



**Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés  
terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula  
stoechas sensu lato*, un complexe d'espèces  
méditerranéennes d'intérêt pharmacologique**

Tarek Benabdelkader

► **To cite this version:**

Tarek Benabdelkader. Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas sensu lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Biologie végétale. Université Jean Monnet - Saint-Etienne; Ecole normale supérieure de Kouba (Alger), 2012. Français. <NNT : 2012STET4007>. <tel-00952695>

**HAL Id: tel-00952695**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00952695>**

Submitted on 27 Feb 2014

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

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



ECOLE NORMALE SUPERIEURE, KOUBA-ALGER  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



UNIVERSITE JEAN MONNET-SAINTE ETIENNE  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
Ecole Doctorale : Sciences, Ingénierie et Santé

# THESE

*En cotutelle présentée à l'ENS de Kouba, Algérie*

*Pour l'obtention du grade de*

Docteur  
de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, Algérie  
et  
de l'Université Jean-Monnet de Saint-Etienne, France

***Discipline : Biologie et Ecophysiologie Végétale***

*par*

**Tarek BENABDELKADER**

**Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils  
des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas Sensu Lato*, un Complexe  
d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique**

***Thèse codirigée par les Professeurs Abdelkrim KAMELI et Laurent LEGENDRE***

**Soutenue le octobre 2012 devant le jury composé de :**

M. Nasserline SABAOU, Professeur, Ecole Normale Supérieure de Kouba-Algérie \_\_\_\_\_ Président  
M. Chabane CHELGHOUM, Professeur, USTHB d'Alger-Algérie \_\_\_\_\_ Rapporteur  
M. Benoit ST-PIERRE, Professeur, Université François Rabelais de Tours-France \_\_\_\_\_ Rapporteur  
M. Mohamed YOUSFI, Professeur, Université Amar Télidji de Laghouat-Algérie \_\_\_\_\_ Examineur  
M. Abdelkrim KAMELI, Professeur, Ecole Normale Supérieure de Kouba-Algérie \_\_\_\_\_ Directeur de thèse  
M. Laurent LEGENDRE, Professeur, Université Jean Monnet de Saint Etienne-France \_\_\_\_\_ Directeur de thèse  
M. Frédéric JULLIEN, Maître de conférences, Université Jean Monnet de Saint Etienne-France \_\_\_\_\_ Invité

Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils  
des Lavandes Aillées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un Complexe  
d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique

---

Thèse de Doctorat

Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger/Université Jean Monnet de Saint Etienne

Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Aillées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un Complexe d'Espèces Méditerranéennes  
d'Intérêt Pharmacologique

---

Thèse cofinancée par une bourse de coopération Algéro-Française (PROFAS ex. BAF) et  
par une bourse CMIRA de la région Rhône Alpe-France



Adresse des Laboratoires :

- ✚ Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux Plantes Aromatiques et Médicinales

Faculté des Sciences et Techniques  
23 rue du Docteur Paul Michelon  
42023 Saint-Etienne Cedex 2  
France



- ✚ Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse
- ✚ Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens

Ecole Normale Supérieure  
BP 92 Kouba  
16000 Alger  
Algérie

---

*À la mémoire de ma mère qui m'a quittée délaissée au milieu de la route,  
À mon père,  
À ma femme Hayet,  
À mon fils Mohamed Ishak qui est venu au milieu de cette thèse,  
À mes frères et sœurs,  
À tous ceux qui me sont chers,...*

# REMERCIEMENTS

*En premier lieu et avant tout je tiens à remercier **DIEU** le tous puissant qui ma donné le courage, la patience et la force de terminer ce travail.*

*La majorité de cette thèse a été réalisée au laboratoire de Biotechnologies Végétale appliquée aux plantes aromatiques et médicinales (BVpam) de la Faculté des Sciences et Techniques de Saint Etienne, dirigé par le Pr. **Laurent LEGENDRE** puis par le Pr. **Sylvie Baudino-Caissard** et une petite partie aux laboratoires de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse (RPBVB) et sur la Biologie des Systèmes Microbiens de l'ENS d'Alger, dirigés par le Pr. **Nasserdine SABAOU**. Je souhaite tous les remercier ici pour l'accueil et les facilités qu'ils m'ont réservés au sein des laboratoires.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon co-directeur de thèse Mr. **L. LEGENDRE**, qui a bien voulu m'encadrer et m'accueillir dans son labo et dans son équipe pendant ce projet et de m'avoir donné la chance de réaliser un projet dans un domaine qui ne m'était pas vraiment familier et dans lequel j'ai beaucoup appris. Sans sa confiance et ses encouragements, le projet n'aurait jamais pu s'achever. Il s'est d'autant plus investi, en me permettant d'acquérir une expérience unique de recherche en biologie moléculaire. De plus, **L. LEGENDRE** m'a soutenu durant tout ce projet par ses conseils et son optimisme. L'ambiance qu'il fait régner dans son laboratoire a de plus grandement contribué au maintien de ma motivation et au plaisir de travailler avec lui.*

*Dans un deuxième temps, je remercie d'une façon toute particulière, mon directeur de recherche, Mr. **Abdelkrim KAMELI**, professeur chercheur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba. Je ne serais pas arrivé jusque là sans l'aide de M. **KAMELI**. Je le remercie pour la qualité de ses conseils, pour sa disponibilité et pour son investissement constant.*

*Je remercie Mr. **N. SABAOU** de m'avoir honoré en acceptant la présidence de ce jury de thèse.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, Mr. **Chabane CHELGHOUM**, Professeur, USTHB d'Alger-Algérie, Mr. **Benoît ST-PIERRE**, Professeur, Université François Rabelais de Tours-France et Mr. **Mohamed YOUSFI**, Professeur, Université Amar Telidji de Laghouat-Algérie, qui ont acceptés d'évaluer ce travail.*

*Je tiens également à dire un merci bien spécial à Mr. **Frédéric JULLIEN** et à Mr. **Jean-Louis MAGNARD**, Maîtres de conférences chercheurs au BVpam pour leur soutien, d'orientation, de l'enthousiasme et les critiques constructives au cours de cette étude.*

*Le travail n'aurait jamais pu être complété sans l'utilisation du GC/MS du CNRS de Solaize-Lyon avec la participation de M. **Hervé CASABIANCA** et **Dany MAITRE** et le GC/MS de l'IUT de Saint Etienne avec la participation de Mr. **Alain PIOT**.*

*Mes recherches n'auraient pas été possibles sans les facilités octroyées par Mr. **Bernard PASQUIER** (Directeur du Conservatoire National des Plantes à Parfum, Médicinales, Aromatiques et Industrielles de Milly la Forêt), merci à vous Mr. Bernard de nous avoir ouvert l'accès à ton jardin et à tes serres de la collection unique de lavandes.*

*Cette recherche de longue durée n'aurait pu se faire sans l'appui financier de la région Rhône Alpe, France, ni sans la bourse de coopération Algéro-Française. Tous ces donateurs m'ont permis d'acheminer cette recherche à l'abri des inquiétudes monétaires.*

*J'adresse de sincères remerciements à l'ensemble de mes collègues et amis du BVpam que ce soit pour les conseils, les services et plus particulièrement pour l'amitié qu'ils m'ont témoignés. En l'occurrence, Romain, Janna, Nadine, Nicolas, Jean-Claude, Sandrine, Florence N, Yann, Sylvain, Karine, Alison, Florence G et Audrey. Merci à vous tous. Je vous souhaite à tous bonheur, réussite et tout le bien que vous méritez.*

*Enfin, je voudrais remercier ma femme, **HAYAT** et mon fils, **MOHAMED ISHAK** qui ont survécu aux aléas d'un mari et d'un père préoccupé et souvent absent surtout en phase finale. L'achèvement de cette étude n'aurait pas été possible sans leur amour inconditionnel, le soutien et la patience.*

*En terminant, je souhaite démontrer ma plus sincère gratitude à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet, à savoir, Leila, Ahmed, Tayeb, Cherif, Abdeghani, Farida.*

*Merci à tous !*

*7. Benabdelkader*



---

Ce travail de thèse a donné lieu à présentation des résultats sous forme de :

### ***Publications***

---

**Article1 (Annexe I):** Tarek Benabdelkader, Abdelghani Zitouni, Yann Guitton, Frédéric Jullien, Dany Maitre, Hérve Casabianca, Laurent Legendre and Abdelkrim Kameli. 2011. Essential oils from wild populations of algerian *Lavandula stoechas* L.: composition, chemical variability and *in vitro* biological properties. *Chemistry & Biodiversity*, 8(5), 937-953.

### ***Communication en congrès internationales***

---

**Poster1 (Annexe II):** Tarek Benabdelkader, Abdelghani Zitouni, Yann Guitton, Frédéric Jullien, Laurent Legendre, Abdelkrim Kameli. Variability in yield, chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of essential oils of *lavandula stoechas* from Algeria. 12<sup>ème</sup> Symposium international d'aromathérapie et plantes médicinales, Grasse les 26, 27 & 28 mars 2010.

**Poster2 (Annexe II):** Tarek Benabdelkader, Jean-Louis Magnard, Yann Guitton, Karine Fattarsi, Nicolas Boyer, Bernard Pasquier, Frédéric Jullien, Abdelkrim Kameli and Laurent Legendre. *Lavandula* terpenoids biosynthesis : clonning, sequencing and functional characterization of three terpene synthases from a leaf cDNA library of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica*. 13<sup>ème</sup> Symposium international d'aromathérapie et plantes médicinales, Grasse les 01, 02 & 03 avril 2011.

### ***Une publication est également en préparation***

---

**Article2 :** Tarek Benabdelkader, Abdelkrim Kameli and Laurent Legendre. Isoprenoid biosynthesis in Lavender: Molecular cloning and functional characterization of three terpene synthases from leaves of *Lavandula stoechas Sensu Lato*.

# RESUME

## BIODIVERSITE, BIOACTIVITE ET BIOSYNTHESE DES COMPOSES TERPENIQUES VOLATILS DES LAVANDES AILEES, *LAVANDULA STOECHAS SENSU LATO*, UN COMPLEXE D'ESPECES MEDITERRANEENNES D'INTERET PHARMACOLOGIQUE

Les terpénoïdes sont parmi les composés naturels les plus variés structurellement et fonctionnellement. Ils jouent plusieurs rôles critiques dans l'écologie chimique d'une large gamme d'organismes. Les terpènes synthases (TPS) sont les enzymes clés impliquées dans la biosynthèse des terpénoïdes, qui aboutit à la production d'huile essentielle (HE) de nombreuses plantes aromatiques comme les espèces du genre *Lavandula*. Dans le but de développer les productions locales de plantes aromatiques et médicinales, nous avons réalisé une évaluation de la composition et des activités biologiques des HEs extraites des parties aériennes fleuries de *L. stoechas* sauvages récoltées sur 11 sites différents dans le nord de l'Algérie. Les huiles ont été analysées par GC/FID et GC/MS, où un total de 121 composés ont été identifiés, représentant de 69.88 à 91.2% du contenu total de l'huile. Nos 11 huiles différaient considérablement de par leur composition avec seulement 66 substances communes à toutes les huiles. Les principaux constituants étaient le fenchone (11.27-37.48%), le camphre (1.94-21.8%), le 1,8-cinéol (0.16-8.71%) et le viridiflorol (2.89-7.38%). Les activités biologiques *in vitro* ont démontré que les activités de piégeage du radical DPPH et l'oxydation des lipides du couple  $\beta$ -carotène/acide linoléique différaient d'un facteur 8 et étaient liées à différents ensembles de molécules. Nos onze HEs ont présenté de bonnes activités antimicrobiennes envers la plupart des 16 souches pathogènes testées de bactéries, de champignons filamenteux et de levures à des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) allant de 0.16 à 3.5 mg/ml.

Les analyses par GC/MS d'extraits hexane des composés organiques volatils (COV) de feuilles de pieds individuels de lavandes *Stoechas* (*L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis*) ont permis d'identifier 124 composés dont la majorité étaient des monoterpènes oxygénés. Nous avons mis en évidence une variation de la teneur des principaux COVs en accord avec les variations chémotypiques inter-spécifiques connues entre les trois lavandes. Les trois pieds que nous avons sélectionnés correspondaient à un chémotype fenchone (*L. pedunculata*), un chémotype camphre (*L. stoechas*) et un chémotype 1,8-cinéol (*L. viridis*). A l'aide d'amorces dégénérées nous avons isolé trois ADNc en pleine longueur, *LpFENS*, *LpPINS* et *LpGEAS*, de feuilles de *L. pedunculata*. Six ADNc homologues en pleine longueur, *LsFENS*, *LsPINS*, *LsGEAS*, *LvFENS*, *LvPINS* et *LvGEAS*, ont été également isolés des feuilles de *L. stoechas* et *L. viridis* en utilisant des amorces spécifiques aux trois premiers ADNc clonés. Tous les clones d'ADNc ont été identifiés en tant qu'homologues de TPSs par comparaison de séquences présentes dans la base de données GenBank. L'expression hétérologue dans *E. coli* et l'analyse de l'activité catalytique par GC/MS des enzymes natives recombinantes purifiées de ces TPSs ont permis leur caractérisation fonctionnelle en tant que,  $\alpha$ -fenchol synthases (*LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS*),  $\alpha$ -pinène synthases (*LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS*) et germacrène A synthase (*LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS*). Au meilleur de notre connaissance, nous rapportons ici pour la première fois trois séquences de TPSs jamais publiées pour le genre *Lavandula*. Il s'agit aussi de la seconde description d'une activité  $\alpha$ -fenchol synthase chez les plantes et d' $\alpha$ -pinène synthase et germacrène A synthase chez les Lamiacées. Tous les gènes clonés sont exprimés dans les feuilles des trois lavandes *Stoechas* à différents niveaux en corrélation avec la teneur en composés associés dans la source végétale. Cela nous a permis de conclure que les activités de ces TPSs sont principalement régulées au stade transcriptionnel. L'arbre phylogénétique reconstruit place nos TPSs dans deux sous-familles de TPSs. Les  $\alpha$ -fenchol synthases et les  $\alpha$ -pinène synthases sont intégrées dans la sous-famille TPS-b et les germacrène A synthases dans la sous-famille TPS-a. Leurs plus proches homologues étaient d'autres TPSs de *Lavandula* ou de Lamiacées.

**Mots clés :** *Lavandula stoechas* ; *L. pedunculata* subsp. *lusitanica* ; *L. viridis* ; Lamiacées ; Terpènes ; GC/MS ; Activité antioxydante ; Activité antimicrobienne ;  $\alpha$ -Fenchol synthase ;  $\alpha$ -Pinène synthase ; Germacrène A synthase.

## العنوان بالعربية

التنوع البيولوجي، النشاط الحيوي والتصنيع الحيوي للمركبات التربينية الطيارة لنباتات الخزامى المجنحة *Lavandula stoechas* بالمعنى الواسع، مجمع من النباتات المتوسطة ذات الأهمية الفارماكولوجية

تعتبر التربينويدات المركبات الطبيعية الأكثر تنوعا من حيث التراكيب والوظائف، حيث تلعب عدة أدوار مهمة في البيئة الكيميائية لمجموعة كبيرة من الأحياء. هذا وتعتبر التربينات السينتاز الإنزيمات المفاتيح التي تلعب الدور الرئيسي في التصنيع الحيوي للتربينويدات وبالتالي إنتاج الزيوت الأساسية للنباتات العطرية مثل أنواع الجنس *Lavandula*. قمنا في محاولة لتطوير الإنتاج المحلي للنباتات العطرية والطبية بتقييم شامل للمكونات الكيميائية وبعض الأنشطة الحيوية للزيوت الأساسية المستخلصة من الأجزاء العلوية المزهرة للنبات *L. stoechas* البري المحصل عليه من 11 موقعا مختلفا في شمال الجزائر. تم تحليل هذه الزيوت بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية والكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة، حيث تم التعرف على 121 مركب مما يشكل مانسبته من 69.88 إلى 91.2% من اجمالي مكونات الزيوت. أبدت هذه الزيوت اختلافات من حيث التكوين حيث تم التعرف على 66 مركب فقط متواجد في جميع الزيوت بدون استثناء. وكانت المركبات الأساسية كالتالي: الفنشون (11.27-37.48)، الكافور (1.94-21.8%)، 1.8-سينيول (0.16-8.71%) و الفيريديفلورول (2.89-7.38%). أظهرت الأنشطة الحيوية المضادة للأكسدة التي تم تقييمها بطريقتي DPPH و الكاروتين اختلافات كبيرة بين الزيوت تصل إلى 8 وحدات وهي على صلة بمركبات مختلفة. هذا وأظهرت هذه الزيوت أيضا فعالية عالية كمضادات للمكروبات ضد أغلبية الـ 16 سلالة ممرضة من البكتريا، الفطريات الخيطية و الخمائر حيث تراوحت قيمة أقل تركيز مثبطين 0.16 و 3.5 مغ/مل.

