001 ; Zucker *et al.*, 2002 ; Beekwilder *et al.*, 2004) et combien une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs de la production des composés volatils est nécessaire.

IV. Conclusion

L'analyse de la littérature concernant les composés volatils a révélé deux problèmes.

Tout d'abord, l'étude des structures sécrétrices est très bien documentée si l'on se réfère aux trichomes sécréteurs. Par contre, la structure des épidermes sécréteurs a été très peu étudiée. L'analyse bibliographique met en évidence les difficultés rencontrées lors de l'étude des mécanismes impliqués dans la sécrétion (granulocrine ou écrine), et notamment les structures de sécrétion.

Les voies de biosynthèse des composés volatils émis par les végétaux sont également assez peu documentées, même si toutes les étapes de la voie de biosynthèse des composés de l'huile essentielle de menthe sont élucidées. L'étude des voies de biosynthèse des composés floraux a été initiée par Dudareva et Pichersky qui ont identifié les enzymes impliquées dans la formation du parfum d'*Antirrhinum majus* et *Clarkia breweri*. Parmi les composés volatils, les composés aromatiques et les composés terpéniques ont été plus étudiés que les composés dérivés d'acide gras.

Chez la rose, l'étude des voies de biosynthèse des composés volatils floraux a débuté très récemment. Une fois de plus, ce sont les composés aromatiques qui ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux de recherche. Lorsque cette thèse a débuté, aucun gène n'avait été isolé. Nous avons décidé de nous focaliser sur les voies de biosynthèse des monoterpènes floraux.

Matériels et Méthodes

I. Matériel végétal, souches et plasmides

A. Matériel végétal

1. *Rosa x hybrida*

a. Variétés de roses

La majorité des variétés utilisées sont des variétés sélectionnées par l'entreprise Meilland Richardier (tableau 5). Parmi ces variétés, deux font l'objet d'une étude plus approfondie : il s'agit de *Rosa x hybrida* 'Papa Meilland' et de *Rosa x hybrida* 'The Mac Cartney rose'.

b. Stades de développement

Six stades du développement floral de la rose sont définis (Fig. 15) et représentés par les caractéristiques suivantes :

- Au stade 'Bouton fermé' (BF), les sépales sont redressés et recouvrent entièrement les pétales ;
- au stade 'Bouton juste ouvert' (BJO), les sépales sont redressés mais laissent apparaître les premiers pétales ;
- au stade 'Bouton ouvert' (BO), les sépales s'écartent des pétales et les pétales les plus externes commencent à se déplier ;
- au stade 'Bouton très ouvert' (BTO), les sépales sont renversés et de nombreux pétales sont dépliés ;
- au stade 'Fleur épanouie' (FE), tous les pétales sont dépliés,
- au stade 'Fleur sénescence' (FS), les pétales commencent à se détacher du réceptacle floral, les étamines, les styles et les stigmates sont bien visibles.

2. *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana glauca*

Deux espèces de tabac sont utilisées. Les expériences de localisation subcellulaire par expression transitoire d'un gène après infiltration d'*Agrobacterium tumefaciens*, sont réalisées sur l'espèce de tabac *Nicotiana tabacum* SR1 cv 'Petit Havana' (Fig. 16A).

Tableau 5 : Variétés de rose utilisées au cours de l'étude. Les caractéristiques de couleur et de parfum sont reprises des catalogues des obtenteurs. L'estimation du parfum va de 'sans parfum' (-) à 'très parfumée' (+++).

Variétés	Couleur	Parfum	Obtenteur	Utilisation
'Anna'	Saumon	++	Paul Pekmez	Ressources carbonnées Structure du pétale
'Black Baccara'	Rouge	-	Meilland Richardier	Recherche de gènes Parfum
'Charles de Gaulle'	Mauve	+++	Meilland Richardier	Ressources carbonnées
'Christophe Colomb'	Orange	+	Meilland Richardier	Ressources carbonnées
'La Sévillana'	Vermillon	-	Meilland Richardier	Ressources carbonnées
'Madame Antoine Meilland'	Jaune	+	Meilland Richardier	Ressources carbonnées
'Marcel Pagnol'	Rouge	++	Meilland Richardier	Ressources carbonnées
'Panthère rose'	Rose	+	Meilland Richardier	Ressources carbonnées
'Papa Meilland'	Pourpre	+++	Meilland Richardier	Parfum
				Ressources carbonnées Structure du pétale
'Paul Ricard'	Jaune	++	Meilland Richardier	Recherche de gènes
'Rouge Meilland'	Rouge	-	Meilland Richardier	Ressources carbonnées
				Structure du pétale Recherche de gènes
'The MacCartney rose'	Rose	+++	Meilland Richardier	Parfum
				Ressources carbonnées Structure du pétale
'Hacienda'	Rouge	+++	Orard	Recherche de gènes
'Alister Stella Gray'	Orange	++	Alexander Hill Gray	Structure du pétale
'Royal Red'	Rouge	-	Kordes	Structure du pétale
				Recherche de gènes
'Royal Baccara'	Rouge	-	Meilland Richardier	Structure du pétale
				Recherche de gènes
'Sonia Rykiel'	Rose	++	Guillot	Structure du pétale
'Pariser Charme'	Rose	++	Tantau	Recherche de gènes
'Baronne Edmond de Rothschild'	Rose	+++	Meilland Richardier	Structure du pétale

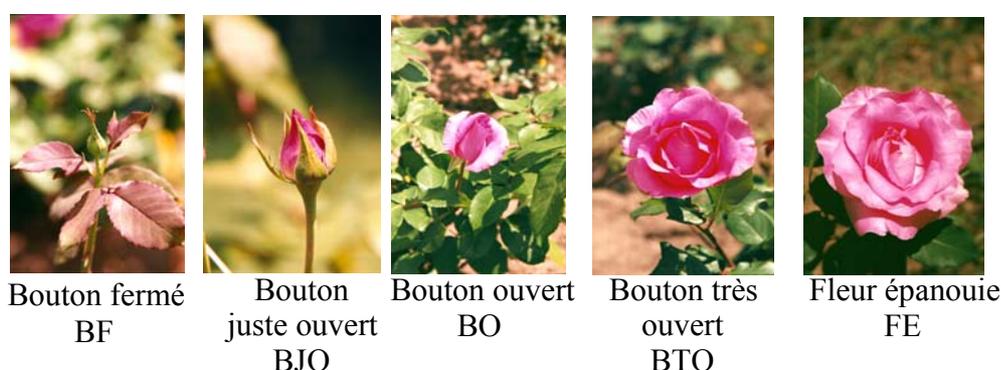


Figure 15 : Différents stades de développement de la variété Hybride de Thé 'The Mac Cartney rose'.

Le tabac *Nicotiana sylvestris* est employé pour étudier l'effet de la surexpression d'un gène sur les composés volatils produits (Fig. 16B).

B. Souches bactériennes

1. *Escherichia coli*

Quatre souches d'*E. coli* sont utilisées :

- La souche DH5 α d'*E. coli* sert au clonage, à la multiplication et à la conservation des gènes ;
- les souches M15 et XL1-blue d'*E. coli* permettent la production en système bactérien des protéines recombinantes ;
- la souche TOP10 d'*E. coli* est une souche bactérienne employée avec le système de clonage GatewayTM.

Les caractéristiques de ces quatre souches sont données dans le tableau 6.

2. *Agrobacterium tumefaciens*

La souche C58pMP90 d'*A. tumefaciens* permet de transformer efficacement les cellules végétales. Elle est utilisée pour l'étude de la localisation subcellulaire par expression transitoire d'un gène et la transformation stable du tabac. Les caractéristiques de cette souche sont données dans le tableau 7.

C. Plasmides

1. Plasmide de séquençage, multiplication et conservation des gènes

Le plasmide pGEMT-easy (Promega) est utilisé pour le séquençage, la multiplication et la conservation des gènes et fragments de gènes isolés tout au long de l'étude (Fig. 17). Le clonage des gènes se fait au niveau d'un site multiple de clonage situé à l'intérieur du gène *lacZ*, codant pour la β -galactosidase : ceci permet donc une sélection blanc-bleu des clones ayant intégré l'insert.

2. Plasmides d'expression bactérienne

Différents plasmides d'expression bactérienne sont employés :

- Le vecteur pGEX-KG (Guan et Dixon, 1991) est une forme modifiée du pGEX-2T ; il nous a été fourni par P. Hugueney (laboratoire RDP, ENS



Figure 16 : Deux espèces de tabac utilisées au cours de l'étude : *Nicotiana tabacum* SR1 cv 'Petit Havana' (A) et *Nicotiana glauca* (B). (photographies : A, site internet du UW-Madison Botanical Garden ; B, http://zfan.hp.infoseek.co.jp/present/nicotiana_sylvestris.jpg)

Tableau 6 : Souches d'*Escherichia coli*

Souche	Génotype	Résistance aux antibiotiques
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	kanamycine (résistance acquise au laboratoire)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	streptomycine
XL1-blue MRF [']	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdS</i> SMR- <i>mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F ['] <i>proAB lacI</i> ^q Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	tétracycline
M15	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	ampicilline

Tableau 7 : Souche d'*Agrobacterium tumefaciens*

Souche	Plasmide	Résistance aux antibiotiques
C58	pMP90 (Koncz et Schell, 1986)	rifampicine, gentamicine

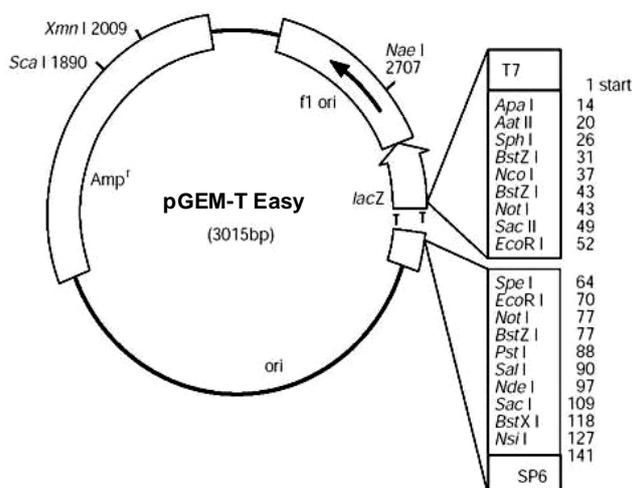


Figure 17 : Carte du vecteur de clonage pGEMT-easy (Promega)

Lyon). Ce vecteur permet une fusion de la protéine d'intérêt avec la glutathion-S-transférase en position N-terminale de la chaîne polypeptidique. Le gène est inséré au niveau des sites de restriction *Bam*HI/*Sst*I (Fig. 18).

- Les vecteurs pQE appartiennent au système *QIAexpress* de la firme QIAGEN. Le vecteur pQE30 permet la production de la protéine d'intérêt avec une étiquette poly-histidine en position N-terminale et le vecteur pQE70 permet la production de la protéine d'intérêt avec une étiquette poly-histidine en position C-terminale. Le gène est introduit dans le vecteur pQE30 au niveau des sites de restriction *Bam*HI/*Sal*I et dans le vecteur pQE70 au niveau des sites de restriction *Sph*I/*Bam*HI (Fig. 18).

3. Plasmides pour l'expression dans les cellules végétales

a. Transformation transitoire

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

- Le vecteur pCKgfp^{S65T} (Reichel *et al.*, 1996), fourni par P. Huguency (laboratoire RDP, ENS Lyon), permet l'expression d'un gène cloné au niveau du site de restriction *Nco*I, sous le contrôle d'un promoteur double CaMV35S (Fig. 19). Alternativement, des sites *Bsp*HI, compatibles, sont générés aux extrémités 3' pour les fragments possédant des sites *Nco*I internes. La protéine produite est fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein) en position C-terminale. La GFP fluoresce en vert lorsqu'elle est excitée par une longueur d'onde de 488 nm. Ce vecteur permet l'étude de la localisation subcellulaire par expression transitoire d'un gène après transformation des cellules végétales par biolistique.
- Le vecteur GatewayTM, pK7FGW2, produit par le laboratoire 'Plant Systems Biology' de l'université de Gent (Karimi *et al.*, 2002 ; Fig. 19), permet également l'expression de protéines de fusion à la GFP, en position C-terminale. Il a été utilisé pour l'étude de la localisation subcellulaire par expression transitoire d'un gène après transformation des cellules végétales par infiltration d'*A. tumefaciens*. Ce vecteur

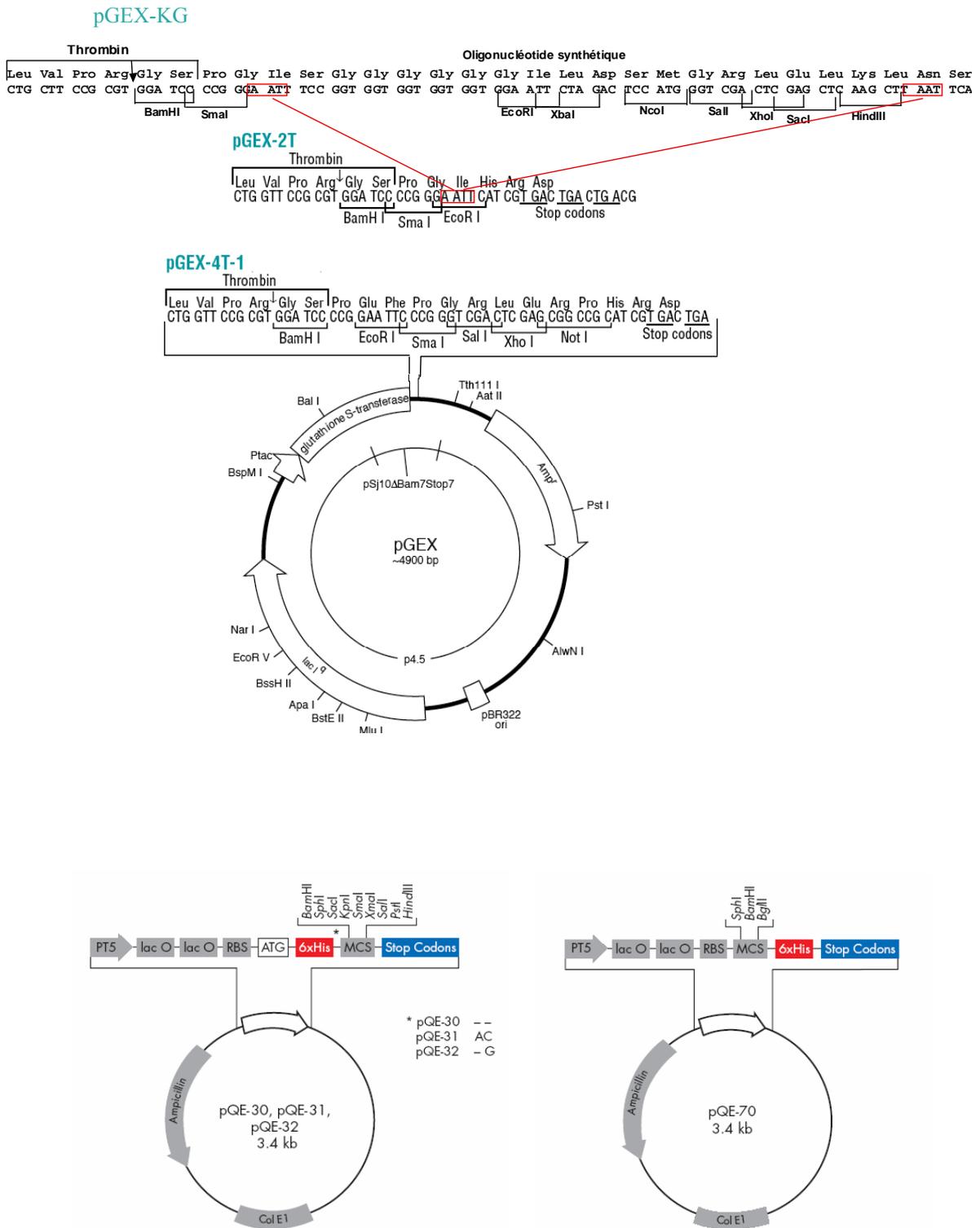


Figure 18 : Vecteurs de clonage utilisés pour la production dans des cellules d'*E. coli* d'une protéine recombinante fusionnée à la Gluthation-S-Transférase (pGEX-KG) ou possédant une étiquette poly-histidine en position N-terminale (pQE30) ou en position C-terminale (pQE70)

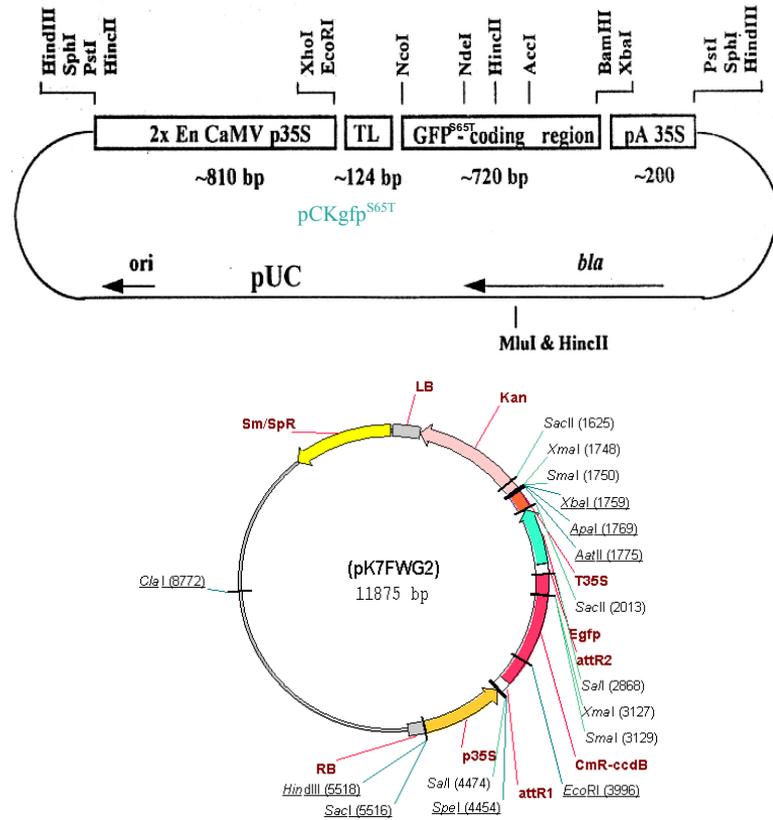


Figure 19 : Vecteurs de clonage utilisés pour l'expression transitoire d'un gène fusionné à la GFP en position C-terminale dans les cellules végétales soit par transformation par biolistique (pCKgfp^{S65T} ; Reichel *et al.*, 1996), soit par infiltration d'*A. tumefaciens* (pK7FWG2 ; Karimi *et al.*, 2002).

nécessite l'introduction du gène d'intérêt dans un vecteur d'entrée, le pENTR/D-TOPO (Invitrogen).

Des vecteurs portant des constructions témoins sont employés afin de déterminer, par comparaison, la localisation subcellulaire des protéines produites par les gènes d'intérêt :

- Le vecteur TpGFP est formé à partir du vecteur pCKgfp^{S65T} dans lequel la GFP est fusionnée à la séquence d'adressage aux plastes de la protéine RhRCD4, caroténoïde-dioxygénase de rose (Scalliet, 2003).
- Le vecteur 35S::GFP nous a été fourni par P. Hugueneu (laboratoire RDP, ENS Lyon). C'est un vecteur GatewayTM contenant la GFP sans séquence d'adressage. Elle est donc adressée au cytoplasme des cellules.

b. Transformation stable

Le vecteur GatewayTM, pK2GW7, produit par le laboratoire 'Plant Systems Biology' de l'université de Gent en Belgique (Karimi *et al.*, 2002 ; Fig. 20), permet la surexpression stable d'un gène d'intérêt dans les cellules végétales, sous le contrôle du promoteur simple CaMV35S. Ce vecteur nécessite d'abord l'introduction du gène d'intérêt dans un vecteur d'entrée, le pENTR/D-TOPO (Invitrogen).

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

II. Techniques d'analyse du parfum

A. Extraction par solvant

L'extraction consiste à piéger les molécules odorantes par un solvant organique. Elle est réalisée dans des fioles en verre à bouchon à vis étanches. Un extrait est obtenu à partir de 1 g de pétales frais et de 2 mL de solvant constitué d'hexane additionné de camphre à une concentration de 40 mg.L⁻¹. Le camphre sert de standard interne, permettant l'homogénéisation des analyses. Dans le cas où la quantité de matériel végétal est insuffisante, le rapport 1 pour 2 est respecté. Après 2 h d'agitation à température ambiante,

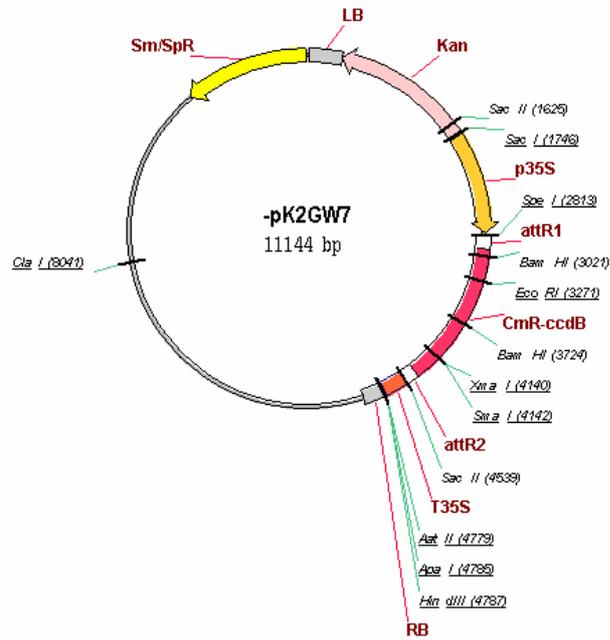


Figure 20 : Vecteur Gateway™ pK2GW7 de clonage d'un gène pour son expression stable dans les cellules végétales (Karimi *et al.*, 2002).

l'extrait est récupéré et placé dans des fioles adaptées au passeur de l'analyseur, puis analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Cette technique est utilisée pour étudier :

- Les composés volatils produits par les différents organes de la fleur,
- l'évolution des composés volatils au cours du développement floral,
- et la répartition des composés volatils dans la fleur, dans le pétale et dans les différents tissus du pétale.

B. Headspace dynamique

La technique de headspace ou technique de 'capture d'effluves' (Fig. 21) a pour but de piéger les composés volatils émis pendant un temps défini par une fleur sur un polymère solide comme le Tenax (ARS Inc.).

Les roses produisent et émettent les composés volatils suivant un cycle diurne circadien dans lequel le maximum d'émission se situe au milieu de la phase de jour (Helsper *et al.*, 1998). Afin de limiter les fluctuations dues à ce rythme d'émission, les analyses sont faites entre 10 et 13 h.

Les fleurs à différents stades de développement sont enfermées dans un sac de polyéthylène téréphtalate (Nalophan) équipé d'une entrée et d'une sortie. Deux pompes à vide sont utilisées pour purifier l'air injecté à travers le sac (cartouches de charcoale Orbo32, Supelco). L'air purifié est aspiré avec un débit $140 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et poussé avec un débit de $120 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$: on peut estimer que le système est parcouru par un flux d'air de $311 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A la sortie, les composés volatils sont collectés pendant 1 h dans une cartouche de verre (75 x 4 mm) contenant 30 mg de Tenax. Les composés volatils sont élués par deux fois $500 \mu\text{L}$ d'hexane, puis $5 \mu\text{L}$ de camphre à $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sont ajoutés. L'extrait est concentré au $1/10^{\text{ème}}$ sous courant d'air puis analysé par CPG.

Cette technique est employée pour étudier les composés volatils émis au cours du développement floral.

C. Solid Phase Micro Extraction ou SPME

L'analyse des composés volatils du parfum peut aussi se faire par piégeage des molécules sur une fibre par la technique de Solid Phase Microextraction ou SPME (Fig. 22). Le pétale est placé sur un support rigide inodore. Une chambre de piégeage est délimitée à l'aide d'un cône bleu de pipette qui permet d'analyser les composés volatils émis par une

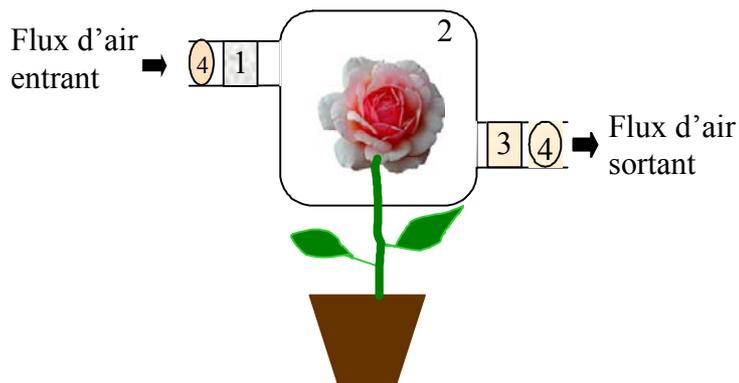


Figure 21 : Technique de collecte des effluves par 'headspace' dynamique (schéma d'après P. Hugueney). 1, filtre de charbon actif ; 2, chambre ; 3, piège (fibre de Tenax) ; 4, pompes. La photographie représente le dispositif lors d'une expérimentation.

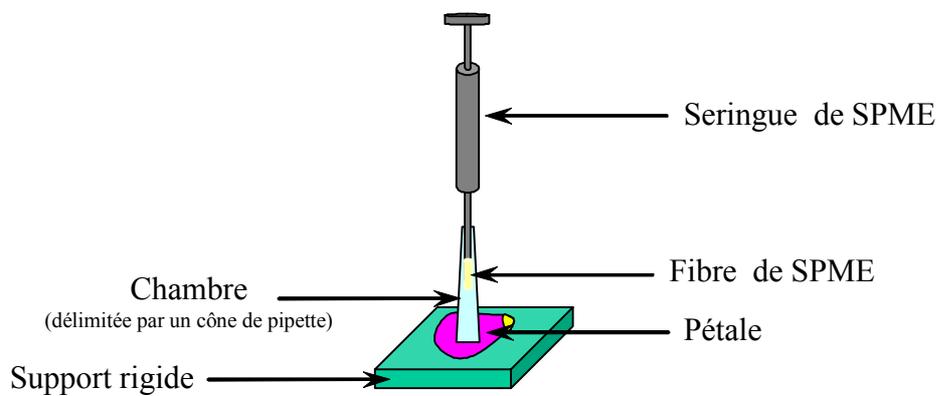


Figure 22 : Technique de SPME adaptée à l'analyse des composé volatils émis par les 2 épidermes du pétale de rose.

surface de pétale de 44 mm². La fibre de SPME, de 65 µm de diamètre (Supelco), est composée d'un mélange de polydiméthylsiloxane et de divinylbenzène. Elle est introduite dans la chambre par l'orifice du cône et le piégeage est réalisé pendant 1 h à température ambiante. La désorption des composés volatils se fait dans la chambre d'injection de la CPG.

Pour cela, la fibre est placée pendant 2 min dans la chambre d'injection à une température de 240°C.

Cette technique permet d'étudier les composés volatils émis par les deux épidermes du pétale.

D. Analyse des composés volatils par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

L'analyse GC-FID (Gas Chromatography-Flame Ionisation Detector) est réalisée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6850, équipé d'un détecteur de flamme par ionisation (FID). L'azote est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Une colonne capillaire Varian CPSil5CB (30 m x 0,32 mm) est employée dans les conditions suivantes : 3 min à 40°C, suivies d'une incrémentation de 2°C.min⁻¹ jusqu'à une température de 160°C, elle-même suivie d'une incrémentation de température de 12°C.min⁻¹ jusqu'à 240°C. La température est ensuite maintenue pendant 2 min à 240°C. Deux µL d'extrait sont injectés sur la colonne, selon le mode 'split' avec un rapport 10 : 1.

E. Identification des composés

Les composés volatils sont identifiés en comparant leurs temps de rétention avec les temps de rétention de composés authentiques. Les composés suivants ont été employés : 2-phényléthanol, géraniol, nérol, citronellol, β-caryophyllène et cis-3-hexénol fournis par la firme Payan-Bertrand, 3,5-diméthoxytoluène ou DMT, fourni par P. Hugueneu (RDP, ENS Lyon), germacrène D (R.C. Treatt & Co. Ltd) et trans-2-hexénal (Aldrich). Le camphre est utilisé comme étalon interne de façon à ramener chaque surface de pic en mg équivalent de camphre. Un ratio de un est postulé (Picone *et al.*, 2004).

Parallèlement, des analyses sont réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse Agilent 6890. Les bases de données de spectres de masse CNRS, Wiley 275 et Wist 98 sont employées pour l'identification des composés. Les conditions de GC décrites précédemment sont maintenues. Les paramètres d'analyse sont les suivants : voltage ionisant 70eV ; taux de balayage de masse 2,94/s pour 50-550 m/z. Ces

analyses par spectrométrie de masse ont été faites par M. Martin du laboratoire 'Génome et Evolution des Plantes Supérieures' de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

III. Techniques cytologiques

A. Microscopie optique et microscopie électronique à transmission

1. Fixation et inclusion

Des pétales de différentes variétés de roses sont prélevés sur des fleurs à différents stades de développement, puis fixés dans les conditions suivantes : glutaraldéhyde 1,5 % pendant 4 à 5 h à température ambiante suivi d'un rinçage au tampon cacodylate 0,1M (15 min à température ambiante, une nuit à 4°C et 1 h à température ambiante) et d'un rinçage à l'eau pendant 5 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite post-fixés au tétrahydroxyde d'osmium (1 % dans l'eau) pendant 1 h à température ambiante. Après lavage, ils sont déshydratés par passage dans des solutions d'éthanol de 50 % à 100 %.

L'inclusion est réalisée dans la résine Spurr suivant les instructions fournies par le kit d'inclusion 'Spurr resin embedding kit' (Taab, Chemicals & Equipment for microscopy).

2. Coupes, colorations et observations

Pour la microscopie optique, des coupes semi-fines de 1 µm d'épaisseur sont réalisées grâce à un ultramicrotome RMC MT 6000, placées sur des lames de verre puis colorées au Paragon (mélange de fushine basique et de bleu de toluidine dans l'éthanol à 30 %). Les observations sont faites à l'aide d'un microscope Leitz DMRB (Leika).

Pour la microscopie électronique à transmission (MET), des coupes ultra-fines (70 à 80 nm) sont réalisées grâce à un ultramicrotome RMC MT 6000, déposées sur des grilles de 200 mesh, recouvertes de formvar. Elles sont ensuite contrastées suivant un protocole conventionnel de contraste à l'acétate d'uranyle, suivi d'une deuxième étape de contraste au citrate de plomb (Reynolds, 1963). Les observations sont faites à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H-800, sous une tension de 75 kVolts.

B. Microscopie électronique à balayage environnementale et microscopie confocale

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

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

C. Mise en évidence des lipides et des terpènes sur matériel non fixé

La coloration par le réactif de NADI a été mise au point par David et Carde (1964). Elle permet de différencier des structures lipidiques ne contenant pas de terpènes (coloration bleue) et des structures lipidiques contenant des terpènes (coloration violette). Le réactif de NADI est un mélange d'une solution alcoolique d' α -naphtol 1 % (m/v dans éthanol 40 %) et d'une solution aqueuse de N-N-diméthyl-p-phénylènediamine-dihydrochloride 1 % (m/v) dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,2 (0,5/0,5/49 ; v/v/v).

Des coupes sont faites à main levée sur des pétales frais, puis placées dans le réactif de NADI pendant 30 min à l'obscurité. L'observation se fait en microscopie optique après avoir monté les coupes entre lame et lamelle. Les terpènes sont visualisés par leur coloration violette.

IV. Techniques de dosage de l'amidon et du D-glucose

A. Principe du dosage

Pour réaliser ces dosages, les instructions fournies avec le kit de dosage de l'amidon de Boehringer Mannheim/R-Biopharm ont été suivies. La détermination de la quantité d'amidon présente dans les pétales repose sur une réaction enzymatique qui permet de produire une molécule de NADPH par molécule de D-glucose libéré de l'amidon.

L'amidon est hydrolysé en D-glucose en présence d'amyloglucosidase à pH 4,6. Le D-glucose est phosphorylé en D-glucose-6-phosphate par l'hexokinase, en présence d'ATP, à pH 7,6. Cette phosphorylation s'accompagne de la formation d'ADP. Le D-glucose-6-phosphate est ensuite oxydé en gluconate-6-phosphate par la Glucose 6P-déshydrogénase en présence de NADP⁺, avec formation de NADPH et H⁺. Pour chaque molécule de D-glucose formé par l'hydrolyse de l'amidon, il se forme une molécule de NADPH. La quantité de NADPH est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 340 nm.

B. Détermination des quantités d'amidon et de D-glucose libre

L'amidon contenu dans les pétales est solubilisé en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'acide chlorhydrique (HCl). Brièvement, 1 g de pétale est prélevé, réduit en poudre dans l'azote liquide puis introduit dans une fiole à bouchon contenant 20 mL de DMSO et 5 mL d'HCl 8M. La fiole est placée pendant 30 min à 1 h dans un four à 60°C et agitée doucement et régulièrement. La fiole est ensuite refroidie rapidement sous l'eau courante et 40 ml d'eau ultrapure sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à une valeur de 4 avec une solution de NaOH 5M. Le volume est enfin ajusté à 100 mL avec de l'eau ultrapure. La solution doit décanter quelques min afin que les débris cellulaires se déposent au fond de la fiole.

Le dosage de l'amidon se fait selon les conditions décrites par le protocole fourni avec le kit. Brièvement, 200 µL de tampon citrate pH 4,6 contenant de l'amyloglucosidase à 14 U.mL⁻¹ sont ajoutés à 100 µL d'échantillon à doser. Après une incubation de 15 min à 60 °C, 1 mL d'eau distillée et 1 mL de tampon triéthanolamine pH 7,6 contenant du NADP (3 mg.mL⁻¹), de l'ATP (7 ml.mL⁻¹) et du sulfate de magnésium sont ajoutés. Après 3 min d'incubation, une première mesure de DO à 240 nm est effectuée. Vingt µL de suspension enzymatique contenant l'hexokinase (0,3 U.µL⁻¹) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (0,1 U.µL⁻¹) sont ajoutés. Après 15 min d'incubation, la D.O. est mesurée une deuxième fois.

La concentration en amidon se calcule en appliquant la formule suivante :

$$c_{\text{amidon}} = [(V \times \text{MM}_a) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)] \times \Delta A_{\text{amidon}},$$

avec V, volume final de la réaction (2,32 mL) ; v, volume d'échantillon (0,1 mL) ; MM_a, masse moléculaire de l'amidon (162,1) ; d, distance de la cuve (1 cm) ; ε, coefficient d'extinction du NADPH pour une DO de 340 nm (6,31 mmol⁻¹.cm⁻¹) et ΔA_{amidon}, [A2-A1]_{échantillon} - [A2-A1]_{blanc échantillon}.

V. Techniques de biologie moléculaire

A. Extraction d'acides nucléiques

1. Extraction d'ARN totaux à partir de matériel végétal

L'extraction des ARN totaux de rose est réalisée sur différents tissus, des pétales prélevés à différents stades de développement, des feuilles matures, des sépales, des étamines et des pistils (styles et stigmates). Le protocole utilisé est adapté de celui de Cock *et al.* (1997).

Le matériel végétal (1 g) est broyé dans l'azote liquide, transféré dans un tube Falcon de 15 mL dans lequel sont ajoutés 5 mL de tampon d'extraction (Tris HCl 0,2 M pH 9 ; KCl 4 M ; glucose 0,2 M ; MgCl₂ 35 mM ; EDTA 25 mM) et 5 mL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v). Les tubes sont agités 1 min puis centrifugés 4 min à 2000 g à 4°C. Une nouvelle phase d'extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique est réalisée sur le surnageant dans les mêmes conditions. Le surnageant est ensuite réparti dans des tubes Eppendorf de 2 mL par fraction de 800 μL et 800 μL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique sont ajoutés ; les tubes sont mélangés pendant 2 min avant d'être centrifugés 5 min à 20000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré et une première précipitation des ARN est réalisée à -80°C pendant 15 min après ajout de 50 μL d'acide acétique 1 M et de 400 μL d'éthanol 100 %. Après une centrifugation de 30 min à 22000 g à 4°C, le culot est repris dans de l'acétate de sodium 3 M pH 6,3, centrifugé 5 min à 22000 g à 4°C puis repris par 50 μL de tampon d'extraction. Toutes les fractions sont regroupées dans un seul tube et 600 μL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique sont ajoutés. Le tube est agité pendant 2 min avant d'être centrifugé 5 min à 22000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré et une deuxième précipitation des ARN est réalisée pendant 15 min à -80°C en ajoutant 60 μL d'acide acétique 1M et 900 μL d'éthanol 100 %. Après une centrifugation de 30 min à 22000 g à 4°C, le culot est lavé par de l'éthanol 70 % puis de l'éthanol 100 %, séché à l'air libre puis repris par 30 μL d'eau Versol (Laboratoire Aguetant) dépourvue d'activité RNase.

sont prélevées de façon à estimer d'une part la concentration en ARN totaux par spectrophotométrie (DO 260 nm) et d'autre part la qualité des ARN par migration sur un gel à 1,3 % d'agarose, coloré au bromure d'éthidium.

2. Extraction d'ARN messagers de feuilles de *Nicotiana sylvestris*

Les ARNm de feuilles matures de *N. sylvestris* sont extraits avec le kit de purification d'ARNm 'SV total RNA isolation' (Promega). Les ADNc sont ensuite obtenus par une réaction de réverse transcription, suivant les indications décrites au § B.2.

3. Extraction d'ADN génomique de tabac

L'ADN génomique des tabacs régénérés après transformation par *A. tumefaciens* est extrait selon la technique d'Edwards *et al.* (1991).

Un disque foliaire de tabac est prélevé à l'emporte-pièce à l'aide d'un tube Eppendorf. Le tissu est réduit en pâte à l'aide d'un pilon, puis 400 µL de tampon d'extraction (Tris HCl 200 mM pH 8 ; EDTA 25 mM ; NaCl 250 mM, SDS 0,5 %) sont ajoutés. Après une centrifugation de 2 min à 20000 g à température ambiante, une extraction par 400 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) est réalisée sur le surnageant. Après une centrifugation de 2 min à 20000 g à température ambiante, l'ADN génomique est précipité pendant 2 min à température ambiante après avoir ajouté 300 µL d'isopropanol à 300 µL de surnageant. Après une centrifugation de 5 min à 20000 g à température ambiante, le culot d'ADN génomique est lavé et séché par 100 µL d'éthanol 70 % et d'éthanol 100 %. Le culot est ensuite repris dans 50 µL de tampon TE (Tris HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 5 mM).

4. Mini et maxipréparation d'ADN plasmidique

a. Minipréparation et maxipréparation d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 2 mL de culture bactérienne suivant le protocole de lyse alcaline décrit par Sambrook *et al.* (1989).

Les maxipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 25 à 50 mL de culture bactérienne suivant le protocole de lyse alcaline décrit par Ish-Horowicz et Burke (1981).

b. Maxipréparation d'ADN plasmidique d'*A. tumefaciens*

1,5 mL de milieu LB contenant les antibiotiques adéquats sontensemencés avec une colonie isolée d'*A. tumefaciens*. Une pré-culture est ainsi réalisée pendant 48 h à 27°C sous faible agitation. La pré-culture est ensuite transférée dans 50 mL de milieu LB contenant les antibiotiques adéquats. Après 24 à 36 h à 27°C sous faible agitation, la culture est centrifugée 5 min à 2000 g. Le culot bactérien est repris par 10 mL de tampon TESS (Tris HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM ; NaCl 0,5 M ; sarkosyl 5 %) et de nouveau centrifugé 5 min à 2000 g. Le culot est repris dans 10 ml de tampon TEG (Tris HCl 25 mM pH 8 ; glucose 50 mM ; EDTA 10 mM) additionné de lysozyme (2 mg.mL⁻¹). L'ensemble est placé pendant 20 min dans la glace. La lyse alcaline est réalisée en ajoutant 20 mL d'une solution de NaOH 0,2 M et SDS 10 %. Après avoir mélangé le tube par inversion, il est placé dans la glace pendant 10 à 20 min. Quinze mL d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 sont ajoutés et l'ensemble est à nouveau incubé dans la glace pendant 20 min. Après une centrifugation de 20 min à 4°C à 2000 g, le surnageant est récupéré et précipité par 90 mL d'éthanol 100 % froid pendant 20 min à -20°C. L'ADN plasmidique est centrifugé pendant 20 min à 4°C et repris par 1 mL d'eau, auquel sont ajoutés 50 µg de RNase. Après une incubation de 30 min à 37°C, des étapes de purification au phénol, puis au phénol/chloroforme et enfin au chloroforme sont réalisées. L'ADN est alors précipité par 1/10 du volume d'acétate de sodium 0,3 M et 2 volumes d'éthanol 100 % pendant au moins 30 min à -20°C. Après une centrifugation de 20 min à 10000 g à 4°C, le culot est lavé par de l'éthanol 70 %, séché et repris dans 50 µL de tampon TE (Tris HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM).

B. Obtention d'ADN complémentaire

1. Traitement à la DNase I

Cinquante microgrammes d'ARN totaux sont traités à la DNase I (Promega) pendant 30 min à 37°C, selon les conditions définies par le protocole du fournisseur. La DNase I est ensuite éliminée par une étape de purification au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v). Les ARN totaux sont concentrés par précipitation à -80°C pendant 30 min après ajout d'acide acétique 1 M et d'éthanol 100 %. Après une centrifugation de 30 min à 22000 g à 4°C, le culot est lavé à l'éthanol 70 % et à l'éthanol 100 %, séché à l'air libre et repris par 15 µL d'eau Versol (laboratoire Aguetant). Les ARN sont analysés sur un gel à 1,3 % d'agarose coloré au bromure d'éthidium et dosés par spectrophotométrie.

2. Réaction de réverse-transcription

Cinq microgrammes de chaque préparation d'ARN traitée à la DNase I sont soumis à la réaction de réverse transcription (RT). Cinq μg d'ARN sont dilués dans un volume final de 10 μL puis dénaturés 5 min à 65°C dans un bloc chauffant. Cette étape permet d'éliminer les structures secondaires des ARN messagers qui pourraient gêner la RT. Neuf μL de mélange réactionnel sont alors ajoutés (4 μL de tampon 10X (Invitrogen), 1 μL de RNase inhibiteur (Promega) à 40 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 2 μL de DTT 0,1 M, 1 μL de dNTP 10 mM et 1 μL d'amorces polyT à 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Le mélange est ensuite incubé 5 min à température ambiante pour permettre l'accrochage des amorces polyT sur les ARN. 1 μL de réverse-transcriptase (Invitrogen) à 200 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ est ajouté au mélange qui est ensuite incubé 1 h à 42°C. L'enzyme est inactivée par une incubation de 5 min à 95°C.

3. Vérification de la qualité des ADN complémentaires

Afin de vérifier la qualité des ADNc obtenus, une PCR est réalisée sur les ADNc dilués avec des amorces, fournies par P. Hugueney (RDP, ENS Lyon), permettant d'amplifier un fragment du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, ou GAPDH (annexe 1). Ce gène a été isolé chez la rose *Rosa chinensis* 'Old Blush', à partir d'une banque d'ESTs (Channelière *et al.*, 2002).

Le mélange PCR est composé de 2 μL de tampon 10X de la Taq polymérase (Promega), 2 μL de dNTP 1 mM, 2 μL d'amorce sens 10 μM , 2 μL d'amorce antisens 10 μM , 0,2 μL de Taq polymérase (Promega) et de 2 μL d'ADNc dilué ; le volume est ajusté à 20 μL avec de l'eau Versol. Après 30 cycles d'amplification, les produits PCR sont déposés sur un gel à 1 % d'agarose, coloré au bromure d'éthidium.