سمحت لنا التحاليل بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة المجرات على المركبات العضوية الطيارة والمستخلصة بواسطة الهيكسان من اوراق نباتات فردية من القسم *Stoechas* (*L. pedunculata*, *L. stoechas*, *L. viridis*) بالكشف على 124 مركب بتركيز جدي عالي من المونوترپينات المؤكسجة. وظهرت أيضا هذه التحاليل تباينات في تراكيز المركبات العضوية الطيارة الرئيسية وفقا للاختلافات المعروفة بين الأصناف الكيميائية لهد الأنواع من الخزامى، فكانت الأفراد النباتية التي تم اختيارها متوافقة مع الصنف الكيميائي فنشون (*L. pedunculata*)، الصنف الكيميائي كافور (*L. stoechas*) و الصنف الكيميائي 1.8-سينيول (*L. viridis*). تم باستخدام البادات المتحللة عزل ثلاثة جينات كاملة، *LpFENS*, *LpPINS*, *LpGEAS* من أوراق نبات *L. pedunculata*. وتم أيضا، باستخدام بادئات محددة خاصة انطلاقا من الجينات الأولى، عزل ستة جينات نظيرة كاملة، *LsFENS*, *LsPINS*, *LsGEAS*, *LvFENS*, *LvPINS*, *LvGEAS*، من أوراق النباتات *L. stoechas* و *L. viridis*. تم التعرف مبدئيا على جميع الجينات المعزولة على أنها تربينات سينتاز بناء على مقارنتها مع قاعدة البيانات الجينية GenBank. تم التوصيف الوظيفي لهذه الجينات باستخدام التعبير المتغير في البكتريا *E. coli* وتحليل النشاط الإنزيمي لبروتيناتها بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية/مطيافية الكتلة ضمن ثلاثة مجموعات: ألفا-فنشول سنتاز (*LpFENS*, *LsFENS*, *LvFENS*)، ألفا-بينان سنتاز (*LpPINS*, *LsPINS*, *LvPINS*) و جيرماكرين أ سنتاز (*LpGEAS*, *LsGEAS*, *LvGEAS*). إلى حد علمنا يعتبر هذا العمل الأول الذي يتم فيه استنساخ ثلاثة جينات تربينات سينتاز من هذه الأنواع للجنس *Lavandula*. ويعتبر أيضا المرة الثانية التي يتم فيها استنساخ ألفا-فنشول سينتاز من النباتات ككل وألفا-بينان سينتاز و جيرماكرين أ سينتاز من العائلة الشفوية. تم أيضا الكشف عن تعابير كل هذه الجينات بمستويات مختلفة في أوراق الثلاثة نباتات الخزامى وفقا لمحتويات هذه الأوراق من المركبات المرتبطة بإنزيمات هذه الجينات. سمح لنا هذا بإنتاج أن نشاط هذه الجينات يتم تنظيمه أساسا في مستوى الاستنساخ. تم أيضا تصنيف هذه الجينات المعزولة باستعمال التصنيف الشجري الجيني في مجموعتين منفصلتين، حيث كانت اللألفا-فنشول سينتاز والألفا-بينان سينتاز ضمن القسم ب و الجيرماكرين أ سينتاز ضمن القسم أ. هذا وكانت كل الجينات المعزولة ضمن هذا التصنيف على علاقة جدي وثيقة مع تربينات سنتاز أخرى للجنس *Lavandula* أو للعائلة الشفوية.

**الكلمات المفتاحية:** *Lavandula stoechas*، *L. pedunculata* subsp. *lusitanica*، *L. viridis*، العائلة الشفوية، التربينات، الكروماتوغرافيا الغازية/مطيافية الكتلة، النشاط ضد الأكسدة، النشاط ضد الجراثيم، ألفا-فنشول سنتاز، ألفا-بينان سنتاز، جيرماكرين أ سنتاز.

---

# ABSTRACT

---

English title

## BIODIVERSITY, BIOACTIVITY AND BIOSYNTHESIS OF VOLATILE TERPENE COMPOUNDS OF WINGED LAVENDERS, *LAVANDULA STOECHAS SENSU LATO*, MEDITERRANEAN SPECIES COMPLEX OF PHARMACOLOGICAL INTEREST

---

---

Terpenoids are the most structurally and functionally diverse natural compounds that play a critical role in the chemical ecology of a wide range of organisms. The terpene synthases (TPS) are key enzymes involved in the biosynthesis of terpenoids which make the bulk of the essential oil (EO) of many aromatic plants like *Lavandula* species. In an effort to develop local productions of aromatic and medicinal plants, we have assessed the composition and the biological activities of EOs extracted from the aerial flowering parts of wild-grown *L. stoechas* collected from 11 different locations in northern Algeria. The oils were analyzed by GC/FID and GC/MS. A total of 121 compounds were identified that accounted for 69.88-91.2 % of the total oil contents. Our 11 oils differed greatly in their composition and only 66 substances were common to all oils. Major components were fenchone (11.27-37.48 %), camphor (1.94-21.8 %), 1,8-cineol (0.16-8.71 %) and viridiflorol (2.89-7.38 %). *In vitro* biological activities demonstrated that the DPPH-based radical scavenging and the  $\beta$ -carotene/linoleic acid-based lipid anti-oxidation activities differed by an 8 fold factor and were linked to different sets of molecules in different EOs. Our 11 EOs exhibited good antimicrobial activities against most of the 16 tested strains of pathogenic bacteria, filamentous fungi and yeast at minimum inhibition concentration (MIC) values of 0.16 to 3.5 mg/ml.

GC/MS analyses of hexane extracts of volatile organic compounds (VOC) from leaves of individual plants of *Stoechas* lavenders (*L. pedunculata*, *L. stoechas* and *L. viridis*) have identified 124 compounds, most of them being oxygenated monoterpenes. We observed a variation in the content of the main VOCs in agreement with the known inter-specific chemotypic variations between these lavenders. The three plants we selected had a fenchone chemotype (*L. pedunculata*), a camphor chemotype (*L. stoechas*) and a 1,8-cineol chemotype (*L. viridis*). The use of degenerate primers allowed us to isolate three full-length cDNAs, *LpFENS*, *LpPINS* and *LpGEAS*, from the leaves of *L. pedunculata*. Six full-length homologous cDNAs, *LsFENS*, *LsFENS*, *LsPINS*, *LsGEAS*, *LvFENS*, *LvPINS* and *LvGEAS* were also isolated from the leaves of *L. stoechas* and *L. viridis* with specific primers designed on the cDNAs previously cloned. All cDNA clones were identified as TPSs homologues by sequence comparison with sequences present in the GenBank database. Heterologous expression in *E. coli* and GC/MS analysis of the catalytic activity of native recombinant enzymes of these TPSs have led to their functional characterization as  $\alpha$ -fenchol synthases (*LpFENS*, *LsFENS* and *LvFENS*),  $\alpha$ -pinene synthases (*LpPINS*, *LsPINS* and *LvPINS*) and germacrene A synthases (*LpGEAS*, *LsGEAS* and *LvGEAS*). To the best of our knowledge, we report here for the first time three TPSs sequences never reported before for the genus *Lavandula*. It is also the second description of an  $\alpha$ -fenchol synthase activity in plants and of  $\alpha$ -pinene synthase and germacrene A synthase in Lamiaceae. All cloned genes are expressed in leaves of the three *Stoechas* lavenders at different levels in correlation with the content of associated products in the plant source. This allowed us to conclude that the activities of these TPSs are principally regulated at the transcriptional level. A phylogenetic reconstruction placed our cloned TPSs in two separate TPSs sub-families. The  $\alpha$ -fenchol synthases and the  $\alpha$ -pinene synthases clustered in the TPS-b subfamily and the germacrene A synthases in the TPS-a subfamily. Their closest homologues were other TPS genes from *Lavandula* or *Lamiaceae*.

---

**Key words** : *Lavandula stoechas* ; *L. pedunculata* subsp. *Lusitanica* ; *L. viridis* ; Lamiaceae ; Terpenes; GC/MS; Antioxidant activity; Antimicrobial activity;  $\alpha$ -Fenchol synthase ;  $\alpha$ -Pinene synthase ; Germacrene A synthase.

# LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Sérum albumine de bœuf
BVpam	Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux Plantes Aromatiques et Médicinales
C	Cytidine
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDPS	Copalyl diphosphate synthase
CDPS	Copalyl diphosphate synthase
CFU	Colony-forming unit
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COV	Composés organiques volatils
CPP	Copalyl diphosphate
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
CTP	Peptide de transit chloroplastidial
Da	Dalton
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	DiThioThréitol
DXR	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétate
EST	Expressed sequence tag
FENS	Fenchol synthase
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FPP	Farnésyl diphosphate
G	Guanosine
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GEAS	Germacrène A synthase
GGPP	Géranylgeranyl diphosphate
GPP	Géranyl diphosphate
GST	glutathione-S-transferase
HE	Huile essentielle
IPP	Isopentenyl diphosphate
IPTG	Isopropyl thio $\beta$ -D-galactoside
KS	ent-Kaurene synthase

LB	Milieu de Luria Bertani
LpFENS	<i>Lavandula pedunculata</i> $\alpha$ -fenchol synthase (GenBank: JX501511)
LpPINS	<i>Lavandula pedunculata</i> $\alpha$ -pinène synthase (GenBank: JX501512)
LpGEAS	<i>Lavandula pedunculata</i> germacrène A synthase (GenBank: JX501513)
LsFENS	<i>Lavandula stoechas</i> $\alpha$ -fenchol synthase (GenBank: JX501514)
LsPINS	<i>Lavandula stoechas</i> $\alpha$ -pinène synthase (GenBank: JX501514)
LsGEAS	<i>Lavandula stoechas</i> germacrène A synthase (GenBank: JX501514)
LvFENS	<i>Lavandula viridis</i> $\alpha$ -fenchol synthase (GenBank: JX501517)
LvPINS	<i>Lavandula viridis</i> $\alpha$ -pinène synthase (GenBank: JX501518)
LvGEAS	<i>Lavandula viridis</i> germacrène A synthase (GenBank: JX501519)
LPP	Linalyl diphosphate
MBP	maltose binding protein
MEP	Voie du 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate
MS	Spectrométrie de masse
MVA	Voie du mévalonate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor-Joining
NusA	N-utilization substance protein A
PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis
PAM	Plantes aromatiques et médicinales
pb	paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	Point isoélectrique
PINS	Pinène synthase
PM	Poids moléculaire
PS	Poids sec
PT	Prényl transférases
RACE	Amplifications rapides des extrémités des ADNc
RI	Indice de rétention
ROS	Les dérivés actifs de l'oxygène
rpm	rotation par minute
RT	Temps de rétention
RT	Transcription inverse
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SD	Erreur standard
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T	Thymidine
TAE	Tris Acétate EDTA
TB	Milieu Turbo Broth
TEMED	Tétraméthyléthylène Diamine
TPS	Terpènes synthases
Tris	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
TRX	Thioredoxine
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
UTR	région non traduite (untranslated region)
X-Gal	X-Galactoside

**Nomenclature et abréviation des aminoacides**

<b>Aminoacide</b>	<b>Code à 3 lettres</b>	<b>Code à 1 lettre</b>
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamique	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
<b>CHAPITRE I. REVUE DE LITTERATURE</b>	<b>3</b>
<b>I.1. LES TERPENOIDES</b>	<b>4</b>
I.1.1. Terme et signification	4
I.1.2. Structure générale et classification	5
I.1.3. Fonction	6
I.1.3.1. Fonctions métaboliques primaires	7
I.1.3.2. Fonctions métaboliques secondaires	7
I.1.4. Importance	10
I.1.5. Biosynthèse	11
I.1.5.1. La formation des blocs de construction, IPP et DMAPP	12
I.1.5.2. La formation des prényl diphosphates, GPP, FPP et GGPP	15
I.1.5.3. Compartimentation sub-cellulaire	16
I.1.5.4. Produits finaux	17
I.1.6. Site de biosynthèse, accumulation et sécrétion	20
I.1.7. Huiles essentielles	23
I.1.7.1. Définition et répartition dans le règne végétal	23
I.1.7.2. Historique et importance	24
I.1.7.3. Méthode d'extraction	24
I.1.7.4. Méthodes d'analyses	26
I.1.7.5. Variation ecophysiological de la composition d'une HE	27
<b>I.2. LES TERPENE SYNTHASES</b>	<b>28</b>
I.2.1. Définition	28
I.2.2. Structures	30
I.2.2.1. Structures primaires	30
I.2.2.2. Structures tridimensionnelles	32
I.2.3. Classification	34
I.2.3.1. Sous-familles (sous-groupes)	34
I.2.3.2. Classes	36
I.2.4. Mécanismes réactionnels	37
I.2.5. Expression et régulation	42
I.2.5.1. Régulation spatiale	43
I.2.5.2. Régulation temporelle	43
I.2.6. Evolution	45
I.2.7. Expression hétérologue	46
<b>I.3. LE GENRE LAVANDULA L.</b>	<b>46</b>
I.3.1. Taxonomie	47
I.3.2. Diversité morphologique	50
I.3.2.1. Section <i>Stoechas</i> Ging. ( <i>L. stoechas Sensu Lato</i> )	57
I.3.2.1.1. L'espèce <i>L. stoechas</i> L.	58
I.3.2.1.2. L'espèce <i>L. pedunculata</i> (Mill) Cav.	62
I.3.2.1.3. L'espèce <i>L. viridis</i> L'Hér.	64
I.3.3. Répartition géographique	66
I.3.4. Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique	67
I.3.5. Phytochimie	70



I.3.5.1. Huiles essentielles	70
I.3.5.1.1. Variation inter-spécifique	70
I.3.5.1.2. Variation intra-spécifique	70
I.3.5.2. Flavonoïdes	74
I.3.6. Les gènes de TPSs de Lavandes	74
I.4. LES OBJECTIFS DE LA THESE	75

## **CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES** 78

II.1. Matériel végétal	79
II.2. Souches de microorganismes	81
II.3. Produits chimiques et vecteurs génétiques	82
II.4. Conditions de culture	84
II.5. Extraction et caractérisation des huiles essentielles	86
II.5.1. Hydrodistillation	86
II.5.2. Calcul de rendement en huile essentielle	86
II.5.3. Extraction des volatils par macération dans l'hexane	87
II.5.4. Analyse en GC/FID	87
II.5.5. Analyse en GC/MS	87
II.5.6. Identification des composés volatils	88
II.5.7. Quantification des composés volatils	89
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles des populations de <i>L. stoechas</i>	89
II.6.1. Criblage rapide de l'activité antioxydante par chromatographie sur couche mince (CCM)	89
II.6.2. Evaluation de l'activité de piégeage du radical libre par la méthode de DPPH	89
II.6.3. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode $\beta$ -carotène/acide linoléique	90
II.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des populations de <i>L. stoechas</i>	91
II.8. Obtention des extraits d'ADN, ARN et ADNc	91
II.8.1. Extraction de l'ADN génomique des feuilles de lavandes	91
II.8.2. Extraction d'ADN plasmidique bactérien	92
II.8.3. Extraction des ARN totaux	93
II.8.4. Synthèse d'ADN complémentaire	93
II.8.5. Dosage et contrôles de la qualité des acides nucléiques	94
II.9. Amplifications par PCR	95
II.9.1. Définition des amorces	95
II.9.2. Conditions réactionnelles	97
II.9.3. Stratégie RACE et marche génomique	97
II.9.4. Détermination de l'expression des gènes de TPSs	98
II.6.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	99
II.6.5. Purification des fragments d'ADN	99
II.10. Techniques de clonage	100
II.10.1. Clonage de routine pour séquençage	100
II.10.2. Clonages par technologie Gateway	100
II.10.3. Transformation bactérienne	102
II.10.4. Séquençage d'ADN	103
II.11. Expression hétérologue de TPSs de lavandes <i>Stoechas</i> et mesure d'activité	103

II.11.1. Expression hétérologue de TPSs	103
II.11.2. Extraction de protéines de TPSs recombinantes	104
II.11.3. Purification partielle de protéines de TPSs recombinantes par chromatographie d'affinité sur résine de nickel	104
II.11.4. Dosage colorimétrique des protéines	105
II.11.5. Electrophorèse sur gel dénaturant (SDS-PAGE)	105
II.11.6. Mesure <i>in vitro</i> de l'activité de terpène synthases de lavandes <i>Stoechas</i>	107
II.12. Analyses bioinformatiques et statistiques de données	107
II.12.1. Alignement de séquences	107
II.12.2. Analyses BLAST	107
II.12.3. Prédiction de peptide de transit chloroplastique (CTP)	108
II.12.4. Autres prédictions	108
II.12.5. Analyses phylogénétiques	108
II.12.6. Analyses statistiques	109
<b>CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>110</b>
<b>III.1. Variation et biodiversité des HEs accumulées par des populations algériennes de <i>L. stoechas</i></b>	<b>112</b>
III.1.1. Introduction	112
III.1.2. Résultats	114
III.1.2.1. Rendements en huile essentielle de 11 populations algériennes de <i>L. stoechas</i>	114
III.1.2.2. Composition chimique des huiles essentielles de 11 populations algériennes de <i>L. stoechas</i>	115
III.1.2.3. Variabilité et biodiversité des huiles essentielles des 11 populations algériennes de <i>L. stoechas</i>	122
III.1.3. Discussion	123
<b>III.2. Activités biologiques <i>in vitro</i> des HEs accumulées par des populations de <i>L. stoechas</i></b>	<b>128</b>
III.2.1. Introduction	128
III.2.2. Résultats	129
III.2.2.1. Activité antioxydante des huiles essentielles de 11 populations de <i>L. stoechas</i>	129
III.2.2.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH	129
III.2.2.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du $\beta$ -carotène/acide linoléique	130
III.2.2.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de populations de <i>L. stoechas</i>	132
III.2.3. Discussion	135
<b>III.3. Biodiversité des COVs et variation chémotypique chez <i>L. stoechas</i> <i>Sensu Lato</i></b>	<b>141</b>
III.3.1. Introduction	141
III.3.2. Résultats	142
III.3.3. Discussion	150
<b>III.4. Biosynthèse des terpènes chez <i>L. stoechas</i> <i>Sensu Lato</i></b>	<b>154</b>
III.4.1. Introduction	154
III.4.2. Résultats	158

---

III.4.2.1. Isolement de gènes de TPSs impliqués dans la biosynthèse des terpènes chez <i>L. stoechas Senu Lato</i>	158
III.4.2.1.1. Amplification de fragments de TPSs avec des amorces dégénérées sur l'ADNg de <i>L. pedunculata</i>	158
III.4.2.1.2. Amplification de fragments de TPSs sur ADNc de <i>L. pedunculata</i>	162
III.4.2.1.3. Obtention de séquences complètes de TPS de <i>L. pedunculata</i> par RACE-PCR	163
III.4.2.1.4. Obtention de gènes homologues de <i>LpFENS</i> , <i>LpPINS</i> et <i>LpGEAS</i> chez <i>L. stoechas</i> et <i>L. viridis</i>	164
III.4.2.2. Analyse des séquences de TPS putatives de <i>L. stoechas Senu Lato</i>	167
III.4.2.3. Expression hétérologue et purification des TPSs recombinantes	171
III.4.2.4. Caractérisation fonctionnelle de nouvelles TPSs de lavandes	174
III.4.2.4.1. Identification des clones d'ADNc <i>LpFENS</i> , <i>LsFENS</i> et <i>LvFENS</i> en tant que $\alpha$ -fenchol synthases	175
III.4.2.4.2. Identification des clones d'ADNc <i>LpPINS</i> , <i>LsPINS</i> et <i>LvPINS</i> en tant que $\alpha$ -pinène synthases	176
III.4.2.4.3. Identification des clones d'ADNc <i>LpGEAS</i> , <i>LsGEAS</i> et <i>LvGEAS</i> en tant que germacrène A synthases	178
III.4.2.5. Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes de TPSs de <i>L. stoechas Senu Lato</i>	179
III.4.2.6. Analyse phylogénétique	181
III.4.3. Discussion	184
<b>CHAPITRE IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>198</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>205</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>239</b>

---

# LISTES DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Rôles des terpénoïdes chez les plantes (d'après Owen & Penuelas, 2005)	7
2	Etapas enzymatiques des voies MEP et MVA dans la synthèse d'IPP et de DMAPP (modifiée d'après Goto <i>et al.</i> , 2010)	14
3	Schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes (modifiée d'après Bohlmann & Keeling, 2008)	15
4	Vue générale sur la compartimentation sub-cellulaire des voies biosynthétiques des terpénoïdes chez les plantes (modifiée d'après Chapell, 2002 ; Bouvier <i>et al.</i> , 2005 ; Bouwmeester, 2006 ; Cheng <i>et al.</i> , 2007)	17
5	Formation de terpénoïdes catalysée par divers types de TPSs (d'après Chen <i>et al.</i> , 2011)	18
6	Schéma d'une coupe radiale anatomique d'un trichome glandulaire pelté de menthe poivrée ( <i>Mentha x piperita</i> ) (d'après Turner <i>et al.</i> , 1999)	21
7	Diagramme en ruban de la linalool synthase cristallisée illustrant le domaine N-terminal (orange) et le domaine C-terminal du site actif (vert) (d'après Hyatt <i>et al.</i> , 2007)	33
8	Phylogénie générale des TPSs (d'après Chen <i>et al.</i> , 2011)	35
9	Mécanismes réactionnels des monoTPSs cycliques (A) et des monoTPSs acycliques (B) initiés par l'ionisation du substrat GPP (d'après Degenhardt <i>et al.</i> , 2009)	39
10	Mécanismes réactionnels des sesquiTPSs initiés par l'ionisation du substrat FPP (d'après Degenhardt <i>et al.</i> , 2009)	41
11	Biosynthèse des diterpènes implique l'ionisation et la cyclisation de GGPP directement, et la cyclisation préliminaire au CPP par protonation de la double liaison terminale (d'après Bohlmann <i>et al.</i> , 1998)	42
12	Taxonomie du genre <i>Lavandula</i> (d'après Upson & Andrews, 2004)	49
13	Arbre de classification des espèces du genre <i>Lavandula</i> basé sur les séquences nucléaire ITS (d'après Upson & Andrews, 2004)	50
14	Diversité de trichomes de <i>L. pedunculata</i> (d'après Zuzarte <i>et al.</i> , 2010)	52
15	Diversité de formes et de contours des feuilles de certaines espèces du genre <i>Lavandula</i> (Collection BVpam)	52
16	Photographies des inflorescences (thyrses) représentatives de 8 sections du genre <i>Lavandula</i> (Collection BVpam sauf pour la section <i>Sabaudia</i> dont la photo est de Tim Upson (Upson, 2009))	53
17	Variation de la morphologie des corolles (fleurs) de certaines espèces du genre <i>Lavandula</i> (d'après Upson, 2002)	54
18	Variation des calices (lobes) de certaines espèces du genre <i>Lavandula</i> (d'après Upson, 2002)	55
19	Exemples illustrant la diversité des formes des bractées de certaines espèces du genre <i>Lavandula</i> (après Upson, 2002)	56
20	Exemples illustrant la diversité des formes des akènes (nucules) de certaines espèces du genre <i>Lavandula</i> (après Upson & Adrews, 2004)	57
21	Distribution géographique de <i>L. stoechas</i> (d'après Upson & Andrews, 2004)	59
22	<i>Lavandula stoechas</i> , tige fleurie x 1 et cyme agrandie x 4 (d'après Upson & Andrews, 2004)	60
23	Distribution géographique de <i>L. pedunculata</i> (d'après Upson & Andrews, 2004)	62

24	<i>Lavandula pedunculata</i> , tige fleurie x 1 et cyme agrandie x 4 (d'après Upson & Andrews, 2004)	63
25	Distribution géographique de <i>L. viridis</i> dans la Péninsule Ibérienne (d'après Upson & Andrews, 2004)	65
26	<i>Lavandula viridis</i> , tige fleurie x 1 et cyme agrandie x 4 (d'après Upson & Andrews, 2004)	65
27	Schématisation de l'aire de répartition des sections du genre <i>Lavandula</i> (d'après Guitton, 2011)	66
28	Origine géographique des 11 populations algériennes de <i>L. stoechas</i> utilisées dans cette étude	80
29	Vecteur pGEM-T easy (Promega) avec un site de clonage multiple ouvert comportant les deux thymidines (T) libres	83
30	Vecteur donneur pENTR/D-TOPO (Invitrogen) avec deux sites de clonage directionnel	83
31	Séries de vecteurs de destination (d'expression) avec une cassette <i>attR1/attR2</i> de recombinaison Gateway	84
32	Représentation schématique du système Gateway	101
33	Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HEs de populations algériennes de <i>L. stoechas</i>	114
34	Structures chimique des composés majoritaires et de certains composés détectés pour la première fois dans des HEs de <i>L. stoechas</i> d'Algérie	121
35	Dendrogramme de l'analyse hiérarchique de onze populations algériennes de <i>L. stoechas</i>	123
36	Activité antioxydante des HEs des populations de <i>L. stoechas</i> (LS1 - LS11) et des standards contrôle (BHT et $\alpha$ -tocophérol)	131
37	CMI cumulées de chaque HE des 11 populations de <i>L. stoechas</i> envers les seize souches cibles	133
38	CMI cumulées des 11 HEs de <i>L. stoechas</i> sur chaque souche de microorganisme cible	134
39	Screening semi-quantitatif sur plaque de CCM de l'activité antioxydante au test DPPH des 11 HEs de <i>L. stoechas</i> en parallèle avec le fenchone, le camphre, le 1,8-cinéol, l'eugénol, le carvacrol, le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol	136
40	Teneurs et variation des classes chimiques des COVs de feuilles des lavandes <i>Stoechas</i>	147
41	Teneurs et variation des constituants majoritaires des COVs de feuilles des lavandes <i>Stoechas</i>	148
42	Composés en formules développées identifiés dans les COVs de feuilles des lavandes <i>Stoechas</i>	149
43	Biosynthèse d' $\alpha$ -fenchol, $\alpha$ -pinène, 1,8-cinéol, bornéol et du camphre à partir du géranyl diphosphate via le $\alpha$ -terpinyl cation	155
44	Arbre de regroupement de 62 TPSs de Lamiacées	160
45	Définition d'une amorce dégénérée sur une zone conservée	161
46	Représentation schématique de la position et les motifs cibles des amorces dégénérées (TPS1dF, TPS2dF, TPS3dF, TPS4dF, TPS5dF, TPS6dR, TPS7dR et TPS8dR) utilisées pour l'amplification des gènes partiels de TPS de <i>L. pedunculata</i>	161
47	Alignement des séquences d'ADNc des TPSs putatives de <i>L. pedunculata</i> , <i>L. stoechas</i> et <i>L. viridis</i>	165
48	Alignement des séquences d'acides aminés prédites des clones d'ADNc des TPSs putatives des groupes FENS, PINS et GEAS de <i>L. pedunculata</i> , <i>L. stoechas</i> et <i>L. viridis</i>	169

---

<b>49</b>	Analyse par SDS-PAGE des TPSs recombinantes putatives de lavandes exprimées dans <i>E. coli</i> , souche Rosetta et purifiées par chromatographie d'affinité au Ni <sup>2+</sup>	173
<b>50</b>	Analyses par GC/MS des produits terpéniques formés <i>in vitro</i> par les enzymes recombinantes de TPSs des lavandes <i>Stoechas</i> avec le GPP ou le FPP en tant que substrats	177
<b>51</b>	Analyse des niveaux relatifs des transcrits des gènes de TPSs par RT-PCR dans les feuilles des trois lavandes	180
<b>52</b>	Relations phylogénétiques des TPSs des lavandes <i>Stoechas</i> avec d'autres TPSs connues	182
<b>53</b>	Proposition de fonctionnement des TPSs de lavandes <i>Stoechas</i> découvertes dans cette étude	194
<b>54</b>	Résidus d'acides aminés impliqués dans la formation de l'intermédiaire germacrène A et sa cyclisation additionnelle par la TEAS	196

---

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Classification des terpénoïdes	6
2	Distribution fonctionnelle et taxonomique des sous-familles de TPSs des plantes (d'après Chen <i>et al.</i> , 2011)	35
3	Variations inter-spécifiques et intra-spécifiques des principaux constituants des HEs des espèces du genre <i>Lavandula</i> dans la littérature	72
4	Tableau 4 : Distribution de différentes classes de flavonoïdes dans le genre <i>Lavandula</i> (d'après Upson & Andrews 2004)	74
5	Sites de collecte (avec les abréviations) et principales caractéristiques écologiques des biotopes de 11 populations algériennes de <i>L. stoechas</i> qui ont servi de source d'HE dans la présente étude	79
6	Génotypes et origines de souches d' <i>E. coli</i> de clonage et d'expression utilisées	82
7	Conditions opératoires GC/FID utilisées pour l'analyse des COVs des populations de <i>L. stoechas</i>	87
8	Conditions opératoires des analyses GC/MS	88
9	Liste des amorces utilisées pour les amplifications d'ADN	96
10	Éléments des réactions d'amplification par PCR	97
11	Conditions des réactions d'amplification par PCR classique	97
12	Conditions des réactions d'amplification par RACE-PCR "Touchdown"	98
13	Recette du tampon de Laemmli, gels de SDS-PAGE et tampon de migration	106
14	Compositions chimiques des huiles essentielles des parties aériennes fleuries de onze populations algériennes sauvages de <i>L. stoechas</i>	116
15	Activité antimicrobienne (CMI) des huiles essentielles des populations algériennes de <i>L. stoechas</i>	133
16	Composition chimique des COVs de feuilles des lavandes <i>Stoechas</i> ( <i>L. pedunculata</i> , <i>L. stoechas</i> et <i>L. viridis</i> )	143
17	Récapitulatif de terpène synthases de lavandes	158
18	Caractéristiques des séquences des gènes clonés de TPSs putatives de <i>L. pedunculata</i> , <i>L. stoechas</i> et <i>L. viridis</i>	168
19	Scores d'identité de gènes clonés de TPSs putatives de <i>L. pedunculata</i> , <i>L. stoechas</i> et <i>L. viridis</i>	170
20	Identification et caractéristiques des produits volatils synthétisés <i>in vitro</i> par les TPSs putatives recombinantes de <i>L. stoechas Sensu Lato</i>	175
21	Produits formés <i>in vitro</i> par les TPSs de <i>L. stoechas Sensu Lato</i>	176

---

# LISTE DES ANNEXES

---

- Annexe I :** Article huiles essentielles de populations algériennes de *L. stoechas* publié en *Chemistry & Biodiversity*
- 
- Annexe II :** Poster huiles essentielles de populations algériennes de *L. stoechas* présenté lors du 12<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et plantes médicinales, Grasse mars 2010
- 
- Annexe III :** Poster terpène synthèses de *L. pedunculata* présenté lors du 13<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et plantes médicinales, Grasse avril 2011



---

# INTRODUCTION GENERALE

---

Les plantes sont une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans plusieurs industries telles que l'industrie cosmétique, l'industrie agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique. La diversité de ces molécules naturelles qui ne sont pas essentielles à la viabilité des plantes reste une énigme pour les biologistes qui essayent de décrypter leur rôle dans la nature. De même, l'élucidation des voies de biosynthèse conduisant à des produits naturels originaux est un champ d'investigation inépuisable pour les scientifiques. L'homme préhistorique, qui avait très peu de moyens, devait se nourrir des produits de cueillette et de chasse. En assimilant la flore locale, il a découvert les plantes utiles et indispensables pour survivre. Ce régime, essentiellement végétarien, a constitué le berceau de l'utilisation des produits naturels. A cette époque, bien que les huiles essentielles ne soient pas signalées nommément, les plantes aromatiques étaient largement employées.

Actuellement, une augmentation de l'utilisation de composés d'origine naturelle est observée, justifiant l'accroissement de la production de certaines plantes aromatiques et médicinales (PAM). Parmi ces PAM de nombreuses Lamiacées méditerranéennes sont utilisées pour leurs propriétés de leurs huiles essentielles (HE). Ces HE sont le résultat de la synthèse et de l'accumulation des composés organiques volatils (COVs) qui, *in planta*, agissent dans les interactions de la plante avec son environnement biotique (attraction de pollinisateurs, défense contre des pathogènes) et abiotique (protection contre les UV). Les HE des Lamiacées sont composées principalement de terpènes de bas poids moléculaire, de phénylpropanoïdes et de dérivés d'acides gras.

La valorisation des terpènes a conduit à des recherches interdisciplinaires impliquant la chimie, la biologie et la médecine. Un des meilleurs exemples a été l'étude de la voie de biosynthèse du taxol, conduisant à la production de différents anticancéreux à usage humain. Par ailleurs, d'autres études envisagent dans un futur proche la production de terpènes comme biocarburants. Les approches génomiques, le séquençage complet d'organismes modèles mais aussi le développement de méthodes de séquençage à haut débit ont permis une progression significative dans la caractérisation des gènes et enzymes impliqués dans la biosynthèse des terpènes. L'accumulation de connaissance dans la biosynthèse des terpènes, leur localisation cellulaire et leur régulation devraient à terme faciliter la manipulation de leurs voies biosynthétiques afin d'améliorer certains caractères

agronomiques tels que les arômes de fruits, le parfum floral, la défense et la résistance des plantes envers les insectes et les microorganismes.

Au cours des dernières années, l'exploitation économique des espèces du genre *Lavandula* a augmentée en raison de l'utilisation de leurs HEs. Ces huiles peuvent être obtenues de plantes sauvages ou cultivées. Plusieurs travaux ont étudiés la composition chimique et l'activité biologique des huiles de lavande, mais très peu de travaux ont porté sur les terpène synthases (TPS) du genre *Lavandula* et aucun travaux sur les TPSs des lavandes *Stoechas*.

Depuis plusieurs années, les lavandes, et plus exactement les espèces de la section *Stoechas*, constituent l'axe de mes recherches. Les objectifs de ce travail de thèse sont :

- \* Une contribution à une meilleure connaissance de la nature chimique des terpènes et des variations chémotypique au sein des espèces de la section *Stoechas* (*L. stoechas*, *L. pedunculata* et *L. viridis*),
- \* Une évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des HEs des populations algériennes de *L. stoechas*.
- \* Une caractérisation des chémotypes de pieds individuels du complexe d'espèces de *L. stoechas Sensu Lato* (*L. stoechas*, *L. pedunculata* et *L. viridis*).
- \* Une caractérisation fonctionnelle de trois terpènes synthase chez *L. stoechas*, *L. pedunculata* et *L. viridis*.

Ces quatre axes de recherches s'inscrivent dans une participation scientifique à l'amélioration et la valorisation des huiles essentielles de *Lavandula stoechas*. Ils ont donné lieu à 2 présentations écrites sous forme de posters dans des congrès internationaux et à la soumission de 2 manuscrits dans des journaux internationaux à comité de lecture.