C. Construction de la banque d'ADNc double brin pour la RACE-PCR

1. Purification des ARN messagers

Les ARN messagers de pétales sont purifiés à partir des ARN totaux suivant les instructions du kit 'Straight A's mRNA Isolation System Kit' (Novagen).

Brièvement, le principe repose sur l'utilisation de billes magnétiques sur lesquelles des amorces oligodT sont fixées. Les ARNm, porteurs d'une queue polyA à leur extrémité 3', se fixent sur ces billes au niveau des amorces oligodT. Après plusieurs lavages, les ARNm sont récupérés par une élution à 65°C dans 2 fois 150 μL d'eau Versol (laboratoire Aguetant). Les ARNm sont précipités une nuit à -80°C après ajout de 1,2 μL de glycogène, 30 μL d'acétate

de sodium 3 M pH 6,3 et 900 μ L d'éthanol 100 %. Après une centrifugation de 30 min à 22000 g à 4°C, le culot est lavé par de l'éthanol 70 % et de l'éthanol 100 %, séché à l'air libre puis repris dans 10 μ L d'eau Versol.

2. Obtention de la banque d'ADNc double brin

Pour obtenir la banque d'ADNc double brin nécessaire pour les expériences de RACE-PCR, le kit 'Marathon' (Clontech) est utilisé suivant les instructions du fournisseur.

Brièvement, les ARNm de *Rosa x hybrida* 'Rouge Meilland' sont purifiés à partir d'ARN totaux extraits de pétales prélevés sur des fleurs au stade 'bouton ouvert'. Le premier brin d'ADNc est synthétisé par l'AMV reverse transcriptase en présence d'amorces oligodT. L'ARN est dégradé et parallèlement le deuxième brin d'ADNc est obtenu grâce à un mélange d'ADN polymérase I, de RNase H et d'ADN ligase d'*E. coli*. L'enzyme T4 ADN polymérase permet ensuite d'obtenir un ADNc double brin aux extrémités franches. Des adaptateurs de séquence connue sont ligués aux ADNc double brin grâce à la T4 DNA ligase. Ce mélange d'ADNc est ensuite dilué aux 1/50 et 1/250 pour être utilisé dans les réactions de RACE-PCR.

D. Techniques d'amplification d'ADN par PCR

Les séquences des oligonucléotides utilisés pour les amplifications PCR sont données dans l'annexe 1.

1. Amplification par oligonucléotides dégénérés

La recherche de deux gènes impliqués dans la voie de synthèse des monoterpènes est réalisée suivant une stratégie PCR basée sur des homologues de séquences. Ainsi, pour les deux gènes, *DXR* et *GPPS*, des séquences connues chez d'autres espèces sont recherchées dans les bases de données et alignées de façon à définir des oligonucléotides dégénérés dans les zones les plus conservées.

Le mélange d'amplification PCR est composé de 2 μ L de tampon de réaction (Tris HCl 100 mM pH 9, KCl 500 mM, Triton X-100, MgCl₂ 15 mM), 2 μ L de dNTP 1 mM, 2 μ L d'amorce sens 10 μ M, 2 μ L d'amorce antisens 10 μ M, 0,2 μ L de Taq-polymérase (Promega) et 2 μ L de matrice (ADNc dilué) ; le volume est ajusté à 20 μ L avec de l'eau ultrapure.

La réaction PCR est faite dans les conditions suivantes : 95°C, 5 min ; 45 cycles de [95°C, 30 sec – 45°C, 30 sec – 72°C, 1 min] ; 72°C, 7 min. Le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium.

Pour l'obtention de la DXR et de la GPPS de rose, la matrice est de l'ADNc obtenu à partir d'ARNm de pétales de la rose 'Rouge Meilland' prélevée au stade 'bouton juste ouvert' et de la rose 'The MacCartney rose' prélevée au stade 'bouton ouvert'. Pour l'isolement de la DXR de *N. sylvestris*, des ADNc de feuilles matures sont utilisés.

2. RACE-PCR

L'obtention des extrémités 5' et 3' des gènes se fait par une succession de deux PCR en utilisant comme matrice la banque d'ADNc obtenue avec le kit 'Marathon'. Lors de la première PCR, un oligonucléotide (AP1 fourni avec le kit) reconnaissant l'adaptateur est associé à un oligonucléotide spécifique du gène. La deuxième PCR est réalisée avec des oligonucléotides plus internes dans la séquence de l'adaptateur (oligonucléotide AP2) et dans la séquence du gène. Le mélange PCR est composé de 5 µL de tampon de réaction (Tricine-KOH 400 mM pH 8.7 ; KOAc 150 mM ; Mg(OAc)₂ 35 mM ; SAB (sérum albumine bovine) 37,5 µg.mL⁻¹ ; Tween 20 0,05 % ; Nonidet-P40 0,05 %), 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL d'amorce AP1 ou AP2 10 µM, 1 µL d'amorce gène spécifique (1 ou 2), 1 µL de Taq Advantage 2 (Clontech) et 1 µL de matrice (banque d'ADNc) diluée au 1/100 ; le volume est ajusté à 50 µL avec de l'eau ultrapure.

La réaction d'amplification est faite dans les conditions suivantes : 95°C, 5 min ; 5 cycles de [95°C, 30 sec – 72°C, 2 min 30] ; 5 cycles de [95°C, 30 sec – 70°C, 2 min 30] ; 25 cycles de [95°C, 30 sec – 68°C, 2 min 30]. Une fraction aliquote des produits PCR est déposée sur gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium.

3. PCR « fidèles » en vue de l'obtention de séquences entières des gènes

Ce type de PCR est utilisé pour d'une part obtenir le gène dans sa totalité après avoir défini avec des logiciels d'analyse (BioEdit ou DNASTAR) une séquence virtuelle correspondant aux gènes entiers, et d'autre part obtenir les séquences des gènes utilisées pour l'expression de protéines recombinantes dans des systèmes bactériens ou dans les cellules végétales de façon transitoire ou stable.

Ces PCR sont réalisées avec la polymérase hautement fidèle Pfu HotStart Turbo-polymerase (Stratagène). Le mélange PCR est composé de 2 µL de tampon de réaction (Tris HCl 200 mM pH 8,8 ; MgSO₄ 20 mM ; KCl 100 mM ; (NH₄)₂SO₄ 100 mM ; Triton X-100 1% ; SAB 1 mg.mL⁻¹), 2 µL de dNTP 1 mM, 2 µL d'amorce sens 10 µM, 2 µL d'amorce

antisens 10 μM , 0,2 μL de polymérase et 2 μL de matrice ; le volume est ajusté à 20 μL avec de l'eau ultrapure.

L'amplification est faite pendant 30 cycles de PCR avec des paramètres ajustés en fonction des oligonucléotides utilisés et de la taille du fragment à amplifier (1 min pour chaque 1000 pb). Une fraction aliquote des produits PCR est déposée sur gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium.

4. RT-PCR semi-quantitative

Les réactions de RT-PCR semi-quantitatives nécessitent une normalisation de tous les échantillons. Le gène *GAPDH* s'exprime à un niveau équivalent quel que soit le tissu ou le stade de développement considéré (Channelière *et al.*, 2002). Il a donc été choisi pour normaliser tous les échantillons.

Le mélange PCR se compose de 2 μL de tampon de réaction de Taq-polymérase (déjà décrit), 2 μL de dNTP 1 mM, 2 μL d'amorce sens 10 μM , 2 μL d'amorce antisens 10 μM , 0,2 μL Taq-polymérase (Promega) et 2 μL de matrice ; le volume est ajusté à 20 μL avec de l'eau ultrapure.

La réaction PCR est faite dans les conditions suivantes : 95°C, 5 min ; 25/30 cycles de [95°C, 30 sec – 55°C, 30 sec – 72°C, 1 min] ; 72°C, 7 min. Le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium et l'intensité de chaque signal est estimée visuellement. Différentes dilutions des échantillons d'ADNc sont utilisées jusqu'à avoir des signaux d'intensité identique pour tous les échantillons utilisés. Parallèlement, des oligonucléotides sont définis à partir des séquences des gènes isolés afin d'amplifier une fraction du gène. Une PCR est réalisée dans les mêmes conditions sur les échantillons normalisés.

5. Hybridation des membranes de RT-PCR semi-quantitative

Les produits d'amplification des expériences de RT-PCR semi-quantitative sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, puis transférés en présence de soude (16 g.L⁻¹) sur une membrane de nylon Hybond N⁺ pendant une nuit. Les membranes sont ensuite hybridées une nuit à 65°C avec les sondes correspondant au gène recherché (*RhDXR*, *RhGPPS* ou *GAPDH*), marquées au [α -³²P]-dCTP. Elles sont ensuite exposées sur un écran Phosphoimager afin de quantifier la radioactivité avant d'être exposées sur un film autoradiographique (Kodak Biomax MS). Le nombre de coups radioactifs obtenu

pour chaque sonde (*RhDXR* ou *RhGPPS*) est rapporté à celui obtenu pour la sonde *GAPDH* afin d'affiner la normalisation des échantillons.

6. PCR sur ADN génomique de *N. sylvestris*

Le mélange PCR se compose de 2 μL de tampon de réaction de Taq-polymérase (Promega), 2 μL de dNTP 1 mM, 2 μL d'amorce sens 10 μM , 2 μL d'amorce antisens 10 μM , 0,2 μL Taq-polymérase (Promega) et 5 μL d'ADN génomique ; le volume est ajusté à 20 μL avec de l'eau ultrapure.

La réaction PCR est faite dans les conditions suivantes : 95°C, 5 min ; 30 cycles de [95°C, 30 sec – 55°C, 1 min – 72°C, 1 min] ; 72°C, 7 min. Le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium.

E. Techniques de clonage

1. Purification sur gel des fragments PCR

Les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 1 % puis purifiés suivant les instructions du kit de purification sur gel 'QIAquick Gel extraction kit' (QIAGEN). Brièvement, le fragment d'ADN est excisé du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel, placé dans un tube Eppendorf et pesé. Pour chaque 100 mg de gel, 100 μL de tampon QG (fourni avec le kit) sont ajoutés. Le tube est incubé 10 min à 50°C. Après dissolution du gel, le mélange est transféré sur une colonne et centrifugé 1 min à 13000 g. La colonne est lavée avec 750 μL de tampon PE (fourni avec le kit) et centrifugée 2 fois 1 min à 13000 g. Le fragment d'ADN est élué par 50 μL de tampon Tris HCl 10 mM pH 8,5 avec une centrifugation de 1 min à 13000 g.

2. Clonage de fragments dans le vecteur pGEMT-easy

Le clonage de fragments d'ADN dans le vecteur pGEMT-easy est utilisé pour séquencer, multiplier et conserver tous les fragments d'ADN.

La ligation dans le vecteur pGEMT-easy peut se faire une nuit à 4°C ou 2 h à température ambiante. Afin de s'assurer d'une bonne efficacité de la ligation, l'insert est concentré en respectant un rapport insert /vecteur de 3 : 1, en accord avec les instructions du kit (Promega). Le mélange de ligation est composé de 2,5 μL de tampon ligase 2X, 0,5 μL de vecteur, 0,5 μL de T4-DNA ligase à 3 U. μL^{-1} et de 1,5 μL d'insert.

La polymérase hautement fidèle (Pfu HotStart Turbo-polymerase, Stratagène) ne présente pas d'activité de polyadénylation. Pour sous-cloner un fragment amplifié avec ce type de polymérase, il est nécessaire d'ajouter des groupements adénosine aux extrémités du fragment amplifié.

A 7 μ L de produit PCR purifié, sont ajoutés 1 μ L de Taq-polymérase (Promega), 1 μ L de dATP 10 mM et 1 μ L de tampon de réaction de l'enzyme Taq-polymérase. L'ensemble est placé 15 à 30 min à 72°C. La même réaction peut être réalisée directement sur les 20 μ L de réaction PCR. Dans tous les cas, une purification des produits PCR est nécessaire afin d'éliminer les dATP non incorporés.

L'introduction des plasmides dans la souche DH5 α est réalisée grâce à un choc thermique (42°C pendant 60 sec suivi d'un passage dans un bain de glace ; Sambrook *et al.*, 1989).

3. Sous-clonage dans les vecteurs d'expression bactérienne

Les fragments d'ADN à sous-cloner dans des vecteurs d'expression sont amplifiés par PCR avec des amorces dont la séquence contient les sites de restriction nécessaires. Après amplification, ils sont dans un premier temps clonés dans le vecteur pGEMT-easy (Promega) dans les conditions déjà décrites. Après vérification de la séquence, le plasmide est multiplié, purifié et l'insert est isolé par digestion.

Parallèlement, le vecteur d'expression bactérienne est également multiplié et digéré par les enzymes adéquates.

L'insert est ensuite ligué au vecteur grâce à l'action de la T4-DNA ligase (Promega). Les rapports insert/vecteur, ainsi que le mélange de réaction sont les mêmes que ceux utilisés lors de la ligation d'un insert dans le vecteur pGEMT-easy. Les plasmides sont ensuite introduits dans les souches DH5 α et M15 par choc thermique.

4. Sous-clonage par recombinaison avec le système GATEWAY™

L'introduction d'un gène dans un vecteur Gateway™ nécessite l'obtention d'un vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO contenant le gène d'intérêt. La réaction se fait grâce à la topoisomérase I, extraite de *Vaccinia virus*. Son rôle biologique est de couper et de religuer l'ADN pendant la réplication. Elle reconnaît spécifiquement la séquence pentamérique 5'-(C/T)CCTT-3' et forme une liaison covalente avec le phosphate de la thymidine en 3'. Elle coupe un des deux brins d'ADN, assurant le déroulement de l'hélice d'ADN, puis associe les

extrémités du brin coupé. Pour exploiter l'activité de ligation de la topoisomérase I, le vecteur pENTR-D/TOPO est linéarisé et la topoisomérase est fixée de façon covalente sur les extrémités 3' des deux brins d'ADN. Elle permet aux vecteurs de se refermer en intégrant une séquence d'ADN avec des extrémités compatibles. Le gène est donc amplifié par PCR avec des amorces permettant d'ajouter des sites *attL1* et *attL2* de recombinaison au gène d'intérêt, mais aussi du côté 5' quatre bases supplémentaires (CACC) qui vont assurer le clonage directionnel du gène dans le vecteur pENTR-D/TOPO. Le clonage se fait dans les conditions décrites par le protocole fourni avec le vecteur (Invitrogen). Des cellules TOP10 d'*E. coli* sont ensuite transformées avec ce vecteur par choc thermique suivant le protocole fourni par le fournisseur (Invitrogen), puis sélectionnées sur un milieu Luria Broth (LB, Sigma) contenant de la kanamycine à 50 mg.L⁻¹. L'ADN plasmidique est extrait par lyse alcaline, puis vérifié par restriction et séquençage.

Lorsque le vecteur d'entrée est vérifié, l'insert est introduit dans le vecteur GatewayTM grâce à une réaction de recombinaison mettant en jeu la LR-clonase (Invitrogen). La recombinaison se fait entre des sites de recombinaison semblables à ceux des phages λ , et plus précisément entre les sites *attL* (1 et 2) et *attR* (1 et 2) du vecteur d'entrée et du vecteur de destination, respectivement. La réaction se fait dans les conditions décrites par le protocole d'utilisation de la LR-clonase (Invitrogen). Des cellules DH5 α d'*E. coli* sont transformées par choc thermique. Les cellules sont sélectionnées sur un milieu LB contenant de la streptomycine ou de la spectinomycine, indifféremment, à 50 mg.L⁻¹. L'ADN plasmidique est récupéré par lyse alcaline, puis vérifié par restriction et séquençage.

Le vecteur ainsi obtenu est enfin introduit par choc thermique dans des cellules C58pMP90 d'*A. tumefaciens*. Pour cela, 200 μ L de cellules compétentes sont ajoutés dans 100 μ L de milieu LB contenant 5 μ g d'ADN plasmidique. L'ensemble est placé pendant 5 min dans l'azote liquide, puis pendant 25 min à 37°C au bain-marie. Dix mL de milieu LB sont ajoutés aux bactéries et l'ensemble est placé toute une nuit à 27 à 28°C sans agitation. La culture bactérienne est ensuite centrifugée pendant 10 min à 6000 g et le culot est repris par 300 μ L de milieu LB, puis une fraction aliquote est étalée sur un milieu LB contenant de la rifampicine (50 mg.L⁻¹), de la gentamycine (20 mg.L⁻¹) et de la streptomycine (50 mg.L⁻¹).

5. Vérification des produits de clonage et technique de séquençage

Tous les vecteurs plasmidiques sont multipliés et récupérés par minipréparation ou maxipréparation d'ADN. Ils sont triés par restriction suivant les instructions données pour chaque enzyme par le fournisseur (Promega). Le séquençage des fragments d'intérêt est

effectué par la firme GenomeExpress (Meylan, France). Le tableau 8 reprend l'ensemble des constructions obtenues et utilisées dans notre étude.

F. Expression de protéines recombinantes

1. Expression en système bactérien

a. Vecteur de fusion à la glutathion-S-transférase (GST)

Cent mL de milieu LB additionné de 50 mg.L⁻¹ d'ampicilline sontensemencés avec 2 mL d'une pré-culture réalisée à partir d'une colonie isolée de cellules XL1-blue d'*E. coli* contenant le vecteur d'expression pGEX-KG. La culture est placée sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une DO de 0,8 à 600 nm. L'expression protéique est induite en présence d'isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside ou IPTG 0,2 mM pendant 2 h à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite centrifugées pendant 6 min à 6000 g, puis reprises par 5 mL de tampon (Tris HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 50 mM).

b. Vecteurs pQE

Une colonie isolée de cellules M15 d'*E. coli* contenant les vecteurs d'expression pQE estensemencée dans 5 mL de milieu LB additionné de 50 mg.L⁻¹ de kanamycine et de 50 mg.L⁻¹ d'ampicilline (LB-K-A) et mise en pré-culture une nuit sous agitation à 37°C.

La pré-culture est diluée au 1/100 dans du milieu LB-K-A, puis remise en culture sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une DO à 600 nm comprise entre 0,6 et 0,8. L'ajout d'IPTG dans le milieu de culture permet l'induction de la production protéique. Différentes concentrations d'IPTG sont testées (de 0,1 mM à 1 mM). De même, la durée de l'induction varie de 1 h à 6 h. Enfin, les inductions sont réalisées à 30°C et 37°C afin de tenter de remédier aux problèmes liés à l'insolubilité de la protéine. En parallèle, des cultures dont la production protéique n'est pas induite par ajout d'IPTG sont maintenues dans les mêmes conditions. A la fin de la période d'induction, les cultures bactériennes sont centrifugées 20 min à 2000 g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les culots bactériens sont conservés à -80°C jusqu'à purification des protéines.

Tableau 8 : Différentes constructions utilisées au cours de l'étude

Nom	Vecteur	Description
TpGFP	pCKgfpS65T	Vecteur témoin d'adressage aux plastes de la GFP
pDXR-GFP	pCKgfpS65T	Séquence d'adressage de la DXR de rose fusionnée à la GFP
35S::GFP	pK7FWG2	GFP sans peptide d'adressage
DXR-GFP	pK7FGW2	Séquence totale de la DXR de rose fusionnée à la GFP
DXR-S30	pQE30	Séquence DXR sans le domaine riche en proline
DXR-L30	pQE30	Séquence DXR avec le domaine riche en proline
DXR-S70	pQE70	Séquence DXR sans le domaine riche en proline
DXR-L70	pQE70	Séquence DXR avec le domaine riche en proline
SurexDXR	pK2GW7	Séquence entière de la DXR de rose sous le contrôle du promoteur CaMV35S
pGEX-GPPS	pGEX-KG	Séquence de la GPPS de rose déletée de la séquence putative d'adressage aux plastes

2. Expression transitoire dans les cellules végétales

a. Transformation par biolistique

Les expériences de transformation transitoire par biolistique sont réalisées sur des cellules d'épiderme d'oignon et sur des cellules d'épiderme supérieur de pétale de rose, selon un protocole mis au point par G. Scalliet et P. Hugueney (laboratoire RDP, ENS Lyon). L'appareillage utilisé lors de l'ensemble des tirs est un 'gun Bio-Rad system PDS/He' (Bio-Rad). Les tissus, épidermes d'oignon ou pétales, sont placés dans des boîtes de Pétri contenant deux épaisseurs de papier filtre imbibées d'eau.

Les plasmides utilisés pour cette expérience sont multipliés en grande quantité et isolés selon le protocole de maxipréparation d'ADN plasmidique. Des billes d'or de 0,6 μm de diamètre (Bio-Rad) sont préparées selon le protocole suivant : Les billes sont lavées deux fois dans l'éthanol à 70 % puis reprises par 500 μL de glycérol 50 % stérile et aliquotées par fractions de 50 μL . L'ADN plasmidique est ensuite fixé sur les billes. Pour chaque tube de 50 μL de billes, 5 μL d'ADN plasmidique à 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 50 μL de CaCl_2 2,5 mM et 20 μL de spermidine 0,1 M sont ajoutés. Le tube est mélangé au Vortex 2 à 3 min, puis les billes sont centrifugées 30 sec. Le surnageant est éliminé, les billes sont rincées une fois par de l'éthanol 70 %, puis une deuxième fois par de l'éthanol 100 %. Elles sont ensuite reprises par 50 μL d'éthanol 100 %.

Six μL de cette préparation sont déposés sur des membranes (macroporteur), placées au-dessus d'une grille de projection, située en position moyenne par rapport au disque de rupture. Les échantillons végétaux sont placés dans une chambre à vide à 9 cm de la plaque porteuse du macroporteur. Lorsque le vide atteint 25 pouces équivalent de mercure, une pression d'hélium de 1100 psi est appliquée, rompant le disque de rupture et provoquant la pulvérisation des billes à la surface des échantillons. Les échantillons sont ensuite placés une nuit dans une chambre climatisée à une température de 20 à 25°C.

b. Transformation par infiltration d'*A. tumefaciens*

L'infiltration des feuilles de tabac est réalisée suivant le protocole de Batoko *et al.* (2000). Une colonie isolée est utilisée pourensemencer 2 mL de milieu LB contenant les antibiotiques adéquats (20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de gentamycine et 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'antibiotique spécifique de la construction). La culture est incubée à 28°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance (2 à 3 jours). Un mL de la culture est transféré dans un tube Eppendorf, centrifugé à température ambiante pendant 5 min à 500 g, puis le culot est rincé 2 fois par 1 mL de tampon d'infiltration (annexe 2). Le culot est enfin repris par 1 mL de ce même tampon. La

suspension bactérienne est diluée de façon à ajuster la concentration de l'inoculum à une DO de 0,1 à 600 nm. L'infiltration de la suspension bactérienne est réalisée grâce à une seringue sans aiguille après avoir fait une petite blessure. La surface de feuille infiltrée est délimitée à l'aide d'un feutre indélébile, puis la plante est replacée dans les conditions de croissance habituelles. Les observations sont faites en général 3 jours après infiltration.

Cette technique a été adaptée aux pétales de roses Hybrides de Thé. Les pétales sont prélevés sur une fleur au stade 'Bouton ouvert'. Un petit trou est pratiqué à l'aide d'une pointe fine de dissection sur l'épiderme supérieur au niveau de l'onglet : on peut facilement suivre la progression de la solution bactérienne à l'intérieur des pétales. Les pétales sont ensuite placés dans des boîtes de Pétri contenant deux épaisseurs de papier filtre imbibées de 2 mL d'eau. Les boîtes sont ensuite scellées et conservées dans une pièce climatisée à 25°C pendant 3 jours jusqu'au moment de l'observation.

G. Techniques d'étude des protéines

1. Purification de protéines totales de pétales de rose

Pour les extractions de protéines totales de pétale de rose, 50 mg de matériel végétal sont broyés dans l'azote liquide, la poudre est versée dans un tube Eppendorf et 200 µL de tampon SDG 2X (Tris HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 5 % ; DTT 4 % ; glycérol 40 %) sont ajoutés. Le matériel est chauffé à 100°C 5 min, puis centrifugé 5 min à 11000 g. Le surnageant est récupéré et la concentration en protéines est déterminée.

2. Purification des protéines recombinantes fusionnées à la GST

Après l'induction de l'expression protéique et mise en suspension des bactéries dans un tampon adéquat, les bactéries sont soniquées 3 fois par pulses de 10 sec. Après centrifugation, 100 µL du lysat bactérien sont prélevés afin d'analyser la fraction protéique totale soluble. 50 µL de résine glutathion (Amersham-Bioscience) sont ajoutés au lysat bactérien et l'ensemble est agité pendant 30 min à température ambiante afin de permettre l'accrochage des protéines de fusion. L'échantillon est centrifugé quelques secondes à 20 g de façon à récupérer tout le surnageant qui est ensuite analysé (fraction 'flow through'). La résine est placée sur une colonne, rincée 3 fois avec 1 mL de tampon (Tris HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 50 mM), puis placée dans un tube Eppendorf en enlevant le maximum de surnageant. La protéine d'intérêt est libérée de la partie GST de la résine par un traitement de 6 h à température ambiante par 10 unités de thrombine (Amersham-Bioscience) pour 100 µL

(fraction d'élution). Les différentes fractions protéiques sont analysées par SDS-PAGE et un test d'activité enzymatique est réalisé sur la fraction d'élution.

3. Purification des protéines recombinantes présentant une étiquette poly-histidine

a. Purification en conditions dénaturantes

La purification en conditions dénaturantes est réalisée suivant les instructions du kit 'QIAexpressionist' (QIAGEN).

Brièvement, le culot bactérien est repris dans un tampon de lyse (Tris HCl 10 mM pH 8 ; NaH₂PO₄ 100 mM ; urée 8 M) dans un rapport de 5 mL.g⁻¹ de culot bactérien. La lyse des bactéries est réalisée en agitant au Vortex, tout en évitant la formation de mousse. Les débris bactériens sont précipités par une centrifugation de 20 à 30 min à température ambiante à 10000 g. Pour 4 mL de lysat bactérien, 1 mL de résine Ni-NTA est ajouté. L'ensemble est agité doucement 60 min à température ambiante. Le mélange lysat/résine est chargé sur une colonne de purification. La fraction 'flow-through' est collectée : elle contient toutes les protéines qui ne se sont pas fixées à la résine. La colonne est lavée deux fois par 4 mL de tampon de lavage (Tris HCl 10 mM pH 6,3 ; NaH₂PO₄ 100 mM ; urée 8 M). La protéine recombinante est éluée par quatre fractions de 500 µL de tampon d'élution (Tris HCl 10 mM pH 4,5 ; NaH₂PO₄ 100 mM ; urée 8 M). Toutes les fractions sont récupérées individuellement et déposées sur un gel SDS-PAGE 10 % pour analyse.

b. Purification en conditions natives

La purification sous forme native de la protéine recombinante est réalisée avec la résine BD-Talon (BD-Biosciences-Clontech) car cette résine est plus spécifique que la résine Ni-NTA agarose.

Brièvement, le culot bactérien est repris par 3 mL de tampon d'équilibration/lavage (EL) froid, contenant du lysozyme à une concentration finale de 0,75 mg.mL⁻¹, puis incubé 30 min à température ambiante. L'ensemble est broyé dans un mortier froid avec 7,5 mL d'Alumina (Sigma) pendant 5 min. Le broyat est transféré dans un tube Nalgène et mortier et pilon sont rincés par 2 mL de tampon EL. Le broyat est centrifugé 20 min à 4°C à 10000 g. Le surnageant, correspondant à l'échantillon clarifié, est récupéré pour la purification.

Deux mL de résine BD-Talon, équilibrée dans du tampon EL sont ajoutés à l'échantillon protéique. L'ensemble est agité doucement pendant 20 min à température ambiante, puis centrifugé 10 min à 700 g à 4°C. Le surnageant, correspondant à toutes les

protéines ne possédant pas d'étiquette poly-histidine, est conservé pour analyse. La résine est lavée par 2 fois avec 10 mL de tampon EL, avec une agitation de 10 min à température ambiante, suivie d'une centrifugation de 5 min à 700 g à 4°C. A chaque fois, les fractions de lavage sont conservées pour analyse. La résine est remise en suspension par 1 mL de tampon EL, puis transférée sur une colonne de 2 mL. Le tampon EL est récupéré par gravité (3^{ème} fraction de lavage), puis un 4^{ème} lavage de la résine est réalisée avec 5 mL de tampon EL. L'élution de la protéine se fait en rajoutant 5 mL de tampon d'élution fourni avec le kit : des fractions de 500 µL sont récupérées. La concentration en protéine de toutes les fractions d'élution est évaluée. Elles sont déposées sur un gel SDS-PAGE 10 % pour analyse.

c. Dosage des protéines par la technique de Bradford

La concentration des protéines est dosée avec la méthode décrite dans le 'BioRad protein assay' (BioRad), adaptée de la méthode de Bradford (1976). Le dosage se fait par une mesure spectrophotométrique à une DO de 600 nm. Une gamme de concentration de SAB permet d'obtenir une courbe étalon à partir de laquelle la concentration en protéines de l'échantillon est déterminée. Brièvement, une fraction aliquote de l'échantillon de protéines est diluée dans 800 µL d'eau, puis 200 µL de réactif de Bradford sont ajoutés. La solution est mélangée et incubée pendant 15 min à température ambiante. La lecture de DO est ensuite réalisée.

H. Analyse par SDS-PAGE et Western-blot

1. Electrophorèse des protéines par SDS-PAGE

Les expériences de SDS-PAGE sont réalisées avec le système 'Mini PROTEAN II electrophoresis cell' de BioRad. La composition des gels est donnée en annexe 3. Les échantillons de protéines sont déposés avec un volume de tampon de charge (Tris HCl 50 mM pH 6,8 ; dithiothreitol 100 mM ; SDS 2 % ; bleu de bromophénol 0,1 % ; glycérol 10 %). La migration se fait pendant 1 h 30 sous une tension de 110 à 130 volts.

Après migration, le gel est fixé pendant 30 min à température ambiante sous faible agitation dans une solution de méthanol/acide acétique/eau (40/10/50 ; v/v/v). La coloration est faite pendant 30 min sous agitation à température ambiante dans du bleu de Coomassie (0,25 g de Coomassie brillant blue R250 dans une solution de méthanol/acide acétique/eau [40/10/50 ; v/v/v]). Elle est suivie d'une phase de différenciation dans une solution d'acide acétique 10 %. Les gels sont séchés suivant les indications du kit 'Gel drying kit' (Promega).

2. Détection des protéines par Western-blot

Lorsqu'une analyse par Western-blot doit être réalisée, les gels SDS-PAGE ne sont ni fixés, ni colorés au bleu de Coomassie.

Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Roche Diagnostics) grâce au système 'Mini PROTEAN II electrophoresis cell' de BioRad. Le transfert se fait en 1 h à température ambiante sous un voltage constant de 100 volts dans un tampon de transfert (Tris HCl 25 mM pH 8,3 ; glycine 192 mM ; méthanol 15 %). Avant le transfert, la membrane est rincée rapidement dans du méthanol, lavée deux fois dans de l'eau et équilibrée pendant au moins 30 min dans le tampon de transfert. De même, gel, papiers filtres et éponges sont équilibrés dans ce tampon. Le montage se fait suivant les instructions fournies avec l'appareillage. Après transfert, la membrane est colorée pendant 10 min dans du rouge Ponceau (Ponceau S 0,2 % - p/v ; acide trichloroacétique 3% - v/v), puis différenciée par des lavages successifs dans du tampon TBS-T (Tris HCl 10 mM pH 8 ; NaCl 150 mM ; Tween 20 0,05 %). Un blocage des membranes de 2 h à température ambiante sous faible agitation est ensuite réalisé dans une solution de blocage (poudre de blocage fournie avec le kit diluée à 1 % dans du tampon TBS-T). La membrane est incubée une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage. La membrane est lavée deux fois 10 min dans du tampon TBS-T à température ambiante sous faible agitation, puis incubée 30 minutes sous agitation à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire lié à la peroxydase, dilué dans la solution de blocage. La membrane est ensuite lavée deux fois dans du tampon TBS-T. La révélation se fait en présence du substrat Lumi-light^{PLUS} suivant la technique dite de 'transparency', décrite dans le manuel du kit 'Lumi-lightPLUS western-blotting kit (mouse/rabbit)' de Roche Diagnostics. Il permet une détection par chimiluminescence et révélation sur un film Kodak X-OMAT AR (Amersham-Biosciences). Les couples d'anticorps utilisés sont décrits dans le tableau 9.

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les Western-blot

Type de protéine	Anticorps primaire	Réactifs secondaires
DXR recombinante avec une étiquette poly-histidine	Anticorps anti-histidine (Sigma, référence : H1029), dilué au 1/1000	Anticorps anti-souris (kit 'Lumi-Light ^{PLUS} western-blotting kit (mouse/rabbit)' de Roche Diagnostics [référence : 2015218]), dilué au 3/1000
OOMT dans les pétales de rose	Anticorps anti-OOMT (Scalliet, 2003)	Anticorps anti-lapin (Amersham)

I. Tests d'activité

1. Complémentation d'une souche déficiente en DXR

La caractérisation enzymatique de la DXR de rose est réalisée par complémentation d'une souche déficiente en DXR, suivant un protocole déjà décrit (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001). Elle a été réalisée par E.M. Uros-Gracia, sous la direction du Dr M. Rodriguez-Concepcion de l'Université de Barcelone (Espagne).

Les vecteurs pQE30 et pQE70 ayant intégré soit la forme longue, soit la forme courte de la DXR de rose, sont introduits dans la souche 'dxr::TET' de cellules EcAB1-2 d'*E. coli*, dans laquelle le gène *DXR* est interrompu par l'insertion du marqueur TET qui confère la résistance à la tétracycline. Les transformants positifs sont sélectionnés sur un milieu LB contenant de la tétracycline à 7,5 mg.L⁻¹, de l'ampicilline à 100 mg.L⁻¹ et de l'IPTG à 0,02 % pour induire l'expression à partir du promoteur T5. Quand cela est nécessaire, du méthylérytol est ajouté (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2000).

2. Activités prényltransférases

Les tests d'activité des prényltransférases sont réalisés par G. Scalliet et P. Huguency du laboratoire RDP, ENS Lyon.

L'activité prényltransférase de la protéine codée par le gène *RhGPPS* est étudiée et comparée aux activités prényltransférase de protéines isolées et caractérisées, AtGPPS isolée chez *A. thaliana* (Bouvier *et al.*, 2000) et RhGGPPS isolée chez la rose à partir d'une banque d'ESTs (Channelière *et al.*, 2002).

Les tests d'activité prényltransférase sont réalisés comme suit : 100 à 300 ng de protéine purifiée sont ajoutés à 100 µL de tampon de réaction (Tris HCl 100 mM pH 7,5 ; MgCl₂ 2 mM ; MnCl₂ 10 µM ; DTT 2 mM ; DMAPP 10 µM ou 100 ng d'IPP-isomérase purifiée chez *A. thaliana*) et 5 µL [1-¹⁴C]-IPP à 60 mCi.mmol⁻¹ (Amersham-Bioscience).

Les incubations sont réalisées à 30°C pendant 2 h. Le milieu réactionnel est ensuite déphosphorylé par la phosphatase alcaline. 100 µL de Tris 1 M sont ajoutés suivi de 10 µg de phosphatase alcaline d'intestin de veau (Sigma) ; le milieu est incubé 4 h à 37°C avant d'être extrait par 100 µL de chloroforme.

La séparation des isoprénols est réalisée en phase inverse, sur plaques de silice greffées en C18 (plaques Chromafix C18ec, Macherey-Nagel). La migration est effectuée en présence de méthanol/eau (70/30 ; v/v). Les références frontales sont déterminées par la

révélation de témoins (géranylgéraniol, farnésol et géraniol) par pulvérisation d'un mélange vanilline/acide sulfurique.

J. Obtention de plantes transgéniques de tabac

Le protocole de transformation de tabac utilisé est dérivé de celui de Horsch *et al.* (1985).

1. Obtention des explants

Des plantules de tabac, *Nicotiana sylvestris*, sont cultivées en pots stériles sur un milieu de culture T (annexe 4). La transformation du tabac avec la souche d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur de surexpression du gène *RhDXR* est réalisée sur 200 explants, prélevés sur de jeunes feuilles issues de culture *in vitro*. Pour le témoin de transformation, 100 explants sont transformés avec une souche d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur Gateway dans lequel la GFP est exprimée de façon constitutive (35S::GFP, tableau 8).

2. Préparation des bactéries

Une culture de 10 mL de milieu LB, additionné de rifampicine à 50 mg.L⁻¹, de gentamycine à 20 mg.L⁻¹ et de streptomycine à 50 mg.L⁻¹, estensemencée avec une colonie isolée de la souche d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur de transformation. La souche est cultivée pendant 36 h à 27°C sous faible agitation. Dans 20 ml de milieu LB contenant les mêmes antibiotiques, 1 mL de la pré-culture est ajouté. La culture est maintenue une nuit à 27°C sous faible agitation.

3. Transformation des explants

La culture bactérienne est centrifugée 15 min à 500 g, puis rincée deux fois par 20 mL de milieu TT (annexe 4). Elle est ensuite reprise dans 20 mL de milieu TT et diluée au 1/10 dans ce même milieu.

Les explants sont placés dans des bocal stériles contenant 100 mL de culture diluée au 1/10 (50 explants par pot). L'ensemble est placé à 27°C pendant 30 min sous faible agitation. Les explants sont séchés rapidement sur papier filtre stérile, puis placés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu TT sans antibiotique (10 explants/boîte). Les boîtes sont ensuite placées pendant 2 jours à la lumière dans une pièce climatisée à 25°C pour la co-culture.

Les explants sont ensuite repiqués sur un milieu TT (5 explants par boîte) additionné d'augmentin à 400 mg.L^{-1} et de kanamycine à 200 mg.L^{-1} , ainsi que des hormones BAP 1 mg.L^{-1} et ANA $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Ils sont remis en culture dans une pièce climatisée à 25°C . Au bout de 3 semaines, les premiers cals se forment. Les explants, puis les cals, sont repiqués tous les 15 jours sur le même milieu jusqu'à la formation de bourgeons, puis de plantules.

4. Entretien des transformants

Lorsque les plantules sont suffisamment développées, elles sont placées dans des boîtes de Pétri contenant 25 mL de milieu T, additionné de kanamycine à 200 mg.L^{-1} . Au bout de 15 à 21 jours, les plantules sont enracinées et sont acclimatées en serre dans des pots individuels. Pour maintenir une humidité relative élevée, les plantes sont recouvertes d'un film plastique transparent durant une semaine. L'acclimatation est réalisée à 24°C sous une intensité lumineuse de $550 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (lampe Mazda MAIH 400) et une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit.

Résultats

I. La production du parfum chez les roses

A. La production du parfum au sein de la fleur

1. Les organes producteurs du parfum

Il est généralement admis que la fragrance des roses provient des pétales (Esau, 1965). Cependant, des études chez la rose sauvage *Rosa rugosa* (Dobson *et al.*, 1999) ont montré que les autres organes de la fleur produisaient aussi des composés volatils. Dans une première expérience, nous avons voulu savoir si cela était également le cas chez les roses modernes Hybrides de Thé, qui font l'objet de notre étude. Pour cela, une analyse des composés volatils est réalisée par extraction sur différents organes floraux de la variété 'Papa Meilland' prélevée au stade 'bouton très ouvert' (BTO) : sépales, pistils (styles et stigmates), étamines et pétales. L'analyse, réalisée plusieurs fois, donne des résultats équivalents. Le tableau 10 présente les résultats obtenus pour une expérience représentative.

Pétales et étamines sont les organes qui renferment le plus de composés volatils. Les pistils sont 2,9 et 3,8 fois moins concentrés que les pétales et les étamines, respectivement. Dans ces trois organes, toutes les classes de composés sont représentées : dérivés d'acide gras, terpènes, composés aromatiques ; néanmoins, les monoterpènes et leurs dérivés sont majoritaires puisqu'ils représentent 37,6 % (étamines) à 60 % (pistils) des composés identifiés. On retrouve de façon générale les mêmes composés volatils dans ces trois organes floraux, mais les proportions sont très différentes. Par exemple, étamines et pistils renferment des quantités d'eugénol et de méthyleugénol 10 à 35 fois plus importantes que celles des pétales.

Dans les pétales, les alcools monoterpéniques sont les composés majoritaires puisqu'ils représentent 54,3 % des composés volatils totaux. Parmi ces composés, le géraniol est prédominant (41,9 %). Nérol (6,8 %) et citronellol (5,6 %) sont deux autres alcools monoterpéniques présents en quantités très importantes. Ces trois alcools monoterpéniques donnent à cette variété une odeur de rose typique. Outre les monoterpènes, les composés aromatiques sont également des composés majeurs du parfum. Ainsi le 2-phényléthanol (6,4 %) lui confère également un parfum typique de rose, avec une note miellée. Le 3,5-diméthoxytoluène ou DMT (1,4 %), typique des roses chinoises, est responsable de 'l'odeur de thé'.

Tableau 10: Composés volatils majeurs identifiés par extraction dans différents organes floraux de la variété 'Papa Meilland' au stade BTO. Les valeurs représentent les pourcentages de l'aire totale des pics des chromatogrammes de GC-FID. La quantité totale est donnée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PF. - : composé non détecté dans les conditions de l'expérimentation.

composés	organes			
	pétales	étamines	pistils	sépales
β -phellandrène	-	<1	-	<1
trans-2-hexénal	<1	<1	1,0	61,5
cis-3-hexényl-acétate	<1	<1	-	3,0
hexylformate	<1	-	3,1	<1
cis-3-hexéno	-	-	-	5,0
trans-2-hexéno	-	-	<1	2,8
linalol	-	-	-	1,8
trans- β -caryophyllène	<1	<1	-	1,0
néral	<1	2,1	1,2	-
germacrène D	<1	<1	-	<1
heptadécane	<1	1,5	-	<1
guaïadiène	-	<1	1,5	-
bicyclogermacrène	<1	1,3	-	-
géraniol	2,4	7,7	2,0	<1
acétate de géranyl	<1	<1	-	<1
citronellol	5,6	7,9	18,6	3,0
nérol	6,8	4,6	17,9	1,1
DMT	1,4	4,6	1,9	<1
géraniol	41,9	15,3	20,2	3,2
benzylalcool	<1	<1	3,3	<1
nonadecane	14,1	3,9	-	<1
2-phényléthanol	6,4	6,2	6,3	1,6
hydroxytoluène butylé	8,1	7,9	6,0	<1
nonadecène 1	-	4,2	3,6	-
méthyleugéno	<1	2,2	4,3	-
heinécose	5,1	15,6	5,7	4,1
TMB	<1	<1	<1	-
eugéno	-	7,3	2,1	-
composés totaux	343,3	437,9	116,7	64,4

D'autres composés, comme le nonadécane (14,1 %, hydrocarbure à longue chaîne), représentent une part importante des composés extraits des pétales. Cependant, ces composés sont très peu volatils et ne sont probablement pas émis en grande quantité.

Les sépales renferment également des composés volatils, mais dans des quantités moins importantes. Par exemple, les sépales renferment 6,8 fois moins de composés que les étamines. Leur nature est également très différente de celle des composés volatils des pétales, étamines et pistils. En effet, les composés volatils des sépales appartiennent majoritairement à la classe des dérivés d'acide gras (trans-2-hexénal, cis-3-hexénol, cis-3-hexényl-acétate). En plus des dérivés d'acides gras, les sépales contiennent des monoterpènes, sesquiterpènes et d'autres composés que l'on retrouve dans les pétales, étamines et pistils mais dans des quantités beaucoup moins importantes : par exemple, les pétales renferment 75 fois plus de géraniol que les sépales. Par contre, les sépales du renferment du linalol, composé absent des pétales, étamines et pistils chez cette variété.