Le présent manuscrit est organisé en 04 chapitres. Un premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique descriptive de la diversité structurale et fonctionnelle et des voies de biosynthèse des terpènes, ainsi qu'un aperçu général sur les TPSs, enzymes clés de la synthèse des terpènes. Enfin, il est terminé par la présentation du genre *Lavandula*, en insistant sur la diversité morphologique des différentes espèces, leur répartition géographique, et surtout leur intérêt économique. Le chapitre II s'intéresse aux méthodologies utilisées lors de la réalisation de cette thèse. Le troisième chapitre, subdivisé en 4 sections, présente les résultats obtenus sur nos 4 objectifs de recherche. Finalement, le dernier chapitre reprendra les conclusions et discutera des perspectives de ce travail.

**CHAPITRE I**  
**REVUE**  
**DE LITTÉRATURE**

## I.1. LES TERPENOÏDES

### I.1.1. Terme et signification

Les terpénoïdes représentent la plus ancienne famille de produits naturels. Les dérivés hopanoïdes étaient présents sur terre il y a 2.5 milliards d'années (Brocks *et al.*, 1999 ; Summons *et al.*, 1999). Les termes terpénoïdes, terpènes et isoprénoïdes sont souvent utilisés de façon interchangeable et proviennent de térébenthine (*lat. balsamum terebinthinae*), une huile essentielle (HE) dont les composés majeurs sont des terpénoïdes et qui est obtenue par distillation de la résine de conifères (Phillips & Croteau, 1999). Cependant, le mot terpène désigne au sens strict des hydrocarbures insaturés dérivant de l'isoprène (suffixe "ène") tandis que, terpénoïde est un terme plus générique utilisé pour indiquer qu'une substance possède le squelette carboné des terpènes, mais pas nécessairement leur degré d'insaturation, tout en ayant éventuellement un, ou plusieurs, groupes fonctionnels contenant de l'oxygène (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone etc.). Dans toute la thèse nous référerons à ces composés par les deux termes "terpènes" ou "terpénoïdes" sans différence. Nous nous concentrerons également plus sur le règne végétal.

Les terpénoïdes constituent la famille de produits naturels la plus diverse structurellement, stéréochimiquement et fonctionnellement avec plus de 55 000 molécules identifiées à ce jour dans toutes les formes de vie (Christianson, 2008). Des centaines de nouvelles structures sont reportées chaque année (Sacchetti & Poulter, 1997 ; Withers & Keasling, 2007; Penuelas & Munne-Bosch, 2005). Leurs structures varient d'une simple chaîne linéaire d'hydrocarbures jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés (Connolly & Hill, 1991). Alors que certains terpénoïdes exercent des fonctions métaboliques primaires essentielles pour la croissance et la reproduction chez de nombreux organismes, la majorité fonctionne comme des métabolites secondaires et contribue à l'adaptation des espèces à leur niche écologique (Harborne, 1991).

Tous les terpénoïdes proviennent des précurseurs simples à 5 atomes de carbone, l'isopentényl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) assemblés et modifiés de milliers de façons (Dewick, 1999). La remarquable diversité de la chimiothèque "terpénome" contredit ainsi ses racines simples avec des précurseurs universels à 5 carbones, l'IPP et le DMAPP (Christianson, 2007).

La majorité des terpénoïdes connus ont été isolés à partir de plantes où ils jouent le rôle de métabolites primaires et secondaires. Chez les végétaux, les terpénoïdes sont produits par tous les tissus végétatifs dont les racines mais aussi par les diverses pièces

florales (Dudareva *et al.*, 2004). En raison de leurs nombreuses structures, les terpénoïdes constituent un groupe hétérogène de molécules avec différentes propriétés physiques et chimiques. Ils peuvent être volatiles, semi-volatiles ou non-volatiles, saturées et insaturées, à chaîne droite, à chaîne ramifiée, cycliques ou acycliques, chiraux ou achiraux, portant éventuellement divers groupes fonctionnels oxygénés (ex. alcools, aldéhydes, cétones, esters et éthers) ou contenant de l'azote ou du soufre et sont solubles ou insolubles dans l'eau (Bohlmann & Keeling, 2008 ; Schwab *et al.*, 2008). Certains terpénoïdes végétaux tels que les stérols et les carotènes font partie du métabolisme primaire et sont présents dans toutes les plantes. Cependant, la majorité des terpénoïdes végétaux sont des métabolites secondaires (Chen *et al.*, 2011). Les terpénoïdes volatils constituent une partie importante des composés organique volatils biogéniques (COVB) émis par les végétaux conjointement avec les oxylipines (dérivés d'acides gras) et les dérivés aromatiques (benzénoïdes et phénylpropanoïdes issus de la phénylalanine) (Dudareva & Pichersky, 2000). Enfin, les terpénoïdes sont les constituants principaux des huiles essentielles, des résines et des cires de nombreuses plantes.

### **I.1.2. Structure générale et classification**

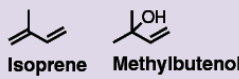
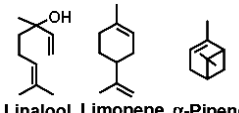
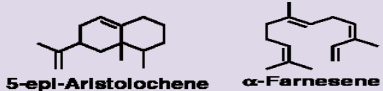
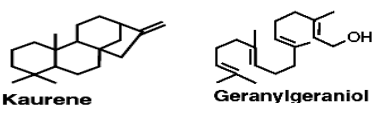
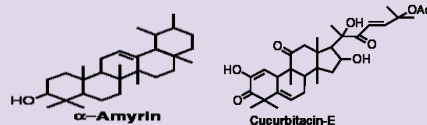
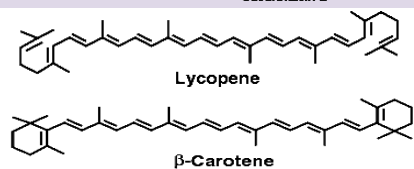
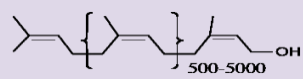
La structure carbonée de base des terpénoïdes est constituée d'un assemblage d'un nombre variable d'unités *2-méthylbutane* (aussi appelées unités isoprène - C5). Ces assemblages peuvent être modifiés par ajout/soustraction de groupes méthyles ou ajout d'atomes d'oxygène. La diversité chimique des terpénoïdes végétaux provient alors de la complexité de leurs voies biosynthétiques (Bohlmann & Keeling, 2008).

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène dans leur structure de base comme illustré par le Tableau 1 (McGarvey & Croteau, 1995).

Les terpénoïdes peuvent également être classés selon le nombre de structures cycliques qu'ils contiennent (cyclique, monocyclique, bicyclique) et l'arrangement des cycles (labdanes par exemple).

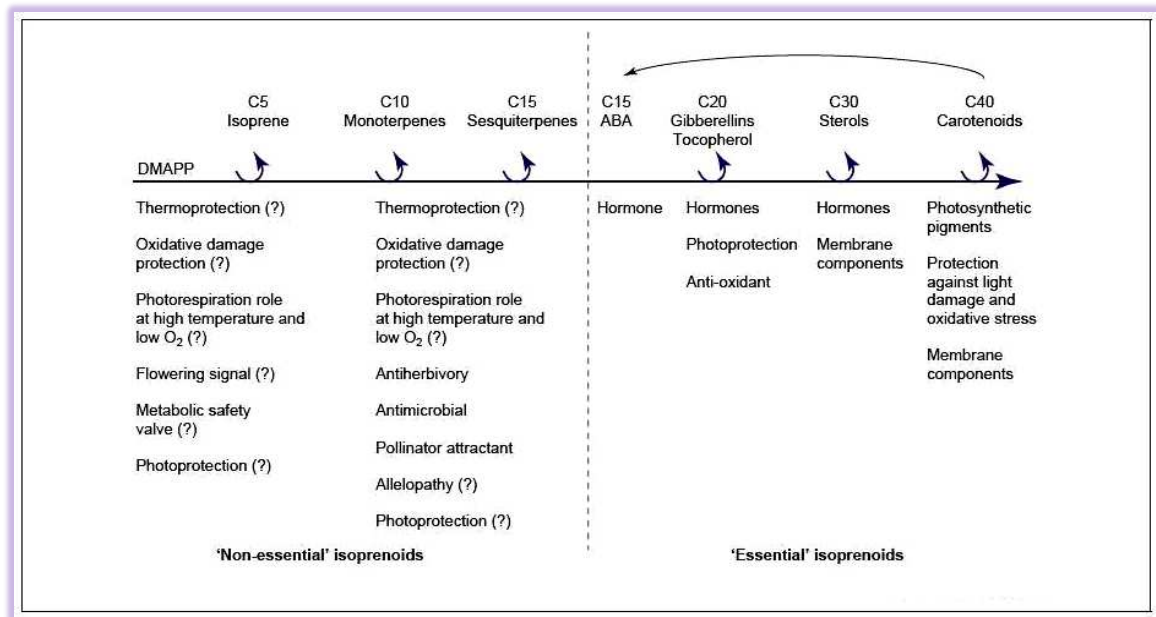
**Tableau 1 : Classification des terpénoïdes**

Formules brutes correspondant aux formes hydrocarbonés linéaires possédant un nombre d'insaturation égal au nombre d'unités isoprènes plus 1

Classe	Formule brute	n° d'isoprène	Exemples
Hémiterpènes	$C_5H_8$	1	 Isoprene Methylbutenol
Monoterpènes	$C_{10}H_{16}$	2	 Linalool Limonene $\alpha$ -Pinene
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	3	 5-epi-Aristolochene $\alpha$ -Farnesene
Diterpènes	$C_{20}H_{32}$	4	 Kaurene Geranylgeraniol
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$	6	 $\alpha$ -Amyrin Cucurbitacin-E
Tétraterpènes	$C_{40}H_{64}$	8	 Lycopene $\beta$ -Carotene
Polyterpènes	$(C_5H_8)_n$	45-30000	 le caoutchouc ( <i>cis</i> -1,4-polyisoprène)

### I.1.3. Fonction

Les terpénoïdes sont la plus large famille de produits naturels, et sont présents et souvent abondants dans tous les phylums du vivant. Comme résumé sur la Figure 1, un nombre relativement faible mais quantitativement important des terpénoïdes sont impliqués dans le métabolisme primaire. Cependant, la grande majorité des terpénoïdes sont classés comme des métabolites secondaires, composés non-requis pour la croissance et le développement cellulaire, mais présumés avoir une fonction écologique (Harborne, 1991).



**Figure 1 : Rôles des terpénoïdes chez les plantes (d'après Owen & Penuelas, 2005)**

Les points d'interrogations indiquent que ces fonctions n'ont pas été démontrées systématiquement chez toutes les espèces émettrices de ces terpénoïdes. ABA : acide abscissique.

### 1.1.3.1. Fonctions métaboliques primaires

Beaucoup des terpénoïdes communs à presque toutes les espèces végétales sont essentiels à la croissance, le développement et le métabolisme général (Croteau *et al.*, 2000). Leurs rôles physiologiques, métaboliques et structurels se situent, entre autre, au niveau des pigments photosynthétiques (le phytol forme la chaîne latérale de la chlorophylle et les caroténoïdes participent à la fixation de la lumière), de plusieurs phytohormones (*e.g.*, l'acide abscissique, les brassinostéroïdes, les cytokinines et les gibbérellines), des quinones transporteurs d'électrons (*e.g.*, plastoquinone et ubiquinone), des composants structuraux membranaires (*e.g.*, les phytostéroïdes qui maintiennent l'intégrité des membranes comme le campestérol, sitostérol et stigmastérol) et des dolichols qui facilitent l'assemblage glycoprotéine-polysaccharide. Certains terpénoïdes remplissent, par des mécanismes inconnus, des fonctions purement développementales pour la plante. A forte concentration, l'isoprène accélère, par exemple, la floraison chez *Arabidopsis thaliana* (Terry *et al.*, 1995).

### 1.1.3.2. Fonctions métaboliques secondaires

La majorité des terpénoïdes sont classés comme des métabolites secondaires non-essentiels à la croissance et au développement cellulaire. Cette classe de composés organiques inclut des hémiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes, qui

présentent la plus grande diversité structurelle et fonctionnelle parmi les produits naturels terpénoïdiques. Ces métabolites secondaires sont connus, ou présumés, avoir des fonctions spécialisées associées à des interactions des plantes avec d'autres organismes vivants dans le contexte de la reproduction, la défense ou la symbiose (Dudareva *et al.*, 2004 ; Paschold *et al.*, 2006 ; Gershenzon & Dudareva, 2007).

Les terpénoïdes forment une partie essentielle des systèmes de défense directs et indirects contre les herbivores et les pathogènes. Les terpénoïdes peuvent agir dans la défense directe envers les bactéries, les champignons, les insectes ou les herbivores comme des toxines, des antibiotiques ou des répulsifs (Bohlmann & Keeling, 2008). Ils peuvent également constituer, des obstacles chimiques et physiques à l'alimentation ou à l'oviposition d'insectes (Keeling & Bohlmann, 2006 ; Heiling *et al.*, 2010), ou agir comme des analogues des hormones d'insectes. Plusieurs études ont montré que l'alimentation des insectes affecte l'émission et la synthèse des terpènes chez le maïs (Turlings *et al.*, 1990), le coton (Rose *et al.*, 1996), le tabac (Kessler & Baldwin, 2002) et les conifères (Lewinsohn *et al.*, 1991 ; Martin *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2003 ; Miller *et al.*, 2005). Les monoterpènes et les diterpènes fournissent la majorité des métabolites constitutifs et induits de l'oléorésine pour la protection des conifères (Bohlmann & Croteau, 1999 ; Phillips & Croteau, 1999 ; Seybold *et al.*, 2000 ; Trapp & Croteau, 2001a ; Martin *et al.*, 2002). Chez les conifères, ces terpènes participent au scellage des blessures suite à un dommage mécanique (oléorésine chez le grand sapin, *Abies grandis* et l'épinette de Sitka, *Picea sitchensis*). Les phytoalexines sont des composés de faible poids moléculaire (PM) produits dans le cadre du système de défense. Dans de nombreuses espèces végétales les diterpènes et les sesquiterpènes agissent comme phytoalexines. Chez le riz (*Oryza sativa*), par exemple, quatorze diterpénoïdes phytoalexines ont été identifiés (Cheng *et al.*, 2007). Les terpénoïdes végétaux peuvent influencer la communication entre insectes par des actions de type phéromone (Crock *et al.*, 1997) ou comme des précurseurs de phéromones (Pickett, 1991). Ils peuvent interférer dans le développement des insectes comme analogues d'hormones (Bowers *et al.*, 1976 ; Bowers, 1991). D'autres espèces végétales sont connues pour leur capacité à synthétiser des terpènes antimicrobiens comme une défense contre les bactéries et les champignons pathogènes (Stoessl *et al.*, 1976).

Par des phénomènes de défense indirecte, les plantes ont la capacité de se défendre contre les herbivores via le renforcement de l'efficacité des ennemis naturels des herbivores. Ces caractéristiques constitutives ou inductibles comprennent également des terpénoïdes de faible PM qui sont souvent libérés en tant que substances volatiles de



plantes avant ou pendant l'attaque par les herbivores. Un des exemples les plus étonnants de la défense indirecte des plantes est la libération d'un mélange de composés volatils qui attirent spécifiquement les prédateurs et parasites des herbivores, après l'attaque par des herbivores (Kessler & Baldwin, 2002 ; Unsicker *et al.*, 2009). La recherche effectuée sur le maïs a ainsi révélé que le caryophyllène émis par les racines était un signal souterrain qui attire fortement les nématodes entomopathogènes (Rasmann *et al.*, 2005). Il a été démontré précédemment que les pousses de *Lotus japonicus* infestées par des acariens (*Tetranychus urticae*) dégagent un mélange de composés volatils qui attire le *Phytoseiulus persimilis* connu comme prédateur d'acariens (Ozawa *et al.*, 2000).

Le terme allélopathie regroupe tous les processus impliquant des métabolites secondaires dans l'inhibition de la croissance et/ou le développement d'un organisme biologique (Gniazdowska & Bogatek, 2005). L'émission de terpénoïdes participerait notamment à l'inhibition de la germination des graines (Fischer *et al.*, 1994 ; Tarayre *et al.*, 1995) et/ou de la croissance de certaines espèces voisines (Stevens, 1984). De ce fait, il a été récemment proposé que les monoterpènes oxygénés puissent être utilisés comme bio-herbicides (Kordali *et al.*, 2007). Les terpènes peuvent également influencer les interactions plante-plante (Singh *et al.*, 2006 ; Ens *et al.*, 2009 ; O'Reilly-Wapstra *et al.*, 2011), les associations plantes-microbes/champignons (Bednarek & Osbourn 2009 ; Ludley *et al.*, 2009 ; O'Reilly-Wapstra *et al.*, 2011) et la phénologie d'espèces d'arbres (Becerra, 2007; Dungey *et al.*, 2000 ; Iason *et al.*, 2005 ; O'Reilly-Wapstra *et al.*, 2011) par des effets allélopathiques souterrains. Ces effets ont le potentiel d'affecter la biodiversité et l'évolution des écosystèmes terrestres.

Bien que leur aptitude à intoxiquer ou à repousser les herbivores soit un point central de la majorité des études, les terpénoïdes peuvent aussi jouer d'autres rôles écologiques tels que l'attraction de pollinisateurs (Pichersky & Gershenzon, 2002). Les parfums floraux sont des mélanges complexes et diversifiés de composés volatils odorants de faible poids moléculaire. Ils sont de nature lipophile et ont un haut point de tension de vapeur. Ils appartiennent à plusieurs classes de composés incluant majoritairement des terpènes, des dérivés d'acides gras et des dérivés des phénylpropanoïdes (Knudsen & Gershenzon, 2006). Le parfum floral est utilisé par de nombreuses plantes pour attirer les insectes pollinisateurs. Il constitue ainsi un élément clé de la reproduction des plantes (Pellmyr, 1986). La volatilité des composés du parfum floral leur permet d'agir en tant que messagers chimiques à longue distance pour fournir des informations sur la localisation et l'identité de la fleur. Cependant, dans certains cas, des terpénoïdes d'attraction sont utilisés par des

tricheurs. Par exemple, des parasites peuvent reconnaître leur plante-hôte par son odeur, une odeur utilisée à la base pour attirer le pollinisateur (Mattiacci *et al.*, 2000).