Les quantités totales de composés volatils sont voisines dans les pétales et les étamines. Néanmoins, lorsque l'on considère la masse totale de chacun de ces organes, les pétales ont une masse totale d'environ 30 g pour la variété de rose étudiée, tandis que les étamines ne représentent qu'une masse totale d'environ 1 g. Ainsi, si on rapporte la quantité de composés volatils à la masse totale de chaque organe, les pétales représentent 24 fois plus de composés volatils que les étamines. En conclusion, même si les étamines apportent une contribution significative, les pétales sont la source majeure du parfum chez cette variété de rose.

2. La répartition du parfum au sein de la fleur

Afin de caractériser la production du parfum dans le pétale, nous avons tout d'abord répondu à deux questions préliminaires :

- Tous les pétales d'une même fleur produisent-ils les mêmes composés dans les mêmes proportions ?
- Toutes les zones du pétale produisent-elles les mêmes composés dans les mêmes proportions ?

Pour répondre à la première question, tous les pétales d'une fleur, prélevée au stade 'fleur épanouie' sont analysés individuellement. L'expérience, réalisée plusieurs fois et sur deux variétés différentes ('Papa Meilland' et 'The Mac Cartney rose'), montre que tous les pétales d'une même fleur, à l'exception des pétales les plus internes, produisent les mêmes composés volatils, dans des quantités et des proportions équivalentes. Les pétales les plus

internes étant plus concentrés en composés volatils (de 1,5 à 2 fois), ils n'ont pas été utilisés pour les analyses qui suivent.

L'observation de la face supérieure du pétale en microscopie électronique environnementale à balayage (MEB) montre une structure différente des cellules de la périphérie du pétale vers l'onglet (Fig. 22). En effet, si les cellules sont très coniques en périphérie et dans la zone centrale, elles deviennent de plus en plus plates lorsque l'on se rapproche de l'onglet. Si l'on se base sur l'hypothèse selon laquelle les cellules coniques de l'épiderme supérieur du pétale sont seules responsables de la production et de l'émission des composés volatils du parfum (Loomis et Croteau, 1973), on peut envisager que toutes les cellules à la base du pétale ne soient pas capables de produire et d'émettre ces composés volatils.

Afin de répondre à cette question, des pétales de la variété 'The Mac Cartney rose' sont prélevés sur une fleur au stade BTO et divisés en 4 zones concentriques. L'analyse par extraction des composés volatils présents dans chacune de ces zones est réalisée plusieurs fois et des résultats identiques sont obtenus. La figure 23 et le tableau 11 présentent les résultats représentatifs obtenus pour une expérience. Les quantités de composés volatils présents dans les cellules du pétale diminuent depuis la périphérie jusqu'à la zone proche de l'onglet (Fig. 23). Si l'on s'intéresse aux pourcentages des différents composés majoritaires, on constate que ceux-ci varient très faiblement dans les zones 1 et 2. Dans les zones 3 et 4, certains composés, comme le linalol, passent en dessous du seuil de détection et le géraniol devient majoritaire (Tableau 11). Suite à ces résultats, dans les analyses qui suivent, la zone la plus proche de l'onglet n'a pas été prélevée.

3. L'évolution du parfum au cours du développement floral

Nous souhaitons étudier les structures cytologiques présentes dans le pétale en relation avec la production de parfum. Pour cela, il était important de définir au préalable la cinétique de cette production du parfum au cours du développement floral.

L'étude de l'émission des composés volatils du parfum de la variété 'Papa Meilland' au cours de son développement floral est réalisée grâce à la technique classique de headspace dynamique dans laquelle une fleur entière est enfermée dans un sac en plastique inerte. Pendant 1 h, les composés volatils sont piégés sur du Tenax, puis élués par de l'hexane. Afin de minimiser les variations environnementales, les fleurs à différents stades de développement

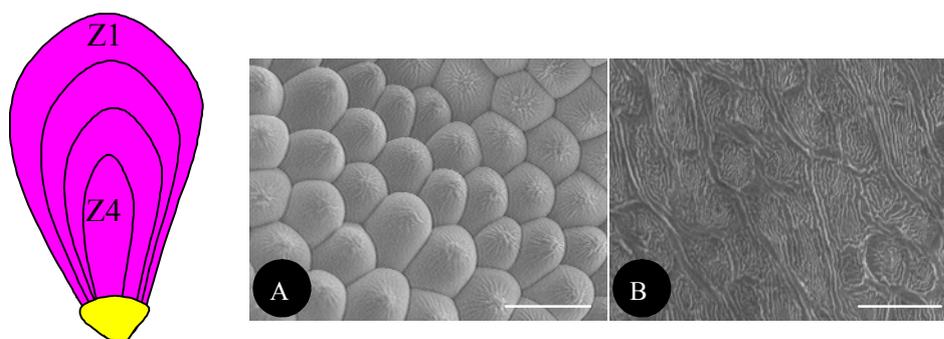


Figure 23 : Zones de la face supérieure des pétales de la variété 'The Mac Cartney rose' stade BTO observées en microscopie électronique environnementale à balayage. A, cellules en périphérie, zone 1 (Z1) ; B, cellules proches de l'onglet, zone 4 (Z4). Les barres représentent une échelle de 50 µm.

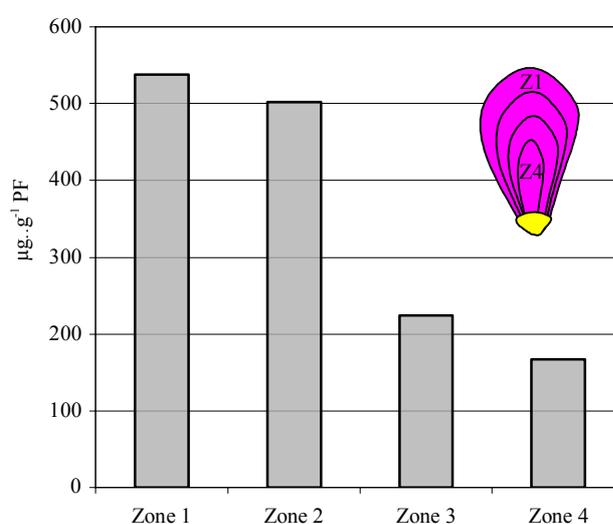


Figure 24 : Répartition dans un pétale des composés volatils majeurs du parfum extraits de la variété 'The Mac Cartney rose' prélevée au stade BTO.

Tableau 11 : Composés volatils majeurs du parfum extraits des quatre zones du pétale d'une fleur de la variété 'The Mac Cartney rose' prélevée au stade BTO

composés	zone							
	1		2		3		4	
	µg.g ⁻¹ PF	%						
2-phényléthanol	53	10	47	9	22	10	0	0
linalol	39	7	22	5	0	0	0	0
nérol	72	13	68	13	44	19	39	23
géraniol	311	58	296	59	159	71	128	77
acétate de citronellyl	62	12	69	14	0	0	0	0
composés totaux	537	100	502	100	225	100	167	100

sont analysées à la même heure de la journée. Au moins trois analyses sur des fleurs différentes sont réalisées pour chaque stade de développement.

Les composés volatils des pétales des mêmes fleurs sont ensuite extraits afin de déterminer leur concentration. La figure 25 et le tableau 12 présentent les résultats obtenus.

Aussi bien en extraction qu'en émission, les quantités de composés volatils détectées augmentent au cours du développement de la fleur ; le maximum de composés volatils est détecté au stade BTO/FE, c'est-à-dire quand la fleur est ouverte. Au stade BJO, l'émission de composés volatils est très faible dans nos conditions d'expérimentation. De plus, la plupart des composés volatils émis à ce stade sont des dérivés d'acides gras et des isomères du pinène (monoterpène). Au stade FS, les quantités émises, bien que significatives, sont plus faibles qu'au stade précédent, BTO/FE.

Parmi les composés volatils émis, les alcools monoterpéniques (géraniol, nérol et citronellol) et leurs dérivés représentent une part très importante des composés volatils totaux quel que soit le stade de développement, excepté le stade BJO. Ainsi, en fonction du stade de développement, ils représentent de 63 à 73 % des composés totaux. Cette importance des composés monoterpéniques est également vérifiée lorsque l'on considère les extraits : en effet, au stade BTO/FE, ils représentent 61 % des composés volatils totaux présents dans les pétales.

En revanche, les quantités de DMT dans le pétale n'évoluent pas de la même façon que les quantités de monoterpènes. En effet, ce composé représente un pourcentage légèrement plus important dans les stades précoces de développement (3,5 % au stade BO) qu'aux stades tardifs (1,6 % aux stades BTO/FE).

Au moment où la fleur est totalement épanouie, deux composés aromatiques, eugénol et méthyleugénol, sont émis à un faible niveau (2,5% des composés totaux), alors qu'ils ne sont pas ou très peu présents dans les extraits de pétale. Ces composés sont probablement émis par les étamines, dans lesquelles ils font partie des composés majoritaires (voir §A.1).

Certains composés, comme le nonadécane, sont présents dans les extraits, mais sont très faiblement émis. Ceci est dû à leur faible volatilité.

L'analyse des composés volatils présents dans les pétales et émis par les fleurs chez d'autres variétés de rose très parfumées, et notamment la variété 'The MacCartney rose', donne des résultats similaires concernant l'évolution des composés volatils au cours du développement floral. Par ailleurs, si l'on prend en compte le rapport entre les composés volatils émis et la concentration en composés volatils dans le pétale, celui-ci est maximum au stade BTO/FE, suggérant que tous les composés volatils ne sont pas émis au stade BO.

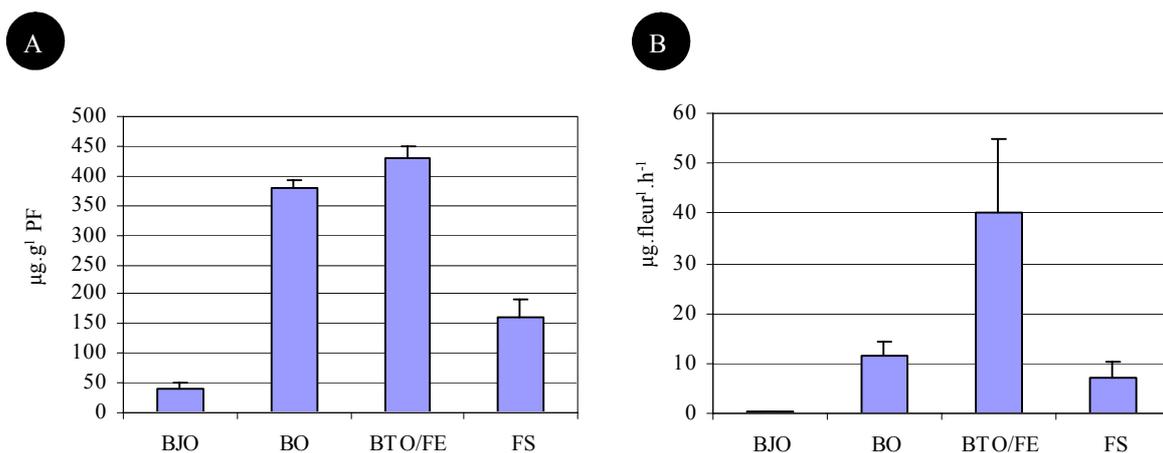


Figure 25 : Evolution des composés volatils extraits des pétales (A, extraction) et émis par les fleurs (B, headspace) au cours du développement floral de la variété 'Papa Meilland'. Les barres représentent l'erreur standard.

Tableau 12 : Composés volatils majeurs extraits des pétales (EX) et émis par les fleurs (HS) de la variété 'Papa Meilland' au cours de son développement floral. Pour l'extraction, les quantités sont exprimées en µg.g⁻¹ PF +/- erreur-standard ; pour le 'headspace', les quantités sont exprimées en µg.fleur⁻¹.h⁻¹.

composés	stade							
	BJO		BO		BTO/FE		FS	
	HS	EX	HS	EX	HS	EX	HS	EX
dérivés d'acide gras	0,1	20,1	0,6	5,1	3,9	5,9	1,2	9,4
citronellol et dérivés	0,0	0,0	0,7	27,6	2,4	22,0	0,4	9,6
géraniol et dérivés	0,0	0,0	6	113,7	22,7	195,8	3,6	39,1
nérol et dérivés	0,0	0,0	1,3	28,9	4,0	39,1	0,5	8,1
autres monoterpènes	0,1	12,3	0,1	7,3	0,1	2,5	0,0	2,0
isomères de germacrène	0,0	0,0	0,0	4,7	0,1	2,8	0,0	0,0
autres sesquiterpènes	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
2-phényléthanol	0,0	3,0	1,3	67,9	1,9	74,5	0,9	78,2
DMT	0,0	0,0	0,9	13,4	1,3	6,9	0,4	2,4
autres benzénoïdes	0,0	0,0	0,2	6,3	0,6	7,7	0,1	7,1
eugénol et méthyleugénol	0,0	0,0	0,0	0,0	1	0,0	0,0	0,0
hydrocarbones à longue chaîne	0,0	6,1	0,2	102,5	1,5	71,1	0,0	5,5
composés non identifiés	0,1	0,0	0,1	0,7	0,3	0,0	0,1	0,0
composés totaux	0,3	41,5	11,5	378,1	39,8	428,2	7,1	161,3
	+/-0,1	+/-7,6	+/-2,6	14,0	14,9	22,0	+/-3,2	31,5

En conclusion, malgré ces petites différences entre l'extraction et la collection des composés volatils par headspace, il existe, chez les roses intensément parfumées, une corrélation étroite entre ce qui est à l'intérieur du pétale et ce qui est émis par la fleur tout au long de son développement.

B. Les pétales : organes producteurs de parfum

Les analyses des composés volatils du parfum réalisées chez les Hybrides de Thé au cours de notre étude et chez la rose sauvage *Rosa x rugosa* (Dobson *et al.*, 1999) montrent que les pétales sont les organes qui produisent le plus de parfum chez ces roses. Une étude de la structure du pétale ainsi qu'une analyse de la localisation du parfum dans cet organe ont donc été mises en œuvre afin de déterminer s'il existe des sites spécialisés dans la production et l'émission du parfum dans les pétales de rose, et si des structures cellulaires spécifiques sont mises en place dans les pétales lors de la production et de l'émission des composés volatils.

1. La structure du pétale de rose

a. Les deux épidermes du pétale

Dans un premier temps, nous avons utilisé la microscopie afin de caractériser au niveau structural le modèle de notre étude : le pétale de rose. Les pétales de rose sont délimités par deux couches d'épiderme, séparées par un parenchyme de type lacuneux. La microscopie électronique environnementale à balayage (MEB) permet l'étude de la surface d'un pétale de rose, sans qu'il soit nécessaire de fixer et de métalliser les échantillons comme dans le cas de la microscopie électronique à balayage classique. Ceci permet de réduire les artefacts liés à ces étapes de préparation de l'échantillon.

L'épiderme inférieur du pétale est plat (Fig. 26A), avec une cuticule intensément striée (Fig. 26C). De longs poils unicellulaires sont parfois observés, mais aucun trichome sécréteur n'est présent.

L'épiderme supérieur est constitué de cellules dont la forme évolue au cours du développement de la fleur. En effet, au stade 'bouton fermé' (BF), les cellules de l'épiderme supérieur sont de petite taille, régulières et leur surface est ridée (Fig. 26D). Au cours du développement de la fleur, ces cellules deviennent plus coniques et les rides s'atténuent sauf au niveau de l'apex des cellules (Fig. 26B et E à I).

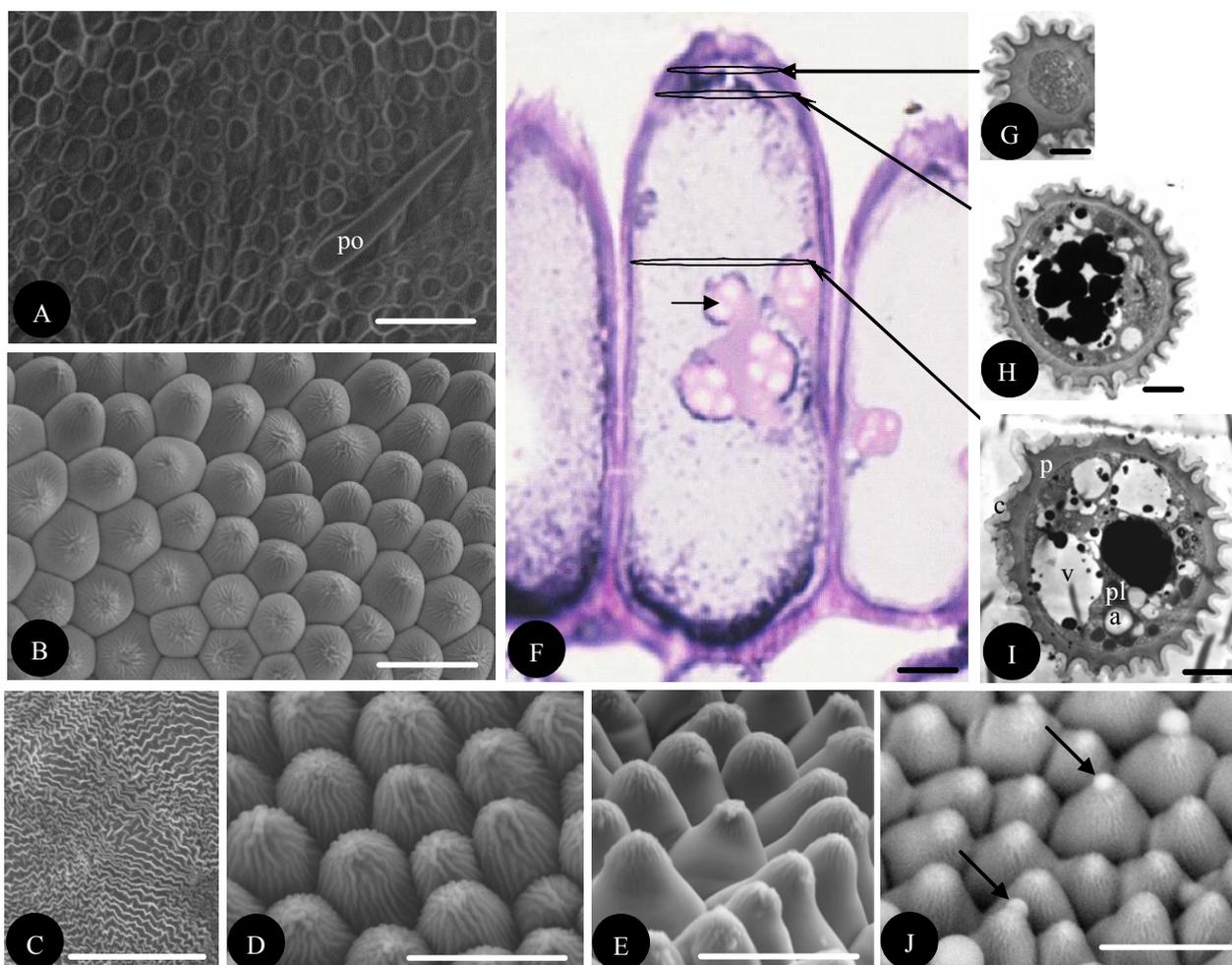


Figure 26 : Structure des épidermes du pétale des roses Hybrides de Thé. A, épiderme inférieur de la variété 'The Mac Cartney rose' stade BTO observé en MEB. B, épiderme supérieur de la variété 'The Mac Cartney rose' au stade BO observé en MEB. C, détail de la cuticule de l'épiderme inférieur de la variété 'The Mac Cartney rose' stade BTO. D, épiderme supérieur de la variété 'The Mac Cartney rose' au stade BF observé en MEB. E, épiderme supérieur de la variété 'The Mac Cartney rose' au stade FE observé en MEB. F, coupe transversale de l'épiderme supérieur de la variété 'Papa Meilland' au stade BO observé en microscopie optique. G à I, coupes tangentielles de l'apex d'une cellule de l'épiderme supérieur de la variété 'Anna' au stade BO observé en MET. J, épiderme supérieur de la variété 'Hacienda' au stade FE observé en MEB, noter la présence de gouttelettes au sommet des cellules (flèche). p, paroi ; c, cuticule ; pl, plaste ; a, amidon ; v, vacuole ; po, poil. Les barres représentent une échelle de 50 μm pour A à E et J, de 10 μm pour F et 2 μm pour G à I.

Chez les variétés parfumées, au moment où la fleur est totalement épanouie, il est possible d'observer des gouttelettes à la pointe des cellules de l'épiderme supérieur (Fig. 25J). Comme ces gouttelettes n'ont jamais été observées chez les roses sans parfum, elles correspondent probablement aux composés volatils. Il est possible que le léger vide exercé à l'intérieur de l'enceinte du MEB soit responsable de la formation de ces gouttelettes par agrégation. Néanmoins, ces gouttelettes sont aussi parfois visibles lorsqu'on observe l'épiderme supérieur d'un pétale en microscopie optique entre lame et lamelle.

b. L'évolution du pétale au cours du développement de la fleur

La microscopie optique est utilisée pour étudier l'évolution de la structure du pétale au cours du développement floral de plusieurs variétés de rose, et plus particulièrement de la variété 'Papa Meilland'. Pour cela, des coupes transversales semi-fines sont réalisées sur des pétales prélevés sur des fleurs à différents stades de développement et colorées au Paragon (Fig. 27A à I).

Aux stades BF (Fig. 27A) et BJO (Fig. 27B), les cellules de l'épiderme supérieur ont une forme plus ou moins rectangulaire. Leur cuticule et leur paroi cellulaire sont fines et leur cytoplasme est dense. Observées en microscopie électronique à transmission (MET), elles ont un noyau large et leurs plastes ont une structure qui rappelle celle des chloroplastes (Figure 27G). Leur cytoplasme contient de très nombreuses vacuoles de petite taille (Fig. 27H) qui fusionnent au cours du développement pour donner une ou quelques très grosses vacuoles. Sous les cellules des épidermes, se trouve une couche de cellules sous-épidermiques dont le cytoplasme est également très dense. Les cellules de l'épiderme supérieur sont reliées entre elles et avec les cellules du sous-épiderme par de nombreux plasmodesmes (Figure 27I). La partie centrale du pétale est remplie d'un parenchyme lacuneux, composé de cellules peu jointives très vacuolisées et de larges espaces intercellulaires. Les cellules de l'épiderme inférieur ont une forme rectangulaire et sont généralement plus grosses que les cellules de l'épiderme supérieur, recouvertes d'une cuticule et d'une paroi plus épaisses. Leur cytoplasme est également relativement dense. Au stade BJO, des amyloplastes sont souvent visibles dans les cellules des deux épidermes et du parenchyme (Fig. 27B, flèches rouges).

Lorsque les boutons floraux commencent à s'ouvrir (stade BO et BTO), les cellules des deux épidermes, ainsi que les cellules du parenchyme, renferment de très nombreux et volumineux amyloplastes (Fig. 27C et D, flèches rouges). Le parenchyme se désorganise et devient de plus en plus lacuneux. C'est à ce stade que la fleur commence à émettre des composés volatils.

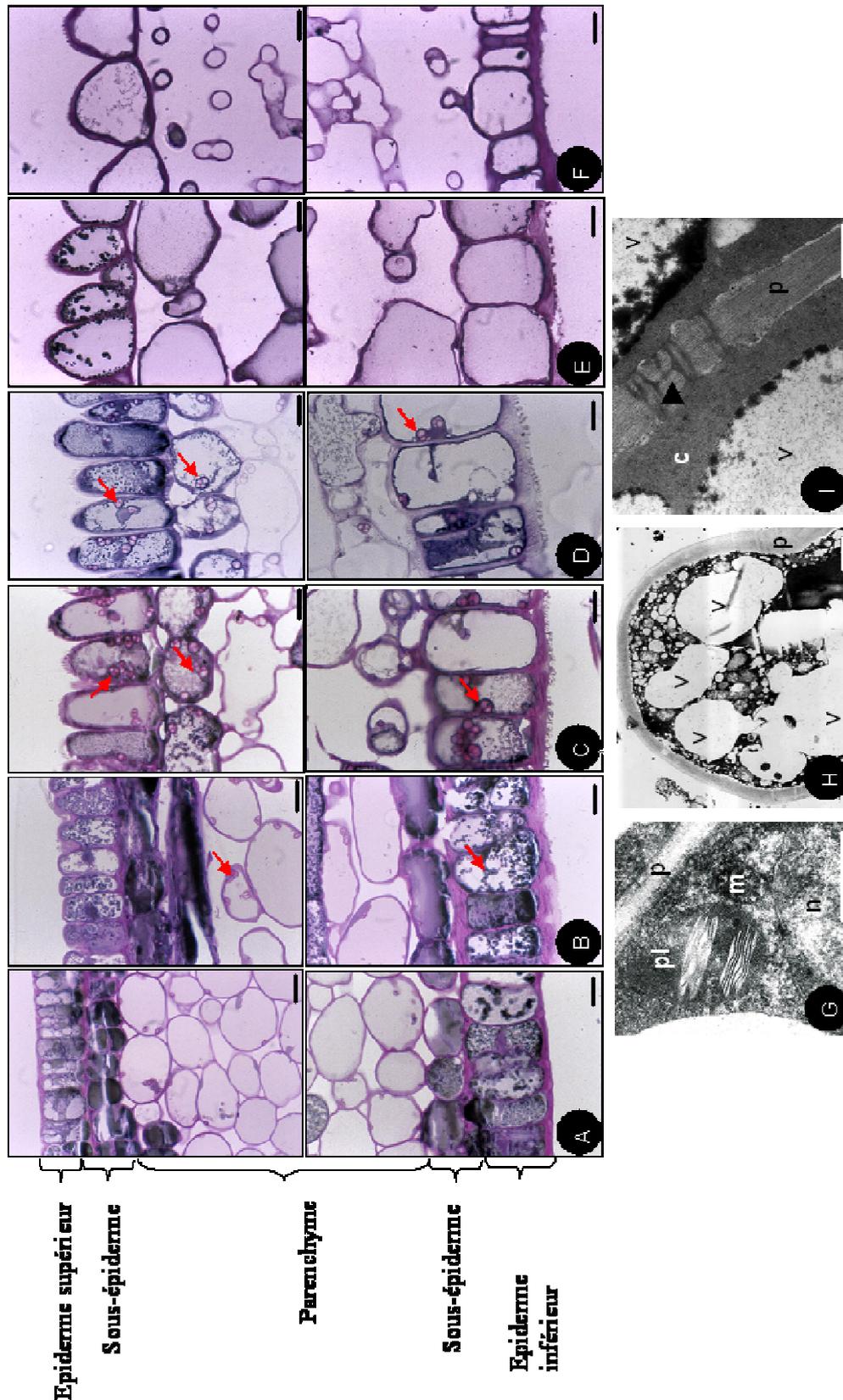


Figure 27 : Micrographies optiques (A à F) et électroniques (G à I) de coupes transversales de pétales de la variété ‘Papa Meiland’. A, stade BF ; B, stade BJO ; C, stade BO ; D, stade BTO ; E, stade FE ; F, stade FS ; G, cellule de l’épiderme supérieur au stade BF ; H et I, cellules de l’épiderme supérieur au stade BJO. v, vacuole ; m, mitochondrie ; c, cytoplasme ; p, paroi ; pl, plaste ; n, noyau ; ►, plasmodesmes ; flèches rouges, amidon. Les barres représentent une échelle de 10 µm pour A à F, de 0,5 µm pour G et H et 1 µm pour I.

Lorsque la fleur est épanouie et émet le maximum de composés volatils (stade FE), les cellules de l'épiderme supérieur ont acquis leur forme de papille conique caractéristique (Fig. 27E). Les vacuoles des cellules des épidermes occupent la quasi-totalité de la cellule et sont remplies de précipités qui pourraient correspondre à des pigments (anthocyanes) ou à des tanins. De plus, les amyloplastés ont disparu (Fig. 27E).

Lorsque la fleur est sénescence (stade FS), la désorganisation du pétale est maximale : les cellules du sous-épiderme ne sont plus visibles et le parenchyme lacuneux est pratiquement dépourvu de cellules (Fig. 27F).

2. La production du parfum par le pétale

Les analyses en MEB confirment que chez la rose, comme chez d'autres espèces, les cellules des deux épidermes du pétale ont des caractéristiques différentes : les cellules de l'épiderme supérieur ont une forme de papille conique et l'ensemble formé par la cuticule et la paroi est fin, tandis que les cellules de l'épiderme inférieur sont plus volumineuses, rectangulaires et recouvertes d'une épaisse couche formée par la cuticule et la paroi.

De plus, depuis fort longtemps, il est supposé que les cellules de l'épiderme supérieur du pétale, à cause leur forme particulière, sont les seules responsables de l'émission des composés volatils du parfum (Loomis et Croteau, 1973). Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. En mettant au point une technique de séparation des épidermes du pétale en les pelant et en adaptant la technique de SPME, nous avons cherché à savoir si les deux épidermes du pétale des roses Hybrides de Thé sont capables de produire et d'émettre les composés volatils du parfum ou bien si seul l'épiderme supérieur possède ces deux fonctions.

a. La production des composés volatils dans les deux épidermes

L'analyse des composés volatils présents dans les cellules des deux épidermes du pétale est réalisée par extraction à l'hexane. Brièvement, à l'aide d'une pince très fine, l'épiderme supérieur d'un pétale est séparé du parenchyme et de l'épiderme inférieur, et l'épiderme inférieur d'un autre pétale est séparé du parenchyme et de l'épiderme supérieur. Une extraction par l'hexane des composés volatils du parfum est réalisée sur les différentes parties du pétale. Deux variétés de rose sont utilisées pour cette expérience : la variété 'The Mac Cartney rose' et la variété 'Baronne Edmond de Rothschild'. Les résultats de l'expérience sur la variété 'Baronne Edmond de Rothschild' sont présentés dans la figure 28A. Des résultats similaires sont obtenus sur l'autre variété. Les concentrations en composés

volatils sont toujours plus élevées dans les fractions correspondant aux épidermes seuls que dans les fractions correspondant au parenchyme plus épiderme. Ceci suggère que les deux épidermes sont les sites de concentration des composés volatils. La concentration en composés volatils est légèrement plus importante dans l'épiderme supérieur (Fig. 28A). Ces résultats prouvent que l'épiderme supérieur n'est pas le seul site de concentration des composés volatils puisque la concentration en composés volatils des cellules de l'épiderme inférieur est relativement élevée, même si elle n'égale pas celle de l'épiderme supérieur.

b. L'émission des composés volatils par les deux épidermes

L'émission des composés volatils par les deux épidermes du pétale de la variété 'The Mac Cartney rose' est réalisée en adaptant la technique de SPME. Le pétale prélevé sur une fleur au stade BTO est placé sur un support inerte et un cône de pipette permet de délimiter une chambre d'analyse. La fibre de SPME est introduite dans cette chambre par l'extrémité du cône et les composés volatils sont piégés pendant 1 h sur la fibre. La désorption de la fibre se fait pendant 2 min à 240°C dans la chambre d'injection du chromatographe et les composés volatils sont analysés par GC-FID. Les composés volatils émis par les deux épidermes du même pétale sont ainsi successivement analysés. L'expérience est répétée plusieurs fois et aucune différence significative n'est observée dans l'émission des deux épidermes (Fig. 28B). Ce résultat prouve que l'épiderme inférieur émet des composés volatils de la même façon que l'épiderme supérieur.

c. La localisation tissulaire d'une enzyme responsable de la synthèse du DMT

L'orcinol-O-méthyltransférase (OOMT) est une enzyme qui intervient dans les dernières étapes de la synthèse du DMT, appartenant à la famille des composés aromatiques et conférant une 'odeur de thé' au parfum de certaines roses, notamment les roses d'origine chinoise. La localisation tissulaire de l'OOMT par Western-blot dans les pétales de rose a été réalisée par P. Huguency (laboratoire RDP, ENS Lyon).

Les protéines du pétale entier, de l'épiderme supérieur et enfin de l'épiderme inférieur sont extraites à partir de pétale de la variété 'Anna' qui synthétise des quantités très importantes de DMT et dont les épidermes sont facilement pelés. La figure 28C montre que l'OOMT est présente dans les deux épidermes du pétale de rose.

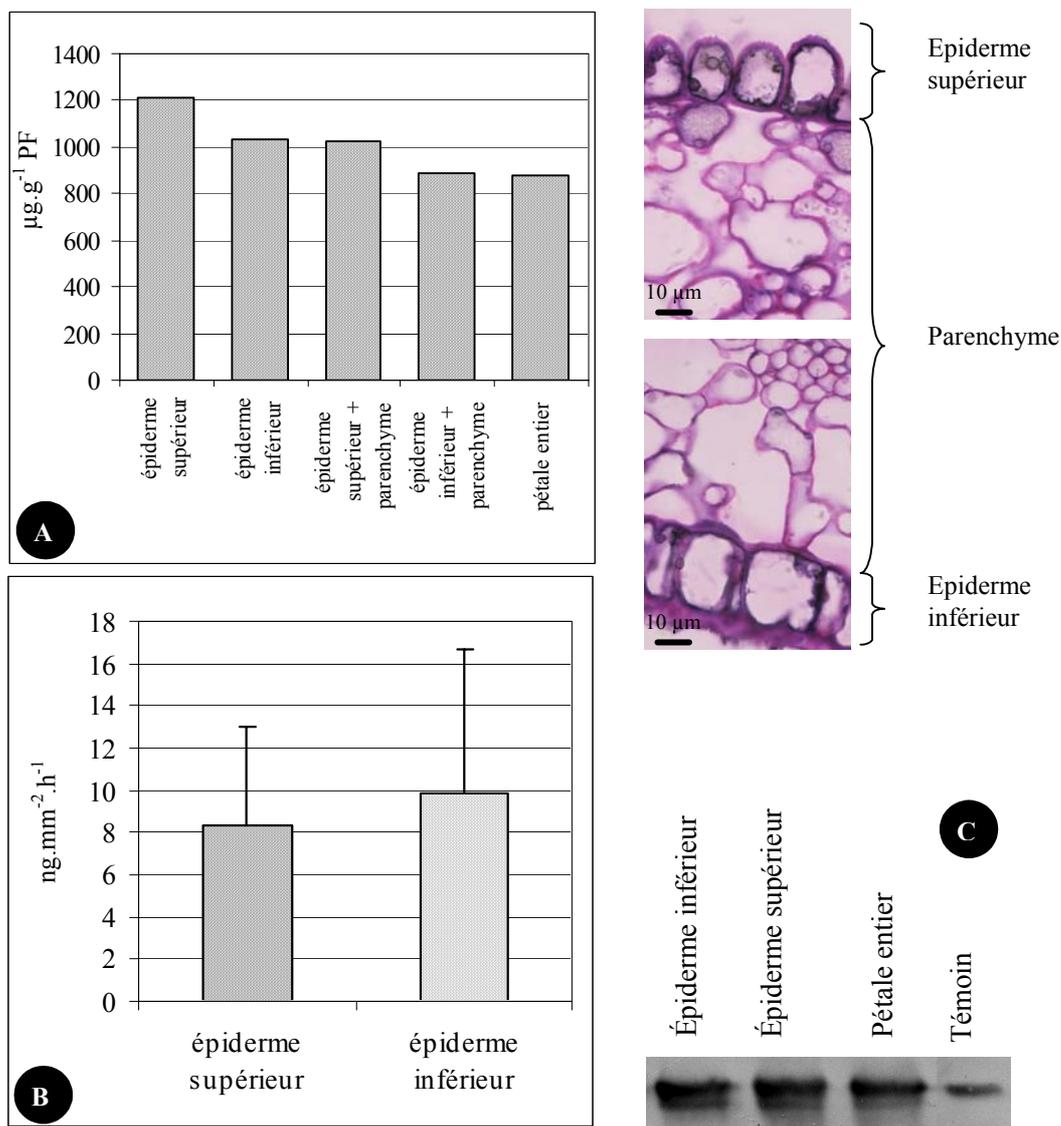


Figure 28 : Analyse des composés volatils extraits (A) dans les tissus du pétale de la variété 'Baronne Edmond de Rothschild' au stade BTO ou émis (B) par les deux faces d'un pétale de la variété 'The Mac Cartney rose' au stade BTO. Pour B, la moyenne a été faite sur 4 analyses et les barres représentent l'erreur standard. C, localisation par Western-blot de l'OOMT de rose, impliquée dans les dernières étapes de la synthèse du DMT (P. Hugueney, RDP, ENS de Lyon). 5 µg de protéines totales extraites des pétales de la variété 'Anna' sont déposées dans chaque puits ; témoin, protéine recombinante purifiée.

Etant donné que des quantités équivalentes de protéines sont déposées dans chaque puits, l'OOMT est présente dans les deux épidermes à des niveaux équivalents.

En conclusion, les trois expériences décrites ci-dessus montrent que les deux épidermes du pétale de rose produisent et émettent des composés volatils et renferment une enzyme responsable de la synthèse de ces composés.

3. Les structures cellulaires du pétale

La littérature est riche d'études cytologiques ayant pour but de mettre en évidence des structures spécifiques de cellules sécrétrices, notamment dans les trichomes sécréteurs. Par exemple, les glandes peltées des Lamiacées, productrices de composés terpéniques, se caractérisent par une prolifération intense du réticulum endoplasmique et par un très grand nombre de leucoplastes (Ascensao *et al.*, 1997 ; Turner *et al.*, 2000a). Nous avons donc utilisé la MET afin de savoir si des structures spécifiques sont mises en place dans les pétales de rose au cours du développement floral, parallèlement à la production de composés volatils.

a. Les structures caractéristiques des pétales de rose aux stades BO, BTO et FE

Au stade BO, les cellules de l'épiderme supérieur du pétale contiennent de nombreux plastes renfermant plusieurs grains d'amidon dont les tailles sont variables d'un plaste à l'autre (Fig. 29C). Au stade BTO, la paroi des cellules de l'épiderme supérieur du pétale forme un réseau à l'intérieur de la cuticule (Fig. 29A). Ce stade se caractérise également par l'abondance de corps de Golgi associés à de nombreuses vésicules (Fig. 29B), ainsi que par de nombreuses mitochondries.

Au stade FE, quand la fleur émet le maximum de composés volatils, les amyloplastes sont pratiquement absents du cytoplasme des cellules de l'épiderme supérieur du pétale. Ce stade se caractérise par l'abondance de plastes renfermant de nombreuses inclusions lipidiques osmiophiles denses aux électrons, les plastoglobules (Fig. 29E et G). On observe parfois à ce stade des plastes renfermant à la fois de l'amidon et des plastoglobules (Fig. 29D). A proximité des plastes, le réticulum endoplasmique forme des empilements, auxquels sont associées des vésicules de réticulum (Fig. 29F). Des enroulements membranaires,

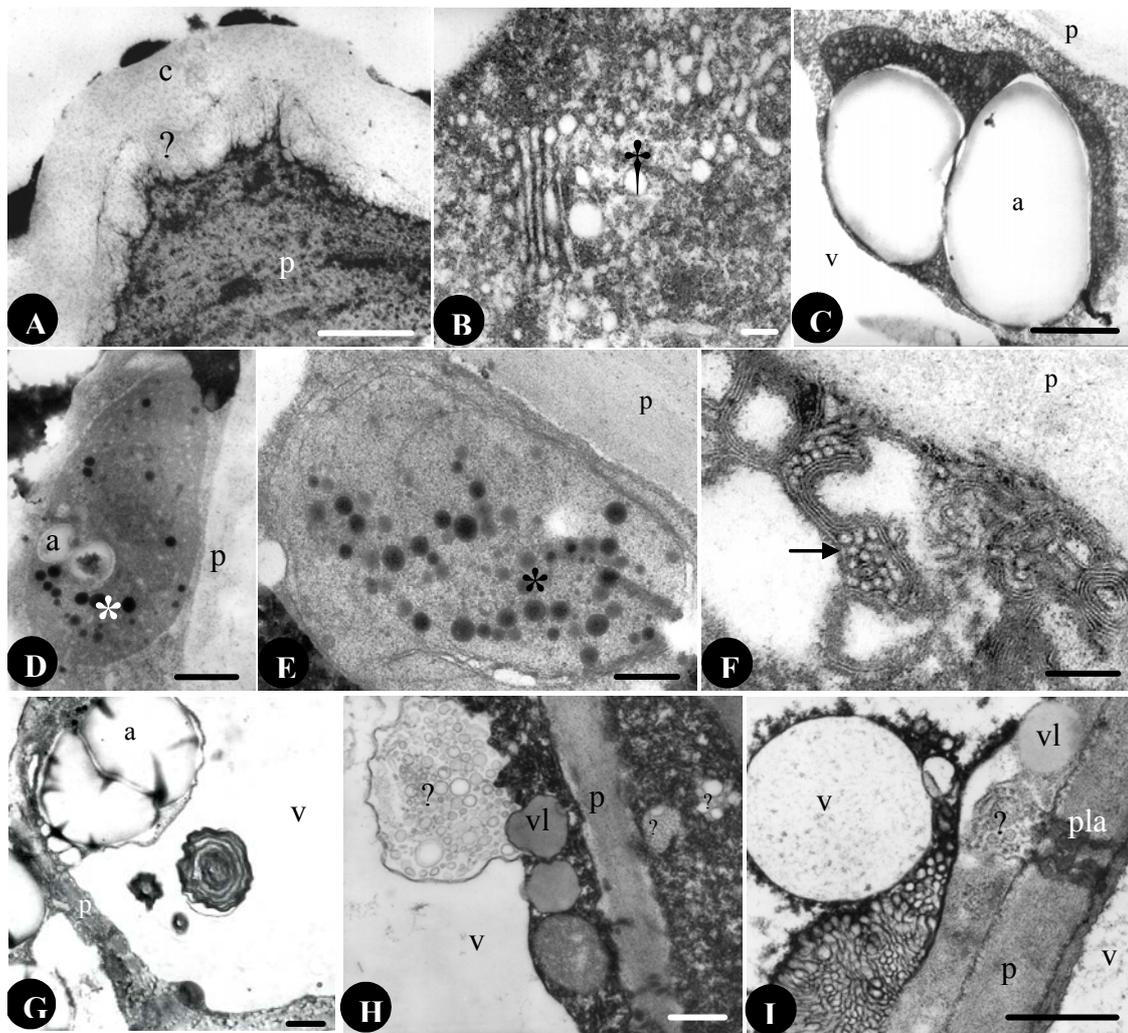


Figure 29 : Micrographies électroniques à transmission des cellules de l'épiderme supérieur du pétale de rose. A et B, cellules de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'Papa Meilland', stade BTO ; C, cellules de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'Alister Stella Gray', stade BO ; D, cellule de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'Royal Red', stade FE ; E, cellule de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'The Mac Cartney rose', stade FE ; F, cellule de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'Paul Ricard', stade FE ; G, cellule de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'Alister Stella Gray', stade FE ; H, cellule de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'Alister Stella Gray', stade FE ; I, cellule de l'épiderme supérieur du pétale de la variété 'Papa Meilland', stade FE. c, cuticule ; p, paroi ; pl, plaste ; a, amidon ; v, vacuole ; pla, plasmodesmes ; vl, vésicules lipidiques ; *, plastoglobules ; †, vésicules golgiennes ; fm, figure de myéline ; flèche, vésicules de réticulum ; ⊙, corps multivésiculaires. Les barres représentent une échelle de 0,1 μm (B et F), 0,5 μm (A, D, E, H et I) et 1 μm (C et G).

rappelant des figures de myéline, sont également observés (Fig. 29G). La présence de nombreuses vésicules lipidiques au contenu dense caractérise également ce stade (Fig. 29H et I). Au niveau de la membrane plasmique, de nombreuses invaginations sont visibles, ainsi que, parfois, de nombreuses vésicules regroupées, formant des corps multivésiculaires (Fig. 29H et I).

Les organites présents dans l'épiderme inférieur des pétales de rose sont les mêmes que ceux décrits ci-dessus dans l'épiderme supérieur.

b. La localisation subcellulaire des terpènes

Nos expériences montrent que chez *Rosa x hybrida*, il n'existe pas de structures spécialisées dans la production du parfum : les deux épidermes du pétale produisent et émettent les composés volatils. Afin de localiser les terpènes à l'intérieur des cellules de ces deux épidermes, la coloration au réactif de NADI est utilisée. Cette coloration permet de différencier des inclusions lipidiques (coloration bleue) de celles renfermant des terpènes (coloration violette).

La coloration au réactif de NADI est mise en oeuvre sur les pétales frais de nombreuses roses, parfumées et non parfumées. Il est nécessaire de choisir des variétés de couleur pâle ou blanche parce que les anthocyanes gênent l'observation de la coloration au NADI. Dans les cellules des épidermes des pétales de toutes les roses, de nombreuses vésicules lipidiques de petite taille sont visibles et colorées en bleu (Fig. 30A et B).

Dans les cellules de l'épiderme supérieur d'un pétale d'une rose parfumée produisant des terpènes, des vésicules plus grosses colorées en violet sont observées, ce qui indique un contenu terpénique (Fig. 30C). Ces vésicules sont également visibles dans les cellules de l'épiderme inférieur. Elles ne sont jamais observées dans les cellules des pétales de roses contenant peu ou pas de terpènes. La présence de ces gouttelettes lipidiques est donc liée à la production et/ou au stockage des composés terpéniques. Elle confirme également que les deux épidermes renferment ce type de composés.

C. Les différences entre les roses parfumées et les roses non parfumées

Certaines roses, notamment celles cultivées pour la fleur coupée sont quasiment dépourvues de parfum (Gudin, 1995). Nous souhaitons savoir cette absence de parfum était due au fait que ces roses produisent peu ou pas de composés volatils, ou bien si elle reflétait un défaut dans l'émission des composés volatils.

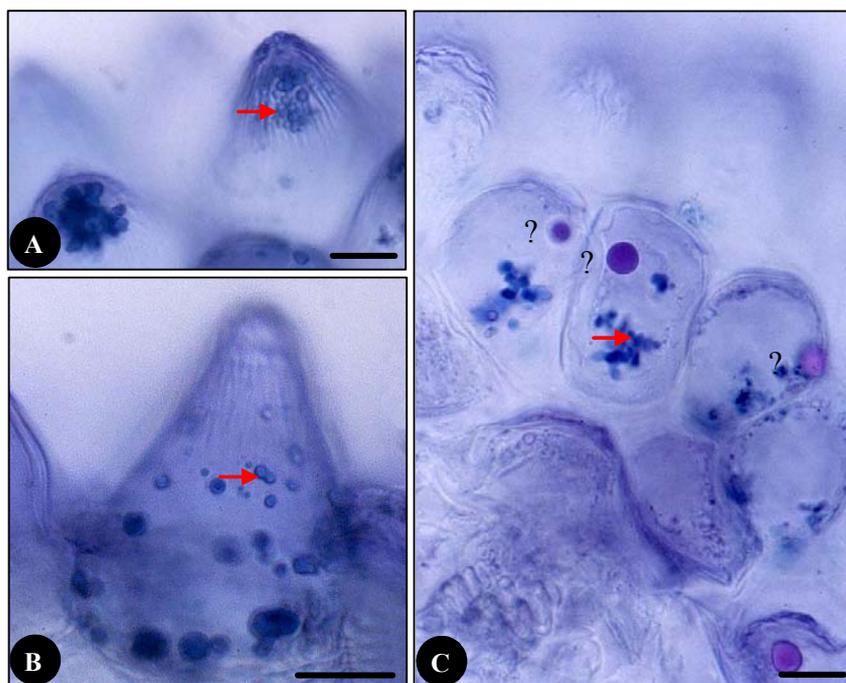


Figure 30 : Micrographies optiques après une coloration avec le réactif de NADI de cellules de l'épiderme supérieur de pétales de la variété ' Sonia Rykiel' (A et B) et de la variété 'Alistar Stella Gray' (C), aux stade BTO. Flèches rouges, vésicules lipidiques ; ►, vésicules lipidiques contenant des terpènes. Les barres représentent une échelle de 10 µm.

1. Les composés volatils d'une rose inodore

La variété 'Black Baccara' est commercialisée par la firme Meilland Richardier pour le marché de la fleur coupée. Elle est considérée comme pratiquement inodore. Les composés volatils extraits à partir des pétales et émis par les fleurs de cette variété au cours de son développement floral sont analysés de la même façon que ceux de la variété 'Papa Meilland' (cf. § A-3). La figure 31 et le tableau 13 présentent les résultats obtenus. Les quantités de composés volatils extraites chez la variété 'Black Baccara' sont beaucoup plus faibles que celles extraites chez la variété 'Papa Meilland', au même stade de développement. Ainsi, au stade BTO/FE, les pétales de la variété 'Papa Meilland' renferment $428,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ PF de composés volatils contre $85,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ PF de composés volatils chez la variété 'Black Baccara', soit une quantité de composés volatils 6 fois moins importante. Les composés volatils majeurs extraits des pétales de la variété 'Black Baccara' sont le DMT et des dérivés d'acides gras. Les pétales renferment également une grande quantité d'hydrocarbures à longue chaîne. Aucun alcool monoterpénique n'est détecté.

Tout au long de son développement floral, la variété 'Black Baccara' émet majoritairement du DMT, dans des quantités très faibles. En effet, les quantités de composés volatils émis sont 27 fois moins importantes que celles de la variété 'Papa Meilland' au même stade. Parmi ces composés volatils émis, on trouve également de l'eugénol et du méthyleugénol, absent des extraits. Leur présence s'explique par le fait que l'analyse de l'émission des composés volatils est réalisée sur la totalité de la fleur. Ces deux composés volatils, et tout particulièrement l'eugénol, sont volatils spécifiques des étamines chez ces roses Hybrides de Thé (cf § A.1). Même si, tout comme pour la variété 'Papa Meilland', l'émission des composés volatils est maximale au stade BTO/FE, elle est presque aussi importante au stade BO. De plus, le rapport entre les quantités de composés volatils émis et la concentration en composés volatils dans les pétales de la variété 'Black Baccara' est faible par rapport à celui observé chez la variété 'Papa Meilland'. En effet, les pétales de la variété 'Papa Meilland' renferment, au stade BTO/FE, 6 fois plus de composés volatils que ceux de la variété 'Black Baccara' mais les fleurs émettent 27 fois plus de composés. Il semble donc que la variété inodore produit très peu de composés volatils et en émet des quantités encore plus faibles.

Par ces expériences, nous pouvons conclure que la variété 'Black Baccara' est capable de synthétiser de petites quantités de certains composés volatils, comme le DMT. Mais pour des raisons inconnues, cette variété n'est pas capable de produire et d'émettre les composés

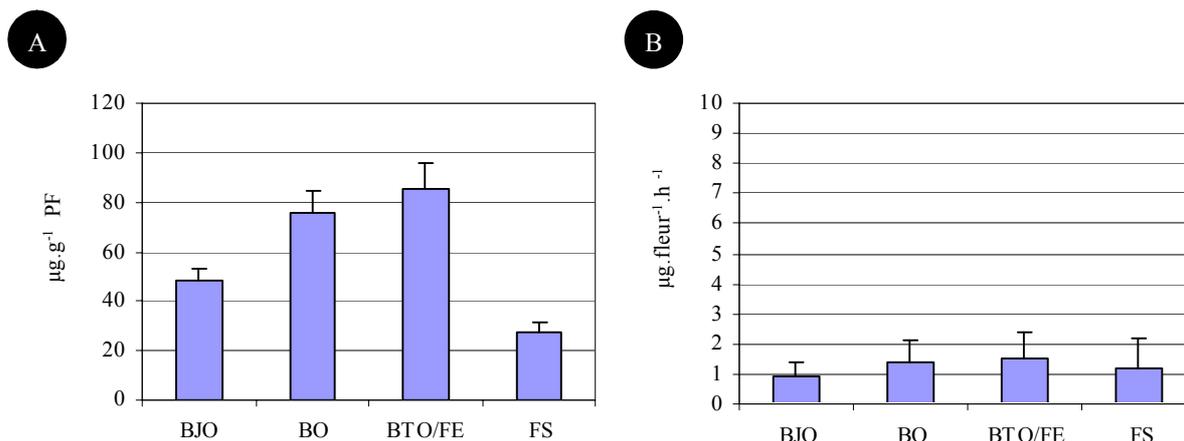


Figure 31 : Evolution des composés volatils extraits des pétales (A) et émis par les fleurs (B) au cours du développement floral de la variété 'Black Baccara'. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

Tableau 13 : Composés volatils majeurs extraits des pétales (EX) et émis par les fleurs (HS) de la variété 'Black Baccara' au cours de son développement floral. Pour l'extraction, les quantités sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ PF +/- erreur-standard ; pour le headspace, les quantités sont exprimées en $\mu\text{g.fleur}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

composés	stade							
	BJO		BO		BTO/FE		FS	
	HS	EX	HS	EX	HS	EX	HS	EX
dérivés d'acides gras	0,1	21,1	0,2	13,7	0,1	10,5	0,2	8,1
monoterpènes	0,3	17,4	0,0	10,3	0,0	6,7	0,0	3,2
DMT	0,0	0,0	0,8	8,7	0,8	18,5	0,5	1,1
méthyleugénol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
hydrocarbones à longue chaîne	0,0	9,6	0,0	39,2	0,1	44,9	0,0	3,6
composés non identifiés	0,6	0,0	0,4	3,5	0,4	5,0	0,5	11,6
composés totaux	0,9	48,0	1,4	75,3	1,5	85,5	1,2	27,7
	+/-0,5	+/- 4,9	+/-0,7	+/- 8,8	+/-0,8	+/-10,5	+/-1,0	+/- 3,5

volatils caractéristiques des roses Hybrides de Thé parfumées, les alcools monoterpéniques et le 2-phényléthanol.

2. La structure du pétale des roses non parfumées

L'étude cytologique décrite au § B a également été conduite sur plusieurs roses décrites comme très peu ou pas parfumées ('Black Baccara', 'Rouge Meilland', 'Royal red'). Que ce soit en microscopie optique sur coupes semi-fines ou en microscopie électronique sur coupes ultra-fines, ces études n'ont pas permis pas de mettre en évidence de différences très nettes entre les deux types de roses, parfumées ou non. Par exemple, tout comme chez les roses parfumées, le pétale de la variété 'Black Baccara' est constitué de deux épidermes, d'une couche sous-épidermique et d'un parenchyme lacuneux. Les cellules de l'épiderme supérieur évoluent au cours de leur développement : petites et de forme régulière aux stades BF et BJO, elles deviennent coniques papilleuses aux stades BO, BTO et FE. Les cellules du pétale de cette variété renferment également de l'amidon sous forme d'amyloplastés aux stades BJO, BO et BTO. Ces plastés évoluent ensuite en plastés contenant des plastoglobules.

La différence entre roses parfumées et non parfumées ne peut donc pas être expliquée par une absence de structures spécifiques de production des terpènes. Nous avons suggéré qu'il existait une différence entre les ratios extraction/émission pour les deux variétés étudiées au § B.2 et C.1, 'Black Baccara' et 'Papa 'Meilland'. Cette différence entre roses parfumées et non parfumées doit être confirmée par l'analyse d'autres variétés. Néanmoins, une des hypothèses, fréquemment avancée pour expliquer ce phénomène, est que la cuticule présente à la surface des épidermes représente une barrière à l'émission des composés volatils (Goodwin, 2003). Cette cuticule particulière aurait été sélectionnée parallèlement à une longue tenue en vase.

Pour tester cette hypothèse, l'épaisseur de la cuticule des cellules de l'épiderme supérieur des pétales des variétés 'Papa Meilland' et 'Black Baccara' est mesurée sur des micrographies électroniques à transmission. Brièvement, sur une même micrographie, 10 mesures d'épaisseur sont faites, permettant de donner une valeur moyenne de l'épaisseur de la cuticule sur cette photographie. Pour chaque variété, dix micrographies de cellules de l'épiderme supérieur de pétales prélevés aux stades BTO et FE sont analysées, provenant d'au moins trois pétales différents.

Dans ces conditions d'analyse, aucune différence significative n'est observée puisque pour les deux variétés, la cuticule des cellules de l'épiderme supérieur du pétale a une épaisseur de $0,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$.

3. Les ressources carbonées dans le pétale de rose

L'étude cytologique de la structure du pétale au cours du développement floral montre que les pétales aux stades BJO, BO et BTO contiennent de nombreux et volumineux amyloplastés. Ces organites étant beaucoup moins nombreux au stade FE, il se produit donc une dégradation de l'amidon, parallèlement à l'émission du parfum. Les composés volatils, notamment les monoterpènes, dérivent du glucose. Il est donc possible que l'absence de monoterpènes chez les roses non parfumées soit liée à une limitation en ressources carbonées sous forme d'amidon ou de D-glucose libre.

Pour tester cette hypothèse, la quantité d'amidon accumulée dans les pétales est tout d'abord analysée chez la variété 'The Mac Cartney rose' tout au long de son développement floral. Chez cette variété, la quantité d'amidon est maximale aux stades BJO et BO (Fig. 32) et les pétales au stade FE renferment des quantités très faibles d'amidon. Ceci confirme les observations de microscopie et met en évidence une dégradation de l'amidon dans le pétale parallèlement à une augmentation de l'émission du parfum au cours du développement floral.

Afin de savoir s'il existe une relation entre quantités d'amidon et quantités de monoterpènes dans le pétale, onze variétés de la firme Meilland Richardier, présentant des caractéristiques de parfum différentes, sont analysées à la fois pour leur composition en composés volatils et pour les quantités d'amidon qu'elles renferment. Toutes les plantes sont cultivées en champ dans des conditions équivalentes. Les résultats sont présentés dans le tableau 14 et la figure 33. Les composés volatils extraits des pétales des onze variétés, prélevés sur des fleurs au stade BTO, sont analysés par GC-FID. Les variétés décrites comme inodores ('Black Baccara', 'Rouge Meilland', 'La Sevillana') contiennent de très faibles quantités de composés volatils, et le composé majoritaire est le plus souvent le DMT (tableau 14). Sur la base des quantités de composés monoterpéniques extraits des pétales, nous pouvons définir trois catégories de roses :

- Classe I : variétés sans monoterpènes : 'Black Baccara', 'La Sevillana', 'Rouge Meilland', 'Paul Ricard' et 'Mme Antoine Meilland' ;
- Classe II : variétés dont les quantités de monoterpènes sont inférieures à 100 ng.mg⁻¹ PF : 'Marcel Pagnol', 'Christophe Colomb' et 'Panthère rose' ;
- Classe III : variétés renfermant des quantités très importantes de monoterpènes (> 100 ng.mg⁻¹ PF) : 'The MacCartney rose', 'Charles de Gaulles' et 'Papa Meilland'.

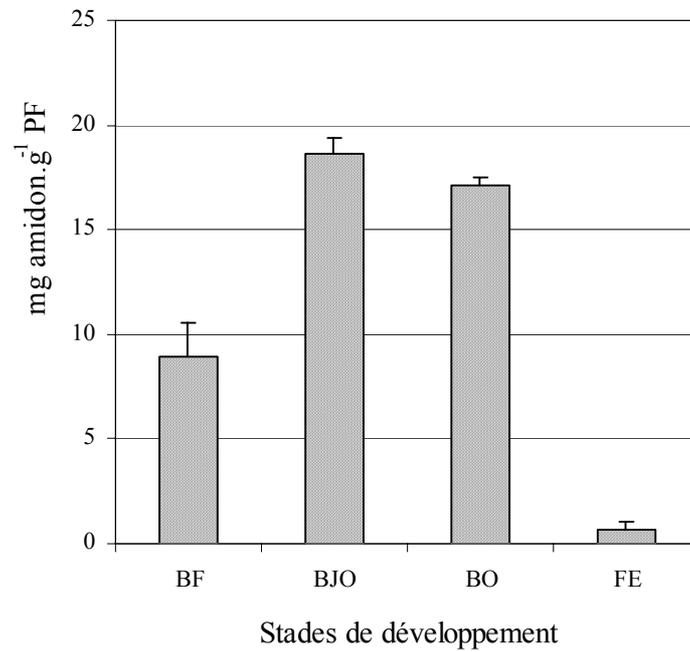


Figure 32 : Evolution de la quantité d'amidon dans les pétales de la variété 'The Mac Cartney rose' au cours de son développement floral. Les barres représentent l'erreur standard, calculée sur 3 répétitions.

Ces catégories établies sur la base des quantités de monoterpènes se superposent à des catégories établies sur la base de la quantité totale de composés volatils. Ainsi, les pétales de la variété ‘Paul Ricard’ contiennent peu de composés terpéniques et de façon générale peu de composés volatils ; par opposition, ceux de la variété ‘Papa Meilland’ contiennent de très grandes quantités de terpènes et de façon générale une quantité très importante de composés volatils (tableau 14). Ces variétés riches en monoterpènes sont également celles qui sont données comme très parfumées dans les catalogues des obtenteurs.

Pour chacune de ces variétés, le contenu en amidon est analysé à deux stades de développement : BJO et BTO. Pour la majorité des variétés, les quantités d’amidon sont plus importantes au stade BJO (Fig. 33). Les résultats obtenus ne permettent pas d’établir une corrélation entre les quantités d’amidon présentes aux stades BJO et BTO et la capacité à produire des composés volatils au stade BTO.

Ainsi, au stade BJO, les pétales de la variété ‘Christophe Colomb’ contiennent une quantité importante d’amidon ($48,5 \text{ mg.g}^{-1}$ PF) alors que la quantité de monoterpènes présente dans les pétales au stade BTO est faible ($37 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ PF). Par opposition, les pétales de la variété ‘Papa Meilland’ qui contiennent une quantité très importante de monoterpènes ($446 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ PF) au stade BTO accumulent peu d’amidon ($10,6 \text{ mg.g}^{-1}$ PF) au stade BJO.

Par la technique de dosage employée, il est également possible d’analyser les quantités de D-glucose libre dans les pétales. En effet, pour être mobilisé pour la biosynthèse, l’amidon doit être transformé en D-glucose libre. Pour toutes les variétés étudiées, la quantité de D-glucose libre est plus élevée au stade BTO qu’au stade BJO (Fig. 33). Cependant, il n’existe aucune corrélation entre la quantité de D-glucose libre et la quantité de monoterpènes ou de composés totaux.

II. Isolement de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des monoterpènes

La compréhension de la production et de l’émission du parfum chez la rose passe par la caractérisation des enzymes responsables de la synthèse des composés volatils. Les monoterpènes, en particulier les alcools monoterpéniques, représentent la plus grande proportion des composés volatils chez *Rosa x hybrida*. Ils sont synthétisés à partir de

Tableau 14: Analyse par extraction de la composition du parfum de 11 variétés de roses prélevées au stade BTO. Les quantités sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PF.

variétés de <i>R. x hybrida</i> L.											
	'Black Baccara'	'La Sevillana'	'Rouge Meilland'	'Paul Ricard'	'Marcel Pagnol'	'Christophe Colomb'	'Mme A.Meilland'	'Panthère rose'	'Charles de Gaulle'	'The Mac Cartney rose'	'Papa Meilland'
dérivés d'acides gras	1	0	5	6	1	0	37	4	11	4	4
monoterpènes	0	0	0	0	31	37	0	75	267	238	446
sesquiterpènes	0	4	0	0	15	40	4	69	31	53	0
DMT	14	0	19	17	3	0	0	0	0	0	0
Autres composés aromatiques	0	14	0	1	0	0	102	14	5	84	69
Composés totaux	16	17	23	24	50	77	143	161	314	379	519

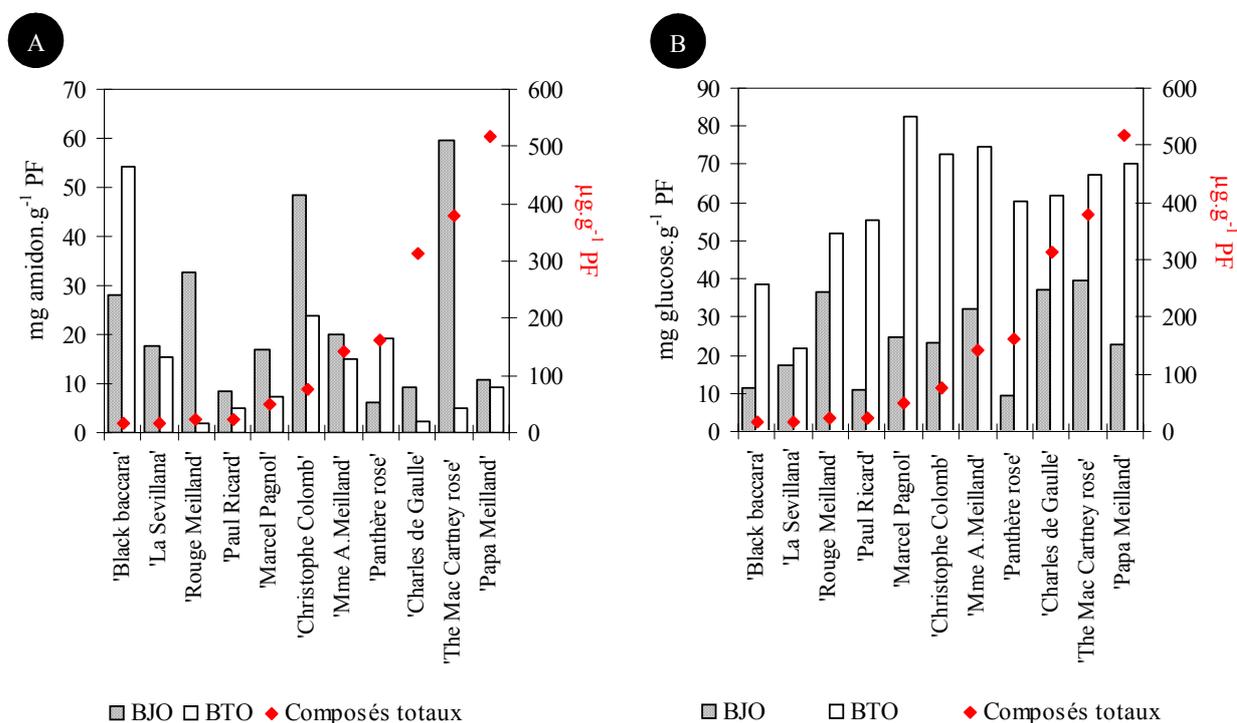


Figure 33 : Evolution de l'amidon (A) et du D-glucose libre (B) en relation avec la quantité de composés totaux extraits des pétales au cours du développement floral de 11 variétés de rose. Pour les composés totaux, les pétales sont prélevés au stade BTO.

l'isopentényl diphosphate (ou IPP), produit par la voie plastidiale de synthèse dont la première étape spécifique est une réaction catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR).

L'IPP et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) sont ensuite assemblés 'tête-bêche' dans une réaction catalysée par la géranyl diphosphate synthase (GPPS) pour donner le géranyl diphosphate (GPP). C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier ces deux enzymes clés dans la synthèse des monoterpènes.

A. La 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ou DXR

1. La DXR et les terpènes du pétale de rose

La fosmidomycine, ou acide 3-(N-formyl-N-hydroxyamino)-propylphosphonique, est un agent antibactérien potentiel contre la plupart des bactéries Gram-négatives et quelques bactéries Gram-positives. Sa structure mime celle du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), intermédiaire de la voie MEP de synthèse de l'IPP, et substrat de la DXR. Il existe une compétition entre la fosmidomycine et le DXP au niveau du site de liaison du substrat de la DXR. De nombreuses études ont démontré que cette molécule est un inhibiteur spécifique des DXR végétales et bactériennes (Engprasert *et al.*, 2005).

Afin d'apporter une preuve de l'implication de la voie MEP de synthèse de l'IPP, et plus particulièrement de la DXR, dans la biosynthèse des terpènes du pétale de rose, nous avons mis au point un système d'infiltration de ces pétales qui permet de suivre l'effet de l'inhibition de la DXR par la fosmidomycine sur la production des composés volatils.

Pour définir la concentration optimale de fosmidomycine et étudier le comportement des pétales après infiltration, une expérience préliminaire est réalisée sur la variété 'Pariser Charme'. Les résultats montrent qu'un traitement à la fosmidomycine 100 μ M, dans les conditions d'expérience, entraîne une diminution de la quantité de monoterpènes dans les pétales au bout de 24 h.

Afin de valider ce résultat, une expérience est réalisée sur la variété 'Papa Meiland'. Dans cette deuxième expérimentation, quatre fleurs au stade BTO sont utilisées. Pour chaque fleur, les pétales sont étudiés par paire suivant une cinétique commençant 24 h après l'infiltration : un pétale est infiltré avec une solution de Tris HCl 10 mM pH 7,5 et l'autre pétale est infiltré avec la fosmidomycine 100 μ M. Les composés volatils présents dans les pétales sont extraits par l'hexane et analysés par GC-FID.

Cette deuxième expérience permet de confirmer les résultats obtenus précédemment, à savoir qu'un traitement à la fosmidomycine entraîne une diminution faible mais significative

(18 % après 30 h par exemple) de la quantité de monoterpènes produits par les pétales (Fig. 34). A l'opposé, les quantités de composés aromatiques ne sont pas affectées par le traitement.

La fosmidomycine inhibant spécifiquement l'activité DXR, les résultats montrent que cette enzyme est bien présente dans les cellules du pétale de rose et qu'elle intervient dans la production des monoterpènes chez cette fleur.

2. L'isolement du gène *RhDXR*

Une stratégie basée sur des homologies de séquence est utilisée afin de rechercher le gène codant pour la DXR de rose. Trois séquences nucléotidiques connues codant pour des DXR sont alignées à l'aide du logiciel DNASTAR (DNASTAR Inc.) afin de définir des oligonucléotides dégénérés dans les zones les plus conservées (annexe 5). Les séquences utilisées sont les séquences de *Mentha x piperita* (accession AF116825), d'*Arabidopsis thaliana* (accession AY091405) et de *Catharanthus roseus* (accession AF250235).

Parmi les nombreux couples d'oligonucléotides dégénérés utilisés, le couple dx1/dx6 (annexe 1) permet d'amplifier un fragment initial de 788 paires de base (pb) à partir d'ADNc obtenu à partir d'ARN de pétales de la variété 'Rouge Meilland', prélevés sur une fleur au stade BJO. Grâce à des réactions de RACE-PCR, les extrémités 3' et 5' du gène sont isolées. Des oligonucléotides spécifiques sont définis à partir de la séquence théorique complète de façon à pouvoir amplifier l'ADNc du gène dans sa totalité.

La séquence nucléotidique ainsi obtenue a une longueur de 1559 pb, correspondant à une ORF de 1413 pb. La protéine correspondante est constituée de 471 acides aminés, soit une masse moléculaire calculée de 51,3 kDa et un pI de 6,4 (Fig. 35). Cette séquence est comparée avec le logiciel Blast à toutes les séquences enregistrées dans les bases de données. Les scores d'identité avec les autres DXR connues chez les plantes sont donnés dans le tableau 15. La séquence protéique déduite de l'ADNc isolé chez la rose présente un niveau d'identité très élevé avec d'autres DXR connues (de 78,3 % avec la DXR de *Mentha x piperita* à 85,5 % avec la DXR d'*Arabidopsis thaliana*). D'une manière générale, les DXR présentent entre elles des pourcentages d'identité très élevés et sont des protéines extrêmement conservées chez les végétaux. La séquence isolée chez la rose est appelée *RhDXR* quand il s'agit de la séquence nucléotidique et *RhDXR* quand il s'agit de la séquence protéique, conformément aux règles de nomenclature.

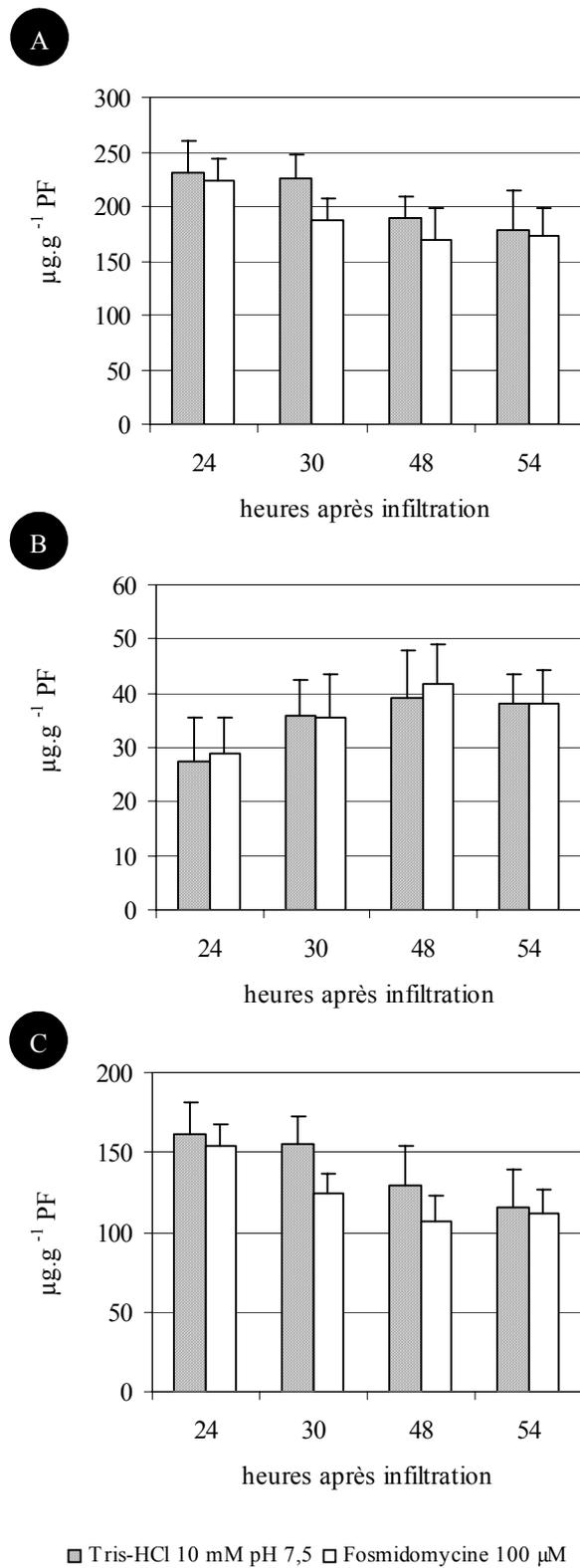


Figure 34 : Influence d'un traitement à la fosmidomycine sur les composés volatils extraits des pétales de la rose 'Papa Meiland' au stade BTO. A, composés totaux ; B, composés aromatiques ; C, monoterpènes. Les analyses ont été faites sur 4 fleurs différentes et les barres représentent l'erreur-type.

L'alignement de la séquence RhDXR avec les séquences DXR de *A. thaliana*, *C. roseus* et *M. x piperita* permet de retrouver des domaines conservés suivants (Fig. 35) :

- Un site de coupure d'une séquence putative d'adressage aux plastes dont le motif est CSX (avec X = A, V ou M),
- un domaine riche en proline dont le motif est P(P/Q)PAWPG(R/T)A
- un site putatif de liaison au NADP dont le motif est GSTGSIG,

quatre acides aminés indispensables pour la réaction de réducto-isomérisation : le groupement glutamate en position 304 et les groupements histidine en position 214, 271 et 314.

3. La localisation subcellulaire de la protéine RhDXR

Les alignements de séquences DXR connues avec celle de la rose mettent en évidence la présence éventuelle d'un site de coupure d'un peptide d'adressage plastidial. Deux logiciels de prédiction d'adressage (ChloroP et TargetP, disponibles sur le site internet : <http://www.expasy.ch/tools/>) sont utilisés afin de vérifier cet adressage. Le logiciel ChloroP met en évidence dans la protéine RhDXR une séquence de 48 acides aminés d'adressage aux plastes, mais ne permet pas de prédire avec certitude cet adressage. Par contre, le logiciel TargetP prédit avec une probabilité de 77 % que la protéine RhDXR possède une séquence peptidique de 48 acides aminés qui permet un adressage aux plastes. Même si ces programmes informatiques prédisent une localisation plastidiale de la DXR, il était nécessaire de démontrer cette localisation *in vivo*. La technique d'expression transitoire d'un gène est utilisée pour étudier la localisation subcellulaire de la DXR fusionnée à la GFP. Deux techniques de transformation sont mises en oeuvre : la transformation par biolistique et la transformation par infiltration d'*A. tumefaciens*.

a. Transformation par biolistique

La technique d'expression transitoire après transformation par biolistique est une technique dont l'efficacité est réduite. En effet, le nombre de cellules transformées dans les épidermes d'oignon est aléatoire d'un bombardement à l'autre. Néanmoins, nous avons observé des cellules transformées avec les deux constructions : la construction témoin dans laquelle la GFP est fusionnée à un peptide d'adressage plastidial caractérisé (TpGFP) et la construction pDXR-GFP dans laquelle les 119 premiers acides aminés de la protéine RhDXR sont fusionnés à la GFP dans le vecteur pCKgfp^{S65T} (Reichel *et al.*, 1996).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Rosa x hybrida  -MALNLLSPA EIKAISFLDS TKSIH---LP KLPGGFALRR RDCRAVIGRR ICSSA----- QAPPPAWPGS AFPEPGRRTW
Arabidopsis thaliana MMTLNLSLSPA ESKAISFLDT SRFNP---LP KLSGGFSLRR RNQGRGFGKG VKCSVKVQQQ QQQPPAWPGR AVPEAPRQSW
Catharanthus roseus -MALNLSLSP KIKTISFLDS SKSNYNLNL KLPGGFAPFK KDFGASGGKK ICSSV----- QPPPPAWPGR AVAEPGYKTW
Mentha x piperita -MALNLMAPT EIKTLSFLDS SKSNYNLNL KFGGGFAPKR KDSRCTAAKR VHCSAQ---S QSPPPAWPGR AFPEPGRMTW

      90      100     110     120     130     140     150     160
Rosa x hybrida  DGPKPISVVG STGSIQTQL DIVAENPEKF RVVALAAGSN VTLQVQVRR FKPKLVAVRN ESLVNLKEA LSGLEDKPEI
Arabidopsis thaliana DGPKPISIVG STGSIQTQL DIVAENPDFK RVVALAAGSN VTLQVQVRR FKPKLVAVRN ESLINELKEA LADLDYKLEI
Catharanthus roseus EGQKPIIVG STGSIQTQL DIVAENPDFK RVVALAAGSN VTLQVQVKT FKPKLVSVRN ESLVNLKEA LSDVDDKPEI
Mentha x piperita  EGPKPISVIG STGSIQTQL DIVAENPDFK RIVALAAGSN VTLQVQVKA FKPKLVSVKD ESLISELKEA LAGFEDMPEI

      170     180     190     200     210     220     230     240
Rosa x hybrida  IPGEQGVIEV ARHPDAVTVV TGI VGCAGLK PTVA AIEAGK DIALANKETL IAGGPFVLEL AHKHNVKILP ADSEHSAIFQ
Arabidopsis thaliana IPGEQGVIEV ARHPDAVTVV TGI VGCAGLK PTVA AIEAGK DIALANKETL IAGGPFVLEL ANKHNVKILP ADSEHSAIFQ
Catharanthus roseus IPGEQGVIEV VRHSDAVTVV TGI VGCAGLK PTVA AIEAGK DIALANKETL IAGGPFVLEL AHKHKVKILP ADSEHSAIFQ
Mentha x piperita  IPGEQGMIEV ARHPDAVTVV TGI VGCAGLK PTVA AIEAGK DIALANKETL IAGGPFVLEL AKKHNVKILP ADSEHSAIFQ

      250     260     270     280     290     300     310     320
Rosa x hybrida  CIQGLPEGAL RRIILTASGG AFRDWPVEKL KEVKVADALK HFNW SMGKKI TVDSATLFN- *KGLEVIEAHY LYGAEYDDIE
Arabidopsis thaliana CIQGLPEGAL RRIILTASGG AFRDWPVEKL KEVKVADALK HFNW NMGKKI TVDSATLFN- KGLEVIEAHY LFGAEYDDIE
Catharanthus roseus CIQGLPEGAL RRIILTASGG AFRDWPVEKL KEVKVADALK HFNW NMGKKI TVDSATLFN- KGLEVIEAHY LFGAEYDNID
Mentha x piperita  CIQGLPEGAL RRIILTASGG AFRDLVPEKL KEVKVADALK HSNW NMGKKN TVRLLQLFFN KGLEVIKAHY LFGAEYDDIE

      330     340     350     360     370     380     390     400
Rosa x hybrida  IVIH PQSIIH SMIE TQDSSV LAQLGW PDMR LPILY TMSWP ERIY CSEVTW PRLDLCKLGS LTFKAPDNVK YPSMDLAYSA
Arabidopsis thaliana IVIH PQSIIH SMIE TQDSSV LAQLGW PDMR LPILY TMSWP DRVPCSEVTW PRLDLCKLGS LTFKPKDNVK YPSMDLAYAA
Catharanthus roseus IVIH PQSIIH SMVETQDSSV LAQLGW PDMR LPILY TMSWP DRIS CSEITW PRLDLCKLGS LTFKTPDNVK YPSMDLAYAA
Mentha x piperita  IVIH SP SIIH SMVETQDSSV LAQLGW PDMR LPILY TMSWP ERVY CSEITW PRLDLCKVD- LPFKPKDNRE IPAMDLAYAA

      410     420     430     440     450     460     470     480
Rosa x hybrida  GRAGGTMTGV LSAANEKAVE MFIDEKIRYL DIFKVV ELTC AKHRAELVTS PSLEEIVHYD LWARDYAANL QSSTSSTPVF
Arabidopsis thaliana GRAGGTMTGV LSAANEKAVE MFIDEKISYL DIFKVV ELTC DKHRNELVTS PSLEEIVHYD LWARDYAANV QLSGSGARFVH
Catharanthus roseus GRAGGTMTGV LSAANEKAVE LFIDEKISYL DIFKVV ELTC AKHQAEVTS PSLEDEIHYD LGARDYAASF QNSLGLS PAL
Mentha x piperita  WKSRSMTMGV LSAANEKAVE MFIDEKIGYL DIFKVV ELTC DKHRSEMAVS PSLEEIVHYD QWARDYAATV LKSAGLS PAL