Les isoprènes et les monoterpènes, via leur capacité de thermoprotection, pourraient jouer un rôle différent en protégeant les plantes contre un stress de chaleur suite à une augmentation brusque de la température (*heat flecks*) des feuilles causée par le soleil (Delfine *et al.*, 2000; Penuelas & Llusia, 2002; Copolovici *et al.*, 2005 ; Sharkey *et al.*, 2008). Il a en effet été suggéré que ces deux classes de terpénoïdes aident l'appareil photosynthétique à survivre de brefs épisodes où les températures ont été supérieures à 40°C (Penuelas & Llusia, 2002). En plus, les isoprènes et les monoterpènes peuvent stabiliser physiquement les membranes des thylacoïdes à haute température (Sharkey *et al.*, 2001) ou détoxifier des dérivés réactifs de l'oxygène, comme l'ozone, qui peuvent endommager les membranes (Loreto & Velikova, 2001).

#### I.1.4. Importance

Les terpénoïdes disponibles en quantités relativement importantes sous forme d'huiles essentielles, de résines ou de cires constituent des ressources renouvelables importantes. Ils fournissent une gamme de produits commercialement utiles pour l'homme comme, par exemple, des arômes ou saveurs (*e.g.*, menthol extrait de la menthe ou produit par hémisynthèse à partir du limonène extrait de peau d'agrumes, McConkey *et al.*, 2000), parfums (*e.g.*, santalols), matières industrielles (*e.g.*, acides résiniques diterpéniques), compléments alimentaires sous forme de vitamines (*e.g.*, linalol, Mercier & Chabardes, 1994) ou édulcorants, pesticides (Bohlmann & Keeling, 2008), solvants, adhésifs, intermédiaires de synthèse (McGarvey & Croteau, 1995). Certains sont à l'étude en tant que précurseurs de biocarburant (*e.g.*, farnésène, Bohlmann & Keeling, 2008).

La grande diversité des structures et des fonctions des terpénoïdes a provoqué un intérêt pour leur utilisation en médecine traditionnelle et moderne. L'utilité des terpénoïdes a été démontrée pour la chimioprévention et la chimiothérapie de plusieurs maladies (*e.g.*, taxol et artémisinine, Jennewein & Croteau, 2001 ; Rodriguez-Concepcion, 2004) et aussi pour des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antivirales, antioxydantes, antiallergènes, antispasmodiques, antihyperglycémiques, anti-inflammatoires, antinéoplastiques et immunomodulatrices (Paduch *et al.*, 2007). Ils jouent également plusieurs rôles dans les remèdes en herboristerie traditionnelle et font l'objet de nombreuses études pour en comprendre les effets thérapeutiques. Par conséquent,

ce groupe de substances mériterait d'être davantage utilisé dans les thérapies modernes (Paduch *et al.*, 2007).

Les membres du groupe terpénoïde incluent également des polymères utiles pour l'industrie (*e.g.*, caoutchouc et chicle) et l'agronomie (*e.g.*, pyréthrinés et azadirachtine) (McGarvey & Croteau, 1995). Ils agissent aussi comme des insecticides naturels et peuvent être utilisés en tant que substances de protection dans le stockage de produits agricoles (Paduch *et al.*, 2007). En plus, les terpénoïdes sont des facteurs caractéristiques de la qualité des produits agricoles et horticoles car ils contribuent grandement à la saveur des fruits et au parfum des fleurs commerciales (Pichersky *et al.*, 1994 ; Aharoni *et al.*, 2004a).

La plupart des terpènes bioactifs peuvent être synthétisés chimiquement à partir de dérivés pétrolifères. Ils conservent alors les mêmes propriétés organoleptiques et thérapeutiques et de nombreux composés commerciaux sont issus de la synthèse chimique. La difficulté, et donc le coût, de la synthèse de terpénoïdes augmente cependant avec la taille de la molécule (des monoterpènes aux sesquiterpènes puis aux diterpènes). Ceci combiné à un regain des consommateurs pour des produits naturels, et à la raréfaction des énergies fossiles, pousse les groupes industriels à développer des méthodologies économiquement rentables d'extraction à partir de plantes agronomiques ou de microorganismes bio-ingéniés pour les produire. Les efforts des recherches actuelles se concentrent ainsi sur l'élucidation des mécanismes enzymatiques de biosynthèse et de leur régulation *in planta*. Spécifiquement, la biosynthèse des terpénoïdes a été un point focal des recherches scientifiques pendant la dernière décennie (Huang *et al.*, 1998 ; Williams *et al.*, 2000) et plusieurs enzymes ont déjà été caractérisées et ont été transférées avec succès dans des plantes et microorganismes (*Escherichia coli* et levure) hôtes par transgénèse.

### **I.1.5. Biosynthèse**

Beaucoup de recherches durant les deux dernières décennies se sont concentrées sur la biochimie moléculaire et la génétique de la biosynthèse des terpénoïdes. Les voies de base de la biosynthèse de terpénoïdes ont été élucidées dans plusieurs systèmes biologiques. Les voies métaboliques des terpénoïdes végétaux sont toutes attachées à la formation de seulement deux précurseurs isomères à 5-carbones, véritables "blocs de construction" que sont l'isopentenyl diphosphate (IPP) et le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) (Cane, 1999). Deux voies distinctes sont actuellement connues chez les organismes vivants pour la biosynthèse de l'IPP et du DMAPP : la voie classique du mévalonate (MVA) et la voie

indépendante récemment découverte du 2-C-méthyl-D-érythritol phosphate (MEP) (Lichtenthaler, 1999 ; Lange *et al.*, 2000 ; Sapir-Mir *et al.*, 2008).

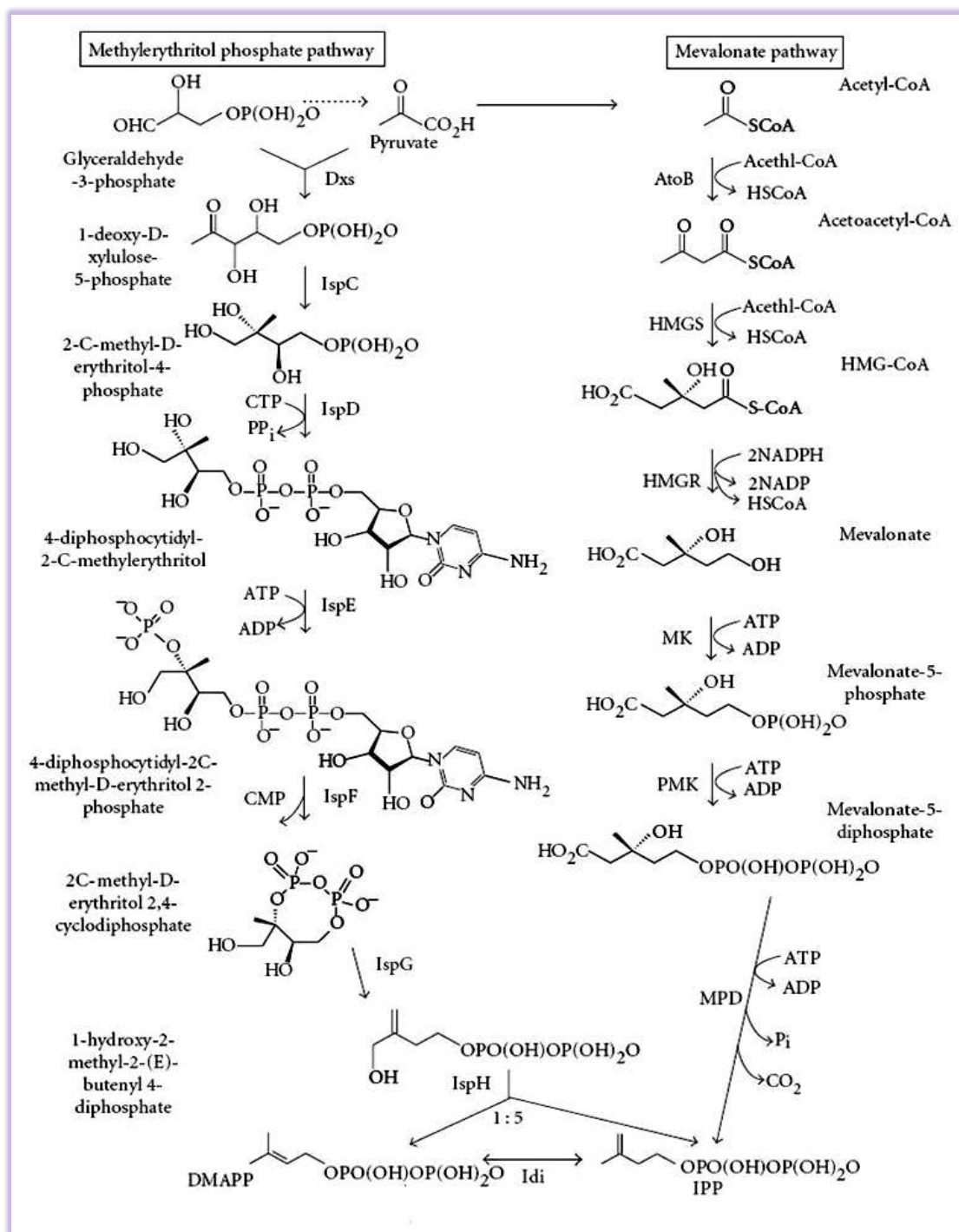
#### ***1.1.5.1. La formation des blocs de construction, IPP et DMAPP***

La voie MVA (Figure 2), est connue depuis longtemps (Agranoff, 1960), et sa biochimie a été exhaustivement étudiée chez les plantes (Goodwin, 1977 ; Qureshi, 1981 ; Gershenzon & Croteau, 1993). Cette voie est initiée par la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA par l'acétoacétyl-CoA thiolase (AACT), après quoi un supplément d'acétyl-CoA est ajouté pour former le (S)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) via une action de condensation de type aldol catalysée par la HMG-CoA synthase (HMGS). La réduction de HMG-CoA en MVA est réalisée par la HMG-CoA réductase (Bochar *et al.*, 1999). Les dernières étapes de la synthèse de l'IPP, qui est ensuite isomérisé en DMAPP, nécessitent une série de phosphorylations du MVA par les actions consécutives de la mévalonate kinase (MK), la mévalonate-5-phosphate kinase (PCM) puis une décarboxylation par la mévalonate-5-diphosphate décarboxylase (Newman & Chappell, 1999).

Avant 1993, la voie MVA était la seule origine biosynthétique connue des terpénoïdes. Après les études de marquage isotopique de Rohmer *et al.* (1993), il a été démontré qu'il existe, chez certains organismes, une voie alternative qui ne découle pas de l'acétyl-CoA. La voie complète a été définitivement élucidée en 2002 (Rohdich *et al.*, 2002). La voie MEP (Figure 2), connue aussi sous le nom de voie des 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (DXP/MEP), est initiée par une réaction de condensation de type transcétolase des deux précurseurs, le pyruvate et le glycéraldéhyde-3-phosphate, catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) conduisant à la synthèse du 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP). La seconde étape consiste en la formation de l'intermédiaire clé, le 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP), suite à des réactions d'isomérisation et de réduction effectuées par l'enzyme 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR). Un groupe cytidyl est ensuite additionné au MEP par la 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate cytidylyl transférase (MCT) pour produire le 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol. Ce dernier, après une série de réactions : phosphorylation catalysée par la 4-(cytidine-5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (CMK), perte du groupe cytidyl catalysée par la 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (MDS) et cyclisation, est transformé en 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate. Vraisemblablement, le 2-C-méthyl-D-

érythritol-2,4-cyclodiphosphate subit des séries de réactions catalysées par la (E)-4-hydroxy-3-méthyl-2-ényle diphosphate synthase (HDS) et réductase (HDR) pour produire l'IPP (Lichtenthaler, 1999 ; Lichtenthaler, 1997). L'IPP est finalement isomérisé en DMAPP par l'IPP isomerase (IPI), une enzyme présente chez tous les organismes vivants (Gershenzon & Kreis, 1999)

La voie MVA prend ses racines dans la glycolyse pour son précurseur l'acétyl-CoA. Cependant, la voie MEP est étroitement liée aux réactions de fixation du CO<sub>2</sub> lors de la photosynthèse comme le témoigne les deux précurseurs immédiats de cette voie, le pyruvate et le glycéraldéhyde-3-phosphate. Les organismes utilisent une seule, ou les deux, voies pour synthétiser leur propre IPP. Chez les animaux, les champignons et les archées seule la voie MVA est utilisée (Chappell, 1995a ; Goodwin, 1977 ; Lichtenthaler, 1997 ; Spurgeon & Porter, 1981). Inversement, seule la voie MEP existe chez d'autres phylla bactériens, les eubactéries, les algues vertes, les cyanobactéries, les diatomées et le *Plasmodium falciparum* (Lichtenthaler, 1999 ; Rohmer, 1999 ; Eisenreich *et al.*, 2001 ; Rohdich *et al.*, 2001 ; Cassera *et al.*, 2004 ; Masse *et al.*, 2004 ; Okada & Hase, 2005 ; Eoh *et al.*, 2007 ; Grauvogel & Petersen, 2007). Chez les plantes supérieures, les deux voies sont actives (Eisenreich *et al.*, 1998 ; Lichtenthaler, 1998 ; Rohmer, 1999). Elles y sont à l'origine de groupes de terpènes différents. Pour permettre une régulation différentielle de ces deux voies, elles sont actives dans des compartiments différents dans les cellules végétales. La voie MVA est active dans le cytoplasme et la voie MEP dans le chloroplaste. Un transporteur permet un échange de l'IPP entre ces deux compartiments mais il n'est pas suffisamment actif pour rendre inutile une de ces deux voies.



**Figure 2 : Etapes enzymatiques des voies MEP et MVA dans la synthèse d'IPP et de DMAPP (modifiée d'après Goto *et al.*, 2010)**

Dxs: 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase ; IspC: 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase ; IspD: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol synthase ; IspE: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol kinase ; IspF: 2-C-methyl-d-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase ; IspG: 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase ; IspH: 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase ; AtoB, acetyl-CoA C acetyltransferase ; HMGS: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase ; HMGR: hydroxymethylglutaryl-CoA reductase ; MK: mevalonate kinase ; PMK: phosphomevalonate kinase ; MPD: mevalonate pyrophosphate decarboxylase ; Idi: isopentenyl pyrophosphate isomerase.

### 1.1.5.2. La formation des prényl diphosphates, GPP, FPP et GGPP

La première étape de diversification des squelettes carbonés des terpènes consiste en la condensation ‘tête-queue’ (attachement du carbone fixant le groupement pyrophosphate d’un des substrats avec le carbone opposé à celui fixant le groupement pyrophosphate de l’autre substrat) de quantités variables d’IPP et de DMAPP pour produire les prényl diphosphates suivants, le géranyl diphosphate (GPP), le farnésyl diphosphate (FPP) et le géranyl géranyl diphosphate (GGPP) (Bohlmann *et al.*, 1998a ; Wise & Croteau, 1999 ; Christianson, 2006 ; Tholl, 2006 ;). Ces réactions de condensation sont catalysées par des prényltransférases (PT) ayant comme substrat des prényl-PP à courte chaîne, la GPP synthase, la FPP synthase et la GGPP synthase (Goodwin, 1977 ; Spurgeon & Porter, 1981 ; Gershenzon & Croteau, 1993). La GPP synthase catalyse la réaction de la condensation de l’IPP avec le DMAPP pour former le GPP, précurseur diphosphate C10 des monoterpènes (Figure 3). La FPP synthase ajoute deux molécules d’IPP au DMAPP pour former le FPP, précurseur diphosphate C15 des sesquiterpènes et des triterpènes (Figure 3). Finalement, la GGPP synthase condense trois molécules d’IPP au DMAPP pour former le précurseur diphosphate C20 des diterpènes et tétraterpènes (Figure 3) (Ramos-Valdivia *et al.*, 1997 ; Ogura & Koyama, 1998 ; Koyama & Ogura 1999 ; Takahashi & Koyama, 2006).

Même si les doubles liaisons formées au cours de ces réactions de condensation sont généralement de configuration *trans*, il est important de signaler que deux produits de configuration *cis* ont été observés, le néryl diphosphate (NPP) (Takahashi & Koyama, 2006 ; Schilmiller *et al.*, 2009) et le *Z,Z*-FPP (Sallaud *et al.*, 2009). Tous deux sont également des précurseurs biosynthétiques de monoterpènes et de sesquiterpènes respectivement.