Rosa x hybrida  A 471
Arabidopsis thaliana A 477
Catharanthus roseus V 474
Mentha x piperita V 475

```

Figure 35 : Aligement de la séquence de RhDXR et de 3 autres séquences de DXR connues ; encadré en rouge, site putatif de coupure de la séquence d'adressage aux plastés ; encadré en bleu, domaine riche en proline ; encadré en vert, site de liaison au NADPH ; *, 4 acides aminés impliqués dans la liaison du DXP.

Tableau 15 : Scores d'identité protéique (logiciel BIOEDIT sur la base de la matrice de similitude PAM250) de différentes DXR connues et de la séquence isolée chez la rose (la séquence totale des protéines avec le peptide d'adressage aux plastés a été prise en compte). Rh, *Rosa x hybrida* ; At, *Arabidopsis thaliana* ; Mp, *Mentha x piperita* ; Cr, *Catharanthus roseus* ; Le, *Lycopersicum esculentum* ; Sr, *Stevia rebaudia* ; Aa, *Artemisia annua* ; Hv, *Hordeum vulgare* ; Os, *Oriza stavia* ; Lu, *Linum usitatissimum* ; Zm, *Zea mays*

	RhDXR	AtDXR	MpDXR	CrDXR	LeDXR	SrDXR	AaDXR	HvDXR	OsDXR	LuDXR	ZmDXR
RhDXR	-	0.855	0.783	0.834	0.845	0.801	0.795	0.814	0.840	0.808	0.840
AtDXR		-	0.759	0.813	0.827	0.780	0.775	0.800	0.828	0.796	0.828
MpDXR			-	0.792	0.803	0.762	0.755	0.745	0.744	0.751	0.752
CrDXR				-	0.869	0.828	0.815	0.807	0.802	0.824	0.817
LeDXR					-	0.813	0.807	0.802	0.824	0.828	0.841
SrDXR						-	0.871	0.753	0.776	0.809	0.778
AaDXR							-	0.757	0.766	0.817	0.768
HvDXR								-	0.860	0.764	0.880
OsDXR									-	0.777	0.913
LuDXR										-	0.783
ZmDXR											-

Les cellules de l'épiderme d'oignon sont grandes et il est donc facile d'observer les organites. Avec le témoin TpGFP, la fluorescence se manifeste sous la forme de très nombreux points d'environ 5 μm de diamètre à l'intérieur de la cellule, correspondant aux plastes (Fig. 36A). Ils sont parfois reliés entre eux par des structures correspondant probablement aux stromules (Pyke et Howells, 2002). Les cellules transformées avec la construction pDXR-GFP présentent le même type de marquage fluorescent, c'est-à-dire des points d'environ 5 μm de diamètre, reliés entre eux par des stromules (Fig. 36B).

L'efficacité de transformation des cellules de l'épiderme supérieur des pétales de roses est beaucoup plus réduite que celle des cellules de l'épiderme d'oignon. Néanmoins, quelques très rares cellules sont observées qui présentent une fluorescence sous la forme de points d'environ 1 μm de diamètre (Fig. 36C). Ces résultats obtenus sur les pétales de rose sont donc peu probants.

Cependant, si l'on prend en compte les résultats obtenus sur l'épiderme d'oignon, l'observation des marquages fluorescents confirme les prédictions des logiciels de bio-informatiques : la DXR de rose est adressée aux plastes.

b. Transformation par infiltration d'*A. tumefaciens*

Il est également possible de faire exprimer à des cellules de façon transitoire des gènes grâce à une technique d'infiltration d'une souche d'*A. tumefaciens* renfermant le vecteur d'expression dans lequel le gène d'intérêt est fusionné à la GFP. Cette technique est utilisée en routine sur le tabac pour un grand nombre d'études de localisation subcellulaire (Batoko *et al.*, 2000). Nous avons donc tenté de transposer cette technique chez la rose.

Dans un premier temps, les constructions et la technique d'infiltration sont testées sur les feuilles du tabac *Nicotiana tabacum* SR1 cv 'petit Havana'. Lorsque la GFP n'est pas fusionnée à une séquence d'adressage, la fluorescence est localisée à la périphérie de la cellule, dans le cytoplasme. Le noyau possède également une fluorescence importante due à la forte intensité de l'expression (Fig. 36D). Dans le cas de la fusion DXR-GFP, la fluorescence est restreinte aux plastes (Fig. 36E). Lorsque les mêmes constructions sont infiltrées dans les pétales de rose, les résultats obtenus sont les mêmes, c'est-à-dire un marquage localisé dans les plastes (Fig. 36F). Par cette technique, comme pour la transformation transitoire par biolistique, l'efficacité de la transformation de la rose est cependant beaucoup plus réduite que celle de la transformation de tabac.

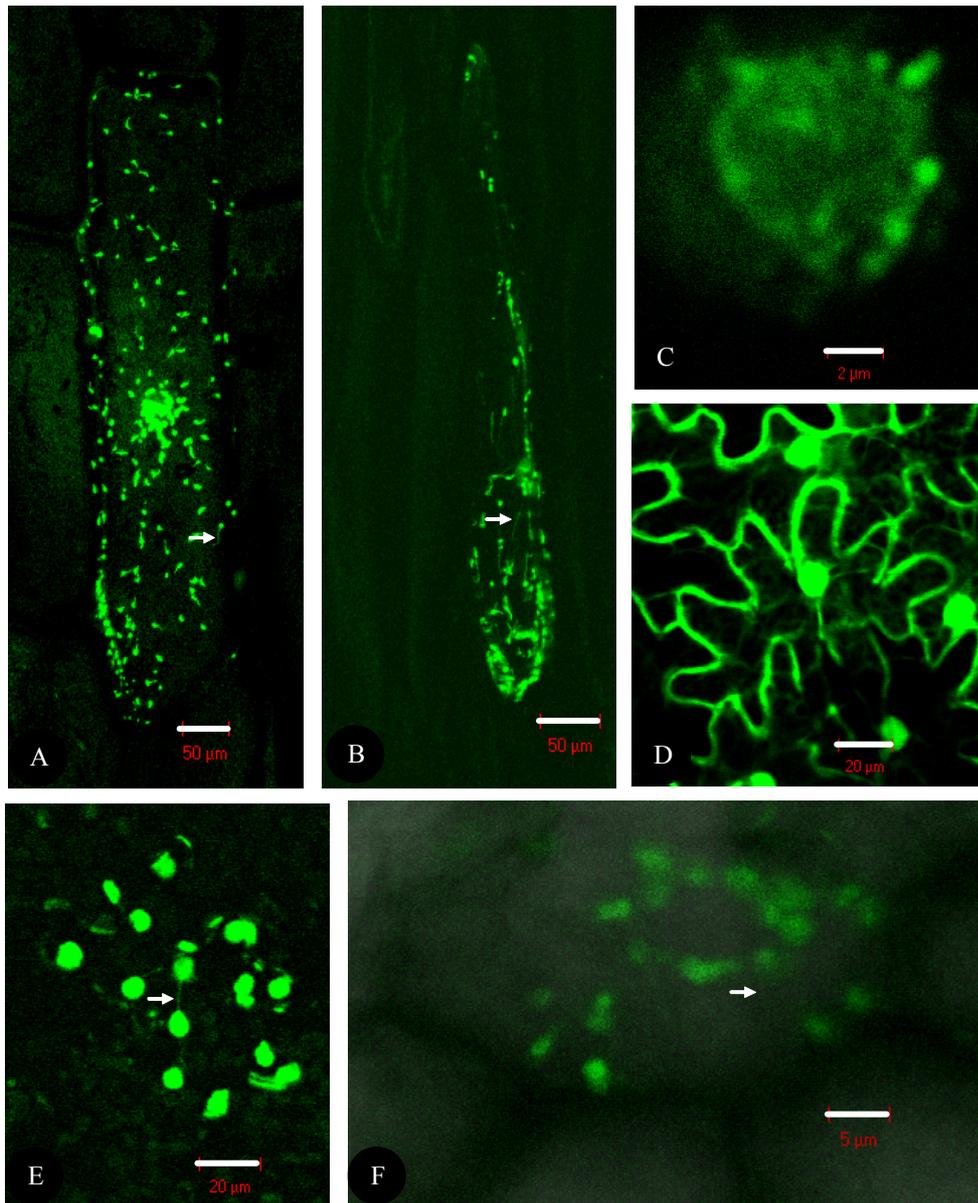


Figure 36: Localisation subcellulaire de la DXR de rose dans différents tissus végétaux. A, expression transitoire de la construction témoin TpGFP dans une cellule d'épiderme d'oignon après transformation par biolistique ; B, expression transitoire de la construction pDXR-GFP dans une cellule d'épiderme d'oignon après transformation par biolistique ; C, expression transitoire de la construction pDXR-GFP dans une cellule d'épiderme supérieur de rose après transformation par biolistique ; D, expression transitoire de la GFP sans peptide d'adressage après transformation d'une cellule d'épiderme de tabac par infiltration d'*A. tumefaciens* ; E, expression transitoire de la construction DXR-GFP après transformation d'une cellule d'épiderme de tabac par infiltration d'*A. tumefaciens* ; F, expression transitoire de la construction DXR-GFP après transformation d'une cellule d'épiderme de rose par infiltration d'*A. tumefaciens*. flèches, stromules. Les barres d'échelle représentent une échelle de 50 μm pour A et B, 20 μm pour D et E, 5 μm pour F et 2 μm pour C.

4. La caractérisation enzymatique de la DXR de rose

L'ADNc isolé à partir des pétales de rose correspond à une protéine dont la séquence est fortement conservée chez les végétaux, la DXR. L'étude de la localisation subcellulaire de cette protéine, ainsi que les logiciels bioinformatiques de prédiction d'adressage confirment que la protéine est adressée aux plastes, lieux de la synthèse de l'IPP par la voie MEP dans laquelle intervient la DXR. Toutes les données indiquent donc que la protéine codée par le gène isolé chez la rose est une DXR. Afin de prouver qu'elle est fonctionnelle, une stratégie de complémentation d'une souche d'*E. coli* déficiente en DXR est utilisée.

a. La production de la protéine RhDXR

Afin de réaliser les expériences de complémentation et de définir les paramètres cinétiques de RhDXR, nous avons voulu savoir si elle était produite efficacement chez *E. coli*.

La production de la protéine RhDXR sans son peptide d'adressage est réalisée grâce à des vecteurs d'expression commercialisés par QIAGEN permettant de fusionner la protéine d'intérêt à une étiquette histidine soit en position N-terminale (pQE30), soit en position C-terminale (pQE70). Dans les deux cas, deux formes de protéine de fusion sont obtenues : une forme longue avec le domaine riche en proline spécifique des DXR eucaryotes, appelée DXR-L, et une forme courte sans ce domaine, appelée DXR-S. Au total, quatre constructions sont donc testées, DXR-L30, DXR-S30, DXR-L70 et DXR-S70 (Fig. 37A).

Les protéines sont tout d'abord extraites des bactéries sous forme dénaturée. Les formes courtes DXR-S sont produites dans des quantités assez importantes, visibles après coloration des protéines au bleu de comassie (Fig. 37B). Cependant, la production de la protéine sous sa forme longue (DXR-L30) est très faible puisque qu'elle est difficilement visible sur gel après coloration au bleu de Coomassie (Fig. 37C). Néanmoins, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la queue poly-histidine permet de détecter sa présence parmi les protéines bactériennes totales (Fig. 37D). La protéine DXR-L70 n'est pas détectée, même par western blot (Fig. 37C et D). Il est à noter que dans le cas des constructions réalisées dans le vecteur pQE30 dans lequel l'étiquette 6xHis est située en position N-terminale de la protéine, d'autres protéines de taille inférieure à la taille attendue sont révélées par l'anticorps anti-histidine. Ceci peut s'expliquer par le fait que la traduction peut être partielle, donnant des protéines plus courtes mais néanmoins détectées par l'anticorps anti-histidine.

Lorsque l'on considère les formes courtes, DXR-S70 et DXR-S30, on constate que le vecteur pQE70 permet de produire des quantités plus importantes de protéines recombinantes que le vecteur pQE30 (Fig. 37B).

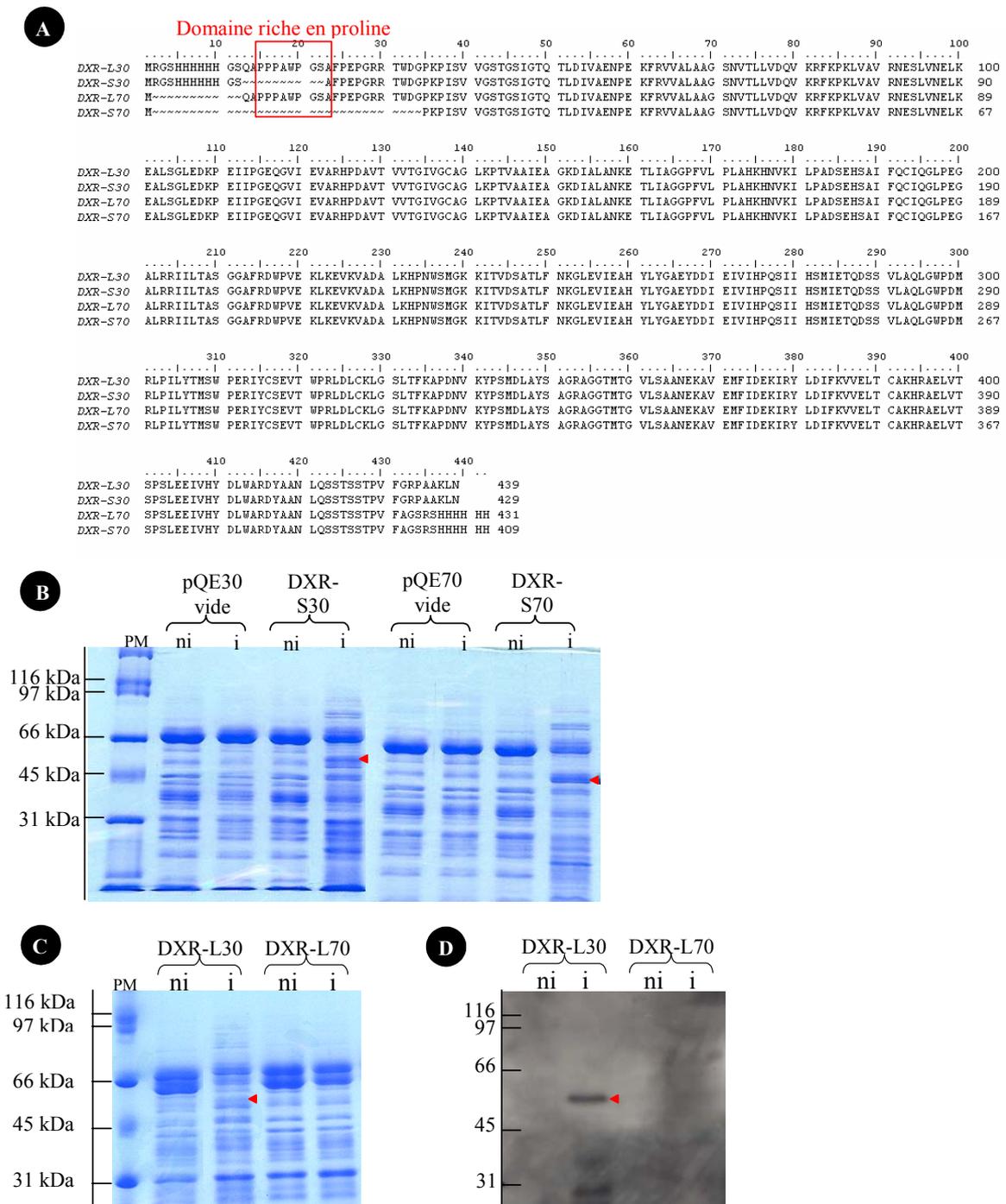


Figure 37 : Production de quatre formes de DXR recombinante. A, Séquences protéiques des formes courtes (DXR-S30 et DXR-S70) et des formes longues (DXR-L30 et DXR-L70) de RhDXR ; B, Gel SDS-PAGE des formes courtes (DXR-S30 et DXR-S70) après extraction en conditions dénaturantes ; C, Gel SDS-PAGE des formes longues (DXR-L30 et DXR-L70) après extraction en conditions dénaturantes ; D, Western-blot avec un anticorps anti-histidine pour visualiser la production des formes longues (DXR-L30 et DXR-L70). Gel SDS-PAGE 10 %, 7 μ g de protéines bactériennes totales ont été déposées dans chaque puits avant (ni) et après une induction par 1 mM d'IPTG pendant 3 h à 37°C (i). DXR-L30, forme longue de la DXR dans le vecteur pQE30 ; DXR-L70, forme longue de la DXR dans le vecteur pQE70 ; DXR-S30, forme courte de la DXR dans le vecteur pQE30 ; DXR-S70, forme courte de la DXR dans le vecteur pQE70 ; PM, marqueur de poids moléculaire.

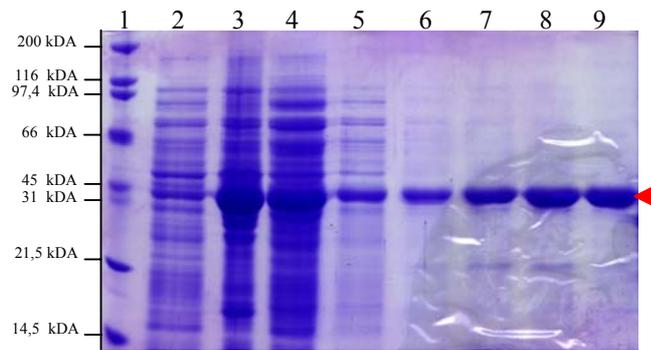


Figure 38 : Purification sur résine Ni-NTA agarose en conditions dénaturantes (urée 8 M) de la protéine recombinante RhDXR possédant une étiquette poly-histidine en position C-terminale (DXR-S70). 1, marqueur de poids moléculaire ; 2, culture non induite ; 3, protéines totales d'une culture induite par 0,5 mM IPTG à 37°C pendant 2h30 ; 4, fraction non accrochée sur la résine Ni-NTA agarose ; 5, fraction de lavage 1 ; 6, fraction de lavage 2 ; 7, fraction d'élution 1 ; 8, fraction d'élution 2 ; 9, fraction d'élution 3.

Nous avons donc tenté d'obtenir la protéine DXR-S70 et de la purifier. Cette purification est possible seulement après extraction en conditions dénaturantes (Fig. 38). La protéine est donc probablement produite sous la forme insoluble de corps d'inclusion. Différentes conditions d'induction ont été testées pour tenter de remédier à ce problème : la concentration en IPTG (0,1, 0,5 ou 1 mM), la température (37°C et 30°C), ainsi que la durée de l'induction (de 3 à 6 h) ont été modifiées. Malgré tous ces tests, les conditions pour l'obtention d'une protéine DXR recombinante soluble et en quantité importante n'ont pu être définies.

Afin de savoir si une faible quantité de DXR-S70 est néanmoins produite sous forme soluble, la purification en conditions natives de celle-ci est réalisée sur une résine de type BD-Talon à partir de 2 L de culture induite pendant 4 h à 30 ou 37°C avec 0,5 mM d'IPTG. Après purification, des fractions aliquotes des différentes fractions de purification sont analysées par western blot avec un anticorps anti-histidine. Les signaux obtenus sont très faibles et il est difficile de savoir si une fraction de la protéine DXRS-70 est présente sous forme soluble dans les bactéries (données non montrées). Les paramètres de production de la protéine n'ont donc pas pu être définis.

b. Stratégie utilisée pour la caractérisation enzymatique

La caractérisation fonctionnelle de la DXR est réalisée par une expérience de complémentation. En effet, il existe une souche d'*E. coli*, EcAB1-2, chez laquelle le gène *DXR* situé sur le chromosome est interrompu par l'insertion du marqueur TET, lui conférant une résistance à la tétracycline. Bien que cette interruption soit létale, les cellules EcAB1-2 peuvent se multiplier sur un milieu additionné de 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP), produit normalement par la DXR (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2000). Dans les cellules bactériennes, la voie du mévalonate (MEV) de synthèse de l'IPP n'existe pas. Les dernières étapes de cette voie ont été introduites chez cette souche d'*E. coli* par génie génétique. Ainsi, ces cellules peuvent se multiplier dans un milieu contenant du mévalonate via la voie MEV de synthèse de l'IPP, indépendamment de la voie MEP, interrompue au niveau du gène *DXR*.

L'objectif de cette expérimentation est d'introduire le gène *RhDXR* dans les cellules EcAB1-2, puis de les multiplier sur un milieu sans mévalonate ni ME (MEP déphosphorylé qui est plus facilement transporté dans la bactérie que le composé phosphorylé). Si elles sont capables de se multiplier dans ces conditions, le gène *RhDXR* introduit est capable de restaurer leur auxotrophie vis-à-vis du MEP.

c. Complémentation de la souche EcAB1-2 d'*E. coli* déficiente en DXR

Les expériences de complémentation ont été réalisées par Eva Maria Urós-Gracia sous la direction du Dr Manuel Rodríguez-Concepción de l'université de Barcelone (Espagne).

Les quatre constructions définies au paragraphe A.4.a sont introduites dans des cellules bactériennes EcAB1-2. Dans un premier temps, les bactéries transformées avec les vecteurs d'expression sont cultivées sur un milieu contenant du MEV. Les quatre souches bactériennes exprimant chacune une forme de la DXR de rose se développent parfaitement dans ces conditions : en présence de MEV, ce sont les dernières étapes de la voie MEV de synthèse de l'IPP qui sont mobilisées pour le bon développement des cellules (Fig. 39). Les cellules sont ensuite striées sur des boîtes ne contenant plus de MEV : seules les formes longues (DXR-L30 et DXR-L70) de la protéine sont capables de restaurer avec efficacité la fonction déficiente dans les cellules EcAB1-2 ; les formes courtes (DXR-S30 et DXR-S70) se multiplient difficilement sur un milieu ne contenant pas de MEV (Fig. 39).

Ces expériences permettent de conclure que l'ADNc isolé chez la rose code pour une DXR fonctionnelle puisqu'elle permet de restaurer la fonction déficiente dans les cellules EcAB1-2. La complémentation étant beaucoup moins efficace avec la forme courte, le domaine riche en résidus proline, présent dans les formes longues, est probablement indispensable au bon fonctionnement de la protéine. Cependant, dans les cellules M15 d'*E. coli*, nous n'avons pas réussi à produire les formes longues en quantité suffisante pour les détecter sur gel de protéines, coloré au bleu de Coomassie. Comme la purification de la protéine n'a pas été réalisée à partir de la souche EcAB1-2, on peut émettre deux hypothèses : soit la protéine est produite en quantité beaucoup plus importante dans cette souche, soit la faible quantité produite suffit pour la complémentation. Néanmoins, on ne peut pas exclure que dans ces souches EcAB1-2 d'*E. coli*, la forme courte de la DXR soit produite en quantités très faibles ou complètement insoluble, comme lorsqu'elle est produite dans les cellules M15 d'*E. coli*. Cette insolubilité pourrait être responsable de l'absence de restauration de fonction dans les cellules déficientes en DXR.

5. Profils d'expression du gène *RhDXR*

La transcription du gène *RhDXR* a été étudiée par RT-PCR semi-quantitative afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la production de monoterpènes et l'expression du gène dans les pétales de rose. Ainsi, l'expression du gène a été suivie d'une part dans plusieurs tissus de la variété 'The Mac Cartney rose' dont le parfum est majoritairement

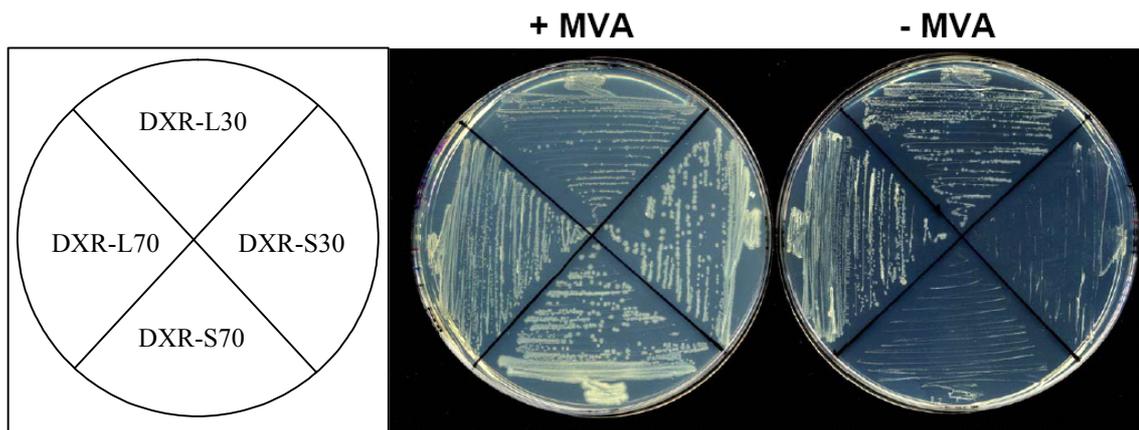


Figure 39 : Complémentation de la souche EcAB1-2 d'*E. coli* déficiente en *DXR* avec l'ADNc du gène *RhDXR*. +MEV, milieu contenant du mévalonate ; -MEV, milieu sans mévalonate ; DXR-L30, forme longue de la DXR dans le vecteur pQE30 ; DXR-S30, forme courte de la DXR dans le vecteur pQE30 ; DXR-L70, forme longue de la DXR dans le vecteur pQE70 ; DXR-S70, forme courte de la DXR dans le vecteur pQE70.

constitué de monoterpènes, et d'autre part au cours du développement floral de cette même variété. L'expression de ce gène a également été étudiée chez d'autres variétés de rose présentant des caractéristiques du parfum différentes : la variété 'Papa Meilland' dont le puissant parfum est composé majoritairement de monoterpènes, la variété 'Anna' dont le parfum plus discret est essentiellement constitué de composés aromatiques et la variété 'Royal Baccara' qui est inodore.

Le gène codant pour la GAPDH de rose a été utilisé comme référence pour normaliser les différents échantillons d'ADNc utilisés. Les réactions de RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées plusieurs fois, transférées sur des membranes puis hybridées avec des sondes spécifiques de chaque gène. La figure 40 représente les résultats obtenus pour une expérience.

Chez la variété 'The MacCartney rose', *RhDXR* est exprimé dans tous les organes testés : feuilles matures, sépales, pistils, étamines et pétales (Fig. 40A). L'expression du gène dans les feuilles matures est très faible. Nous n'avons pas testé son expression dans les feuilles jeunes. Chez *A. thaliana*, *AtDXR* est exprimé plus intensément dans les feuilles jeunes que dans les feuilles matures et que son expression dans les feuilles est moins importante que dans les inflorescences (Carretero-Paulet *et al.*, 2002). Dans les pétales de rose, *RhDXR* est exprimé à tous les stades de développement, même s'il semble qu'il soit légèrement plus exprimé dans les stades précoces (Fig. 40B).

L'ARNm du gène *RhDXR* est présent dans les pétales de toutes les variétés de rose, indépendamment du type de parfum qui les caractérise. Par ailleurs, l'expression du gène chez les variétés 'Papa Meilland' et 'Royal Baccara' semble être légèrement plus importante dans les stades tardifs (Fig. 40C).

Dans nos conditions d'expérimentation, l'expression du gène *RhDXR* n'est donc ni spécifique des pétales, ni spécifique de la production de monoterpènes. Des expériences de RT-PCR quantitatives sont envisagées de façon afin d'affiner les résultats obtenus.

6. La surexpression du gène *RhDXR* chez *Nicotiana sylvestris*

a. Choix de l'espèce pour la surexpression

Bien que *RhDXR* soit probablement constitutif chez la rose, il est possible que sa surexpression conduise à une augmentation de la production de composés volatils, comme cela a été montré chez la menthe (Mahmoud et Croteau, 2001). Pour le tester, nous n'avons pas pu utiliser le rosier.

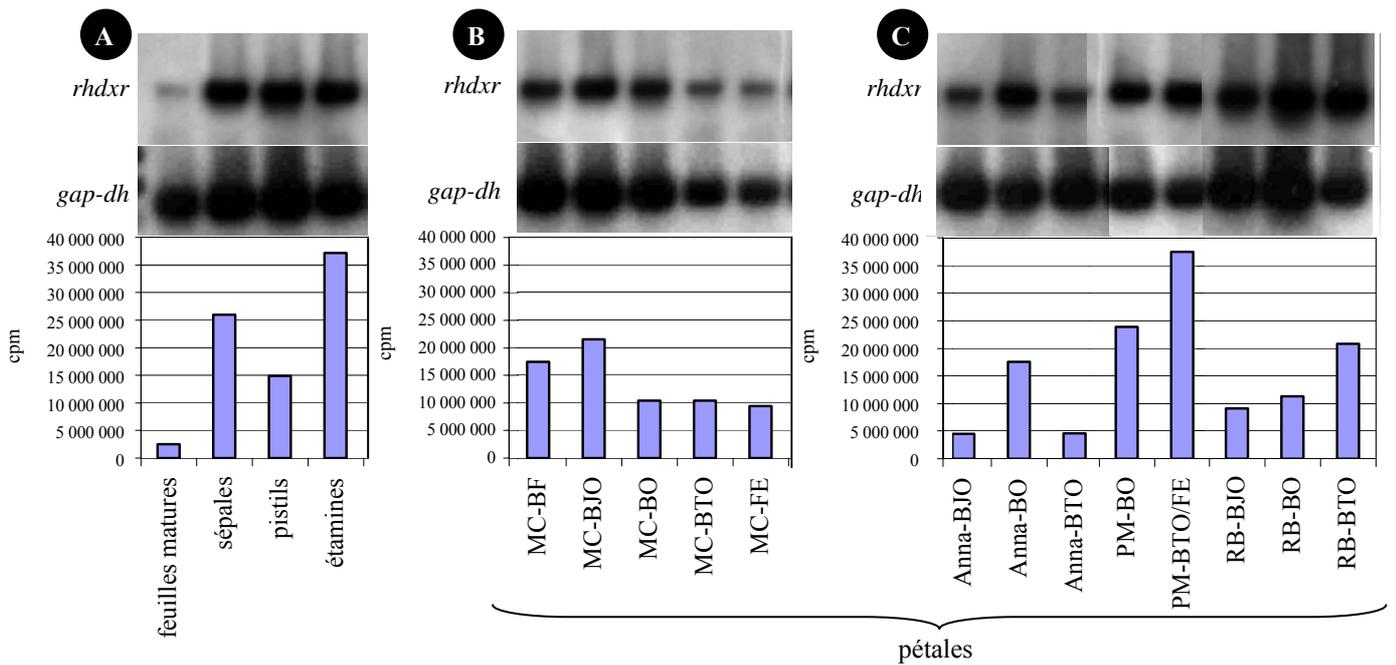


Figure 40 : Etude par RT-PCR semi-quantitative de l'expression du gène *RhDXR* dans les différents tissus de roses (A), au cours du développement floral de la variété 'The MacCartney rose' (B) et chez différentes variétés de roses (C). MC, 'The Mac Cartney rose' ; PM, 'Papa Meilland' ; RB, 'Royal Baccara' ; BF, bouton fermé ; BJO, bouton juste ouvert ; BO, bouton ouvert ; BTO, bouton très ouvert ; FE, fleur épanouie. Les membranes de RT-PCR ont été hybridées avec des sondes marquées au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$, correspondant à chacun des gènes. Les histogrammes représentent les valeurs normalisées par rapport à une même valeur de référence obtenue pour le gène *GAPDH*.

En effet, actuellement, la transformation du rosier n'est pas maîtrisée, que ce soit au laboratoire BVpam de Saint-Etienne ou dans les laboratoires partenaires (RDP, ENS de Lyon ou INRA d'Angers).

Nous avons donc recherché une plante se transformant facilement et se rapprochant de la rose pour son caractère parfumé. Notre choix s'est porté sur le tabac *N. sylvestris*. En effet, cette espèce émet des composés volatils suivant un rythme circadien avec un pic nocturne d'émission, suggérant une pollinisation nocturne par des papillons (Raguso *et al.*, 2003). Son parfum se compose de monoterpènes (β -myrcène, trans- β -ocimène, linalol, α -terpinéol), de sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, oxyde de caryophyllène), de composés aromatiques (benzaldéhyde, benzylalcool, 2-phényléthanol, méthylbenzoate, benzylacétate, benzylvalérate) et de dérivés d'acides gras (cis-3-hexénol, cis-jasmone). De plus, c'est une espèce qui se transforme facilement par *A. tumefaciens* et la technique de transformation est maîtrisée au sein du laboratoire.

b. Obtention des plantes transgéniques

Deux cents explants issus de feuilles de plants de tabac cultivés *in vitro* ont été transformés avec une souche d'*A. tumefaciens* contenant la construction SurecDXR (vecteur GatewayTM de surexpression dans lequel a été introduit l'ADNc total de la DXR sous le contrôle du promoteur CaMV35S). Parmi ces explants, 83 ont produits des cals et régénérés des plantules (efficacité de transformation 41,5 %). Au cours de la multiplication des cals et de l'enracinement des plantules, certains événements ont été perdus à cause de contaminations. Néanmoins, 72 explants ont été maintenus et pour chaque explant, une plantule est acclimatée en serre et conservée. Parallèlement, une vingtaine de plantes ayant intégré une construction témoin (35S::GFP) ont été obtenues et sont acclimatées en serre. Leur analyse permettra de vérifier que les modifications éventuelles des profils terpéniques sont bien dues à la surexpression du gène *RhDXR* et non pas à l'introduction d'un gène exogène dans le génome du tabac.

c. Clonage de la DXR de *Nicotiana sylvestris*

Afin de caractériser les plantes transgéniques, il sera nécessaire de suivre l'expression du gène *RhDXR* dans les feuilles et les pétales. L'expression de la DXR étant peut-être constitutive chez le tabac, les niveaux d'expression du gène risquent de refléter à la fois l'expression du gène *DXR* endogène du tabac et celle du gène *DXR* de rose. Nous avons donc mis au point une stratégie de discrimination par CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic

Sequence) qui repose sur un polymorphisme de site de restriction dans les deux gènes à distinguer. Ainsi, un fragment d'ADN est amplifié par PCR puis digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction ; le polymorphisme de longueur des fragments est révélé par électrophorèse.

Nous avons donc isolé une partie de la séquence codante de la DXR chez le tabac *N. sylvestris*. Dans un premier temps, les ARNm de feuilles matures de *N. sylvestris* sont extraits et les ADNc sont obtenus par une réaction de réverse transcription. Dans un deuxième temps, une PCR est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites au § V.D.1 du 'Matériels et Méthodes'. Les oligonucléotides dégénérés DX1 et DX6, utilisés pour isoler le gène *DXR* de rose, sont employés dans cette PCR. La séquence obtenue a une longueur de 752 pb et présente 82 % d'identité au niveau acide nucléique avec la séquence *RhDXR* (annexe 7). Dans la séquence DXR de tabac, il est possible d'amplifier un fragment de 400 pb avec les amorces RT-DXR (annexe 1). Dans cette zone, *RhDXR* se distingue de l'ADNc isolé chez le tabac par la présence d'un site *EcoRV* en position 310-315 (annexe 8). Après PCR sur les ADNc de rose et de tabac, les deux gènes se différencient grâce à leur polymorphisme de restriction (Fig. 41).

d. Analyse préliminaire de deux transformants

Afin de vérifier que le gène *RhDXR* s'est bien intégré dans le génome du tabac, une PCR est réalisée sur ADN génomique avec les amorces RT-DXR (annexe 1) dans les conditions décrites dans le § V.D.6 du 'Matériels et Méthodes'. Quatre tabacs différents sont utilisés : deux tabacs transformés avec le gène *RhDXR* (clones DXR-46 et DXR-49), un tabac transformé avec 35S:GFP et un tabac *N. sylvestris* non transformé. Les amorces RT-DXR permettent d'amplifier un fragment de taille attendue (400 pb) uniquement chez les tabacs DXR-46 et DXR-49. Il est possible d'observer un fragment de taille supérieure chez tous les tabacs. Les amorces RT-DXR se trouvant de part et d'autre d'un intron, ce fragment correspond probablement à la séquence de la DXR présente dans l'ADN génomique du tabac. Après digestion par *EcoRV*, le fragment amplifié chez les plantes transgéniques est clivé en deux fragments (Fig. 42).

Lorsque les plantules seront suffisamment développées, une première série d'analyses CPG sera réalisée sur les feuilles et les fleurs. En effet, le gène *RhDXR* est sous le contrôle du

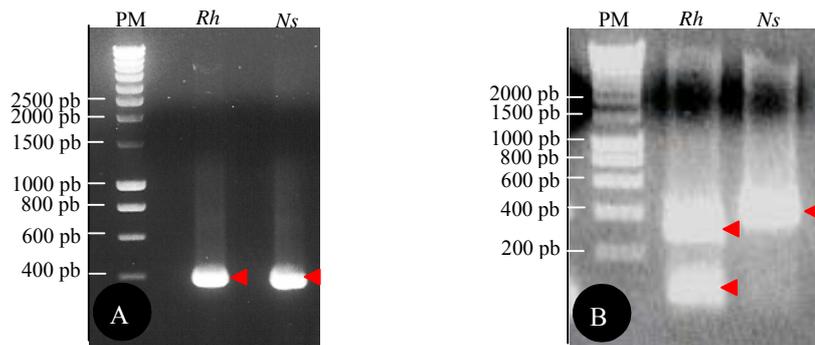


Figure 41 : Génération d'un CAPS DXR. A, fragments PCR amplifiés avec les amorces RT-DXR à partir d'ADNc de pétale de la rose 'The MacCartney rose' et d'ADNc de feuilles de *N. sylvestris* ; B, profils de restriction obtenus après digestion par *EcoRV* des fragments PCR. PM, marqueurs de poids moléculaires ; Rh, *Rosa x hybrida* ; Ns, *Nicotiana sylvestris*.

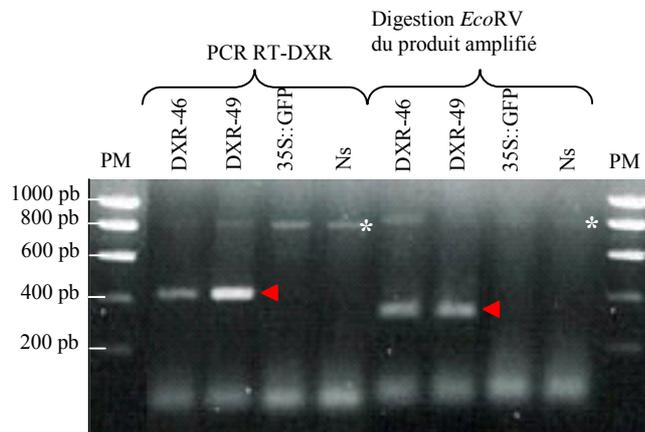


Figure 42 : Vérification par PCR avec les amorces RT-DXR de l'insertion du gène *RhDXR* dans le génome de tabac. Noter qu'après une digestion par *EcoRV*, le fragment a une taille plus petite. Noter également la présence d'un fragment d'environ 800 pb (*) correspondant à la séquence amplifiée sur l'ADN génomique. PM, marqueur de poids moléculaires ; DXR-46 et DXR-49, deux tabacs *N. sylvestris* transformés avec la construction SurexDXR ; 35S::GFP, tabac *N. sylvestris* transformé avec la construction 35S::GFP ; Ns, tabac *N. sylvestris* non transformé.

promoteur CaMV35S dont l'expression est constitutive. L'effet de la surexpression de ce gène peut donc être analysé au niveau de ces deux organes. Les profils terpéniques des plantes transformées seront comparés aux profils terpéniques des plantes témoins. Les plantes seront conservées jusqu'à l'obtention des graines. Les graines des plantes présentant une surproduction de composés terpéniques seront conservées afin de pouvoir poursuivre par des études de biologie moléculaire sur la 2^{ème} génération de plantes.

B. La géranyl diphosphate synthase ou GPPS

La GPPS permet la formation du GPP, précurseur de tous les monoterpènes, cycliques ou acycliques. Il existe deux formes de GPPS, une forme homodimérique, comme chez *A. thaliana* (Bouvier *et al.*, 2000) et *Abies grandis* (Tholl *et al.*, 2001 ; Burke and Croteau, 2002), et une forme hétérodi- ou hétérotétramérique, comme chez *M. x piperita* (Burke *et al.*, 1999) et *Antirrhinum majus* (Tholl *et al.*, 2004). Lorsque nous avons débuté nos recherches, la GPPS hétérotétramérique d'*A. majus* n'était pas connue. Une seule GPPS hétérodimérique était connue, chez la menthe. Par contre trois séquences de GPPS homodimériques étaient disponibles dans les banques de données. Nous avons fait l'hypothèse que chez la rose, il existait une GPPS de forme homodimérique.

1. Isolement du gène codant pour une GPPS homodimérique chez la rose

La recherche du gène *GPPS* chez la rose repose sur une stratégie PCR basée sur des homologies de séquences. Trois séquences de GPPS homodimériques connues et caractérisées sont alignées de façon à définir des oligonucléotides dégénérés dans les zones les plus conservées (annexe 6). Il s'agit des séquences GPPS d'*A. thaliana* (accession Y17376 ; Bouvier *et al.*, 2000), de *Citrus sinensis* (accession AJ243739) et de *Quercus robur* (accession AJ298245). Les oligonucléotides S1 et AS1 (annexe 1) permettent d'amplifier un fragment de 940 pb à partir de l'ADNc obtenu à partir d'ARN de pétales des variétés 'Rouge Meiland' et 'The Mac Cartney rose', prélevées au stade BO. Grâce à des réactions de RACE-PCR, les extrémités 5' et 3' du gène sont isolées. Des oligonucléotides spécifiques sont ensuite définis à partir de la séquence théorique complète de façon à pouvoir amplifier l'ADNc du gène dans sa totalité. Les ADNc obtenus à partir des deux variétés sont identiques.

La séquence nucléotidique obtenue a une longueur de 1777 pb, correspondant à une ORF de 1278 pb. La protéine correspondante est constituée de 426 acides aminés, soit une

masse moléculaire calculée de 47,1 kDa et un pI de 6,0. La séquence protéique de la GPPS de rose partage 64 % d'identité avec la GPPS d'*A. thaliana* et seulement 20 % d'identité avec GPPS d'*Abies grandis*, autre GPPS homodimérique isolée et caractérisée. Les domaines DDXD et FQXXDDXXD, impliqués dans la liaison de l'IPP et du DMAPP, sont conservés dans la séquence isolée chez la rose (Fig. 43). Elle est appelée *RhGPPS* pour faire référence au gène et *RhGPPS* lorsqu'il s'agit de la protéine, conformément à la nomenclature.

Les logiciels de prédiction de localisation subcellulaire (ChloroP et TargetP) ne permettent pas d'attribuer une compartimentation nette de *RhGPPS*. La séquence GPPS d'*A. thaliana* présente une séquence d'adressage aux plastes de 100 acides aminés. En 2000, Bouvier *et al.* ont montré que l'initiation de la traduction pouvait avoir lieu à partir de deux résidus méthionine, produisant ainsi une forme longue et une forme courte de la GPPS. Mais ils ont démontré que seule la forme longue est importée dans les plastes. Même si la séquence N-terminale de la protéine *RhGPPS* ne partage que 33 % d'identité avec la séquence d'adressage de la GPPS d'*A. thaliana*, ces séquences sont très conservées dans leur région C-terminale (Fig. 43). Il est donc possible que dans la séquence GPPS de rose, les 100 premiers acides aminés aient un rôle dans l'adressage aux plastes.

2. Caractérisation enzymatique de la protéine *RhGPPS*

La confirmation de la fonction de la protéine *RhGPPS* est réalisée par la formation de GPP à partir d'IPP et DMAPP en présence de la protéine recombinante.

Pour cela, des amorces spécifiques de la *RhGPPS* sont déterminées de façon à amplifier la région codante du gène sans le peptide putatif d'adressage aux plastes. Le gène est ensuite introduit par digestion et ligation dans le vecteur pGEX-KG (Pharmacia), en fusion avec la glutathion-S-transférase (vecteur pGEX-GPPS).

La production de la protéine recombinante est induite par l'IPTG dans des cellules XL1-blue d'*E. coli*. La protéine recombinante est purifiée sur une résine d'affinité (glutathion sépharose 4B). La figure 44 montre qu'il est possible de produire de faibles quantités de protéine recombinante et qu'elle reste majoritairement fixée à la résine. Pour récupérer la protéine *RhGPPS*, la résine est traitée à la thrombine.

La caractérisation enzymatique de la protéine recombinante purifiée est faite par G. Scalliet et P. Hugueney (laboratoire RDP, ENS de Lyon). Les tests d'activité sont réalisés en présence d'IPP marqué au ^{14}C et de DMAPP ou d'IPP marqué seul et de l'enzyme IPP isomérase d'*A. thaliana* purifiée après expression de la protéine recombinante chez *E. coli*. Les produits de la réaction enzymatique sont déphosphorylés par l'action de la phosphatase

alcaline, séparés par chromatographie sur couche mince, détectés par autoradiographie, puis identifiés par comparaison à des standards purifiés (géraniol, farnésol, géranylgeraniol).

La GPPS d'*A. thaliana*, (AtGPPS, Bouvier *et al.*, 2000) et la GGPPS de rose (RhGGPPS, Channelière *et al.*, 2002 ; Scalliet, 2003) sont utilisées comme témoins d'activité prényltransférase. RhGGPPS est capable de produire du géranylgeraniol, alors que RhGPPS ne permet pas de produire du géraniol (Fig. 45). Les expériences réalisées avec AtGPPS ne permettent pas non plus la synthèse de géraniol. Il est donc possible que dans nos conditions d'expérimentation, ces deux protéines, RhGPPS et AtGPPS ne soient pas produites sous leur forme active. Il est également possible qu'elles soient produites sous forme active mais en quantités trop faibles pour que leur activité soit détectable.

3. Profil d'expression du gène RhGPPS

La transcription du gène *RhGPPS* est étudiée par RT-PCR semi-quantitative afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la production de monoterpènes et l'expression du gène dans les pétales de rose. L'expression du gène est donc suivie dans tous les tissus et au cours du développement floral de la variété 'The Mac Cartney rose'. L'expression de ce gène est également étudiée chez d'autres variétés : la variété 'Papa Meilland' dont le puissant parfum est composé majoritairement de monoterpènes, la variété 'Anna' dont le parfum plus discret est essentiellement constitué de composés aromatiques et la variété 'Royal Baccara' qui est inodore. Le gène codant pour la GAPDH de rose est utilisé comme référence pour normaliser les échantillons d'ADNc utilisés (Channelière *et al.*, 2002). Les RT-PCR semi-quantitatives sont réalisées plusieurs fois, transférées sur membrane et hybridées avec des sondes spécifiques de chaque gène. La figure 46 présente les résultats obtenus pour une expérience représentative.

D'après nos résultats, l'expression du gène *RhGPPS* est probablement constitutive. En effet, il est exprimé dans tous les organes : feuilles matures, sépales, pistils, étamines et pétales. De plus, ce gène n'est pas spécifique des roses dont le parfum est composé de monoterpènes. En effet, il est exprimé non seulement dans les pétales de la variété 'The MacCartney rose' qui produisent des monoterpènes, mais également dans ceux des variétés 'Anna' et 'Royal Baccara' qui n'en produisent pas ou des quantités très faibles.

L'expression du gène *RhGPPS* n'est donc ni pétale spécifique, ni spécifique des roses produisant des monoterpènes. De plus, la fonction de cette protéine n'a pas pu être démontrée *in vitro*. Pour ces raisons, la caractérisation de la protéine RhGPPS homodimérique n'a pas été poursuivie.

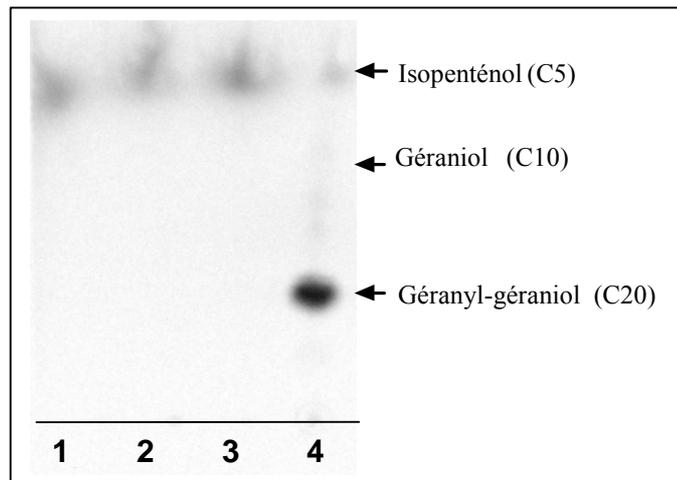


Figure 45 : Radiographie de la chromatographie sur couche mince phase inverse des produits d'incubations des diverses prényltransférases. 1, extrait brut des protéines totales d'*E.coli* ; 2, protéine AtGPPS purifiée ; 3, protéine RhGPPS purifiée ; 4, protéine RhGGPPS purifiée.

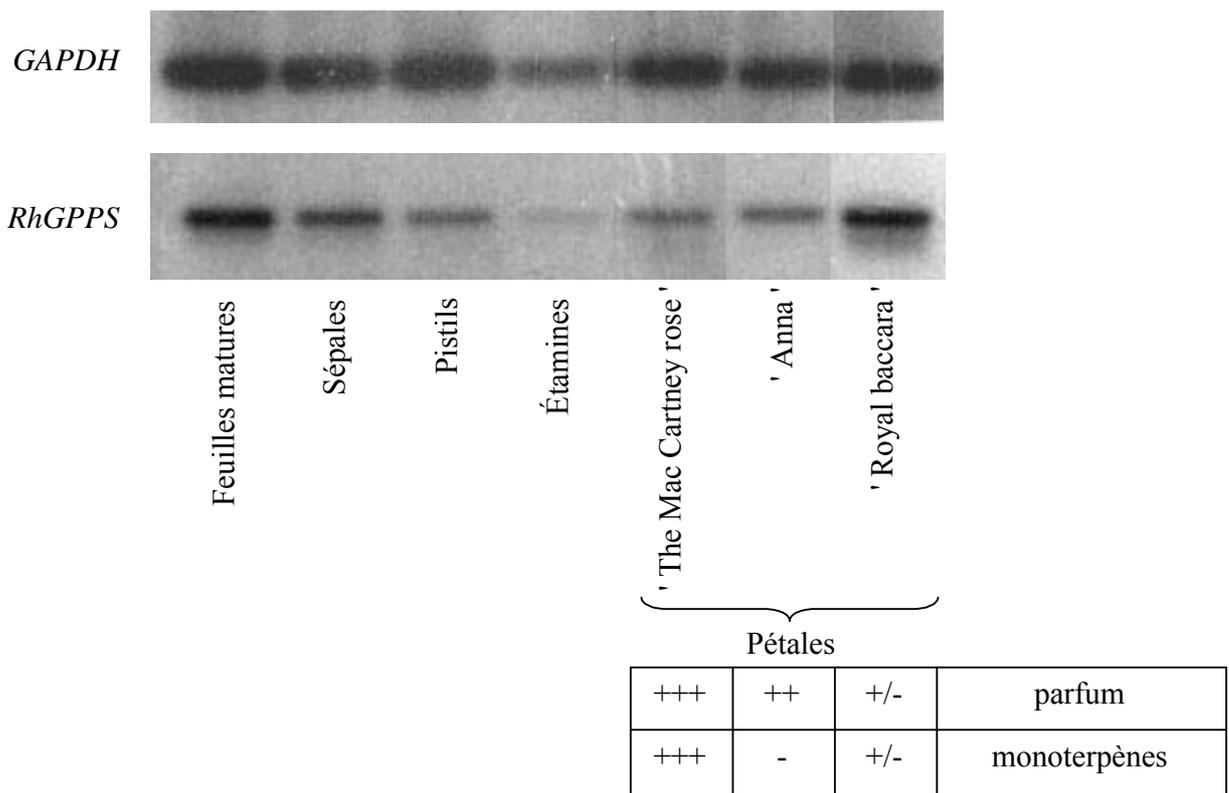


Figure 46 : Etude par RT-PCR semi-quantitative de l'expression du gène *RhGPPS* dans les différents tissus de roses et dans les pétales de différentes variétés de roses. Les membranes de RT-PCR sont hybridées avec des sondes marquées au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$, correspondant à chacun des gènes. Le gène *GAPDH* de rose est utilisé pour normaliser les différents échantillons.

4. Recherche d'une GPPS hétéromérique chez la rose

Récemment, une GPPS hétérodimérique a été isolée à partir des pétales d'*A. majus* (Dudareva *et al.*, 2004). Cette protéine est constituée d'une petite sous-unité (SSU) et d'une grosse sous-unité (LSU). La LSU possède une activité de GGPPS, alors que la SSU seule ne possède pas d'activité prényltransférase. Lorsque les deux gènes sont coexprimés dans des cellules bactériennes, une GPPS active est produite.

Suite aux résultats décrits aux paragraphes précédents, nous avons cherché à savoir si, chez la rose, il existait une GPPS hétérodimérique comme chez *A. majus*. Parmi les séquences de la banque d'ESTs de pétales de la rose chinoise 'Old Blush' (Channelière *et al.*, 2002) se trouve une séquence correspondant probablement à une GGPPS. Nous avons émis l'hypothèse que cette GGPPS correspondait à la grosse sous-unité de la GPPS de rose (LSU). Nous avons recherché par une stratégie PCR basée sur des homologies de séquences la petite sous-unité de la GPPS (SSU).

Les séquences des petites sous-unités de trois GPPS hétéromériques (*Mentha x piperita*, accession AF182827 ; *Clarkia breweri*, accession AY534745 ; *Antirrhinum majus*, accession AY534686) ont été alignées de façon à définir des oligonucléotides dégénérés dans les zones les plus conservées. Six oligonucléotides dégénérés ont ainsi été définis et employés en combinaison. Différentes matrices ont été utilisées (ADNc obtenus à partir de pétales de la variété 'Papa Meiland' ou 'The Mac Cartney rose' prélevés à différents stades de développement BO, BTO). Toutefois, aucun fragment d'ADN présentant des homologies de séquences avec la petite sous-unité de la GPPS d'*A. majus* n'a été obtenu.

Discussion

Comme cela l'a été mentionné dans l'avant-propos, mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme financé par la région Rhône-Alpes portant sur le parfum des roses. De façon générale, Il s'agit de mieux comprendre les mécanismes de la production et de l'émission des composés volatils chez la rose. A terme, l'objectif de ces recherches est de savoir pourquoi une rose est parfumée, quand une autre ne l'est pas. Nous avons abordé cette problématique à différents niveaux. Tout d'abord, nous nous sommes attaché à caractériser le pétale de rose en tant qu'organe producteur et émetteur de parfum chez les roses Hybrides de Thé. Nous avons tout particulièrement cherché à mettre en évidence des structures caractéristiques de la production de monoterpènes. Une analyse comparative a été réalisée chez des roses parfumées et non parfumées afin de savoir si l'absence de parfum était liée à l'absence de structures cellulaires spécifiques. Notre deuxième objectif était d'étudier la voie de biosynthèse responsable de la formation des monoterpènes. Ces composés constituent une proportion très importante des composés volatils des roses modernes Hybrides de Thé. Connaître les enzymes impliquées dans leur synthèse est une première étape, nécessaire pour comprendre pourquoi une rose est inodore. Lorsque nous avons commencé ce travail, aucune enzyme impliquée dans la synthèse des composés volatils notamment celle des monoterpènes, n'avait été isolée chez la rose. Nous avons donc caractérisé deux gènes clés de cette voie de biosynthèse. A la lumière des résultats que nous avons obtenus, les points suivants peuvent être discutés :

I. Développement floral et sécrétion du parfum

A. Les organes floraux des roses Hybrides de Thé produisent des bouquets de composés spécifiques

Avant d'étudier la production du parfum dans le pétale de rose, il nous a semblé important de caractériser les composés volatils émis par les différents organes des roses Hybrides de Thé. Nous avons donc réalisé une analyse chimique des composés volatils présents dans les sépales, les pétales, les étamines et les pistils (styles et stigmates). Cette expérience a déjà été réalisée chez d'autres espèces comme *Boronia megastima* (MacTavish et Menary, 1997), *Chrysanthemum coronarium* (Flamini *et al.*, 2003) et la rose sauvage *Rosa rugosa* (Dobson *et al.*, 1990). Dans toutes ces études, les auteurs ont mis en évidence que

chaque partie de la fleur a un profil de composés spécifique. Nos résultats confirment largement ceux de Dobson *et al.* chez *R. rugosa*. Chez les roses Hybrides de Thé comme 'Papa Meilland', même si certains composés sont communs aux quatre organes, les quantités et les proportions sont différentes et la présence de certains composés est propre à chaque organe. Cependant, les odeurs des différentes parties de la fleur ne sont pas exactement les mêmes dans notre étude et celle de Dobson *et al.* (1990). Ainsi, par exemple, les sépales de la variété 'Papa Meilland' produisent essentiellement des dérivés d'acides gras, alors que ceux de *R. rugosa* renferment surtout des sesquiterpènes. Ces composés sont spécifiques des nombreux trichomes glandulaires présents à la surface des sépales et des feuilles chez cette espèce (Hashidoko, 1996). Les composés volatils extraits des pétales de *R. rugosa* et *Rosa x hybrida* appartiennent majoritairement à la famille des terpènes et des composés aromatiques.

Les organes de la fleur émettent donc un bouquet de composés spécifiques, qui ont probablement des rôles écologiques différents. En effet, des dérivés d'acides gras et certains monoterpènes sont impliqués dans les réactions de défense, soit de façon directe à cause de leur toxicité, soit de façon indirecte en attirant les insectes prédateurs et/ou parasites des insectes herbivores (Arimura *et al.*, 2005). Dans les sépales de la variété 'Papa Meilland', on trouve du trans-2-hexénal et du linalol, caractérisés comme molécules de défense (Kessler et Baldwin, 2001). Les sépales pourraient donc offrir une barrière chimique, en plus d'une barrière mécanique, contre l'agression des insectes phytophages qui créent des dommages au niveau des organes reproducteurs. D'après Hashidoko *et al.* (1992a ; 1992b), les sesquiterpènes des trichomes glandulaires présents sur les feuilles et les sépales, jouent aussi un rôle dans la défense contre les pathogènes. Leur effet anti-appétent sur les larves de *Spodoptera litura*, la chenille du tabac a été démontré. Dans les pétales, les étamines et les pistils, les composés de défense sont peu représentés. Dans ces trois organes, on retrouve de façon générale les mêmes composés volatils mais dans des proportions différentes. Les pistils et les étamines produisent et émettent deux composés volatils qui ne sont pas ou peu produits par les pétales, l'eugénol et le méthyleugénol. Selon Dobson *et al.* (1999), ces deux composés ont une forte activité antimicrobienne et pourraient offrir une protection aux gamétophytes mâles. Ainsi, chez la rose sauvage *R. rugosa*, un rôle différent dans la biologie de la fleur a été attribué à chaque organe : les pétales, par leur forme, leur couleur et leur parfum, attirent les insectes pollinisateurs, les composants de l'androcée guident les insectes pollinisateurs jusqu'au pollen et limitent le développement microbien, et les sépales protègent la fleur en bouton des attaques d'insectes herbivores (Dobson *et al.*, 1990). La caractérisation des composés volatils produits par les différents organes floraux des roses Hybrides de Thé

aboutit aux mêmes conclusions. Ainsi, au cours de la domestication, les bouquets de composés volatils associés aux fonctions de chaque organe semblent avoir été conservés.

B. Le parfum évolue au cours de l'épanouissement de la fleur

Dans une rose Hybride de Thé comme celle de la variété 'Papa Meilland', le poids des pétales est environ 30 fois supérieur à celui des étamines. Ainsi, même si nous avons montré que la concentration en composés volatils dans les deux organes était pratiquement équivalente, la fragrance de la fleur est majoritairement due aux pétales. La suite de notre étude s'est donc focalisée sur cet organe.

Notre analyse chimique des composés volatils dans les pétales au cours du développement floral met en évidence une relation très nette entre production de parfum et épanouissement de la fleur. En effet, chez la rose 'Papa Meilland', la quantité de parfum présente dans les pétales augmente au cours du développement floral jusqu'au moment où la fleur est épanouie. Les mêmes observations ont été faites chez d'autres espèces comme par exemple le tabac *Nicotiana suaveolens*. Dans les fleurs de ce tabac, les quantités de composés volatils augmentent de façon importante après anthèse (Loughrin *et al.*, 1992). Cette relation étroite entre parfum et développement floral est associée, là encore, à la capacité de la fleur à attirer les insectes pollinisateurs.

Comme cela a été montré chez d'autres espèces comme *Boronia megastigma* (MacTavish et Menary, 1997) et *Chrysanthemum coronarium* (Flamini *et al.*, 2003), la quantité de composés volatils émis est relativement bien corrélée à la quantité de composés volatils présente dans les pétales. D'une manière générale, les roses dont les pétales renferment beaucoup de composés volatils en émettent de grandes quantités et inversement, les roses inodores ont des concentrations de composés très faibles dans leurs pétales. C'est aussi ce qu'ont montré Shalit *et al.* (2004) sur *Rosa x hybrida* 'Fragrant Cloud' et 'Golden gate'. Cependant, chez la variété 'Papa Meilland', le rapport entre les quantités de composés volatils présentes dans le pétale et celles émises par celui-ci est plus faible au stade BO qu'au stade BTO/FE. Cela pourrait signifier que lorsque la fleur n'est pas totalement épanouie, des composés volatils sont produits mais pas émis. Pour être validé, ce résultat inattendu devrait bien entendu être confirmé par des expériences sur d'autres variétés parfumées. Il serait également nécessaire de faire des analyses à des intervalles de temps rapprochés, afin de s'affranchir des variations dues au rythme d'émission des composés volatils.

Dans notre étude, la plupart des composés du parfum évoluent parallèlement au cours du développement de la fleur. Shalit *et al.* (2004) ont obtenu les mêmes résultats sur deux variétés de *Rosa x hybrida*. Ils en concluent que l'émission des différentes classes de composés pourrait être régulée par des mécanismes similaires. Des études très fines des rythmes d'émission des composés volatils montrent néanmoins que ces rythmes peuvent être spécifiques pour tel ou tel composé. Par exemple, les travaux de Helsper *et al.* (1998) sur *Rosa x hybrida* 'Honesty' montrent que certains composés comme la dihydro- β -ionone ont un rythme d'émission particulier. Chez l'œillet, Schade *et al.* (2001) suggèrent aussi une régulation développementale indépendante pour chaque composé. Chez *Rosa x damascena*, tous les composés présentent un rythme d'émission avec généralement un pic à la fin de la photopériode (Picone *et al.*, 2004). Toutes ces données, parfois contradictoires, soulignent la complexité de l'étude de l'émission rythmique des nombreux composés volatils émis par les fleurs, en particulier la rose.

Selon certains auteurs, les précurseurs du parfum seraient déjà présents dans les pétales de boutons fermés sous la forme de conjugués β -D-glucosidés non volatils (Ackerman *et al.*, 1989 ; Riou *et al.*, 1998 ; Reuveni *et al.*, 1999 ; Jakobsen et Christensen, 2002 ; Hayashi *et al.*, 2004). Ainsi, chez le jasmin (*Jasminum polyanthum*), des extraits de boutons floraux, mis en présence d'une préparation d'enzymes issues de fleurs ouvertes, sont capables de produire les composés parfumés (Watanabe *et al.*, 1993). Chez le narcisse, une corrélation étroite a été établie entre l'augmentation de la production des composés volatils et l'augmentation de l'activité β -glucosidase (Reuveni *et al.*, 1999). Chez *Vanilla planifolia*, les composés aromatiques sont piégés dans les vacuoles sous forme conjuguée avec le glucose et libérés au cours de la maturation du fruit par des glucosidases endogènes (Prince *et al.*, 1994). Chez *Rosa x damascena*, le 2-phényléthanol est produit dans les stades précoces sous la forme d'un composé β -D-glucosidé. Au cours du développement floral, la proportion de composé β -D-glucosidé diminue, tandis que la proportion de 2-phényléthanol libre augmente, parallèlement à une augmentation de l'activité β -glucosidase (Watanabe *et al.*, 2002). Ainsi, des formes conjuguées des composés volatils pourraient avoir un rôle dans le stockage et peut-être le catabolisme de certains composés volatils. Pour les monoterpènes, cela n'a pas été formellement démontré et le rôle des composés glucosidés n'est pas clair (Oka *et al.*, 1999). Dans le cadre de notre étude, une analyse des conjugués β -D-glucosidés et des formes libres respectives au cours du développement floral de la rose serait utile. En particulier, elle nous permettrait de savoir si l'augmentation de la quantité de D-glucose libre que nous avons

observée dans les pétales au cours du développement floral est reliée à l'hydrolyse de composés glycosylés.

II. Structure du pétale, production et sécrétion des composés volatils

Notre analyse des composés volatils du parfum dans les différents organes d'une rose a clairement identifié les pétales comme le site de production de la fragrance florale. Une caractérisation plus détaillée de cet organe nous semblait donc indispensable pour comprendre les mécanismes impliqués dans la production et l'émission du parfum. Nous avons donc étudié la structure du pétale des roses Hybrides de Thé au cours du développement floral à l'aide de techniques de microscopie, parallèlement à la production et à l'émission des composés volatils.

A. L'organisation générale du pétale

La structure des pétales de rose est similaire à celle des pétales d'*A. thaliana* (Pyke et Page, 1998), de giroflée (Weston et Pyke, 1999) et de nombreuses autres espèces. Les pétales de rose sont constitués de deux épidermes et d'un parenchyme lacuneux. Les cellules de l'épiderme supérieur d'un pétale de rose subissent de profondes modifications au cours du développement floral. Le cytoplasme dense au stade BF se vacuolise au cours du développement floral, se réduisant à une fine couche contre les parois de la cellule au stade FE. Par ailleurs, la forme des cellules de l'épiderme supérieur évolue au cours du développement. En effet, elles sont petites, régulières sur un pétale prélevé au stade BF et présentent des 'rides' sur toute leur surface. Lorsque la fleur est épanouie, les cellules de l'épiderme supérieur ont la forme conique en papille et les ornements sont restreints à l'apex. Ces ornements peuvent être considérées comme des excès de paroi/cuticule nécessaires à l'expansion du pétale au cours du développement floral. Ainsi, chez la giroflée (*Erysimum cheiri*), l'augmentation de la taille du pétale ne se fait pas par division, mais par expansion cellulaire (Weston et Page, 1999). Chez *A. majus*, l'augmentation de la surface du pétale est due à une expansion rapide de celui-ci au cours de son développement. Elle se manifeste par un affinement de la cuticule et de la paroi des cellules des lobes supérieur et inférieur des pétales (Goodwin *et al.*, 2003). Nous avons également observé cet amincissement des parois et de la cuticule dans les cellules des épidermes du pétale de rose.

B. Les deux épidermes du pétale sont sécréteurs

L'étude en microscopie électronique à balayage environnemental des pétales de rose révèle que les cellules de l'épiderme supérieur n'ont pas la même forme sur toute la surface du pétale : les cellules sont coniques dans les zones distales et plus plates dans les zones proches de l'onglet. Cette différence de forme s'accompagne d'un gradient de production des composés volatils au sein du pétale. Notre étude montre également que les deux épidermes du pétale ont des caractéristiques structurales différentes : les cellules de l'épiderme inférieur sont grandes et plates, alors que les cellules de l'épiderme supérieur sont petites et coniques, avec de nombreux replis. Aucun des deux épidermes du pétale de rose ne présente de trichomes sécréteurs. Des gouttelettes, observées à l'apex des cellules de l'épiderme supérieur des pétales des roses parfumées pourraient correspondre aux composés lipidiques du parfum, les gouttes d'huile essentielle ayant fusionné artificiellement dans l'environnement de la chambre du microscope à balayage ou dans l'espace entre lame et lamelle, lors d'observation en microscopie optique.

La capture d'effluves des deux épidermes de la rose 'The Mac Cartney Rose' montre qu'ils sont tous deux capables d'émettre des composés volatils dans des quantités équivalentes. Afin de savoir si les deux épidermes renferment les enzymes de voies de biosynthèse des composés volatils, la localisation de l'OOMT, impliquée dans les dernières étapes de la biosynthèse du DMT, a été faite sur les différents tissus du pétale par Western-blot. Les résultats montrent que l'OOMT est présente dans les deux épidermes du pétale. Des tests d'activité sur des extraits de protéines des deux épidermes pourraient confirmer que les deux épidermes renferment des enzymes fonctionnelles. Néanmoins, ce résultat suggère que les cellules des deux épidermes possèdent la machinerie indispensable à la synthèse des composés volatils. Très peu d'enzymes ont été localisées dans le pétale à l'échelle tissulaire. Chez *C. breweri*, des expériences d'hybridation *in situ* montrent que les enzymes LIS (Dudareva *et al.*, 1996) et IEMT (Dudareva et Pichersky, 2000), intervenant dans la synthèse des composés volatils, sont exprimés dans les deux couches de cellules épidermiques des pétales. Chez *A. majus*, l'enzyme BAMT, visualisée par immunocytochimie, est localisée dans les deux épidermes du pétale (Kolossova *et al.*, 2001). En microscopie optique, l'épiderme interne des lobes, aux cellules coniques en papilles, semble plus marqué. Cependant, en microscopie électronique, un marquage important est détecté dans les cellules non coniques de l'épiderme interne des lobes du pétale. Nos résultats semblent donc en accord avec ces données de la littérature, même si l'épiderme supérieur est souvent mentionné comme étant le seul épiderme sécréteur du pétale (Glover et Martin, 2002 ; Dudareva *et al.*, 2005). La forme conique en papille des cellules de l'épiderme supérieur du pétale de rose est

caractéristique de plus de 80 % des espèces végétales (Kay *et al.*, 1981). Les cellules concentrent la lumière absorbée et augmentent ainsi l'intensité de couleur du pétale (Gorton et Vogelmann, 1996). Chez les fleurs d'*A. majus*, elles sont également responsables de l'augmentation de la fréquence de visite des pollinisateurs. La preuve de cette fonction a été apportée par des analyses en champ comparant l'attractivité de fleurs sauvages d'*A. majus* et de fleurs mutées dans le gène *MIXTA*, présentant un épiderme des pétales plat (Glover et Martin, 1998). Ces auteurs proposent que cette forme conique en papille aide l'insecte à s'orienter sur la fleur en lui fournissant des signaux tactiles qui renforcent le syndrome de pollinisation. Il a également été suggéré que cette forme des cellules joue un rôle dans l'émission des composés du parfum en assurant une surface d'échange plus importante avec le milieu environnant (Glover et Martin, 2002). D'après nos résultats, la différence d'anatomie entre les deux épidermes, supérieur et inférieur, n'entraîne pas de différence marquante dans l'émission des composés volatils. Des analyses sur un éventail plus large de variétés parfumées et avec d'autres enzymes sont encore nécessaires pour pouvoir généraliser nos résultats. Néanmoins, s'ils se vérifient, ils confirment, comme la diversité des cellules sécrétrices peut le laisser penser, que la fonction de sécrétion n'est pas inféodée à un type cellulaire particulier.

C . L'évolution des plastes dans le pétale

L'évolution des plastes est la caractéristique la plus visible dans les pétales au cours du développement floral chez la rose. Dans les trichomes glandulaires de nombreuses espèces, on trouve un type bien particulier de plastes, les leucoplastes. Carde (1984) décrit ces plastes comme des 'plastes non-verts, non-pigmentés, morphologiquement différents de tout autre type de chloroplastes ou chromoplastes'. Ils ont été observés dans les trichomes foliaires sécréteurs d'huiles essentielles riches en monoterpènes de *Leonitis leonurus* (trichomes peltés, Ascensao *et al.*, 1997) et *Prostanthera ovalifolia* (Gersbach, 2002), ainsi que dans les cellules des canaux sécréteurs de *Rhus toxicodendron* (Vassilyev, 2000). Ils sont impliqués dans la synthèse des monoterpènes dans les fruits de *Citrofortunella mitis* (Gleize *et al.* 1983). Chez *A. thaliana*, qui n'est pas considérée comme une espèce produisant du parfum, les chloroplastes, initialement présents dans le pétale jeune, se différencient progressivement en leucoplastes dans le pétale de la fleur épanouie (Pyke et Page, 1998). Chez *Mentha x piperita*, la limonène synthase, enzyme impliquée dans la synthèse des monoterpènes, est localisée dans les leucoplastes des cellules glandulaires (Turner *et al.*, 1999). Chez *A. majus*, la petite sous-unité de la GPPS est localisée par immunomarquage dans les leucoplastes des lobes du

pétale (Tholl *et al.*, 2004). De nombreuses autres enzymes des voies de biosynthèse des terpènes, comme la GPPS de *Mentha x piperita*, sont plastidiales (Turner et Croteau, 2004). Ainsi, un gène codant pour une caroténoïde-dioxygénase a été isolé dans le pétale de rose (Scalliet, 2003). Ce gène code pour une enzyme probablement responsable de la formation des cétones de rose. Il possède une séquence d'adressage aux plastes et l'étude de la localisation subcellulaire de ce gène par fusion à la GFP a confirmé cet adressage.

Chez la rose, lorsque le bouton floral est fermé et encore protégé par les pétales, les plastes ont une structure qui rappelle celle des chloroplastes. Au cours du développement, ces plastes se différencient en amyloplastes contenant de nombreux grains d'amidon. La présence de chloroplastes, aux stades précoces du développement floral, pourrait indiquer que les cellules des épidermes du pétale ont une certaine activité photosynthétique permettant, au moins en partie, la synthèse de métabolites qui seront stockés sous la forme d'amidon, visible dès le stade BJO dans des amyloplastes. Dans les baies de raisin, les plastes des cellules du péricarpe contiennent des quantités suffisantes de chlorophylle pour assurer la production de métabolites à l'origine de l'amidon stocké dans ces mêmes plastes (Hardie *et al.*, 1996). Il est néanmoins possible que les précurseurs de l'amidon soient importés depuis des organes à forte activité photosynthétique jusqu'aux cellules du pétale.

Quand la fleur est épanouie, les cellules des épidermes du pétale de rose ont des plastes qui renferment de nombreux plastoglobules. Ces plastes remplis d'inclusion lipidiques ne répondent pas à la définition de Carde (1984). Ils sont plutôt voisins des chromoplastes des fruits, voire des élaïoplastes rencontrés dans les anthères (Wu *et al.*, 1997). Aucun plaste de type leucoplaste n'est donc observé chez la rose à aucun stade de développement.

La même transition, de plastes remplis d'amidon à des plastes remplis de plastoglobules, a déjà été rapportée dans les cellules sécrétrices de terpènes. Dans les baies de *Vitis vinifera*, Hardie *et al.*, (1996) ont émis l'hypothèse d'un lien entre la diminution de l'amidon et l'apparition de plastoglobules dans les plastes du péricarpe d'une part, et le contenu en monoterpènes des cellules, d'autre part. Les plastoglobules représenteraient un environnement adapté à l'accumulation des monoterpènes qui, non liés à un sucre, sont totalement insolubles dans les phases aqueuses.

Des plastes remplis de plastoglobules sont généralement considérés comme typiques des cellules produisant des monoterpènes. Ils ont par exemple été décrits dans les trichomes sécréteurs des feuilles de *Fagonia glutinosa* (Fahn et Shimony, 1998) et dans ceux des fleurons d'*Achillea millefolium* (Figueiredo et Pais, 1994). Le matériel présent dans les plastoglobules est assimilé par ces auteurs aux composés lipidiques sécrétés par ces trichomes à des stades de développement ultérieurs. Bien qu'il soit possible que les plastoglobules

denses aux électrons soient reliés à la sécrétion de composés volatils, aucune preuve n'est apportée par ces différentes études.

Chez les Orchidacées, les composés volatils sont émis par des zones des pétales appelées osmophores. La structure des cellules de ces osmophores est souvent assez voisine de celle de l'épiderme d'un pétale comme celui de la rose. En dessous des cellules de l'épiderme des osmophores, la présence d'une ou plusieurs couches de cellules très riches en amyloplastés a été remarquée depuis très longtemps (Vogel, 1962). Ces amyloplastés disparaissant parallèlement à l'émission du parfum, les auteurs supposent qu'ils fournissent l'énergie nécessaire à la synthèse des composés parfumés (Vogel, 1962 ; Esau, 1965). Dans les feuilles de *Cymbopogon flexuosus*, Singh et al., (1991) ont montré, en utilisant de l'amidon marqué, que le marquage passait progressivement de l'amidon à l'huile essentielle. Dans les cellules des épidermes des pétales de roses parfumées, ces organites pourraient jouer le même rôle dans la synthèse des monoterpènes.

En même temps, l'amidon présent dans les pétales pourrait aussi servir dans d'autres processus nécessitant une grande quantité d'énergie, comme l'expansion du pétale (Ho et Nichols, 1977 ; Hammond, 1982 ; Evans et Reid, 1988). Chez la rose, notre étude montre que la diminution des quantités d'amidon s'accompagne d'une augmentation des quantités de D-glucose libre. Ho et Nichols (1977) ont aussi observé une augmentation en sucre soluble parallèlement à une diminution du contenu en amidon dans la corolle de la rose 'Sonia' au cours de son développement. Ils ont postulé que, dans les pétales en développement, l'hydrolyse de l'amidon est à l'origine de l'augmentation des sucres solubles dans les cellules ce qui favorise l'entrée d'eau et donc l'expansion cellulaire. Parallèlement, l'épanouissement de la fleur s'accompagne d'une augmentation de l'activité amylase dans les pétales de rose (Hammond, 1982). Plus récemment, il a été montré que lorsque l'on inhibe la dégradation de l'amidon en sucres libres, les fleurs du lis asiatique ne sont plus capables de s'ouvrir (Bialeski et al., 2000).

D. Les mécanismes de sécrétion

Une autre caractéristique des cellules de l'épiderme du pétale au cours du développement floral est la prolifération des membranes qui forment des enroulements caractéristiques. Ces enroulements peuvent prendre plusieurs aspects. Certaines structures, que nous avons observées dans les pétales, sont très régulières et ressemblent à des figures de myéline (Fig. 29G). Stubbs et Francis (1971) avaient déjà observé ces structures de nature probablement lipidique chez la rose 'Lady Seton' sans leur attribuer un rôle physiologique.

Nous avons également observé d'autres figures moins régulières, souvent situées à proximité des plastes et qui sont peut-être dérivées du réticulum endoplasmique (Fig.29F). L'association plastes/RE est fréquente dans les systèmes sécréteurs (Figueiredo et Pais, 1994 ; Turner *et al.*, 2000a). Le réticulum endoplasmique joue un rôle important dans la synthèse et le transport des sesquiterpènes et des stéroïdes, ainsi que dans la conversion de la phénylalanine en acide cinnamique, précurseur des phénylpropanoïdes (Schöpker *et al.*, 1995). Chez la menthe, certaines enzymes, comme la limonène 6-hydroxylase, ont été localisées par immunocytochimie dans le RE (Turner et Croteau, 2004). Dans les cellules de l'épiderme des pétales de rose au stade 'Fleur épanouie', l'implication des plages de RE dans la production et/ou la sécrétion des composés volatils est possible mais non démontrée.

D'autres enzymes des voies de biosynthèse du parfum sont cytoplasmiques, comme la pulégone réductase de *Mentha x piperita* (Turner et Croteau, 2004). L'acétyl-CoA géraniol/citronellol acétyltransférase, impliquée dans la synthèse de dérivés de monoterpènes (acétate de géranyl et acétate de citronellyl), a été isolée chez la rose (Shalit *et al.*, 2003), mais sa localisation subcellulaire n'est pas encore établie. Néanmoins, on peut supposer que cette enzyme est cytoplasmique. En effet, elle appartient à la même famille d'enzymes que la BAMT isolée chez *A. majus*, responsable de la formation du méthylbenzoate, dont la localisation cytoplasmique a récemment été démontrée (Kolosova *et al.* 2001b).

Outre les figures de RE, les cellules de l'épiderme supérieur des pétales aux stades BTO et FE renferment de très nombreuses vésicules dont le contenu n'est pas osmiophile (Fig.29H et I). Ces vésicules sont regroupées par paquet au sein d'une enveloppe, souvent proche de la vacuole. Ces vésicules avaient déjà été décrites par Stubbs et Francis (1971) sous le terme de corps multivésiculaires (ou CMV) avec un rôle supposé avoir dans la sécrétion des monoterpènes. La présence de CMV a été également rapportée par Ascensão et Pais (1998) dans les trichomes capités de *L. leonurus* qui sécrètent surtout des protéines et des polysaccharides. Selon eux, la présence de CMV est en étroite relation avec la voie de l'endocytose, bien décrite dans les cellules eucaryotes. Les cellules glandulaires de *L. leonurus* présentent une forte activité d'exocytose ; l'augmentation de la surface membranaire qui en découle pourrait être balancée, au moins en partie, par un processus d'endocytose, impliqué dans la récupération de la membrane plasmique. Les vésicules seraient ensuite dégradées au niveau de la vacuole par l'intermédiaire de ces CMV (Hawes *et al.*, 1995).

Nous avons également mis en évidence la présence de nombreuses vésicules lipidiques d'environ 1µM de diamètre, souvent à proximité de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme (Fig. 29H et I). La coloration au réactif de NADI en microscopie optique a montré la présence de vésicules plus volumineuses renfermant des terpènes (Fig. 30C). Il est possible

que la taille supérieure des vésicules observées en microscopie optique soit un artéfact dû à la fusion de vésicules plus petites lors de la coloration. Ces deux types de vésicules lipidiques représenteraient en fait les mêmes organites. Des vésicules lipidiques ont déjà été mises en relation avec la production du parfum chez certaines plantes. Ainsi, les cellules des thalles de l'hépatique *Marchantia polymorpha* synthétisent des sesquiterpènes et renferment de volumineux oléosomes. Il a récemment été montré que certaines enzymes du métabolisme des terpènes, comme la FPPS, la GPPS et la GGPPS sont présentes dans ces organites (Suire *et al.*, 2000). Hudak et Thompson (1997) ont isolé à partir de pétales d'oeillet des vésicules, contenant à la fois de protéines et de lipides. D'après ces auteurs, ces particules, ressemblant à des oléosomes, renferment des composés du parfum, par exemple des dérivés d'acides gras. Elles pourraient être impliquées dans le transport et/ou le stockage de ces composés volatils.

Chez la rose, nous avons donc observé un certain nombre de vésicules (CMV, vésicules lipidiques) mais la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique n'a pas été observée de façon significative. Nous ne savons donc pas si elles jouent un rôle dans le transport des molécules volatiles depuis leur site de production jusqu'à leur site d'émission. Il est néanmoins possible que cette fusion des vésicules soit de nature transitoire et que nos observations, nécessairement fragmentaires, ne l'aient pas mise en évidence. Ces vésicules pourraient également représenter une forme de stockage des composés volatils puisque certains de ces composés sont toxiques pour la cellule. Au laboratoire, la purification et la caractérisation des vésicules lipidiques est en cours. En particulier, nous réalisons des expériences pour identifier les protéines éventuellement présentes dans ces structures, ainsi que les composés du parfum qu'elles contiennent.

Nous n'avons donc pas prouvé formellement l'existence d'un processus de sécrétion granulocrine dans le pétale de rose et l'hypothèse d'une sécrétion de nature écrine reste ouverte. Selon Fahn (2000), dans le cas d'une sécrétion écrine, les molécules volatiles, de faible poids moléculaire, sont transportées jusqu'à la membrane plasmique par un processus moléculaire actif, ou par simple diffusion, sans participation de vésicules (Fig. 6).

Récemment, il a été montré que des métabolites secondaires pouvaient être véhiculés par des transporteurs ABC liant l'ATP (Goossens *et al.*, 2003 ; Stukkens *et al.*, 2005). Ces protéines ABC correspondent à une famille de protéines ubiquitaires dont la structure moléculaire permet le transport de substrats variés à travers les membranes biologiques via la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. La liste des molécules transportées est impressionnante et inclut des peptides, des sucres, des lipides, des acides inorganiques et des stéroïdes. Les transporteurs ABC sont impliqués dans l'extrusion des composés cytotoxiques. Quand on sait que certains composés volatils du parfum sont toxiques pour la cellule, on peut envisager

qu'ils soient pris en charge par des transporteurs ABC. Chez *Nicotiana plumbaginifolia*, la protéine membranaire NpPDR1 transporte un diterpène antifongique, le sclaréol ; elle est impliquée dans les réactions de défense constitutives et induites par le jasmonate (Stukkens *et al.*, 2005). La recherche de ces protéines dans le pétale de rose pourrait se révéler particulièrement intéressante. L'implication de protéines de structure différente mais pouvant assurer la même fonction de transport, comme les LTP, est aussi à envisager.

III. L'absence de parfum chez les roses sélectionnées pour la fleur coupée

La production du parfum est un processus complexe qui fait intervenir un très grand nombre de voies métaboliques et probablement un très grand nombre de compartiments subcellulaires. La compréhension des mécanismes qui ont abouti à la perte du parfum chez certaines variétés sera probablement difficile. Afin d'apporter des informations sur les mécanismes responsables de cette perte du caractère parfumé, nous avons comparé la variété très parfumée 'Papa Meilland' à la variété inodore 'Black Baccara'.

A. Le parfum des roses non parfumées

Les composés volatils de plusieurs roses considérées comme inodores ont été analysés par extraction. Toutes les roses choisies ('Royal Red', 'Royal Baccara', 'Black Baccara', 'Rouge Meilland') renferment dans leurs pétales, à des degrés divers, des composés volatils, mais dans des quantités trop faibles pour être détectées par l'odorat humain. En général, ces roses inodores ne produisent pas d'alcools monoterpéniques comme le géraniol, le citronellol et le nérol. Néanmoins, la rose complètement dépourvue de parfum n'existe probablement pas et cette absence de véritable « témoin négatif » a beaucoup pénalisé notre étude.

Nous avons étudié plus en détail les composés volatils de la rose 'Black Baccara', par extraction et headspace. L'analyse montre, là encore, que si elle est dépourvue de parfum pour l'homme, elle produit et émet des composés volatils, DMT et dérivés d'acides gras principalement. Néanmoins, les quantités produites sont bien inférieures aux quantités produites par la variété parfumée 'Papa Meilland'. Shalit *et al.* (2004) ont aussi analysé la rose inodore 'Golden gate' et constaté qu'un des seuls composé émis était le DMT. De plus, chez 'Black Baccara', le rapport entre quantités émises et quantités dans le pétale est très largement inférieur à ce même rapport chez la variété parfumée 'Papa meilland'. Pour valider

ce résultat, il faudrait le confirmer par des expériences similaires sur d'autres couples de variétés. Il est néanmoins possible qu'il existe une barrière à l'émission des composés volatils produits par la variété 'Black Baccara'.

B. La structure des pétales des roses non parfumées est identique à celle des roses parfumées

Au niveau ultrastructural, les pétales de la variété 'Black Baccara' et ceux des autres variétés inodores que nous avons analysées ne présentent pas de différence majeure avec ceux de la variété parfumée. Les cellules de l'épiderme supérieur évoluent de la même façon : d'abord régulières et de petites tailles au stade BF, elles acquièrent leur forme caractéristique conique en papille au cours du développement floral et se vacuolisent fortement. La microscopie électronique à transmission révèle la présence des mêmes organites : amyloplastés aux stades BJO, BO et BTO qui disparaissent lorsque la fleur est épanouie et sont remplacés par des plastés à plastoglobules. Des plages de réticulum sont également observées. Ainsi, toutes les structures caractéristiques des variétés très parfumées semblent mises en place chez cette rose inodore. Après coloration au réactif de Nadi, de nombreuses vésicules bleues de nature lipidique sont visibles. Cependant, aucune vésicule violette n'est observée, ce qui témoigne de l'absence de terpènes en grandes quantités chez ces roses inodores. Toutes ces observations, en microscopies optique et électronique semblent indiquer que l'absence de parfum n'est pas liée à l'absence de structures cellulaires spécifiques.

C. L'hypothèse de la cuticule

Sur la base d'observations faites par les créateurs de variétés de rose, il est supposé depuis longtemps que l'absence d'effluves est liée à une cuticule plus épaisse chez les roses n'émettant pas de parfum. Des mesures montrent que les cellules de l'épiderme supérieur des pétales des variétés 'Papa Meilland' et 'Black Baccara' sont recouvertes d'une cuticule de même épaisseur. Ceci suggère que le défaut d'émission chez la variété 'Black Baccara' n'est pas du à la barrière physique que représente l'épaisseur de la cuticule. Néanmoins, les mesures ont été réalisées sur des clichés de microscopie électronique à transmission. Avec cette technique, il n'est pas exclu que les différences d'épaisseur, si elles sont minimes, ne soient pas détectées. Par ailleurs, l'épaisseur de la cuticule n'est probablement pas le seul paramètre à prendre en compte. L'abondance en cires varie énormément d'une espèce à l'autre : une cuticule riche en cires favorise le passage des substances lipidiques mais constitue une barrière pour les composés hydrosolubles (Nepi *et al.*, 1996). Goodwin *et al.*

(2003) rapportent que la composition en cires de la cuticule pourrait être déterminante pour sa perméabilité, notamment en définissant la taille du maillage pour la diffusion. Néanmoins, ces auteurs ont aussi montré que la cuticule du pétale d'*A. majus* ne constituait pas une barrière significative pour l'émission des composés volatils. Une étude de la composition chimique de la cuticule ou d'autres propriétés physico-chimiques de celle-ci, chez des roses très parfumées et des roses inodores permettrait d'éclairer cette question.

D. Les ressources carbonées chez les roses non parfumées

L'évolution des plastes au cours du développement floral est similaire chez les roses non parfumées et les roses parfumées. Dans les fleurs au stade BF, les plastes ressemblent à des chloroplastes. Les pétales aux stades BJO, BO et même BTO renferment de volumineux amyloplast. Lorsque les fleurs commencent à émettre des composés volatils, la taille des grains d'amidon diminue et des plastoglobules lipidiques denses aux électrons apparaissent. Il semble donc qu'il existe un lien très étroit entre ces trois événements : disparition de l'amidon, apparition des plastoglobules et émission des composés volatils. Il est donc très probable que l'amidon est utilisé pour la production de molécules parfumées. Nous avons donc émis l'hypothèse que cet amidon était limitant chez les roses dépourvues de parfum et qu'il existait un lien entre l'importance du stock d'amidon et la synthèse du parfum. Les résultats de notre étude montrent que ce n'est pas le cas. L'accumulation d'amidon dans les plastes des cellules du pétale et l'augmentation de D-glucose libre ne sont pas des facteurs limitants dans la production de composés volatils du parfum chez les roses non parfumées. La ou les causes de l'absence de parfum chez ces roses doit être recherchée dans d'autres phénomènes.

IV. La DXR est impliquée dans la synthèse des terpènes chez la rose.

Les roses Hybrides de Thé parfumées synthétisent des grandes quantités de terpènes. Il est maintenant largement admis que les monoterpènes sont synthétisés à partir de l'IPP et du DMAPP, produits dans les plastes par la voie MEP identifiée en 1993 par Rohmer *et al.* La DXR catalyse la deuxième étape clé de cette voie et la première étape engagée uniquement dans la synthèse des terpènes (Takahashi *et al.*, 1998).

Afin de mettre en évidence une corrélation entre la synthèse des terpènes dans le pétale et la présence de la DXR, l'effet de son inhibiteur spécifique, la fosmidomycine, a été

étudié. Les traitements à la fosmidomycine de fleurs de deux variétés de rose, produisant des monoterpènes, ont eu le même résultat : la diminution de la production des monoterpènes. Cependant cette diminution n'est pas très importante (18 % dans le cas de la variété 'Papa Meilland'). L'utilisation de fosmidomycine à 2 mM dans une culture enrichie en glandes sécrétrices de menthe entraîne une diminution de 51 % de la production de monoterpènes (Lange *et al.*, 2001). Une expérience similaire à la nôtre a récemment été décrite chez *A. majus*. Les fleurs entières sont mises en vases dans une solution de fosmidomycine 100 μ M. L'inhibition de l'émission des monoterpènes est de 60 % après les trois premières heures de traitement. Chez la rose, nous avons réalisé quelques essais avec ce mode d'application, sans succès, peut-être à cause de la taille de la fleur, qui est beaucoup plus importante que celle d'*A. majus*. Néanmoins, il est possible que l'application de l'inhibiteur par infiltration ou la concentration utilisée ne soient pas optimales. De plus, nous avons étudié la quantité de terpènes présents dans le pétale et non leur émission, qui pourrait être affectée par le traitement de manière plus importante. Bien que cela soit très peu probable (Dudareva *et al.*, 2005), il est également possible que l'inhibition de la voie MEP de synthèse de l'IPP par la fosmidomycine soit contrebalancée par la voie MEV. En effet, des travaux récents sur le tabac tendent à prouver que les deux voies ne sont pas strictement cloisonnées et qu'il existe des passerelles entre elles (Hemmerlin *et al.*, 2003). Des expériences complémentaires seraient donc utiles pour déterminer si une inhibition plus complète, en particulier de l'émission des composés, peut être obtenue. Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent que la DXR est bien impliquée dans la synthèse des terpènes chez la rose.

Un ADNc codant pour une DXR a donc été isolé à partir de pétales de rose. La comparaison des différentes séquences connues révèle des pourcentages d'identité très élevés entre les différentes DXR. Ceci peut s'expliquer par le fait que la DXR est impliquée dans une voie de biosynthèse qui permet de produire des composés vitaux pour la cellule (hormones : acide abscissique et gibbérellines ; chlorophylles, tocophérols, plastoquinones, chaînes phytols,...). Tous les motifs conservés, indispensables pour l'activité catalytique de la protéine, sont présents dans la séquence de rose.

La comparaison de la séquence de RhDXR avec les autres séquences DXR connues met en évidence la présence d'un site de coupure d'une séquence d'adressage aux plastides dont le motif est CSX, avec X représentant soit un groupement alanine, valine ou méthionine. La partie N-terminale de la séquence en amont de ce site de coupure est peu conservée mais elle est enrichie en résidus sérine, caractéristique des peptides d'adressage aux plastides (von Heijne *et al.*, 1989). La fusion de RhDXR à la GFP nous a permis de déterminer son adressage dans

les cellules d'oignon, de tabac et de rose. Par comparaison avec le signal obtenu avec une séquence connue pour assurer un adressage aux plastes, nous avons montré que RhDXR est adressée aux plastes, quel que soit le système végétal considéré. Cette localisation plastidiale avait été observée pour la première fois dans les feuilles d'*A. thaliana* (Carretero-Paulet *et al.*, 2002). Chez le maïs, Hans *et al.* (2004) ont montré par immunocytochimie que la DXR se trouve dans des plastes très modifiés, autour des arbuscules des mycorhizes. Dans les épidermes de rose, les plastes sont de deux types suivant le stade de développement, amyloplastides aux stades BJO, BO et BTO et plastides à plastoglobules aux stades BTO et FE. Il est donc probable que RhDXR est localisée dans ces deux organites.

La complémentation d'une souche d'*E. coli* déficiente en DXR (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001) a permis de confirmer que l'ADNc isolé chez la rose, *RhDXR*, code bien pour une protéine fonctionnelle. La protéine contient un domaine riche en proline dont le motif est P(P/Q)PAWPG(R/T)A. Ce domaine riche en résidus proline, conservé dans la forme longue de la DXR est probablement indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme puisque la forme courte de l'enzyme ne permet pas aux cellules mutées de se développer normalement. Chez *A. thaliana*, un résultat similaire a été obtenu par Carretero-Paulet *et al.* (2002) Ils concluent que ce domaine, absent des DXR procaryotes, contient des éléments importants pour la stabilité et/ou l'activité, au moins dans le cas d'une expression chez *E. coli*. L'analyse de la structure secondaire de la DXR (logiciel GOR4 : Combet *et al.*, 2000) révèle que ce domaine est compris dans une région 'coil', c'est-à-dire une région impliquée dans les interactions protéine/protéine. Selon Carretero-Paulet *et al.* (2002), il pourrait intervenir dans des interactions spécifiques avec des protéines régulatrices ou d'autres enzymes de la voie MEP.

Parce que la DXR est la première étape clé de la voie MEP de biosynthèse des terpènes plastidiaux, elle pourrait être un point clé de la régulation de cette voie. Ainsi chez *A. thaliana*, l'expression du gène *AtDXR* est régulée au cours du développement et des quantités importantes de transcripts s'accumulent dans les germinations et les inflorescences (Carretero-Paulet *et al.*, 2002). De même, les transcrits correspondant à la DXR s'accumulent dans les cultures cellulaires de *Catharanthus roseus*, induite à produire des alcaloïdes terpéniques (Veau *et al.*, 2000). Enfin, lors de la mycorhization des racines de maïs, le gène *DXR* est surexprimé dans les cellules colonisées par les champignons des mycorhizes arbusculaires. Cette surexpression a pour conséquence l'accumulation de caroténoïdes qui pourraient jouer un rôle dans la structure des mycorhizes (Hans *et al.*, 2004). Toutes ces études plaident en

faveur d'un rôle régulateur de la DXR dans les phénomènes considérés. Dans d'autres cas, la DXR est exprimée de façon constitutive. Le mûrissement du fruit de tomate, associé à une augmentation de la quantité de caroténoïdes, est un autre processus mettant en jeu la DXR. Cependant, la régulation de la biosynthèse des caroténoïdes n'est pas assurée par au niveau de la DXR, mais au niveau d'autres étapes, catalysées par la DXS (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001) et l'HDR (hydroxyméthylbutényl diphosphate réductase, Botella-Pavia *et al.*, 2004). Récemment, la DXR de *Ginkgo biloba* a été isolée (Gong *et al.*, 2005). Cette première DXR de gymnospermes présente les mêmes caractéristiques que toutes les DXR d'Angiospermes connues à ce jour. Une analyse phylogénétique montre que GbDXR est plus ancienne que les autres DXR de plante. Le gène *GbDXR* est exprimé dans tous les tissus, même si l'ARNm est moins abondant dans les feuilles.

Chez les roses Hybrides de Thé, l'étude de l'expression du gène DXR au cours du développement de la fleur, en corrélation avec la production de terpènes a été réalisée. Nous n'avons mis en évidence aucune corrélation entre l'expression du gène et la quantité de terpènes produits dans les organes de la plante. De plus, les roses produisant une faible quantité de terpènes ont le même taux d'expression de la DXR que celles qui en produisent peu. Les travaux de Dudareva *et al.* (2005), portant sur la synthèse des terpènes par les pétales d'*A. majus*, montrent que, chez cette espèce, le gène *DXR* s'exprime dans tous les organes, sauf les sépales, avec une expression préférentielle dans les lobes des pétales, organes producteurs de terpènes. Le gène *DXS*, dont la protéine permet la synthèse du DXP, substrat de la DXR, est fortement exprimé dans les lobes des pétales et les feuilles. De plus, la rythmicité de la production du parfum suivant l'horloge circadienne est régulée par l'expression du gène *DXS*. Selon les auteurs, l'absence d'oscillation rythmique des niveaux de transcripts *DXR* pourrait être due à un rôle mineur de la DXR dans la régulation de la voie MEP chez le muflier ou bien à une régulation post-transcriptionnelle de l'activité DXR (Dudareva *et al.*, 2005).

En conclusion, la régulation de la voie de biosynthèse des terpènes plastidiaux est complexe et met probablement en jeu plusieurs enzymes, plus ou moins déterminantes selon les phénomènes biologiques examinés. Dans le cas de la production des terpènes dans le pétales, nos travaux indiquent que la DXR n'est probablement pas régulatrice. Néanmoins, comme Dudareva *et al.* (2005), il est possible d'envisager une régulation post-transcriptionnelle de l'activité DXR dans les pétales de rose en corrélation avec la production des composés volatils du parfum. Afin de répondre à cette question, des expériences de western blot, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la DXR ainsi que des dosages d'activité dans plusieurs variétés de rose et les différents organes, sont envisagés.

Chez *Mentha x piperita*, l'expression du gène *DXR* est détectée par northern blot dans des feuilles jeunes mais pas dans des feuilles matures (Mahmoud et Croteau, 2001). Ces auteurs ont postulé que l'étape catalysée par la *DXR* est une étape régulatrice et que cette enzyme est une cible potentielle pour le contrôle du flux dans la voie MEP. Ainsi, ils ont montré qu'il était possible d'augmenter la quantité d'huile essentielle en surexprimant le gène *DXR* chez la menthe. Chez la rose, l'expression du gène *RhDXR* ne régule probablement pas *in vivo* la production des monoterpènes du parfum. Néanmoins, il est possible que sa surexpression permette d'augmenter les quantités de composés produits, comme dans le cas de la menthe. La transformation et la régénération de la rose n'étant pas encore maîtrisée, nous avons choisi une autre plante facilement transformable, *Nicotiana sylvestris*. De plus, cette espèce émet, entre autres, des terpènes suivant un rythme circadien avec un pic nocturne d'émission, suggérant une pollinisation nocturne par des papillons (Raguso *et al.*, 2003). Le gène *RhDXR* a donc été introduit chez *N. sylvestris* sous le contrôle d'un promoteur constitutif et la caractérisation des transformants au niveau moléculaire, ainsi que l'analyse des composés volatils est en cours.

Pour conclure, nous avons isolé chez la rose un gène codant pour une *DXR* fonctionnelle, dont l'expression ne semble pas liée à la production de parfum et dont la surexpression chez le tabac est en cours. Dans le cas où la surproduction de *RhDXR* permettrait d'augmenter les rendements en composés volatils chez le tabac, nous pourrions transférer cette technologie dans le végétal cible : la rose. L'isolement et la caractérisation d'autres enzymes de la voie MEP, potentiellement régulatrices, pourraient également être envisagés. En particulier, la *DXS*, dont l'expression suit le rythme circadien d'émission des composés volatils chez *A. majus*, semble une cible intéressante.

V. Une GPPS homodimérique ou hétéromérique chez la rose ?

Les monoterpènes, cycliques ou acycliques, sont synthétisés dans les plastes à partir de la condensation de l'IPP et du DMAPP en GPP. Cette réaction est catalysée par la prényltransférase GPPS. La première caractérisation d'un ADNc correspondant à la GPPS a été réalisée en 1999 chez la menthe poivrée (Burke *et al.*, 1999). La protéine est un hétérodimère constitué de deux sous-unités de taille différente (28 et 37 kDa), qui prises individuellement ne sont pas capables de produire du GPP. D'autres séquences de GPPS ont

été isolées par la suite. Les études ont abouti à la conclusion qu'il existait deux types de GPPS :

- Une forme homodimérique, isolée et caractérisée chez *Arabidopsis thaliana* (Bouvier *et al.*, 2000) et *Abies grandis* (Tholl *et al.*, 2001 ; Burke et Croteau, 2002),

- Une forme hétérodi- ou hétérotétramérique, isolée et caractérisée chez la menthe poivrée (Burke *et al.*, 1999) et dans les pétales d'*Antirrhinum majus* (Tholl *et al.*, 2004).

Lorsque nous avons cherché à isoler la GPPS de *Rosa x hybrida*, la GPPS hétérotétramérique d'*A. majus* n'était pas encore connue et les GPPS homodimériques étaient donc plus fréquentes que les GPPS hétérotétramériques. Nous avons postulé qu'il existait une GPPS homodimérique chez *R. x hybrida*. Une recherche par oligonucléotides dégénérés a abouti à l'isolement d'un ADNc de 1777 pb, correspondant à une protéine de 426 acides aminés. Les domaines DDXXD et FQXXDDXXD impliqués dans la liaison de l'IPP et du DMAPP, caractéristiques des prényltransférases, sont conservés dans la séquence isolée chez la rose. La séquence protéique partage 64 et 20 % d'identité avec les séquences protéiques des GPPS d'*A. thaliana*, et d'*Abies grandis* (AgGPPS2), respectivement. Burke et Croteau (2002) avaient déjà noté les faibles pourcentages d'identité entre les séquences d'*A. thaliana* et d'*A. grandis*. Les GPPS d'*A. grandis* sont beaucoup plus proches de la GGPPS de la même espèce. Burke et Croteau (2002) en concluent qu'il est impossible de prédire la spécificité de substrat d'une prényltransférase en analysant sa séquence.

La caractérisation enzymatique de la protéine RhGPPS n'a pas permis de mettre en évidence d'activité prényltransférase. Néanmoins, cela ne signifie pas pour autant que l'ADNc isolé ne code pas pour une protéine fonctionnelle. En effet, la GPPS d'*A. thaliana*, isolée et caractérisée par Bouvier *et al.* (2000) nous a servi de témoin d'activité GPPS. Or dans nos conditions d'expérimentation, nous n'avons pas obtenu d'activité avec AtGPPS. Cela peut signifier que nos conditions expérimentales ne permettent pas d'obtenir les protéines sous leur forme active. Dans les expériences de Bouvier *et al.* (2000), AtGPPS est étudiée sous la forme d'une protéine recombinante possédant une extension de 6 résidus histidine en position C-terminale. Cependant, ces auteurs purifient la protéine par immunoprécipitation. Ceci suggère que la production et la caractérisation de la GPPS sous forme active dans les bactéries sont difficiles. De plus, la GPPS est en général une enzyme plastidiale (Soler *et al.*, 1992), présentant normalement un peptide d'adressage aux plastes, qui n'est pas prédit par les logiciels bioinformatiques. Pour produire la protéine recombinante RhGPPS dans un système bactérien, nous avons défini, par comparaison avec la séquence AtGPPS, une région N-terminale d'adressage aux plastes et avons produit une protéine délétée de ce domaine. Il se peut que la protéine recombinante ne corresponde pas à la protéine mature *in vivo*, ce qui

expliquerait qu'elle ne soit pas fonctionnelle *in vitro*. Afin de déterminer sa localisation subcellulaire, des expériences préliminaires de fusion de RhGPPS avec la GFP avaient été effectuées par G. Scalliet (2003). L'observation de cellules transformées avec ces constructions n'avait donné aucun résultat. Néanmoins, ces expériences devraient être réalisées à nouveau, en fusionnant plusieurs zones de la protéine avec la GFP.

Pour conclure, d'autres systèmes d'expression devraient être mis en œuvre pour caractériser la fonction de la protéine codée par l'ADNc isolé chez la rose. Une expérience possible serait de surexprimer le gène *RhGPPS* dans une plante comme le tabac ou la rose. On pourrait également inhiber son expression, par interférence d'ARN.

L'étude de l'expression du gène *RhGPPS* a été réalisée sur différents tissus de rose et au cours du développement floral de rose de différentes variétés. Les résultats de RT-PCR montrent que *RhGPPS* est exprimé de façon constitutive, et dans toutes les variétés, qu'elles produisent ou non des monoterpènes. Là encore, il est possible qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle de l'activité GPPS chez la rose. Des western-blot avec un anticorps dirigé contre la GPPS permettraient de le préciser. De tels anticorps, dirigés contre la GGPS d'*A. thaliana* ont été testés chez la rose par G. Scalliet. Malheureusement, ils ne reconnaissent pas la protéine de rose produite chez *E. coli*. (Scalliet, 2003). Chez *A. majus* et *C. breweri*, la production de monoterpènes fait intervenir des GPPS hétérodimériques (Tholl *et al.*, 2004). La petite sous-unité est majoritairement exprimée dans les lobes du pétale qui produisent le parfum alors que la grande sous-unité est exprimée de façon constitutive. Chez *A. thaliana*, l'expression d'AtGPPS a été montrée par northern blot dans les feuilles.

Parce que la protéine GPPS isolée chez la rose n'est pas spécifique des pétales et de la production de monoterpènes dans ceux-ci, nous avons pensé qu'il pouvait exister une forme hétérodimérique comme chez *A. majus* (Tholl *et al.*, 2004). Cette recherche chez la rose d'une GPPS hétérodimérique n'a pas abouti.

Selon Bouvier *et al.* (2000), la différence observée entre les GPPS de *Mentha* et d'*A. thaliana* pourrait être liée au fait que la GPPS de menthe est localisée dans les trichomes, tandis que la GPPS d'*Arabidopsis* est localisée dans le parenchyme foliaire contenant des chloroplastes. Néanmoins, chez *A. majus*, la GPPS est produite dans les cellules de l'épiderme du pétale et non pas à l'intérieur de cellules spécialisées. Il n'existe donc pas de relation entre la forme de GPPS et la localisation tissulaire.

La forme hétéromérique de la GPPS est selon toute vraisemblance largement représentée chez les angiospermes puisqu'il a été possible de l'isoler dans différentes clades :

Lamiacées (*Mentha*, Burke *et al.*, 1999), Plantaginacées (*Antirrhinum*, Tholl *et al.* 2004) et Onagracées (*Clarkia*, Tholl *et al.*, 2004). Néanmoins, cette forme n'est pas présente chez toutes les Angiospermes. En effet, il n'existe aucune GPPS hétéromérique dans le génome totalement séquencé d'*A. thaliana* (Tholl *et al.*, 2004). Par ailleurs, chez les Gymnospermes, tels que *Abies grandis*, la séquence de la GPPS homodimérique ressemble à des GGPPS (Burke et Croteau, 2002). Toutes ces données suggèrent que des activités GPPS ont évolué indépendamment de nombreuses fois au cours de l'évolution des plantes. La caractérisation récente d'une GPPS chez un insecte, qui présente des pourcentages d'identité très faibles avec les GPPS de plantes va dans le même sens (Gilg *et al.*, 2005).

Pour conclure, nous avons isolé chez la rose un ADNc codant pour une GPPS, mais l'activité de la protéine correspondante n'a pas pu être démontré *in vitro*. Tous les éléments sont réunis pour dire que, chez la rose, la GPPS est homodimérique comme chez *Arabidopsis*. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de cette enzyme. Dans un premier temps, l'adressage de la protéine pourrait être étudié par le biais de protéines de fusion avec la GFP. Dans un deuxième temps, l'effet de la surexpression ou de l'inhibition de l'expression du gène *RhGPPS* sur la production des monoterpènes chez des espèces productrices d'huile essentielle pourrait être évalué.

Au cours de mon travail de thèse, l'étude de la production du parfum des roses a été appréhendée à différents niveaux et par différentes techniques.

Dans un premier temps, la caractérisation des pétales de rose, parallèlement à la production de composés volatils du parfum, a permis de fournir le contexte structural nécessaire pour l'étude des voies de biosynthèse et de leur régulation. Au cours de cette étude, nous avons obtenu des résultats remarquables. En effet, pour la première fois, à notre connaissance, nous avons mis en évidence que les deux épidermes du pétale sont impliqués dans la production et l'émission des composés volatils du parfum. Nous avons également pu observé des vésicules contenant des terpènes. Nous avons montré que l'absence de parfum chez les roses inodores n'était pas due à une absence de structures sécrétrices.

Nous avons isolé deux gènes potentiellement impliqués dans la synthèse des composés monoterpéniques : *RhDXR* et *RhGPPS*. L'expression de ces deux gènes n'est pas différente dans

les roses parfumées et dans celles qui sont dépourvues de parfum. La fonction de *RhGPPS* reste à prouver. La fonction de l'autre protéine, *RhDXR*, a été démontrée, ainsi que sa localisation plastidiale. L'effet de sa surexpression est actuellement testée dans des tabacs transgéniques. La caractérisation d'autres gènes, notamment le gène codant pour la *DXS*, et l'isolement de facteurs de transcription, permettraient de mieux comprendre les mécanismes de la régulation de la production et de l'émission des composés volatils chez la rose.

Références bibliographiques

- A -

- Ackerman I.E., Bonthorpe V., Fordham W.D., Kinder J.P. and Poots I.** – 1989 – β -glucosides of aroma components from petals of *Rosa* species : assay, occurrence and biosynthetic implications – *Journal of Plant Physiology*, **134** : 567-572
- Adam K. P., Thiel R. and Zapp J.** – 1999 – Incorporation of 1-[1-¹³C] deoxy-d-xylulose in chamomile sesquiterpenes – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **369** : 127-132
- Adam K.P. and Zapp J.** – 1998 – Biosynthesis of isoprene units of chamomile sesquiterpenes – *Phytochemistry*, **48** : 953-959
- Aharoni A., Giri A.P., Verstappen F.W.A., Berteaux C.M., Sevenier R., Sun Z., Jongsma M.A., Schawb W. and Bouwmeester H.J.** – 2004 – Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species – *The Plant Cell*, **16** : 3110-3131
- Altenburger R. and Matile P.** – 1988 – Circadian rhythmicity of fragrance emission in flowers of *Hoya carnos*a R. Br. – *Planta*, **174** : 248–252
- Altenburger R. and Matile P.** – 1990 – Further observations on rhythmic emission of fragrance in flowers – *Planta*, **180** : 194–197
- Altincicek B., Duin E.C., Reichenberg A., Hedderich R., Kollas A.-K., Hintz M., Wagner S., Wiesner J., Beck E. and Jomaa H.** – 2002 – LytB protein catalyses the terminal step of the 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis – *FEBS Letters*, **532** : 437-440
- Araki N, Kusumi K., Masamoto K., Niwa Y. and Iba K.** – 2000 – Temperature-sensitive Arabidopsis mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5 phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis – *Physiologia Plantarum* **108** : 19-24
- Arimura G.-I., Kost C. and Boland W.** – 2005 – Herbivore-induced, indirect plant defences – *Biochimica et Biophysica Acta*, **1734** : 91-111
- Ascensao L., Marques N. and Pais M.S.** – 1997 – Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves : ultrastructure and histochemical characterization of secretions – *International Journal of Plant Science*, **158** : 249-258

Ascensao L., Mota L and Castro M. de M. – 1999 – Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus* : morphology, distribution and histochemistry – *Annals of Botany*, **84** : 437-447

Ascensao L. and Pais M.S. – 1998 – The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus* : histochemistry, ultrastructure and secretion – *Annals of Botany*, **81** : 263-271

- B -

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 and for normal golgi movement in plants – *The Plant Cell*, **12** : 2201-2217

Beekwilder J., Alvarez-Huertai M., Neef E., Verstappen F.W.A., Bouwmeester H.J. and Aharoni A. – 2004 – Functional Characterization of Enzymes Forming Volatile Esters from Strawberry and Banana - *Plant Physiology*, **135** : 1865-1878

Benayoun J. and Fahn A. – 1979 – Intracellular transport and elimination of resin from Epithelial, Duct-cells of *Pinus halepensis* – *Annals of Botany*, **43** : 179-181

Bieleski R., Elger J. and Heyes J. – 2000 – Mechanical aspects of rapid flower opening in Asiatic lily – *Annals of Botany*, **86** : 1175-1183

Boatright J., Negre F., Chen X., Kish C.M., Wood B., Peel G., Orlova I., Gang D., Rhodes D. and Dudareva N. – 2004 – Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue – *Plant Physiology*, **135** : 1993-2011

Bohlmann J., Meyer-Gauen G. and Croteau R. – 1998 – Plant terpenoid synthases : molecular biology and phylogenetic analysis – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **95** : 4126-4133

Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A. and Lamb C. – 2000 – Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis – *The Plant Cell*, **12** : 2383-2394

Bosabalidis A. – 1996 – Ontogenesis, ultrastructure and morphometry of the petiole oil ducts of celery (*Apium graveolens* L.) – *Flavour and Fragrance Journal*, **11** : 269-274.

Bosabalidis A. and Tsekos I. – 1982 – Glandular scale development and essential oil

secretion in *Origanum dictamnus* – *Planta*, **156**: 496-504

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

Bottega S. and Corsi G. – 2000 – Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) – *Botanical Journal of the Linnean Society*, **132** : 325-335

Bourett T.M., Howard R.J., O'Keefe D.P., Hallahan D.L. – 1994 – Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa* – *International Journal of Plant Science*, **155**: 623-632

Bouvier F., d'Harlingue A., Suire C., Backhaus R.A. and Camara B. – 1998 – Dedicated roles of plastid transesterase during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits – *Plant Physiology*, **117** : 1423-1431

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

Bradford M. – 1976 – A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins, utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, **72** : 248-254

Brundrett M. C., Kendrick B., and Peterson C. A. –1991 – Efficient lipid staining in plant-material with sudan red-7b or fluoral yellow-088 in polyethylene glycol-glycerol – *Biotechnic and Histochemistry*, **66** : 111-116

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

Burke C., Klettke K. and Croteau R. – 2004 – Heteromeric geranyl diphosphate synthase from mint : construction of a functional fusion protein and inhibition by biphosphonate substrate analogs – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **422** : 52-60

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

Buttery R.G., Seifert R.M., Guadagni D.G. and Ling L.C. – 1971 – Characterization of additional volatile components of tomato – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **19** : 524-529.

Buttery, R.G., Teranishi, R. & Ling, L.C. – 1988 – Identification of damascenone in tomato volatiles – *Chem. Industr. (London)*, 238.

Buttery R.G., Teranishi R., Ling L.C., and Turnbaugh J.G. – 1990 – Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38** : 336-340.

- C -

Caissard J.C., Bergougnoux V., Martin M., Mauriat M. and Baudino S. – Chemical and histochemical analysis of 'Quatre Saisons Blanc Mousseux', a moss rose of the *Rosa x damascena* group (article soumis)

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

Carde J.-P. – 1984 – Leucoplasts : a distinct kind of organelles lacking typical 70S ribosomes and free thylakoids – *European Journal of Cell Biology*, **34** : 18-26

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

Chaintreau A., Joulain D., Marin C., Schmidt C.O. and Vey M. – 2003 – GC-MS quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reactions – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** : 6398-6403

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

Chen G., Hackett R., Walker D., Taylor A., Lin Z. and Grierson D. – 2004a –

Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavour compounds – *Plant Physiology*, **136** : 2641-2651

Chen F., Ro D.-K., Petri J., Gershenzon J., Bohlmann J., Pichersky E. and Tholl D. – 2004b – Characterization of root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole – *Plant Physiology*, **135** : 1956-1966

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

Cock J.M., Swarup R. and Dumas C. – 1997 – Natural antisens transcripts of the *s* locus receptor kinase gene and related sequences in *Brassica oleracea* – *Molecular and General Genetics*, **225** : 514-524

Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deléage G. – 2000 – NPS@:Network Protein Sequence Analysis – *Trends in Biochemical Science*, **25** : 147-150

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

Crock J., Wildung M. and Croteau R. – 1997 – Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)- β -farnesene – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **94** : 12833-12838

Croteau R., Gershenzon J., Wheeler C.J. and Satterwhite D.M. – 1990 – Biosynthesis of monoterpenes. Stereochemistry of the coupled isomerization and cyclization of geranyl pyrophosphate to camphene and isocamphene monoterpenes – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **87** : 929-954

Croteau R. and Purkett P.T. – 1989 – Geranyl pyrophosphate synthase : characterization of the enzyme and evidence that this chain-length specific prenyltransferase is associated with monoterpene biosynthesis in sage (*Salvia officinalis*) – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **271** : 524-535