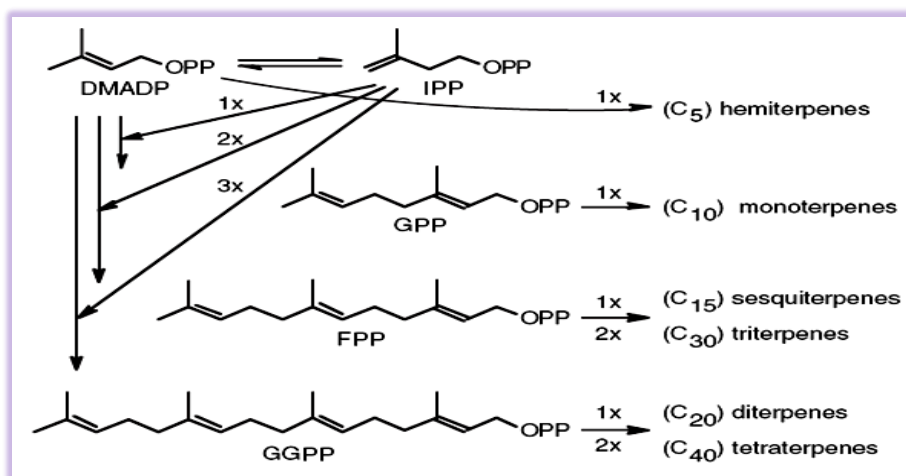


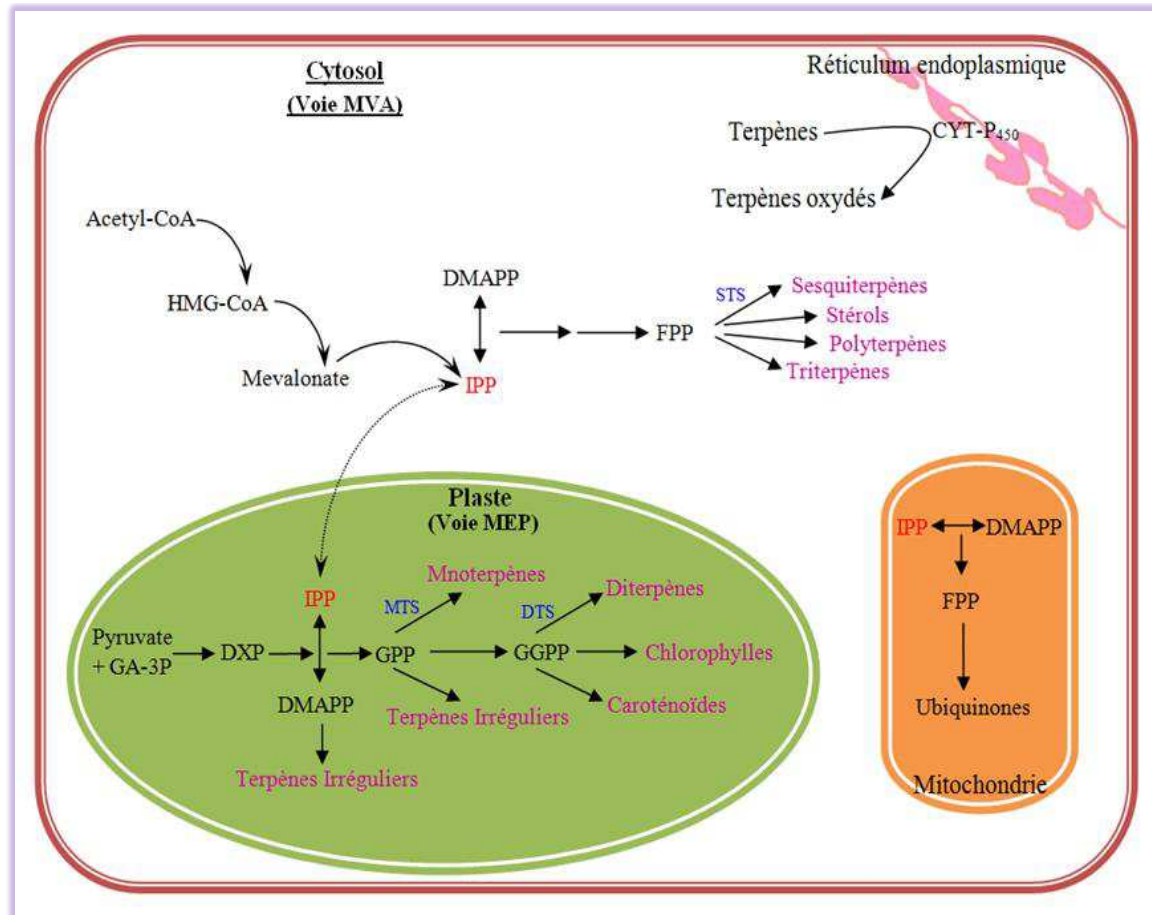
Figure 3 : Schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes (modifiée d’après Bohlmann & Keeling, 2008)

### 1.1.5.3. Compartimentation sub-cellulaire

Les voies de biosynthèse des terpénoïdes sont probablement parmi les voies les plus complexes connues. Les plantes utilisent les deux voies, MEP et MVA, en parallèle pour la synthèse de l'IPP. Pour permettre leur régulation différentielle, elles fonctionnent presque indépendamment l'une de l'autre dans deux compartiments sub-cellulaires différents (Eisenreich *et al.*, 1998 ; Lichtenthaler, 1998 ; Rohmer, 1999 ; Croteau *et al.*, 2000). Les voies MVA et MEP sont en effet respectivement localisées dans le cytosol et dans les plastes (Figure 4). Les prényl synthases (PT) et terpènes synthases (TPS) nécessaires aux voies centrales de la synthèse des terpénoïdes sont également présents dans le cytosol et dans les plastes. Cependant, un point d'inter-croisements (cross-talk) entre ces deux voies (compartiments) existe du fait d'une possibilité de transport de l'IPP à travers l'enveloppe chloroplastique (Hemmerlin *et al.*, 2003a ; Laule *et al.*, 2003 ; Dudareva *et al.*, 2005). Il est plus important dans le sens plastes vers cytosol (Laule *et al.*, 2003 ; Lichtenthaler, 2007). Les voies MVA et MEP ne sont donc pas totalement indépendantes (Laule *et al.*, 2003). Un travail récent dans les fleurs de muflier a montré que la voie plastidiale MEP fournit les précurseurs IPP pour la biosynthèse des monoterpènes plastidiaux et des sesquiterpènes cytosoliques (Dudareva *et al.*, 2005). Des échanges de l'IPP, du DMAPP, du GPP et/ou du FPP entre le cytoplasme et les chloroplastes ont été également observées (Adam & Zapp, 1998 ; Arigoni *et al.*, 1999 ; Hemmerlin *et al.*, 2003a). Une déficience totale d'une des deux voies induite par mutagénèse dirigée ou par ajout d'inhibiteurs spécifiques ne peut cependant pas être totalement compensée par le fonctionnement de l'autre voie comme en témoignent les phénotypes de telles plantes.

Dans la majorité des cas, les héli-, les mono- et les diterpénoïdes sont préférentiellement formés dans les plastes en utilisant les précurseurs de la voie MEP via la synthèse des GPP et GGPP. Les sesquiterpènes, les stérols et les triterpènes sont synthétisés dans le cytosol par la voie MVA et l'intermédiaires clé, le FPP (Bohlmann *et al.*, 1998a). Exceptionnellement, chez la tomate, des TPSs localisées dans les plastes produisent également des sesquiterpènes issus de Z,Z-FPP (Sallaud *et al.*, 2009). Les enzymes cytochrome P450 impliquées dans des modifications oxydatives des terpénoïdes sont associées au réticulum endoplasmique (Bohlmann & Keeling, 2008). Les terpénoïdes mitochondriaux sont synthétisés à partir de l'IPP cytosolique formé par la voie MVA suite à son importation dans la mitochondrie (Lichtenthaler, 1999).





**Figure 4 : Vue générale sur la compartimentation sub-cellulaire des voies biosynthétiques des terpénoïdes chez les plantes (modifiée d'après Chappell, 2002 ; Bouvier *et al.*, 2005 ; Bouwmeester, 2006 ; Cheng *et al.*, 2007)**

HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA; GA-3P, glyceraldehyde-3-phosphate; MVA, acide mévalonique ; MEP, 2-C-méthyl-D-erythritol-4-phosphate ; DXP, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate; IPP, isopentenyl diphosphate ; DMAPP, diméthylallyl diphosphate ; GPP, geranyl diphosphate ; FPP, farnesyl diphosphate; GGPP, géranyl géranyl diphosphate ; MTS, monoterpènes synthase ; STS, sesquiterpènes synthase ; DTS, diterpènes synthase ; CYT-P<sub>450</sub>, cytochrome P450.

La connaissance de la localisation cellulaire et subcellulaire de l'ensemble des enzymes des voies spécifiques des terpénoïdes est importante pour orienter les efforts en ingénierie des voies et stratégiquement rediriger les flux métaboliques (*e.g.* Wu *et al.*, 2006).

#### 1.1.5.4. Produits finaux

La deuxième étape de diversification des squelettes carbonés des terpènes implique l'action de terpènes synthases (TPSs) sur les prényl-PP (Wise & Croteau, 1999 ; Bohlmann *et al.*, 1998a ; Christianson, 2006 ; Tholl, 2006). Les prényl-PP, GPP, FPP et GGPP sont modifiés par les TPSs pour former les monoterpènes (monoTPS), les sesquiterpènes (sesquiTPS), et les diterpène (diTPS), respectivement (Figure 5) (Bohlmann *et al.*, 1998a ;

Davis & Croteau, 2000). Bien que ces prényl-PP en configuration *trans* aient été considérés comme les substrats universels des TPSs. Des études récentes ont montré que deux prényl-PP en configuration *cis*, le néryl diphosphate (NPP) (Takahashi & Koyama, 2006 ; Schilmiller *et al.*, 2009) et le Z,Z-FPP (Sallaud *et al.*, 2009), sont aussi des substrats naturels de certaines TPSs. En conséquence, les isoprène synthases, les monoterpènes synthases, les sesquiterpène synthases et les diterpène synthases transforment le DMAPP, le GPP (ou NPP), le FPP (ou Z,Z-FPP) et le GGPP en isoprènes, monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes, respectivement (Figure 5).

Les terpénoïdes végétaux les plus courts, les hemiterpenoïdes (*e.g.*, isoprène, C5), peuvent être formés directement à partir du DMAPP par l'action des isoprènes synthases qui catalysent son ionisation (perte du groupement pyrophosphate) suivie par une déprotonation (Figure 5) (Miller *et al.*, 2001 ; Bohlmann & Keeling, 2008). Le linalyl diphosphate (LPP), issu de l'isomérisation du GPP, est l'intermédiaire catalytique clé permettant la formation du cation  $\alpha$ -terpinyle en vue de la formation des monoterpènes cycliques (Wise & Croteau, 1999). Cependant, la formation des monoterpènes acycliques, comme le myrcène et l'ocimène, n'exige pas l'isomérisation du GPP en LPP. Ils pourront être formés directement à partir du GPP après clivage du groupement pyrophosphate (Bohlmann *et al.*, 1999). Le mécanisme de fonctionnement des TPSs est décrit en détail dans la section I-2 ci-dessous.

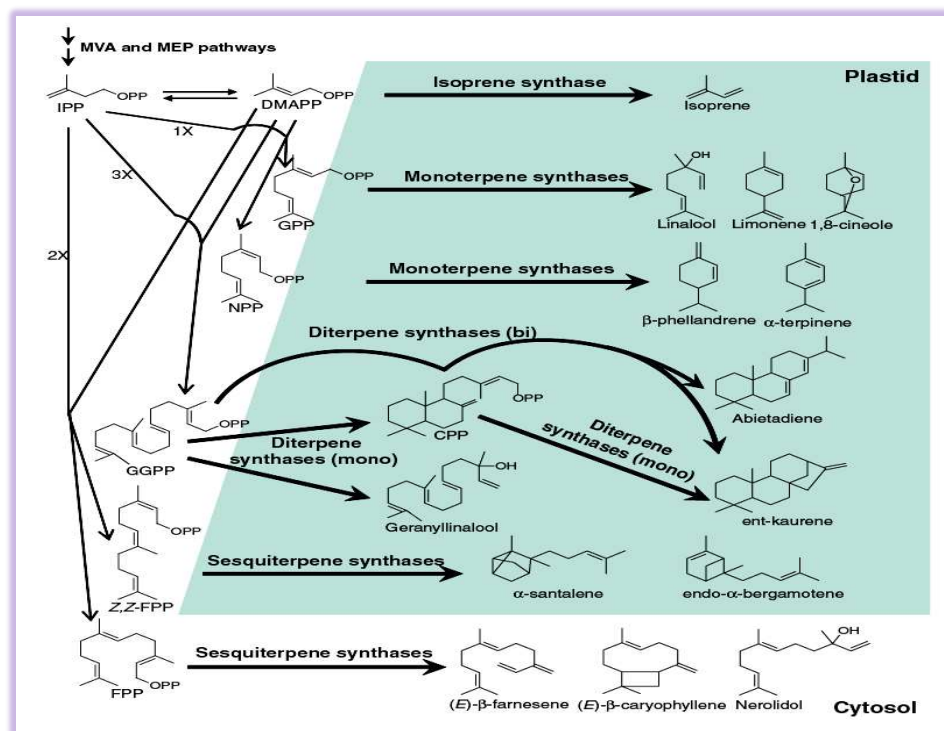


Figure 5 : Formation de terpénoïdes catalysée par divers types de TPSs (d'après Chen *et al.*, 2011)

Tous les sesquiterpènes (acyclique, mono-, bi- et tricyclique) dérivent similairement du FPP (Dudareva *et al.*, 2006 ; Fraga, 2007). La condensation ‘tête-tête’ de deux molécules de FPP conduit à la production de squalène précurseur des stérols (par perte de deux groupes de diphosphate (Yamaguchi, 2008). La condensation par paire de FPP donne lieu à différentes classes de triterpénoïdes (Bohlmann & Keeling, 2008).

Le GGPP est, pareillement, le précurseur de tous les diterpènes dont les gibbérellines. Ces dernières sont formées par l’action successive de deux diTPSs, la copalyl diphosphate synthase (CDPS) et la kaurene synthase (KS), qui transforment le GGPP en copalyl diphosphate (CPP) puis en *ent*-kaurène, le précurseur de toutes les gibbérellines chez les plantes (Yamaguchi, 2008). La condensation ‘tête-tête’ par paire de deux GGPP donne lieu à la formation des différentes classes de tétraterpénoïdes (C<sub>40</sub>), dont le phytoène, précurseur des caroténoïdes (Yamaguchi, 2008).

L’assemblage d’un nombre indéfini de précurseurs C<sub>5</sub> produit les polyterpénoïdes comme, par exemple, le caoutchouc qui contient de 400 à plus de 100,000 unités isoprènes (Cornish, 1993).

En plus des terpénoïdes décrits ci-dessus et qui sont dits ‘réguliers’, un grand nombre d’autres terpénoïdes, dits irréguliers, sont formés dans les plantes comme des terpénoïdes ne répondant pas à la formule C<sub>n</sub>x<sub>5</sub> (*e.g.*, norterpènes), des terpénoïdes conjugués (*e.g.*, alkaloides indoliques monoterpéniques, Facchini & DeLuca, 2008) et des terpènes au squelette carboné branché ou comportant un cycle pentane ou butane. Deux familles végétales (Astéracées et Lamiacées) produisent des HEs caractérisées par la présence d’un groupe de monoterpènes irréguliers dont la structure ne correspond pas à l’enchaînement ‘tête-tête’ isoprénique classique (Waller *et al.*, 1968 ; Epstein & Poulter, 1973).

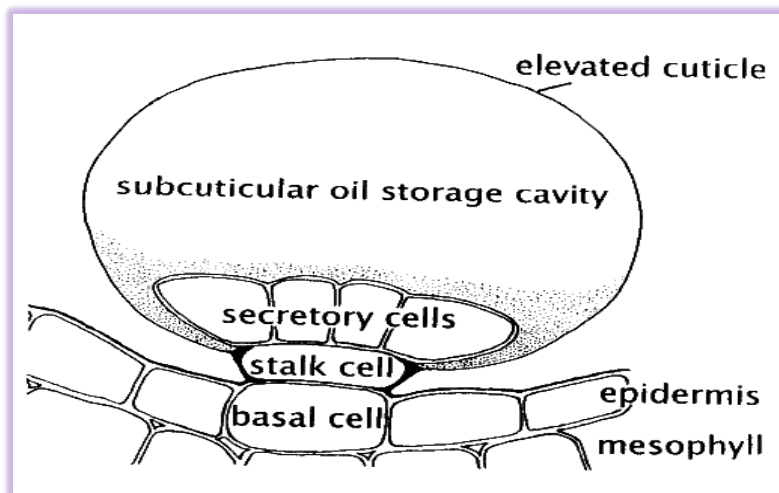
En général, la diversité des milliers de structures de terpénoïdes végétaux a pour origine la combinaison d’action de différentes isoformes de TPSs et d’enzymes de modification de terpénoïdes. Les transformations catalysées par les TPSs peuvent être suivies par une variété de modifications des squelettes carbonés d’origine afin de produire des milliers de métabolites terpéniques. Après la formation de nombreuses structures de base d’hémi-, mono-, sesqui- et diterpènes, sous la forme d’oléfines ou de simples terpénoïdes mono-oxygénés par les TPSs, ces métabolites peuvent être encore fonctionnalisés par différentes cytochrome P450 mono-oxygénases (P450), réductases, déshydrogénases ou transférases (Bohlmann & Keeling, 2008). Les modifications des produits des TPSs par oxydation, peroxydation, méthylation, acylation, ou par rupture de liaison C-C modifient leurs propriétés physiques et, par voie de conséquence, leurs

activités biologiques (Chen *et al.*, 2011). A l'instar du fraisier des bois d'Europe, l' $\alpha$ -pinène est modifié chez le fraisier domestique par un cytochrome P450 hydroxylase en myrténol, lui-même transformé en acétate de myrtényle par une alcool acétyl transférase (Aharoni *et al.*, 2004). Ces différences sont, en partie, responsables des différences organoleptiques entre ces deux types de fraises.