- D -

David R. and Carde J.P. – 1964 – Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi – *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **258** : 1338-1340

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 Physiology*, **137** : 873-881

Degenhardt J., Gershenzon J., Baldwin I.T. and Kessler A. – 2003 – Attracting friends to feast on foes : engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivores enemies – *Current Opinion in Biotechnology*, **14** : 169-176

Delbard H. – 2002 – Evolution du marché des rosiers de jardin et des fleurs coupées – Colloque “Les roses aujourd’hui et demain” ; *Jardins de France*, **4** : 27-29

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

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

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

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

Dudareva ,Cseke L., Blanc V.M. and Pichersky E. – 1996 – Evolution of floral scent in *Clarkia* : novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flowers – *Plant Cell*, **8** : 1137-1148

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

Dudareva N., Murfitt L.M., Mann C.J., Gorenstein N., Kolosova N., Kish C.M., Bonham C. and Wood K. – 2000 – Developmental regulation of methylbenzoate

biosynthesis and emission in snapdragon flowers – *The Plant Cell*, **12** : 949-961

Dudareva N. and Negre F. – 2005 – Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission – *Current Opinion in Plant Biology*, **8** : 113-118

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

Dudareva N., Pichersky E. and Gershenzon J. – 2004 – Biochemistry of plant volatiles – *Plant Physiology*, **135** : 1893-1902

Dudareva N., Raguso R.A., Wang J., Ross J.R. and Pichersky E. – 1998a – Floral Scent Production in *Clarkia breweri*. III. Enzymatic Synthesis and Emission of Benzenoid Esters – *Plant Physiology*, **116** : 599-604

Dufaÿ M. – 2003 – Conflits d'intérêts et rencontre des partenaires du mutualisme : le cas du mutualisme palmier nain / pollinisateur – Mémoire de thèse, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, Montpellier, France

Dufaÿ M., Hossaert-McKey M. and Anstett M.C. – 2003 – When leaves act like flowers : hw dwarf palms attract their pollinators – *Ecology Letters*, **6** : 28-3

- E et F -

Edwards K., Johnstone C. and Thompson C. – 1991 – A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for the PCR analysis – *Nucleic Acids Research*, **19** : 1349

Engprasert S., Taura F. and Shoyama Y. – 2005 – Molecular cloning, expression and characterization of recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Coleus forskohlii* Briq. – *Plant Science*, **169** : 287-294

Esau K. – 1965 – Plant anatomy – J. Wiley and sons eds, New York, 767 pp

Evans Y. E. and Reid M. S. – 1988 – Changes in carbohydrate and osmotic potential during rhythmic expansion of rose petals – *Journal of American Society of Horticultural Science*, **113** : 884-888

Fahn A. – 1979 – Secretory Tissues in plants – Academic press ed., London, New York, San Francisco, 302 pp.

Fahn A. – 2000 – Structure and function of secretory cells – *Advances in Botanical*

Research, **31** : 37-97

Fahn A. and Benayoun J. – 1976 – Ultrastructure of resin ducts in *Pinus halepensis* development, possible sites of resin synthesis, and mode of its elimination from the protoplast – *Annals of Botany*, **40** : 857-863.

Fahn A. and Shimony C. – 1998 – Ultrastructure and secretion of the secretory cells of two species of *Fagonia* L. (Zygophyllaceae) – *Annals of Botany*, **81** : 557-565

Figueiredo A. C. and Pais M. S. – 1994 – Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. spp. *Millefolium* – *Annals of Botany*, **74** : 179-190

Flament I., Debonneville C. and Furrer A. – 1993 – Volatile constituents of roses : characterization of cultivars based on headspace analysis of living flower emissions. *In* : R. Teranishi, RG Buttery, H Sugisawa, eds, *Bioactive Volatile Compounds from Plants*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 269-281

Flamini G., Cioni P. L. and Morelli I. – 2003 – Differences in the fragrances of pollen, leaves, and floral parts of garland (*Chrysanthemum coronarium*) and composition of the essential oils from flowerheads and leaves. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51** : 2267-2271.

- G -

Gang D.R., Wang J.H., Dudareva N., Nam K.H., Simon J.E., Lewinsohn E. and Pichersky E. – 2001 – An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil – *Plant Physiology*, **125** : 539-555

Gargouri M., Drouet P. and Legoy M.-D. – 2004 – Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves. Volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids – *Journal of Biochemistry*, **111** : 59-65

Gersbach P.V. – 2002 – The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae) – *Annals of Botany*, **89** : 255-260

Gershenzon J., McConkey M.E. and Croteau R.B. – 2000 – Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint – *Plant Physiology*, **122** : 205-213

Gibernau M., Hossaert-McKey M., Frey J.E. and Kjellberg F. – 1998 – Are olfactory signals sufficient to attract fig pollinators ? – *Ecoscience*, **5** : 306-311

- Gilg A. B., Bearfield J.C., Tittinger C., Welch W. H. and Blomquist G. J.** – 2005 – Isolation and functional expression of an animal geranyl diphosphate synthase and its role in bark beetle pheromone biosynthesis – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **102** : 9760-9765
- Gleize M., Pauly G., Carde J.-P., Marpeau A. and Bernard-Degan C.** – 1983 – Monoterpene hydrocarbon biosynthesis by isolated leucoplasts of *Citrofortunella mitis* – *Planta*, **159** : 373-381
- Glover B.J. and Martin C.** – 1998 – The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus* – *Heredity*, **80** : 778-784
- Glover B.J. and Martin C.** – 2002 – Evolution of adaptative petal cell morphology – In *Developmental genetics and plant evolution*, 161-172. Cronk C. Q., Bateman R. M. and Hawkins J. A. eds, london.
- Glover B.J., Perez-Rodriguez M. and Martin C.** – 1998 – Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcript factor – *Development*, **125** : 3497-3508
- Gong Y., Liao Z., Chen M., Zuo K., Guo L., Tan Q., Huang Z., Kai G., Sun X., Tan F., Tang K.** – 2005 – Molecular cloning and characterization of a 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Ginkgo biloba* – *DNA sequence*, **16** : 111-120
- Goodwin S.M., Kolosova N., Kish C.M., Wood K.V., Dudareva N. and Jenks M.A.** – 2003 – Cuticle characteristics and volatiles emission of petals in *Antirrhinum majus* – *Physiologia Plantarum*, **117** : 435-443
- Goossens A., Häkkinen S.T., Laakso I., Oksman-Caldentey K-M. and Inzé D.** – 2003 – Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures – *Plant Physiology*, **131** : 1161-1164
- Gorton H.L. and Vogelmann T.C.** – 1996 – Effects of epidermal cell shape and pigmentation on optical properties of *Antirrhinum* petals at visible and ultraviolet wavelengths – *Plant Physiology*, **112** : 879-888
- Grison L. Edwards A.A. and Hossaert-McKey M.** – 1999 – Interspecies variation in floral fragrances emitted by tropical Ficus species. *Phytochemistry*, **52** : 1293-1299
- Grison-Pigé L., Bessièrè J.M. and Hossaert-McKey M.** – 2002a – Specific attraction of fig-pollinating wasps : role of volatile compounds released by tropical figs – *Journal of*

Chemical Ecology, **28** : 283-295

Grison-Pigé L., Hossaert-McKey M., Greeff J.M. and Bessière J.M. – 2002b- Fig Volatile compounds – a first comparative study – *Phytochemistry*, **61** : 61-71

Guan K.L. and Dixon J.E. – 1991 – Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase – *Analytical Biochemistry*, **192** : 262–267

Gudin S. – 1995 – Rose improvement, a breeder's experience. *Acta horticulura*, **420** : 125-128

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

Guevara-Garcia A., San Roman C., Arroyo A., Cortes M. E., de la Luz Gutierrez-Nava M., Leon P. – 2005 – Characterization of the Arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway – *Plant Cell*, **17** : 628-43

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

Gutierrez-Nava Mde L., Gillmor C.S., Jimenez L.F., Guevara-Garcia A. and Leon P. – 2004 – Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development – *Plant Physiology*, **135** : 471-482

- H -

Hammond J.B.W. – 1982 – Changes in amylase activity during rose bud opening – *Scientia Horticultura*, **16** : 283-289

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

Hara-Nishimura I. and Matsushima R. – 2003 – A wound-inducible organelle derived

from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses ? – *Current Opinion in Plant Biology*, **6** : 583-588

Hardie W.J., Aggenbach S.J. and Jaudzems V.G. – 1996 – The plastids of the grape pericarp and their significance in isoprenoid biosynthesis – *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2** : 144-154

Hashidoko Y. – 1996 – The phytochemistry of *Rosa rugosa* – *Phytochemistry*, **43** : 535-549

Hashidoko Y., Endoh K., Kudo T. and Tahara S. – 2001 – Capability of Wild *Rosa rugosa* and its varieties and hybrids to produce sesquiterpene components in leaf glandular trichomes – *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **65** : 2037-2043

Hashidoko Y., Tahara S. and Mizutani J. – 1992a – Sesquiterpene hydrocarbons in glandular trichome exudate of *Rosa rugosa* leaves – *Zeitschrift für Naturforschung*, **47c** : 353-359

Hashidoko Y., Tahara S. and Mizutani J. – 1992b – Rugosal A and related carotane sesquiterpenes in the glandular trichome exudate of *Rosa rugosa* – *Phytochemistry*, **31** : 779-782

Hawes C., Crooks K., Coleman J. and Satiat-Jeunemaitre B. – 1995 – Endocytosis in plants : fact or artefact ? – *Plant Cell and Environment*, **18** : 1245-1252

Hayashi S., Yagi K., Ishikawa M., Asai T., Picone J., Turnbull C., Hiratake J., Sakata K., Takada M., Ogawa K. and Watanabe N. – 2004 – Emission of 2-phenylethanol from its β -D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [$^2\text{H}_8$]L-phenylalanine in rose flowers – *Tetrahedron*, **60** : 7005-7013

Hecht S., Eisenreich W., Adam P., Amslinger S., Kis K., Bacher A., Arignoni D. and Rohdich F. – 2001 – Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes : the role of the GcpE (IspG) protein – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **98** : 14837-14842

Heide L., and Berger U. – 1989 – Partial purification and properties of geranyl pyrophosphate synthase from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **273** : 331-338

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

Hemmerlin A., Hoeffler J.-F., Meyer O., Tritsch D., Kagan I.A., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M. and Bach T.J. – 2003 – Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells – *The Journal of Biological Chemistry*, **278** : 26666-26676

Herz S., Wungsintaweekul J., Schuhr C.A., Hecht S., Lüttgen H., Sagner S., Fellermeier M., Eisenreich W., Znek M.H., Bacher A. and Rohdich F. – 2000 – Biosynthesis of terpenoids : YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **97** : 2486-2490

Hill R.E., Sayer B.G. and Spencer D. – 1989 – Biosynthesis of vitamine B6 : incorporation of D-1-deoxyxylulose – *Journal of American Chemistry Society*, **111** : 1916-1917

Ho L.C. and Nichols R. – 1977 – Translocation of ¹⁴C-sucrose in relation to changes in carbohydrate content in rose corollas cut at different stages of development – *Annals of Botany*, **41** : 227-242

Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eichholtz D., Rogers S.G. and Fraley R.T. – 1985 – *Science*, **227** : 1129-1231

Hsieh K. and Huang A.R.C. – 2005 – Lipid-rich tapetosomes in *Brassica* tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum – *The Plant Journal*, **43** : 889-899

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

Hudak K.A. and Thompson J.E. – 1996 – Flotation of lipid-protein particles containing triacylglycerol and phospholipid from the cytosol of carnation petals – *Physiologia Plantarum*, **98** : 810-818

- I et J -

Ish-Horowicz D. and Burke J. F. – 1981 – Rapid and efficient cosmid cloning – *Nucleic Acids Research*, **9** : 2989-2998

Jakobsen H.B. and Christensen L.P. – 2002 – Diurnal changes in the concentrations of 2-

phenylethyl β -D-glucopyranoside and the corresponding volatile aglycone in the tissue and headsace of *Trifolium repens* L. florets – *Plant Cell and Environnement*, **25** : 773-781

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

Jasinski M., Stukkens Y., Degand H., Purnelle B., Marchand-Brynaert J. and Boutry M. – 2001 – A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion – *The Plant Cell*, **13** : 1095-1107

Jirovetz L., Buchbauer G., and Shahabi M. – 2002 – Comparative investigations of essential oils and their SPME headsace volatiles of *Rosa damascena* from Bulgaria and *Rosa centifolia* from Morocco using GC-FID, GC-MS and olfactometry – *JEOP*, **5** : 111-121

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

Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Türbachova I., Ebert M., Zeidler J., Lichtenthaler H.K., Soldati D. and Beck E. – 1999 – Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs – *Science*, **285** : 1573-1576

Jousselin E., Hossaert-McKey M., Herre E.A. and Kjellberg F. – 2003 – Why do fig wasps actively pollinate monoecious figs ? – *Oecologia*, **134** : 381-387

Julliard J.H. and Douce R. – 1991 – Biosynthesis of the Thiazole Moiety of Thiamin (Vitamin B₁) in Higher Plant Chloroplasts – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **88** : 2042-2045

Jurgens A., Webber A.C. and Gottsberger G. – 2000 – Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips – *Phytochemistry*, **55** : 551-558

- K -

Karimi M., Inzé D. and Depicker A. – 2002 – GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation – *Trends in Plant Sciences*, **7** : 193-195

Kasahara H., Hanada A., Kuzuyama T., Takagi M., Kamiya Y. and Yamaguchi S. – 2002 – Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathway to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis* – *The Journal of Biological Chemistry*, **277** : 45188-45194

Kaul V.K., Gujral R.K. and Singh B. – 1999 – Volatile constituents of the essential oil of flowers of *Rosa brunonii* Lindl – *Flavour and Fragrance Journal*, **14** : 9-11

Kay Q.O.N., Daoud H.S. and Stirton C.H. – 1981 – Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals – *Botanical Journal of the Linnean Society*, **83** : 57-84

Kessler A. and Baldwin I.T. – 2001 – Defensive function of herbivore-induced plant volatiles emissions in nature – *Science*, **291** : 2141-2144

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

Kisser J. – 1958 – Der stoffwechsel sekundärer pflanzenstoffe – In Handbuch der pflanzenphysiologie (w. ruhland ed.) vol. 10, pp 91 –131. Springer, Berlin

Knudsen J.T. and Tollsten L. – 1993 – Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes : floral scent composition in moth-pollinated taxa – *Botanical Journal of the Linnean Society*, **113** : 263-284

Knudsen J.T., Tollsten L. and Bergström L.G. – 1993 – Floral scents – a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques – *Phytochemistry*, **33** : 253-280

Kolossova N., Gorenstein N., Kish C.M. and Dudareva N. – 2001a – Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants – *The Plant Cell*, **13** : 2333-2347

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

Koncz C. and Schell J. – 1986 – The promoter of T₁-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*, **204**, 383-396.

Kovats E. – 1987 – Composition of essential oils. Part 7. Bulgarian oil of rose (*Rosa damascena* Mill.) – *Journal of Chromatography*, **406** : 185-222

Kurkcuoğlu M. and Baser K.H.C. – 2003 – Studies on turkish rose concrete, absolute, and hydrosol – *Chemistry of Natural Compounds*, **39** : 457-464

Kuzuyama T., Takahashi S., Takagi M. and Seto H. – 2000 – Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues – *The Journal of Biological Chemistry*, **275** : 19928-19932

Kuzuyama T., Takahashi S., Watanabe H. and Seto H. – 1998 – Direct formation of 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate – *Tetrahedron Letters*, **39** : 4509-4512

- L -

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

Lange B. M. and Croteau R. B. – 1999b – Genetic engineering of essential oil production in mint – *Current Opinion in Plant Biology*, **2** : 139-144

Lange B. M., Ketchum R. E. B. and Croteau R. B. – 2001 – Isoprenoid biosynthesis. Metabolite profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis – *Plant Physiology*, **127** : 305-314

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

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

Lavy M., Zuker A., Lewinsohn E., Ravid U., Vainstein A. and Weiss D. – 2002 – Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia*

breweri linalool synthase gene – *Molecular Breeding*, **9** : 103-111

Lawrence B. M. – 1997 – Progress in essential oils – *Perfumer & Flavorist*, **22** : 57-74

Lewinsohn E., Schalechet F., Wilkinson, J., Matsui K., Tadmor Y., Nam K. H., Amar O., Lastochkin E., Larkov O., Ravid U., Hiatt W., Gepstein S. and Pichersky E. – 2001 - Enhanced Levels of the Aroma and Flavor Compound S-Linalool by Metabolic Engineering of the Terpenoid Pathway in Tomato Fruits – *Plant Physiology*, **127** : 1256-1265

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

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

Loomis W. D. and Croteau R. – 1973 – Biochemistry and physiology of lower terpenoids *Recent Advanced in Phytochemistry*, **295** : 517-524.

Loughrin J. H., Hamilton-Kemp T. R., Andersen R. A. and Hildebrand D. F. – 1991 – Circadian rhythm of volatile emission from flowers of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens* – *Physiologia Plantarum*, **83** : 492-496

Loughrin J., Hamilton-Kemp T. R., Burton H. R., Anderson R. A. and Hildebrand D. F. – 1992 – Glycosidically bound volatile components of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens* flowers – *Phytochemistry*, **31** : 1537-1540

Lu S., Xu R., Jia J. W., Pang J. H., Matsuda S. P. T. and Chen X. Y. – 2002 – Cloning and characterization of a beta-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression – *Plant Physiology*, **130** : 1335-1348

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

Lücker J., El Tamer M. K., Scwab W., Verstappen F. W. A., Van der Plas L. H. W., Bouwmeester H. J. and Verhoeven H. A. – 2002 – Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) – *European Journal of Biochemistry*, **269** : 3160-3171

Lücker J., Schwab W., Franssen M. C. R., Van der Plas L. H. W., Bouwmeester H. J. and Verhoeven H. A. – 2004b – Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis : two-

step production of (+)-isopiperitenol by tobacco – *The Plant Journal*, **39** : 135-145

Lücker J., Schwab W., van Hautun B., Blaas J., van der Plas L. H. W., Bouwmeester H. J. and Verhoeven H. A. – 2004a – Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon – *Plant Physiology*, **134** : 510-519

Lüttgen H., Rohdich F., Herz S., Wungsintaweekul J., Hecht S., Schuhr C. A., Fellermeier M., Sagner S., Zenk M. H., Bacher M. and Eisenreich W. – 2000 – Biosynthesis of terpenoids : YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl- 2C-methyl-D-erythritol – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **97** : 1062-1067

- M -

MacTavish H. S., Davies N. W. and Menary R. C. – 2000 – Emission of volatiles from brown boronia flowers : some comparative observations – *Annals of Botany*, **86** : 347-354

MacTavish H. S. and Menary R. C. – 1997 – Volatiles in Different Floral Organs, and Effect of Floral Characteristics on Yield of Extract from *Boronia megastigma* (Nees) – *Annals of Botany*, **80** : 305 - 311.

Mahmoud S. S and Croteau R. B. – 2001 – Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **98** : 8915-8920

Mahmoud S. S., Williams M. and Croteau R. B. – 2004 - Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil – *Phytochemistry*, **65** : 547–554

Maia N. and Vénard P. – 1976 – Cytotaxonomie du genre *Rosa* et origine des rosiers cultivés – In : FNHP (ed) Travaux sur le rosier de serre. *INRA Editions, Paris*, pp 7-20

Markham K. R., Gould K. S., Winefield C. S., Mitchell K. A., Bloor S. J. and Boase M. R. – 2000 – Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower coloration – *Phytochemistry*, **55** : 327-336

Martin M., Piola F., Chessel D., Jay M. and Heizmann P. – 2001 – The domestication

process of the modern rose : genetic structure and allelic composition of the rose complex – *Theoretical and Applied Genetic*, **102** : 398-404

Martin D., Tholl D., Gershenzon J. and Bohlmann J. – 2002 – Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems – *Plant Physiology*, **129** : 1003-1018

Matsushima R., Hayashi Y., Kondo M., Shimada T., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. – 2003 – An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis* – *Plant Physiology*, **130** : 1807-1814

McCaskill D. and Croteau R. – 1997 – Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis – In : *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Edited by / Berger R., Springer-Verlag, Heidelberg, pp 107-146

McCaskill D., Gershenzon J. and Croteau R. B. – 1992 – Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory-cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha-piperita* L.) – *Planta*, **187** : 445-454

Memelink J., Verpoorte R. and Kijne J. W. – 2001 – ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism – *Trends in Plant Science*, **6** : 212-219

Menke F. L. H., Champion A., Kijne J. W. and Memelink J. – 1999 – A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2 – *EMBO Journal*, **18** : 4455-4463

Meynet J. – 2001 – Les rosiers cultivés, une très longue histoire d'exploitation de la biodiversité seulement pour le plaisir et l'art de vivre – *Dossier de l'environnement de l'INRA*, **21** : 113-118

Miallau L., Alphey M. S., Kemp L. E., Leonard G. A., McSweeney S. M., Hecht S., Bacher A., Eisenreich W., Rohdich F. and Hunter W. N. – 2003 – Biosynthesis of isoprenoids : crystal structure of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase – *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **100** : 9173-9178

Miller B., Heuser T. and Zimmer W. – 2000 – Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis – *FEBS Letters*, **481** : 221-226

Mol J., Grotewold E., and Koes R. – 1998 –How genes paint flowers and seeds – *Trends in*

Plant Science, **3** : 212-217

Mostafavi R., Henning J. A., Gardea-Torresday J. and Ray I. M. – 1996 – Variation in aphid alarm pheromone content among glandular and eglandular-haired *Medicago* accessions – *Journal of Chemical Ecology*, **22** : 1629-1638

- N et O -

Nagy N. E., Franceschi V. R., Solheim H., Krekling T. and Christiansen E. – 2000 – Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (Pinaceae) : anatomy and cytochemical traits – *American Journal of Botany*, **87** : 302-313

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

Nam K., Dudareva N. and Pichersky E. – 1999 – Characterization of benzylalcohol acetyltransferase in scented and non-scented *Clarkia* species – *Plant Cell Physiology*, **40** : 916-923

Negre F., Kish C. M., Boatright J., Underwood B., Shibuya K., Wagner C., Clark D. G. and Dudareva N. – 2003 – Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers – *Plant Cell*, **15** : 2992-3006

Nepi M., Ciampolini F. and Pacini E. – 1996 – Development and ultrastructure of *Cucurbita pepo* nectaries of male flowers – *Annals of Botany*, **78** : 95-104

Noda K.I., Glover B. J., Linstead P. and Martin C. – 1994 – Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor – *Nature*, **369** : 661-664

Obeng-Ofori D. and Reichmuth C. H. – 1997 – Bioactivity of eugenol, a major component of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera – *International Journal of Pest Management*, **43** : 89-94

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

Ohnuma S.-I., Nakazawa T., Hemmi H., Hallberg A.M., Koyama T., Ogura K. and Nishino T. – 1996a – Conversion from farnesyl diphosphate synthase to geranylgeranyl

diphosphate synthase by random chemical mutagenesis – *The Journal of Biological Chemistry*, **271** : 10087-10095

Ohnuma S.-I., Narita K., Nakazawa T., Ishida C., Takeuchi Y., Ohto C. and Nishino T. – 1996b – A role of the amino acid residue located on the fifth position before the first aspartate-rich motif of farnesyl diphosphate synthase on the determination of the final product – *The Journal of Biological Chemistry*, **271** : 30748-30754

Oka N., Ohishi H., Hatano T., Hornberger M., Sakata K. and Watanabe N. – 1999 – Aroma evolution during flower opening in *Rosa damascena* Mill. – *Zeitschrift für Naturforschung Teil C*, **54** : 1-7

Özel M. Z. and Clifford, A. A. – 2004 - Superheated water extraction of fragrance compounds from *Rosa canina* – *Flavour and Fragrance Journal*, **19** : 354-359

- P et Q -

Paré P. W. and Tumlinson J. H. – 1997 – *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants – *Plant Physiology*, **114** : 1161-1167

Paré P. W. and Tumlinson J. H. – 1999 – Plant volatiles as a defense against insect herbivores – *Plant Physiology*, **121** : 325-331

Pauw B., Hilliou F. A. O., Martin V. S., Chatel G., de Wolf C. J. F., Champion A., Pré M., van Duijn B., Kijne J. W., van der Fits L. and Memelink J. – 2004 – Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus* – *The Journal of Biological Chemistry*, **17** : 52940-52948

Perez- Rodriguez M., Jaffe F. W., Butelli E., Glover B. J. and Martin C. – 2005 – Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers – *Development*, **132** : 359-370

Phillips M. A. and Croteau R. B. – 1999 – Resine-based defenses in conifers – *TRENDS in Plant Science*, **4** : 184-190

Pichersky E. and Gershenzon J. – 2002 – The formation and function of plant volatiles : perfumes for pollinator attraction and defence – *Current Opinion in Plant Biology*, **5** : 237-243

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

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

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

Piel J., Donath J., Bandemer K. and Boland W. – 1998 – Mevalonate-independent biosynthesis of terpenoid volatiles in plants: induced and constitutive emission of volatiles – *Angewandte Chemie International Edition in English*, **37** : 2478-2481

Pridgeon A. M. and W. L. Stern W. L. – 1985 – Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae) – *Botanical Gazette*, 146: 115-123

Prince R. C. and Gunson D. E. – 1994 – Just plain vanilla? – *Trends in Biochemical Science*, **19** :521.

Proctor M., Yeo P. and Lack A. – 1996 – The natural history of pollination – Timber Pres ed. 479 pp

Pyke K. A and Howells C. A. – 2002 – **Plastid and Stromule Morphogenesis in Tomato** – *Annals of Botany*, 90 : 559-566.

Pyke K. A. and Page A. M. – 1998 – Plastid ontogeny during petal development in *Arabidopsis* – *Plant Physiology*, **116** : 797-803

- R -

Raguso R. A., Levin R. A., Foose S. E., Holmberg M. W. and McDade L. A. – 2003 – Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination ‘syndromes’ in *Nicotiana* – *Phytochemistry*, **63** : 265-284

Raguso R. A., Light D. M. and Pichersky E. – 1996 – Electro-antennogram responses of *Hyles lineata* (Sphingidae : Lepidoptera) to volatile compounds from *Clarkia breweri* (Onagraceae) and other moth-pollinated flowers – *Journal of Chemical Ecology*, **22** : 1735-

Raguso R. A. and Pichersky E. – 1995 – Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C.concinna* (Onagraceae) : recent evolution of floral scent and moth pollination – *Plant Systematics and Evolution*, **194** : 55-67

Raguso R. A. and Pichersky E. – 1999 – A day in the life of a linalool molecule: chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: linalool biosynthesis in flowering plants – *Plant Species Biology*, **14** : 95-120

Rajapakse S., Byrne D. H., Zhang L., Anderson N., Arumuganathan K. and Ballard R. E. – 2001 – Two genetic linkage maps of tetraploid roses – *Theoretical and Applied Genetic*, **103** : 575-583

Rehder A. (éd.) – 1940 – A manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America exclusive of the subtropical and warmer temperate regions (2nd ed.) – Macmillan, New York, New York, USA

Rehder A. – 1949 – Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the northern hemisphere – In: Koeltz, S. (ed.), *Collectanea bibliographica*, vol. 10, 296–317. Jamaica Plain. Mass.: Arnold Arboretum. Reprint 1978 by O. Koeltz Koenigstein.

Reichel C., Mathur J., Eckes P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B. and Maas C. – 1996 – Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **93** : 5888-5893

Reuveni M., Sagi Z., Eynor D. and Hetzroni A. – 1999 – β -glucosidase activity is involved in scent production in Narcissus flowers – *Plant Science*, **147** : 19-24

Reynolds, E.S. – 1963 – The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy – *Journal of Cellular Biology*, **17** : 208-212

Ringer K. L., Davis E. M. and Croteau R. – 2005 – Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of (-)-isopiperitenol/(-)-carveol dehydrogenase of peppermint and spearmint – *Plant Physiology*, **137** : 863-872

Riou C., Salmon J.M., Vallier M.-J., Günata Z. and Barre P. – 1998 – Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* – *Applied and Environmental Microbiology*, **64** : 3607-3614

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

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

Rodriguez-Concepcion M., Campos N., Lois L. M., Maldonado C., Hoeffler J. F., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M. and Boronat A. – 2000 – Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli* – *FEBS Letters*, **473** : 328-332

Rodríguez-Concepción M., Forés O., Martínez-García J. F., González V., Phillips M. A., Ferrer A. and Boronat A. – 2004 – Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development – *The Plant Cell*, **16** : 144-156

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

Rohdich F., Wungsintaweeikul J., Fellermeier M., Sagner S., Herz S., Kis K., Eisenreich W., Bacher A. and Zenk M. H. – 1999 – Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids : YbgP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2C-methylerythritol – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **96** : 11758-11763

Rohdich F., Wungsintaweeikul J., Lüttgen H., Fisher M., Eisenreich W., Schuhr C. A., Fellermeier M., Schramek N., Zenk M. H. and Bacher A. – 2000b – Biosynthesis of terpenoids : 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase from tomato – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **97** : 8251-8256

Rohmer M., Knami M., Simoni P. Sutter B. and Sahn H. – 1993 – Isoprenoid biosynthesis in bacteria : a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate – *Biochemical Journal*, **295** : 517-524

Rohmer M., Seemann M., Horbach S., Bringer-Meyer S. and Sahn H. – 1996 –

Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis – *Journal of American Chemistry Society*, **118** : 2564-2566

Röse U. S., Manukian A., Heath R. R and Tumlinson J. H. – 1996 – Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves : a systemic response of living plants to caterpillar damage – *Plant Physiology*, **111** : 487-495

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

Rout G. R., Samantaray S., Mottley J. and Das P. – 1999 – Biotechnology of the rose : a review of recent progress – *Scientia Horticulturae*, **81** : 201-228

- S -

Salas J. J., Sanchez C., Garcia-Gonzales D. L. and Aparicio R. – 2005 – Impact of the suppression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase on the quality of the green odor in green leaves – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** : 1648-1655

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. –1989 – Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Scalliet G. – 2003 – Clonage et caractérisation d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du parfum chez la rose – Mémoire de thèse, pp 236

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

Scalliet G., Lionnet C., Le Behec M., Dutronc L., Magnard J.-L., Baudino S., Bergougnoux V., Jullien F., Chambrier P., Vergne P., Dumas C., Cock J. M. and Hugueney P. – Role of petal-specific orcinol O-methyltransferases in the evolution of rose scent – *Plant Physiology*, sous presse

Schade F., Legge R. L. and Thompson J. E. – 2001 – Fragrance volatiles of developing

and senescing carnation flowers – *Phytochemistry*, **56** : 703-710

Schiestl F. P., Ayasse M., Paulus H. F., Löfstedt C., Hansson B. S., Ibarra F. and Francke W. – 1999 – Orchid pollination by sexual swindle – *Nature*, **399** : 421-422

Schöpker H., Kneisel M., Beerhues L., Robenek H. and Wiermann R. – 1995 – Phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in glands of *Primula kewensis* (W.Wats) : immunofluorescence and immunogold localization – *Planta*, **196** : 712-719

Schulz H. – 2003 – Odoriferous substances and pigments. In: Roberts, A., Debener, T., Gudin, S. (eds.): Encyclopedia of Rose Science. Academic Press, London, pp. 231-240.

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

Serrato-Valenti G., Bisio A., Cornara L. and Ciarallo G. – 1997 – Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil – *Annals of Botany*, **79** : 329-336

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

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

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

Shukla, R. P. and V. G. Prasad, 1985. Population fluctuation of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel in relation to host and abiotic factors. *Tropical Pest Management*, **31**: 273-275.

Singh N., Luthra R. and Sangwan R. S. –1991 – Mobilization of starch and essential oil biogenesis during leaf ontogeny of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf.) *Plant and Cell Physiology*, **32** :803–811

- Skubatz H., Kunkel D. D., Patt J. M., Howald W. N., Hartman T. G. and Meeuse B. J. D.** – 1995 – Pathway of terpene excretion by the appendix of *Sauromatum guttatum* – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **92** : 10084-10088
- Sommer S., Severin K., Camara B. and Heide L.** – 1995 – Intracellular localization of geranylpyrophosphate synthase from cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon* – *Phytochemistry*, **38** : 623-627
- St -Pierre B. and De Luca V.** – 2000 – Evolution of acyltransferase genes : origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism – In : T. Romea, R. Ibrahim, L. Varin, V. De Luca, eds, *Recent Advances in Phytochemistry Evolution of Metabolic Pathways*, **Vol 34**. Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, pp 285-315
- Stern W. L., Curry K. J. and Pridgeon A. M.** – 1987 – Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae) – *American Journal of Botany*, **74** : 1323-1331
- Stern W. L., Curry K. J. and Whitten W.** – 1986 – Staining fragrance glands in orchid flowers – *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, **113** : 288-297
- Stubbs J. M. and Francis M. J. O.** – 1971 – Electron microscopical studies of rose petal cells during flower maturation – *Planta Medica*, **20** : 211-218
- Stukkens Y., Bultreys A., Grec S., Trombik T., Vanham D. and Boutry M.** – 2005 – NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense – *Plant Physiology*, **139** : 341-352
- Suga T. and Endo T.** – 1991 – Geranyl diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium roseum* – *Phytochemistry*, **30** : 1757-1761
- Suire C., Bouvier F., Backhaus R. A., Bégu D., Bonneu M. and Camara B.** – 2000 – Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering a new role of oil bodies – *Plant Physiology*, **124** : 971-978
- Suzuki M., Matsumoto S., Fleischmann H. P., Shimada H., Yamano Y., Ito M. and Watanabe N.** – 2002 – Identification of β -damascenone progenitors and their biogenesis in rose flowers (*Rosa damascena* Mill.) – In Carotenoids derived aroma compounds, 89- 101, American Chemical Society ed.

Tadmor Y., Fridman E., Gur A., Larkov O., Lastochkin E., Ravid U., Zamir D., and Lewinsohn E. – 2002 – Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication – *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **27** : 2005-2009

Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H. and Seto H. – 1998 – A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **95** : 9879-9884

Tamagnone L., Merida A., Parr A., Mackay S., Culianez-Macia F. A., Roberts K. and Martin C. – 1998 – The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco – *Plant Cell*, **10** : 135-154

Tarbouriech M.F. – 2001 – Des églantiers et des roses – *Dossier de l'environnement de l'INRA*, **21** : 119-124

Teixeira S., Borba E. and Semir J. – 2004 – Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae) – *Annals of Botany*, **93** : 499-505

Testu C. – 1984 – Roses anciennes – La maison rustique/Flammarion, Paris – 247 p

Tholl D., Croteau R. B. and Gershenzon J. – 2001 – Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (Grand Fir) – *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **386** : 233-242

Tholl D., Kish C. M., Orlova I., Sherman D., Gershenzon J., Pichersky E. and Dudareva N. – 2004 – Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyldiphosphate synthase – *The Plant Cell*, **16** : 977-992

Thompson J. N. – 1989 – Concepts of coevolution – *Trends in Ecology and Evolution*, **4** : 179-183

Trapp S. C. and Croteau R. B. – 2001a – Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual*

Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **52** : 689-724

Trapp S. C. and Croteau R. B. – 2001b – Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications – *Genetics*, **158** : 811-832

Turlings T. C. and Tumlinson J. H. – 1992 – Systemic release of chemical signals by herbivore-induced corn – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **89** : 8399-8402

Turner G. W. and Croteau R. B. – 2004 – Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase – *Plant Physiology*, **136** : 4215-4227

Turner G. W., Gershenzon J. and Croteau R. B. – 2000a – Development of peltate glandular trichomes of peppermint – *Plant Physiology*, **124** : 665-679

Turner G. W., Gershenzon J., and Croteau R. B. – 2000b – Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint – *Plant Physiology*, **124** : 655-664

Turner G. W., Gershenzon J., Nielson E. E, Froehlich J. E. and Croteau R. B. – 1999 – Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells – *Plant Physiology*, **120** : 879-886

- V -

Van de Pol P. A., Schiet F. T. and Frijters J. E. R. – 1986 – A preliminary investigation of odor change in cut and intact roses in various stages of maturation. *Acta horticultra*, **189** : 215-220

Van der Fits L. and Memelink J. – 2000 – ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism – *Science*, **289** : 295-297

Vassilyev A. E. – 2000 – Quantitative ultrastructural data of secretory duct epithelial cells in *Rhus toxicodendron* – *International Journal of Plant Science*, **161** : 615-630

Veau B., Courtois M., Oudin A., Chénieux J.-C., Rideau M and Clastre M. – 2000 –

Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus* – *Biochimica et Biophysica Acta*, **1517** : 159-163

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

Verpoorte R. and Memelink J. – 2002 – Engineering secondary metabolite production in plants – *Current Opinion in Biotechnology*, **13** : 181-187

Vogel S. – 1962 – Duftdrüsen im Dienst der Bestäubung über Bau und Funktion der Osmophoren – *Akad. Wiss. Abh. Math.-Naturwiss. Kl.*, **10** : 598-763

Von Heijne G., Steppuhn J. and Herrmann R. – 1989 – Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides – *European Journal of Biochemistry*, **180** : 535-545

- W -

Wagner G. J., Wang E. and Shepherd R. W. – 2004 – New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome – *Annals of Botany*, **93** : 3-11

Wahlroos T., Soukka J., Denesyuk A., Wahlroos R., Korpela T. and Kilby N. J. – 2003 – Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells – *Genesis*, **35** : 125-132

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

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

Ware A. B. and Compton S. G. – 1994 – Responses of fig wasps to host plant volatile cues - *Journal of Chemical Ecology*, **23** : 785-802

Watanabe S., Hayashi K., Yagi K., Asai T., MacTavish H., Picone J., Turnbull C. and Watanabe N. – 2002 – Biogenesis of 2-phenylethanol in rose flowers : incorporation of

[²H₈]L-phenylalanine into 2-phenylethanol and its β-D-glucopyranoside during the flower opening of *Rosa* 'Hoh-Jun' and *Rosa damascena* Mill. – *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **66** : 943-947

Watanabe N., Watanabe S., Nakajima R., Moon J.-H., Shimokihara K., Inagaki J., Etoh H., Asai T., Sakata K. and Ina K. – 1993 – Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymatic action during flower opening – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **57** : 1101-1106

Weichert H., Kolbe A., Kraus A., Wasternack C. and Feussner I. – 2002 – Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings – lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes – *Planta*, **215** : 612-619

Weiss E. A – 1997 – Rosaceae – In : Essential oil crops. CAB International (ed.), pp 393-416

Weston E. L. and Page A.M. – 1999 – Developmental ultrastructure of cells and plastids in the petals of wallflower (*Erysimum cheiri*) – *Annals of Botany*, **84** : 763-769

Weston E. A. and Pyke K. A. – 1999 – Developmental ultrastructure of cells and plastids in the petals of Wallflower *Erysimum cheiri* – *Annals of Botany*, **84** : 763-769

Wissemann, V. – 2003 – Conventional taxonomy (wild roses). In: Roberts, A., Debener, T., Gudin, S. (eds.): Encyclopedia of Rose Science. Academic Press, London, pp. 111-117.

Wu S. S. H., Platt K. A., Ratnayake C., Wang T.-W., Ting J. T. L. and Huang A. H. C. – 1997 – Isolation and characterization of neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from *Brassica napus* tapetum – *Proceedings of National Academy of Science of USA*, **94** : 12711-12716

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

- X à Z -

Yajima S., Nonaka T., Kuzuyama T., Seto H. and Ohsawa K. – 2002 – Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase complexed with cofactors : implications of a flexible loop movement upon substrate binding – *Journal of Biochemistry*,

131 : 313-317

Yamamoto T., Matsuda H., Utsumi Y., Hagiwara T. and Kanisawa T. – 2002 – Synthesis and odor of optically active rose oxyde – *Tetrahedron*, **43** : 9077-9080

Yeboah Gyan K and Woodell S. R. J. – 1987 – Flowering phenology, flower colour and mode of reproduction of *Prunus spinosa* L. (Blackthorn); *Crataegus monogyna* Jacq. (Hawthorn); *Rosa canina* L. (dog rose); and *Rubus fruticosus* L. (Bramble) in Oxforshire, England – *Functional Ecology*, **1** : 261-268

Yokoya K., Roberts A.V., Mottley J., Lewis R. and Brandham P.E. – 2000 – Nuclear DNA amounts in Roses – *Annals of Botany*, **85** : 557-561

Zucker A., Tzfira T., Ben-Meir H., Ovadis M., Shklarman E., Itzhaki H., Forkmann G., Martens S., Neta-Sharir I., Weiss D. and Vainstein A. – 2002 – Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene – *Molecular Breeding*, **9** : 33-41

Annexe 1 : Séquences des oligonucléotides utilisés par les techniques de biologie moléculaire.

Nom de l'oligonucléotide	Utilisation	Séquence
DX1	Oligo sens dégénéré du gène DXR	GAYATHGTNGCNGARAATCC
DX6	Oligo antisens dégénéré du gène DXR	ATNGGNARNCGCATRTCNGGCCA
S1	Oligo sens dégénéré du gène GPPS	GAGTACTTCTTCAAAATGGGAGTGGA AGGGAAA
AS1	Oligo antisens dégénéré du gène GPPS	ACTTGGTCCTTGTAATGACTCTTTCAG TGAGATCT
DXR-RA-AS1	Amorce antisens de RACE-PCR DXR 5'	CCTTGCTCCCCAGGAATGATCTCAGG CTTGTCT
DXR-RA-AS2	Amorce antisens de RACE-PCR DXR 5' (nested)	TAGGGCCACAACCTCTGAACCTTTTCGG GATTTTC
DXR-RA-S1	Amorce sens de RACE-PCR DXR 3'	TCGTCCATTCGATGATTGAAACTCAG GATTC
DXR-RA-S2	Amorce sens de RACE-PCR DXR 3' (nested)	AGCACAGTTGGGTTGGCCGGATATGC GACTAC
RA-AS2	Amorce antisens de RACE-PCR GPPS 5'	TGACATTCAGAGCTGTTGACATTAAT AATAAGACC
RA-AS3	Amorce antisens de RACE-PCR GPPS 5' (nested)	CACCCCCATTTTAAAGAAGTACTCAG CAGA
RA-S1	Amorce sens de RACE-PCR GPPS 3'	ACCTTCTAACTATCTTCGTCCTCACTC TCGGGCAA
RA-S2	Amorce sens de RACE-PCR GPPS 3' (nested)	GGAATACAGAGGACAAGGGAGCTAG CAAGAAAACA
FL-DXR-S	ADNc entier de la DXR	GGGGTTCTTTGTTTTTTGGACTTTTGG
FL-DXR-AS	ADNc entier de la DXR	TTCATACATAAACAACCCCATCTACG CCACATCTA
FL-GPPS-S	ADNc entier de la GPPS	TTCCACCTTTCTGATTCGT
FL-GPPS-AS	ADNc entier de la GPPS	TCAACAGTGTGTTATTTGTGGTG
eA01A	Amorce sens du fragment du gène <i>GAPDH</i>	ATCCATTCATCACCACCGACTACA
eA01B	Amorce antisens du fragment du gène <i>GAPDH</i>	GCATCCTTACTTGGGGCAGAGA
RTS-DXR	Amorce sens de RT-PCR DXR	GGCCCTTTTGTTCCTCCTCTT
RTAS-DXR	Amorce antisens de RT-PCR DXR	CCGGCCAACCCAACTGTGCTA
RT1-S	Amorce sens de RT-PCR GPPS	TGCGTGCAAGACAGCAATGTATAGCA GAAGTGA
RT1-AS	Amorce antisens de RT-PCR GPPS	GAGCAGTAATGATGCCATGGCGGATG TCA
DXR/GFP-S	Amorce sens de fusion	CCATCATGACTCTGAATCTGTCTCCA

	DXR-GFP dans le vecteur pCAT	GCTGA
DXR/GFP-AS2	Amorce antisens de fusion DXR-GFP dans le vecteur pCAT	CGCTCATGAACACCTGATCGACAAGA AGAG
SurexDXR-S	Amorce sens utilisée pour la surexpression du gène <i>RhDXR</i> dans le tabac et la fusion à la GFP dans un vecteur Gateway TM	CACCTCTTTGTTTTTTGGACTTTTGGGA TTGC
pK7FWG2-AS	Amorce antisens utilisée pour la fusion à la GFP dans un vecteur Gateway TM	TGCGAATACAGGGGTTGAACTTGTTG A
SurexDXR-AS	Amorce antisens de surexpression du gène <i>RhDXR</i> dans le tabac	GCTCATGCGAATACAGGGGTTGAACT TGTTGAGC
Compl-Bor-S	Amorce sens de la forme longue de la DXR pour le vecteur pQE30	CCGGATCCCAAGCACCACCTC
DXR-Compl-S2	Amorce sens de la forme courte de la DXR pour le vecteur pQE30	GGGGGATCCGCTTTTCCGGAGCCCGG CCG
DXR-Compl-AS	Amorce antisens de la DXR pour le vecteur pQE30	CCCGTCGACCGAATACAGGGGTTGAT G
DXR-L70-S	Amorce sens de la forme longue de la DXR pour le vecteur pQE70	CCCGCATGCAAGCACCACCTC
DXR-S70-S	Amorce sens de la forme courte de la DXR pour le vecteur pQE70	CCCGCATGCCAAAGCCTAT
DXR-70-AS	Amorce antisens de la DXR pour le vecteur pQE70	CCCGGATCCTGCGAATACAG
ExpRGS	Amorce sens de la GPPS pour le vecteur pGEX-KG	GCGGGATCCTCTGATGAGCTATCACT TATTGCT
ExpRGAS	Amorce antisens de la GPPS pour le vecteur pGEX-KG	CGCGAGCTCTTACTTCGTTCTTGTAAT GACTAG

Annexe 2 Composition du tampon d'infiltration utilisé lors de la transformation
transitoire par *Agrobacterium tumefaciens*.

Mes 500 mM	1 mL
Na ₂ HPO ₄ , 7H ₂ O 200 mM	0,1 mL
Glucose	0,05 g
Acétosyringone (3,5 diméthoxy 4-hydroxy acétophénone) 50 mM	100 µl
H ₂ O	qsp 50 mL

Annexe 3 : Composition des gels SDS-PAGE 10 %

Gel de résolution (pour 2 gels)	
Acryl / bis-acryl (BIORAD)	2,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	4 mL
Glycérol 40 %	3 mL
H ₂ O	2,3 mL
SDS 20 %	60 µL
TEMED	12 µL
Persulfate d'ammonium 10 %	120 µL
Gel de concentration (pour 2 gels)	
Acryl / bis-acryl (BIORAD)	400 µL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,24 mL
H ₂ O	3,36 mL
SDS 20 %	18 µL
TEMED	12 µL
Persulfate d'ammonium 10 %	120 µL

Annexe 4 : Composition des milieux T et TT utilisés lors de la transformation stable de
Nicotiana sylvestris.

	Milieu TT de callogénèse et de régénération (1 litre)	Milieu T d'entretien et d'enracinement (1 litre)
MS5524	4,4 g	
MS5519		4,4 g
Vitamins B5 de Gamborg (X500)	2 ml	
Saccharose	30 g	20g
Agar	8 g	8 g
pH	5,6 ou 5,7	5,8
BAP	1 mg	0,1 mg éventuellement
ANA	0,1 mg	
Augmentin	400 mg	
Kanamycine	200 mg	200 mg

Les hormones et antibiotiques, stérilisés sur filtre 0,22 µm, sont ajoutés au milieu après 20 min d'autoclavage à 120°C.

composés	Milieux (références Sigma-Aldrich)	
	M5524 (mg/L)	MS6899 (mg/L)
Nitrate d'ammonium	1650,0	1650,0
Acide borique	6,20	6,20
Chlorure de calcium anhydre	332,20	332,20
Chlorure de cobalt hexahydraté	0,025	0,025
Sulfate de cuivre pentahydraté	0,025	0,025
EDTA (dihydrate de sodium)	37,26	37,26
Sulfate de fer heptahydraté	27,8	27,80
Sulfate de magnésium anhydre	180,7	180,70
Sulfate de manganèse	16,9	16,90
Myo-ionositol		100,0
Iodure de potassium	0,83	0,83
Nitrate de potassium	1900,00	1900,0
Phosphate de potassium monosodique	170,00	170,0
Molybdate de sodium dihydraté	0,25	0,25
Hydrochlorure de thiamine		0,40
Sulfate de zinc heptahydraté	8,60	8,60

Annexe 5 : Séquence nucléotide de *RhDXR*

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Rosa x hybrida ATGGCTCTGA ATCTGTTGTC TCCAGCTGAA ATTAAAGCTA TCTCTTTTCT GGATTCCACC AAGTCCATTC ACTTGCCAAA 80

      90      100     110     120     130     140     150     160
Rosa x hybrida GCTTCCAGGT GGGTTTGCTT TGAGGAGGAG AGATTGCAGA GCGGTGATTG GAAGAAGAAT TCAGTGTTC A GCACAAGCAC 160

      170     180     190     200     210     220     230     240
Rosa x hybrida CACCTCCAGC TTGGCCGGGA AGTGCCTTTC CGAGACCCGG CCGGAGGACT TGGGATGGTC CAAAGCCTAT TTCTGTGTGT 240

      250     260     270     280     290     300     310     320
Rosa x hybrida GGATCTACTG GTTCCATTGG AACCCAGACA TTGGACATAG TTGCAGAGAA CCCCAGAAAAG TTCAGAGTTG TGGCCCTAGC 320

      330     340     350     360     370     380     390     400
Rosa x hybrida AGCTGGCTCA AATGTCACTC TTCTTGTCGA TCAGGTGAAG AGGTTCAAAC CCAAAGTAGT TGCAGTTAGA AATGAATCAT 400

      410     420     430     440     450     460     470     480
Rosa x hybrida TAGTTAATGA ACTTAAAGAG GCTCTTCTCT GTCTAGAAGA CAAGCCTGAG ATCATTCTCT GGGAGCAAAG AGTCATTGAG 480

      490     500     510     520     530     540     550     560
Rosa x hybrida GTTGCTCGGC ACCCAGATGC AGTCACAGTA GTTACAGGAA TAGTTGGTTG TGCAGGACTG AAGCCTACAG TGGCTGCAAT 560

      570     580     590     600     610     620     630     640
Rosa x hybrida AGAAGCAGGG AAAGATATAG CTTTAGCCAA TAAGGAGACC CTGATTGCTG GAGGCCCTTT TGTTCCTTCT CTGTCACACA 640

      650     660     670     680     690     700     710     720
Rosa x hybrida AGCATAATGT GAAAATTCTT CCTGCTGATT CAGAACATTC TGCAATTTTT CAGTGTATCC AAGGCTTGCC AGAGGGTGCA 720

      730     740     750     760     770     780     790     800
Rosa x hybrida CTTGCGCGTA TCATTTGAC AGTTCCTGGT GGGGCTTCA GGGATTGGCC TGTTGAAAAA CTCAAAGAAG TTAAGGTGTC 800

      810     820     830     840     850     860     870     880
Rosa x hybrida TGATGCTCTG AACATCCTA ACTGGAGTAT GGGAAAGAAG ATAAGTGTG ATTCAGCTAC GCTTTTCAAT AAGGGGCTAG 880

      890     900     910     920     930     940     950     960
Rosa x hybrida AAGTCATTGA AGCCCATTC TGTATGGAG CTGAGTATGA TGATATCGAG ATTGTGATTC ATCCACAATC CATCATCCAT 960

      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
Rosa x hybrida TCGATGATTG AAACTCAGGA TTCATCTGTT CTAGCACAGT TGGGTTGGCC TGATATGCGC TTACCAATCC TCTACACCAT 1040

      1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
Rosa x hybrida GTCATGGCCG GAGAGAATCT ATTGCTCTGA AGTAACCTGG CCCGGCTTG ATCTTTGCAA GCTTGTTTCA CTAACCTTTA 1120

      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
Rosa x hybrida AAGCTCCTGA CAACGTGAAA TACCCATCCA TGGATCTTGC TTATTCTGCT GGACGGGCCG GTGGCACCAT GACAGGAGTT 1200

      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
Rosa x hybrida CTTAGTGCAG CAAATGAAAA GGCTGTGGAG ATGTTTATCG ATGAAAAAAT TAGATATCTG GATATTTTCA AGGTTGTTGA 1280

      1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350    1360
Rosa x hybrida GCTAACATGT GCCAAGCACA GGGCAGAGCT CGTGACCTCA CCTTCCCTCG AGGAAATTGT ACATTATGAT TTATGGGCAA 1360

      1370    1380    1390    1400    1410
Rosa x hybrida GAGATTACGC TGCTAATCTG CAAAGCTCAA CAAGTTCAAC CCCTGTATTC GCA 1413

```

Annexe 6 : Séquence nucléotidique de *RhGPPS*

```

      10      20      30      40      50      60      70
Rosa x hybrida ATGATGTATA GCCGTGGCTT TAGCCGCTCTG CCGCGTAAACA GCTTTAACGG CCTGTGCCGT TGCCTGCTGA 70

      80      90     100     110     120     130     140
Rosa x hybrida GCAACCGTCC GGATCCGCAT CAGTTTTTTTG TGAGCAAAGC GTTTAGCCAG AGCCCGGGCG ATAGCACCCA 140

     150     160     170     180     190     200     210
Rosa x hybrida GCGTATTCTG GGCTGCCGT~ ~GAATTTTG GCCGACCTTT CCGGGCAGCA GCATTAGCCG TCATCAGATT 207

     220     230     240     250     260     270     280
Rosa x hybrida CATCATCAGA GCAGCAGCAT TGTGGAAGAA CCGCAGGATC CGTTTCTGCT GGTGAGCGAT GAACTGGCGC 277

     290     300     310     320     330     340     350
Rosa x hybrida TGATTGCGGA TCGTCTGCGT GCGatgTGG TGCGAAAGT GCCGAACTG GCGAGCGCGG CGGAATATTT 347

     360     370     380     390     400     410     420
Rosa x hybrida TTTTAAAtg GCGGTGGAAG GCAAACGTTT TCGTCCGACC GTGCTGCTGC TGatgAGCAC CGCGCTGAAC 417

     430     440     450     460     470     480     490
Rosa x hybrida GTGAGCATTG CGGAACCGCC GACCCGTAGC GAAAGCCCGa tgCGTCTGGG CGATGCGTTT CCGACCGAAC 487

     500     510     520     530     540     550     560
Rosa x hybrida TGGTGGCGCG TCAGCAGTGC ATTGCGGAAG TGACCGAAat gATTCATGTG GCGAGCCTGC TGCATGATGA 557

     570     580     590     600     610     620     630
Rosa x hybrida TGTGCTGGAT GATGCGGATA CCCGTCGTGG CGTGGGCAGC CTGAACAGCG TGatgGGCAA CAAACTGGCG 627

     640     650     660     670     680     690     700
Rosa x hybrida GTGCTGGCGG GCGATTTTCT GCTGAGCCGT GCGTGCCTGG CGCTGGCGAG CCTGCGTAAC ACCGAAGTGG 697

     710     720     730     740     750     760     770
Rosa x hybrida TGAGCCTGCT GAGCACCGTG GTGGAACATC TGGTGACCGG CGAAACCatg CAGatgACCA CCGGGCGGGA 767

     780     790     800     810     820     830     840
Rosa x hybrida TCAGCGTTGC AGCatgGAAT ATTATATTGA AAAAACCTAT TATAAAACCG CGAGCCTGAT TAGCAACAGC 837

     850     860     870     880     890     900     910
Rosa x hybrida TGCAAAGCGA TTGCGATTCT GCGGGGCCAT ACCACCGAAG TGGCGatgat gGCGTATGAA TATGGCAAAA 907

     920     930     940     950     960     970     980
Rosa x hybrida ACCTGGGCCT GGCGTTTCTAG CTGATTGATG ATGTGCTGGA TTTTACCGGC ACCAGCGCGA GCCTGGGCAA 977

     990    1000    1010    1020    1030    1040    1050
Rosa x hybrida AGGCAGCATT AGCGATATTC GTCATGGCAT TATTACCGCG CCGATTCTGT TTGCGatgGA AGAATTTCCG 1047

    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
Rosa x hybrida CAGCTGCGTG CCGTGGTGGGA ACAGGGCTTT GATAACCCGG CGAACATTGA AATTGCGCTG GATTATCTGG 1117

    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190
Rosa x hybrida GCAAAGCAA CGGCATTCTAG CGTACCCGTG AACTGGCGCG TAAACATGCG AACCTGGCGG CGGAAGCGAT 1187

    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
Rosa x hybrida TGAAAGCCTG CCGGAAAGCG AAGATGAAGA TGTGCTCGT AGCCGTCGTG CGCTGCTGGA TCTGACCCAT 1257

    1270    1280
Rosa x hybrida CTGGTGATTA CCCGTACCAA A 1278

```

Annexe 7 : Séquence nucléotidique d'un fragment de la séquence *NsDXR*, amplifié
avec les amorces dégénérées DX1 et DX6

```

      10      20      30      40      50      60      70
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
ATAGTCGCTG AAAATCCGGA CAAGTTTAGA GTTGTTCAC TAGCTGCTGG TTCAAATGTT ACTCTTCTTG 70

      80      90      100     110     120     130     140
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CTGATCAGGT CAAAACATTC AGACCAAAAC TAGTTGCTGT TCGAAATGAG TCATTGGTTG AGGAACTCAA 140

      150     160     170     180     190     200     210
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AGATGCTCTG GCTGATATGG AAGACAAGCC TGAGATTATA CCTGGTGAGC AGGGTATCAT CGAGGTCGCC 210

      220     230     240     250     260     270     280
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CGCCATCCTG ATGCTGTCAC TGTAGTTACA GGAATAGTTG GTTGTGCAGG TTAAAGCCT ACAGTGGCTG 280

      290     300     310     320     330     340     350
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CCATAGAAGC AGGAAAGGAC ATTGCCTTGG CCAATAAAGA GACTTTAATT GCTGGTGGTC CATTGTCTCT 350

      360     370     380     390     400     410     420
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TCCTCTTGCA CACAAGCACA AGGTGAAGAT TCTTCTGCA GATTCAGAAC ATTCAGCTAT ATTCCAGTGC 420

      430     440     450     460     470     480     490
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
ATACAAGGCT TGCCAGAGGG TGCCCTTAGG CGCATTATAT TAACTGCATC TGGAGGGGCT TTCAGGGACT 490

      500     510     520     530     540     550     560
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TGCCAGTTGA GAAGTTGAAA GAAGTTAAAG TAGCTGATGC TTTGAAGCAT CCAATTGGA ACATGGGGAA 560

      570     580     590     600     610     620     630
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AAAGATTACT GTTGATTCTG CCACCTTATT CAATAAGGGT CTTGAAGTTA TTGAAGCTCA CTACCTTTTC 630

      640     650     660     670     680     690     700
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GGAGCTGAGT ATGATGACAT TGAAATTGTC ATCCATCCCC AGTCCATCAT ACATTCAATG GTGGAAACAC 700

      710     720     730     740     750
Nicotiana sylvestris  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ..
AGGATTCATC AGTATTGGCA CAGCTGGGGT GGCCGGATAT GCGTCTACCA AT 752

```

Annexe 8 : Polymorphisme de site de restriction dans la région du gène *DXR* amplifié
avec les amorces RT--DXR

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
RT RhDXR  GGCCCTTTG TTCTTCCTCT TGCACACAAG CATAATGTGA AAATTCCTCC TGCTGATTCA GAACATTCTG CAATTTTCA 80
RT NsDXR  GGTCCATTG TCCTTCCTCT TGCACACAAG CACAAGGTGA AGATTCCTCC TGCAGATTCA GAACATTGAG CTATATTCCA 80

      90     100     110     120     130     140     150     160
RT RhDXR  GTGTATCAA GGCTTGCCAG AGGGTGCACT TCGGCGTATC ATTTTGACAG CTTCTGGTGG GGCTTTCAGG GATTGGCCTG 160
RT NsDXR  GTGCATACAA GGCTTGCCAG AGGGTGCCCT TAGGCGCATT ATATTAACCTG CATCTGGAGG GGCTTTCAGG GACTTGCCAG 160

      170     180     190     200     210     220     230     240
RT RhDXR  TTGAAAACT CAAAGAAGTT AAGGTGCTG ATGCTCTGAA ACATCCTAAC TGGAGTATGG GAAAGAAGAT AACTGTTGAT 240
RT NsDXR  TTGAGAAGTT GAAAGAAGTT AAAGTAGCTG ATGCTTTGAA GCATCCCAAT TGGAACATGG GAAAAAAGAT TACTGTTGAT 240

      250     260     270     280     290     300     310     320
RT RhDXR  TCAGCTACGC TTTTCAATAA GGGGCTAGAA GTCATTGAAG CCCATTACTT GTATGGAGCT GAGTATGATG ATATCGAGAT 320
RT NsDXR  TCTGCCACCT TATTCAATAA GGGTCTTGAA GTTATTGAAG CTCACTACCT TTTCGGAGCT GAGTATGATG ACATTGAAAT 320

      330     340     350     360     370     380     390     400
RT RhDXR  TGTGATTCAT CCACAATCCA TCATCCATTC GATGATTGAA ACTCAGGATT CATCTGTTCT AGCACAGTGG GGTGGCCTG 400
RT NsDXR  TGTGATTCAT CCCCAGTCCA TCATACATTC AATGGTGGAA ACACAGGATT CATCAGTATT GGCACAGCTG GGGTGGCCGG 400

```

Séquence du site de restriction EcoRV : GAT'ATC