#### **I.1.6. Site de biosynthèse, accumulation et sécrétion**

Toutes les plantes, et dans une plus grande mesure celles nommées aromatiques, émettent des terpènes volatils de façon constitutive ou induite. Ceux-ci sont synthétisés *de novo* ou mobilisés à partir de sites de stockage internes ou externe (Miller *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2009).

Beaucoup de plantes produisent et accumulent des mono-, sesqui- et/ou diterpènes en quantités dépassant de loin les capacités de stockage des cellules vivantes productrices. Ces plantes ont typiquement des structures anatomiques spécialisées pour la séquestration et la sécrétion des terpénoïdes (Fahn, 1979 ; Bernard-Dagan, 1988a ; Hallahan, 2000 ; Gershenzon *et al.*, 2000). Ces structures anatomiques spécialisées sont très diverses : cellules d'huile, idioblastes, cavités de stockage, glandes coniques sous-cuticulaires, trichomes glandulaires, laticifères, poches et canaux de résine. Plusieurs catégories de tissus producteurs et sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (Fahn, 1979). La forte densité des structures anatomiques spécialisées pour l'accumulation des terpénoïdes est un critère agronomique important pour la production d'HE (Bohlmann & Keeling, 2008). Les menthes, à titre d'exemple, portent deux types de trichomes glandulaires non-photosynthétiques, un type capité avec une capacité de stockage limitée, et un type pelté contenant une cellule basale, une cellule colonne et huit cellules sécrétrices disposées en disque (Figure 6) (Amelunxen, 1965 ; Amelunxen *et al.*, 1969 ; Fahn, 1979). Le dernier type développe un grand espace de stockage sous-cuticulaire au sommet où la cuticule épaisse est séparée des parois cellulaires des cellules sécrétrices pour former une poche (Amelunxen *et al.*, 1969). La séquestration des terpénoïdes dans l'espace sous-cuticulaire s'explique en partie par le fait que certains terpènes sont phytotoxiques et doivent donc être accumulés dans des espaces externes spécialisés (Brown *et al.*, 1987 ; Wagner, 1991).



**Figure 6 : Schéma d'une coupe radiale anatomique d'un trichome glandulaire pelté de menthe poivrée (*Mentha x piperita*) (d'après Turner & Croteau, 1999)**

La biosynthèse des terpénoïdes a lieu dans tous les types cellulaires végétaux. Cependant, certains types cellulaires peuvent se spécialiser dans la production des terpènes volatils. Les parfums des pétales des fleurs sont ainsi souvent produits par les cellules épidermiques et/ou parenchymateuses (Dudareva & Pichersky, 2000 ; Caissard *et al.*, 2004). Chez les conifères, les terpénoïdes résinifères sont formés par les cellules épithéliales des canaux sécréteurs (Bernard-Degan, 1988b). Spatialement, l'expression constitutive et induite des gènes, et l'accumulation des protéines, de TPS chez l'épicéa est localisée, au moins en partie, aux cellules épithéliales des canaux de résine dans les tissus des feuilles-aiguilles tels que déterminés par localisation immunofluorescente (Zulak *et al.*, 2010) et microdissection au laser (Abbott *et al.*, 2010). Typiquement, les cellules adjacentes aux sites de stockage des terpénoïdes volatils sont considérées comme site de production pour la sécrétion dans des sites extracellulaire tels que l'espace sous-cuticulaire de trichomes glandulaires ou le lumen des canaux de résine (Fahn, 1979). Des études biochimiques sur des trichomes glandulaires peltés isolés de la menthe poivrée ont révélé que les cellules sécrétrices sont non-seulement responsables de la sécrétion de monoterpènes dans l'espace de stockage, mais aussi l'emplacement réel de la biosynthèse de monoterpènes (Gershenzon *et al.*, 1992 ; McCaskill *et al.*, 1992). La production des terpènes en leur sein est liée au développement souvent hypertrophique de deux compartiments privilégiés : le plaste et le réticulum endoplasmique (Carde, 1979 ; Bosabalidis & Tsekos, 1982a ; Bosabalidis & Tsekos, 1982b ; Heinrich *et al.*, 1983 ; Sevinat-Pinto & Antunes, 1991). Des recherches ont montré que plusieurs organites cellulaires participent à la production et au stockage de l'HE dont les plastes (Amelunxen,

1965 ; Wooding & Northcote, 1965 ; Akers *et al.*, 1978), le réticulum endoplasmique (Schnepf, 1974 ; Bourett *et al.*, 1994 ; Ascensao *et al.*, 1997 ; Turner *et al.*, 2000a) et les vacuoles (Amelunxen, 1965). Cependant, il existe une corrélation étroite entre la présence de monoterpènes dans les extraits volatils et la présence de leucoplastes dans les cellules sécrétrices (Cheniclet & Carde, 1985). Dans toutes les cellules végétales, des relations de proximité, voire de continuité métabolique, existent entre le réticulum endoplasmique et les plastes (Douce & Joyard, 1981 ; Douce & Joyard, 1984 ; Whatley *et al.*, 1991). Toutefois, la fréquence de telles associations est particulièrement élevée dans les cellules sécrétrices contenant des leucoplastes (Cheniclet, 1984 ; Carde, 1987).

Il peut arriver que des cellules sécrétrices inactives puissent retrouver leur potentialité de synthèse terpénique. C'est ce qui se passe lors d'une blessure (accident, compression, piqûre d'insecte, attaque de champignons). La synthèse est initiée à multiples reprises après la blessure, suggérant des rôles diversifiés pour les monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes (Bohlmann *et al.*, 1998b). Dans ce cas, la reprise d'activité sécrétrice s'accompagne d'une régénération limitée des structures fonctionnelles à leucoplastes (Croteau *et al.*, 1987 ; Cheniclet *et al.*, 1988). Marpeau *et al.* (1989) ont observé que la réactivation des cellules sécrétrices par des excisions de tissus corticaux primaires de jeunes pousses de pin maritime (*Pinus pinaster*) induit un fonctionnement sécrétoire de type secondaire caractérisé par la synthèse quasi-exclusive d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -pinène.

Etant donné que les terpénoïdes s'accumulent avec un fort gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, une certaine forme de transport actif et directionnel à travers la membrane cellulaire lipophile est nécessaire. Cependant, les mécanismes de transport de terpénoïdes à partir des cellules biosynthétiquement actives vers l'espace de stockage extracellulaire ne sont pas connus. L'exocytose est le mécanisme le plus probable pour le déplacement de l'HE de la cellule vers l'espace sous-cuticulaire (Ascensao & Pais 1998 ; Gersbach, 2002). Ce transport peut impliquer aussi l'activité d'un transporteur à cassette fixatrice d'ATP (ATP-binding cassette transporter, Jasinski *et al.*, 2001).

La compartimentation et l'accumulation terpéniques décrites ci-dessus sont réalisées dans plusieurs familles de Gymnospermes et d'Angiospermes. Cependant, dans de nombreuses espèces végétales, des formes de stockage des HEs sont absentes et les terpènes sont rapidement, et massivement, libérés dans l'atmosphère. En général, les hémiterpénoïdes très volatils comme l'isoprène s'échappent dans l'atmosphère immédiatement après leur synthèse. Mais ils peuvent aussi être stockés de manière non-

spécifique à l'intérieur des feuilles (Niinemets & Reichstein, 2002). De part leur nature lipophile, les terpénoïdes volatils les moins polaires peuvent traverser librement la cuticule avant d'être émis vers l'atmosphère (Schmid & Ziegler, 1992). Il semble cependant que les composés présentant un certain niveau de polarité soient émis préférentiellement par les stomates car ils ne peuvent pas diffuser au travers de la cuticule (Fall & Monson, 1992).

### **I.1.7. Huiles essentielles**

Les terpénoïdes disponibles en quantités relativement importantes chez les végétaux comme huile essentielle, résine ou cire sont des ressources renouvelables importantes qui fournissent une large gamme de produits d'importance commerciale (Zinkel & Russell, 1989 ; Dawson, 1994). Etant donné que les lavandes, sujet principale de cette thèse, sont des plantes productrices d'HE, nous limiterons cette introduction aux HEs.

#### ***I.1.7.1. Définition et répartition dans le règne végétal***

Les HEs, appelées communément essences végétales, sont des mélanges variables et complexes de substances volatiles aromatiques et parfumantes contenant principalement des terpénoïdes (principalement des mono- et sesquiterpènes bien que des diterpènes puissent être également présents), et des dérivés des acides gras (hydrocarbures aliphatiques de faible PM linéaires, ramifiés, saturés et insaturés, acides, alcools, aldéhydes, esters, lactones). Exceptionnellement, des composés azotés, soufrés, et phénoliques (dérivant de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes) peuvent être également présents (Lis-Balchin, 2002). La norme française, AFNOR NF T 75-006 (AFNOR, 1996), donne une définition aux HEs basée sur leur méthode d'obtention "produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche".

De très nombreuses espèces végétales produisent les HEs. Il en existe plus de 2000 espèces appartenant à environ 60 familles. Citons, à titre d'exemple, les Lamiacées, Astéracées, Rutacées, Myrtacées, Apocynacées, Apiacées, Géraniacées, Myrtacées, Rosacées, Rutacées, Pinacées, Cupressacées. Les HEs se retrouvent dans toutes les parties de la plante comme les fleurs (lavande, bergamote, jasmin, rose), les feuilles (lavande, citronnelle, laurier, romarin, sauge, sapin), les tiges (citronnelle, lemongrass), les racines (vétiver, angélique), les rhizomes (gingembre, acorus), le bois (santal), l'écorce (cannelier),

les fruits (bleuet, citron) et les graines (muscade, aneth). Les espèces productrices d'HE sont présentes dans toutes les régions climatiques du globe (Guenther, 1948).

### ***1.1.7.2. Historique et importance***

L'utilisation de substances odorantes de plantes est connu depuis l'antiquité et a été décrit par les plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient puis le nord de l'Afrique suivi de l'Europe (Franchomme & Pénéol, 1990). Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des HEs occupent une place de plus en plus importante. En 1928 le chimiste français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme 'aromathérapie' pour décrire les propriétés curatives des HEs lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main. En 1964, le docteur français Jean Valunet a connu un certain succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie avec des HEs. Aujourd'hui, nous reconnaissons que les HEs ont des effets thérapeutiques, psycho-actifs et physiologiques sur l'homme (Garneau, 2002).

L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage des HEs en médecine douce. Leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années (International Trade Centre, 1993) et les industries de la parfumerie, des arômes et de la cosmétique consomment des dizaines de milliers de tonnes par an de plantes à HEs (Bruneton, 1993).

En général, et étant donné que les HEs sont principalement des terpénoïdes, presque tout ce qui a été écrit sur l'importance commerciale et médicinale des terpénoïdes s'applique aux HEs. Les HEs étant des mélanges complexes de substances, elles sont douées d'effets biologiques variés comme, par exemple, des effets antiseptiques (antibiotiques), anti-inflammatoires, antihistaminiques, antioxydants, analgésiques, calmants, anti-anxiolytiques, sédatifs, antispasmodiques, diurétiques, laxatifs, antihypertenseurs, vasopresseurs, antipyrétiques. Certaines HEs sont dermocaustiques (agressive pour la peau) comme l'origan. D'autres sont photo-sensibilisantes comme celles des agrumes, et peuvent être irritantes, contenir des allergènes voire être toxiques. Par conséquent, il faut les utiliser avec grande précaution en respectant les règles de traitements.

### ***1.1.7.3. Méthode d'extraction***

L'HE représente de 0,1 à 3 % du poids sec des plantes aromatiques (Hassiotis, 2010). Une grande variété de méthodes d'extraction sont utilisées commercialement pour isoler les HEs à partir du matériel végétal. Les méthodes traditionnelles et commerciales utilisées pour extraire les HEs sont :



- L'Hydrodistillation (la distillation par l'eau) lors de laquelle le matériel végétal (feuilles ou inflorescences dans le cas des espèces de lavande) est immergé dans l'eau, le mélange hétérogène bouilli et l'HE volatilisée puis condensée. Les principaux composés volatils ne se dissolvent pas dans l'eau et l'HE peut être séparée par décantation après refroidissement dans un séparateur de phases (Bruneton, 1993 ; Paris & Moyses, 1976).
- L'entraînement par la vapeur d'eau (distillation à la vapeur d'eau) lors de laquelle l'eau est bouillie dans un récipient situé en dessous, et à une certaine distance, du matériel végétal à distiller. A son passage, la vapeur d'eau saturante entraîne l'HE des plantes vers un condenseur où elle est liquéfiée et séparée de l'eau comme lors de l'hydrodistillation (Bruneton, 1993 ; Paris & Moyses, 1976).
- L'Hydrodiffusion (percolation) est une modification du processus de l'entraînement par la vapeur d'eau au cours duquel la vapeur d'eau arrive par le haut d'un conteneur d'herbe, permettant ainsi à la vapeur de percoler à travers la matière végétale par gravité (Franchomme & Pénoël, 1990 ; Richard, 1992). Vapeurs d'huile et vapeurs d'eau sont ensuite condensées et séparées comme décrit ci-dessus.
- L'expression à froid au cours duquel des tissus végétaux très riches en HE sont comprimés pour en extraire l'HE. Ce procédé est principalement utilisé pour isoler les HEs à partir des épicarpes (zeste frais) des fruits de *Citrus*. Cette opération peut se faire à la main ou après scarifications mécaniques (Boucard & Serth, 1991).
- L'extraction directe des plantes par des solvants organiques volatils. Les solvants organiques sont ensuite retirés par distillation pour ne laisser que les substances végétales, un mélange alors appelé "concrète" et des essences dites "absolues". Ces extraits sont très utilisés en parfumerie (Boucard & Serth, 1991).
- l'enflourage qui est préféré sur les organes, ou composés, fragiles. Lors de ce processus, les tissus végétaux sont mis en contact avec un corps gras (axonge) pour le saturer en essences végétales. Le corps gras est ensuite épuisé par l'alcool absolu et ce solvant évaporé sous vide pour ne laisser que les substances végétales (Guillemain *et al.*, 1990).

Pour obtenir une HE naturelle et authentique, elle doit être isolée uniquement à partir de plante entière, ou partie de plante, d'origine taxonomique et géographique bien connues par des moyens physiques basés sur la volatilité des HEs. Les pharmacopées n'admettent que les deux premiers procédés de la liste établie ci-dessus (Paris & Moyse, 1976). La distillation à la vapeur et l'extraction par solvant sont par contre des méthodes très utilisées pour isoler les HEs commercialement. Les essences extraites d'une même plante par ces différentes méthodes n'ont pas exactement la même composition. Pendant l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité des tissus végétaux et la température peuvent provoquer la formation de produits indésirables, la destruction des produits labiles et des réarrangements chimiques (Lawrence, 1976). En dépit d'avantages apparents (efficacité d'extraction et pas de contact prolongé de la matière végétale avec l'eau en ébullition), l'entraînement à la vapeur d'eau à pression atmosphérique est une méthode susceptible d'introduire de nombreuses modifications des substances volatiles (Bruneton, 1993) notamment du fait de la surpression qui parfois règne à l'intérieur du système d'extraction (Richard & Multon, 1992). Par conséquent, le développement de méthodes d'extraction alternative avec une meilleure sélectivité et efficacité sont fortement souhaitables. Récemment, d'autres méthodes d'extraction ont été développées, telles que les headspace dynamique et statique, l'extraction par fluide supercritique et la micro-extraction en phase solide (SPME) (Ravid *et al.*, 1996 ; Milner *et al.*, 1997 ; An *et al.*, 2001 ; Kovacevic & Kac, 2001 ; Kim & Lee, 2002 ; Cavalli *et al.*, 2003 ; Sonboli *et al.*, 2004). Le fluide supercritique le plus largement utilisé est le CO<sub>2</sub> en raison de sa capacité à solubiliser les essences végétales, sa faible toxicité et son inertie chimique (Hawthorne *et al.*, 1993 ; Reverchon & Senatore, 1994 ; Fernandez-Perez *et al.*, 2000). Cependant, le CO<sub>2</sub> ne permet pas de dissoudre certains composés moyennement polaires comme les alcools, les esters, les aldéhydes et les cétones. Par contre, la technique de la micro-extraction en phase solide a été acceptée parce qu'elle est simple et peu coûteuse (An *et al.*, 2001 ; Kovacevic & Kac, 2001 ; Kim & Lee, 2002). Elle n'est cependant utilisée que pour analyser la composition chimique de l'HE. Tellez *et al.*, (2004) ont développé une nouvelle méthode impliquant simultanément la micro-extraction en phase solide combinée avec l'hydrodistillation continue de l'HE pour un suivi en continu du processus de distillation.

#### ***1.1.7.4. Méthodes d'analyses***

Vu l'importance industrielle des HEs, une analyse de leurs propriétés physiques et composition chimique est nécessaire pour les caractériser et les décrire. Les HEs sont généralement liquides à température ambiante et ont une odeur aromatique souvent due à

un ou plusieurs composés. Ceux-ci ont souvent un carbone asymétrique. Les deux énantiomères ont alors des odeurs différentes (Bauer *et al.*, 1990 ; Boelens & van Gemert, 1993 ;). Les HEs sont rarement colorées quand elles sont fraîches. Leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau (à l'exception de quelques essences comme celles du sassafras, du girofle et de la cannelle). Elles ont un indice de réfraction élevé et sont généralement douées de pouvoir rotatoire. Les HEs sont très peu solubles dans l'eau mais solubles dans l'alcool, l'éther, la plupart des solvants organiques et les huiles fixes (Paris & Moysse, 1976 ; Brunéton, 1993).

La détermination de la composition chimique des HEs est généralement réalisée par la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse ou l'infrarouge (GC/MS ou GC/IRFT) sur deux colonnes de polarité différente (Hedges & Wilkins, 1991). Les composés sont alors identifiés d'après leur indice de rétention et leur spectre de masse. Suite aux travaux innovants de Formáček et Kubečzka (1982), une troisième méthode consiste à identifier les composants individuels d'une HE sur la base d'un spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'HE, sans séparation préalable de ses constituants.

Pour permettre la séparation de deux énantiomères, la GC chirale est la méthode généralement utilisée. Différentes approches peuvent être distinguées: (a) l'injection directe du mélange dans la colonne chirale (l'identification nécessite souvent un système MS pour confirmer l'identité des pics), (b) la séparation sur colonne chirale des deux composés énantiomères purifiés au préalable par une technique chromatographique achirale (Casabianca & Graff, 1994) et (c) l'utilisation de la chromatographie gazeuse multidimensionnelle (MDGC) qui permet l'injection directe de l'échantillon dans le chromatographe; la première colonne achirale conduit à une pré-séparation des composés, qui sont transférés vers la deuxième colonne chirale en utilisant la technique coupe-cœur (heart-cutting, Bicchi & Pisciotta, 1990).

Les propriétés physiques et la composition chimique d'une HE sont déterminées dès leur obtention. Ces données seront utilisées pour authentifier une HE en vue de son exploitation industrielle.

#### ***1.1.7.5. Variation ecophysiologique de la composition d'une HE***

La quantité et la qualité des constituants d'une HE peuvent varier fortement selon un grand nombre de facteurs. Ceux-ci peuvent avoir une origine extrinsèque (écologique ou environnementale) ou intrinsèque (différentiation tissulaire, ontogénétique ou génétique) et peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'HE (Yamaura *et al.*,

1989 ; Figueiredo *et al.*, 1997). La composition chimique de l'HE peut varier au sein d'une même espèce (polymorphisme chimique). Cette variation peut être quantitative ou qualitative et des variants chimiques sont dits avoir des chémotypes différents s'ils diffèrent par des constituants majeurs. Le mot chémotype est synonyme de chimiotype ou chimiovariété. Deux chémotypes peuvent différencier deux populations différentes ou bien deux individus au sein d'une même population. Le polymorphisme chimique des HEs est omniprésent chez plusieurs espèces de plusieurs familles. Citons à titre exemple, *Artemisia herba-alba* (Salido *et al.*, 2004a), *Pinus halepensis* (Schiller & Grunwald, 1987), *Juniperus phoenicea* (Cavaleiro *et al.*, 2001), *Piper lanceaefolium* (Mundina *et al.*, 2001), *Chrysanthemum balsamita* (Marculescu *et al.*, 2001) et *Lychnophora ericoides* (Curado *et al.*, 2006). Les cas de "polychémisme" sont particulièrement abondants dans la famille des Lamiacées, caractérisées par des plantes productrices d'HEs (Lawrence, 1980). Citons, *Mentha citrata* (Murray & Lincoln, 1970), *Mentha spicata* (Kokkini & Vokou, 1989), *Origanum vulgare* (Vokou *et al.*, 1993), *Rosmarinus officinalis* (Granger *et al.*, 1973), *Salvia fruticosa* (Karousou *et al.*, 1998) ainsi que de nombreuses espèces du genre *Lavandula* (García-Vallejo *et al.*, 1992) et du genre *Thymus* (Granger & Passet, 1973 ; Adzet *et al.*, 1977 ; Sáez & Stahl-Biskup, 2002 ; Stahl-Biskup, 2002 ; Thompson, 2002). Il semble donc que les cas de polymorphismes chimiques intra-spécifiques soient assez courants dans le règne végétal. La certification botanique de l'espèce végétale doit précéder toute exploitation industrielle ou traditionnelle.

La régulation de la biosynthèse des HEs s'effectue principalement au niveau de l'activité des enzymes soit en contrôlant le nombre ou le fonctionnement catalytique, soit en modulant la quantité de substrat disponible. Cette régulation peut être spatiale dans le sens où tous les organes ne vont pas produire les mêmes composés dans les mêmes quantités. Elle peut aussi être temporelle puisque la production des composés peut être affectée par le développement des organes. La production est généralement abondante lors des stades précoces de développement d'un organe, reste relativement constante puis diminue durant sa sénescence (Harley *et al.*, 1998 ; Dudareva & Pichersky, 2000 ; Gershenzon *et al.*, 2000).

## I.2. LES TERPENE SYNTHASES

### I.2.1. Définition

La diversité des squelettes carbonés des terpènes est principalement liée à l'action d'une famille d'enzymes connue sous le nom de terpène synthases (TPS). Ces catalyseurs

convertissent des prényles diphosphates acyclique et le squalène en une multitude de formes cycliques et acycliques (Degenhardt *et al.*, 2009). De nombreux gènes de TPS ont été isolés de végétaux et microorganismes. Les trois premiers gènes isolés de TPS végétales sont l'épi-aristolochène synthase (sesquiTPS, Facchini & Chappell, 1992), la limonène synthase (monoTPS, Colby *et al.*, 1993) et la casbène synthase (diTPS, Mau & West, 1994). De nombreuses TPSs de plantes ont été clonées, séquencées et caractérisées dans différents organes d'Angiospermes et Gymnospermes. Récemment, Degenhardt *et al.* (2009) ont présenté une liste exhaustive de toutes les monoTPSs et sesquiTPSs clonées de différents organes d'Angiospermes et Gymnospermes jusqu'à 2008 inclus. Ces TPSs catalysent des réactions complexes en plusieurs étapes et sont capables de générer des centaines d'hydrocarbures et diverses structures oxygénés d'importance biologique et commerciale.

Bien que les TPSs génèrent des composés terpéniques très différents, elles partagent des propriétés catalytiques assez semblables (Alonso & Croteau, 1993), en exigeant un ion métallique comme seul cofacteur pour la catalyse et en fonctionnant par un mécanisme d'attaque électrophile comme le font les prényltransférases, un groupe d'enzymes qui leur est relié métaboliquement et évolutivement (Poulter & Rilling, 1978 ; Poulter & Rilling, 1981). La plupart des TPSs catalysent des réactions de cyclisation et sont donc aussi appelées terpène cyclases (Christianson, 2008). Étonnamment, la spécificité enzymatique de produit des TPSs peut varier considérablement. Des enzymes à haute fidélité telles que l'aristolochène synthase d'*Aspergillus terreus* génèrent un seul et unique produit, l'aristolochène (Felicetti & Cane, 2004). D'autres enzymes (et c'est généralement le cas) sont moins spécifiques et génèrent de multiples produits à partir d'un seul substrat. C'est, par exemple, le cas de la  $\gamma$ -humulène synthase qui génère 52 produits distincts parmi lesquels le  $\gamma$ -humulène est le produit majoritaire (28.6%) (Steele *et al.*, 1998). Généralement, les TPSs sont nommées sur la base du produit majoritairement formé. Etant donné que la plupart des TPSs forment de multiples produits à partir d'un seul substrat, et que ces produits sont souvent modifiés par l'action d'autres enzymes telles que les Cytochrome P450 (Schuler, 1996), le nombre de terpénoïdes existant dans un organisme donné est susceptible de dépasser le nombre de gènes de TPS en activité (Bohlmann & Keeling, 2008). Beaucoup de TPSs sont codées par des familles multi-géniques résultant de la duplication, et des fois la neofonctionnalisation, d'un gène ancestral (Facchini & Chappell, 1992 ; Back & Chappell, 1995 ; Chen *et al.*, 1995 ; Bohlmann *et al.*, 1998a). La Bryophyte, *Physcomitrella patens* possède un seul gène de TPS, la copalyl diphosphate

synthase/kaurene synthase (CDPS/KS), codant pour une enzyme bifonctionnelle produisant l'*ent*-kaurene, un précurseur biosynthétique des gibbérélines (Hayashi *et al.*, 2006). Le génome du Lycophyte, *Selaginella moellendorffii* contient par contre 18 gènes de TPS, et les génomes de certaines Angiospermes et Gymnospermes contiennent de 40 (*Arabidopsis* (Aubourg *et al.*, 2002) à 152 (*Vitis vinifera* (Martin *et al.*, 2010) gènes de TPS. Tous ces gènes ne sont pas fonctionnels et la plupart de ceux qui le sont présentent une activité très réduite (Chen *et al.*, 2011). Etant donné que cette thèse traite des monoTPSs et sesquiTPSs, ces deux classes de TPS sont décrites plus en détail.

## I.2.2. Structures

### I.2.2.1. Structures primaires

Les TPSs végétales sont en général d'une longueur de 600 à 900 résidus d'acides aminés (aa) (Chen *et al.*, 2011) et incluent un domaine C-terminal hébergeant le site actif et un domaine N-terminal sans activité connue (Cheng *et al.*, 2007). En général, les monoTPSs sont constituées de 600 et 650 aa et se différencient des sesquiTPSs par la présence d'un peptide N-terminal d'adressage au plaste (Bohlmann *et al.*, 1997 ; Bohlmann *et al.*, 1998a ; Turner *et al.*, 1999 ; Fischbach, 2001 ; Martin *et al.*, 2004). Ce peptide de transit, de 50 à 70 aa, riche en sérine et thréonine et pauvre en résidus acides, est vraisemblablement clivé juste en amont d'un motif "RRx8W" après entrée des TPSs dans le plaste. Ce dernier motif est essentiel pour catalyser la cyclisation des monoterpènes. Il est également présent, avec quelques variations, dans la plupart des sesqui- et des diTPSs (Whittington *et al.*, 2002 ; Hyatt *et al.*, 2007). Contrairement aux monoTPSs, les sesquiTPSs cytosoliques sont moins longues (550 à 580 aa) par manque du peptide de transit (Facchini & Chappell, 1992 ; Back & Chappell, 1995 ; Chen *et al.*, 1995 ; Crock *et al.*, 1997 ; Steele, 1998). Par contre, la plupart des diTPSs sont environ 210 aa plus longues que les monoTPSs en raison de la présence d'un élément interne supplémentaire qui est conservé en séquence et en position entre toutes les diTPSs (Sun & Kamiya, 1994 ; Bensen *et al.*, 1995 ; Stofer Vogel *et al.*, 1996 ; Wildung & Croteau, 1996 ; Yamaguchi *et al.*, 1996 ; Ait-Ali *et al.*, 1997) à l'exception de la casbène synthase (Mau & West, 1994 ; Prusic *et al.*, 2004 ; Bohlmann *et al.*, 1998a). Exceptionnellement, cette séquence interne est présente dans la (*E*)- $\alpha$ -bisabolène synthase et la linalol synthase, sesquiTPS du sapin grandissime et monoTPS de *Clarkia*, respectivement (Dudareva *et al.*, 1996). Aucune fonction n'est encore décrite pour cet élément et il peut constituer une caractéristique

ancestrale des TPSs de plantes et pointer vers l'origine commune de cette famille d'enzymes (Bohlmann *et al.*, 1998a).

Presque toutes les monoTPSs sont caractérisés par la présence d'un motif riche en arginine "RRx8W" qui est placé près de la partie N-terminale de la chaîne polypeptidique et se situe juste après le peptide de transit présumé (Bohlmann *et al.*, 1998a). Le motif RRx8W est en fait caractéristique des monoterpènes synthases des sous-familles TPSb (voir plus bas classification TPSs) d'Angiospermes et TPSd des Gymnospermes (Bohlmann *et al.*, 1998a, 1999 ; Aubourg *et al.*, 2002). Pendant la formation du monoterpène cyclique, (-)-4S-limonène, catalysée par la limonène synthase de *Mentha spicata*, l'élément double-Arg du motif RRx8W est impliqué dans l'étape de la migration du diphosphate pour donner le 3S-LPP, un intermédiaire réactionnel clé pour former des monoterpènes cycliques (Williams *et al.*, 1998). La caractéristique commune des monoTPSs de la sous-famille TPSg est l'absence du motif RRx8W, et, effectivement, se sont des monoTPSs qui produisent des monoterpènes acycliques.

Le motif structurel des TPSs le plus étudié est la région C-terminale riche en aspartate "DDxxD" trouvée pratiquement dans toutes les mono- et sesquiTPSs végétales ainsi que dans les isoprényl diphosphate synthases et les TPSs microbiennes. Des expériences de mutagenèse dirigée, ainsi que l'analyse structurale par les rayons X, ont révélé que cette région est impliquée dans la fixation des cations métalliques divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) qui à leur tour interagissent avec le groupement diphosphate du substrat (Ashby & Edwards, 1990 ; Tarshis *et al.*, 1994, 1996 ; Cane *et al.*, 1996a, 1996b ; Lesburg *et al.*, 1997 ; Stark *et al.*, 1997). La mutagenèse de l'un des trois aspartates de ce motif en Ala ou Glu a réduit l'activité catalytique d'au moins 1000 fois (Bohlmann *et al.*, 1998a). L'emplacement du motif DDxxD à l'entrée du site catalytique semble être critique dans le positionnement du substrat pour la catalyse. Le motif DDxxD est absent dans la (-)-copalyl diphosphate synthase (Aït-Ali *et al.*, 1997) qui contient à la place un autre motif riche en aspartate, DxDD. Certaines diTPSs telles que l'abietadiène synthase bifonctionnelle du sapin grandissime (Vogel *et al.*, 1996) et l'ent-copalyl diphosphate synthase du riz (Prisic *et al.*, 2004) contiennent les deux motifs DxDD et DDxxD. Un autre motif riche en acides aminés "NSE/DTE" (Cane & Kang, 2000 ; Rynkiewicz *et al.*, 2001) caractérise les TPSs de la classe I (voir plus bas classification TPSs) où il est également essentiel pour la fixation des cations métalliques divalents. Le motif "NSE/DTE" est l'abréviation de la séquence consensus **(N,D)D(L,I,V)x(S,T)xxxE** dans laquelle les résidus en gras sont souvent directement responsables de la fixation du cation divalent (Starks *et al.*, 1997 ; Cane &

Kang, 2000 ; Rynkiewicz *et al.*, 2001 ; Whittington *et al.*, 2002 ; Hyatt *et al.*, 2007 ; Shishova *et al.*, 2007). La formation de plusieurs produits pourrait également être renforcée par la présence du motif NSE/DTE (Degenhardt *et al.*, 2009). Alors que le motif DDxxD est hautement conservé dans presque toutes les TPSs des plantes, le motif NSE/DTE semble être moins bien conservé (Degenhardt *et al.*, 2009). Dans certaines sesquiTPSs, le motif NSE/DTE est remplacé par un second motif DDxxD (Steele *et al.*, 1998) qui a également été montré pour être impliqué dans la catalyse (Little & Croteau, 2002).

A Environ 35 acides aminés en amont du motif DDxxD on trouve un autre motif très conservé "RxR". Selon Stark *et al.* (1997), ce motif aide à diriger l'anion diphosphate loin du carbocation réactif après l'ionisation du substrat pour empêcher l'attaque nucléophile sur l'un des intermédiaires carbocationiques.

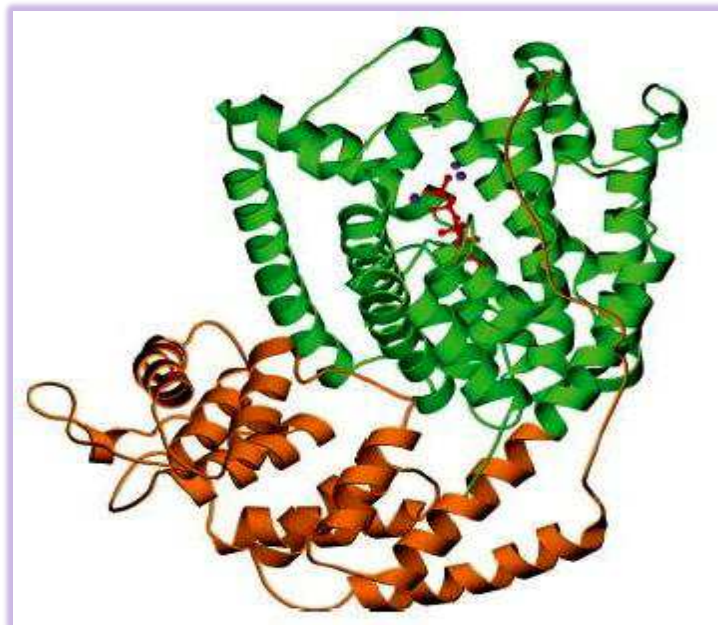
Un autre élément présent dans certaines TPSs est le motif LQLYEASFL. Ce motif est supposé faire partie du site actif (McGeady & Croteau 1995 ; Wise *et al.*, 1998).

### ***1.2.2.2. Structures tridimensionnelles***

Les structures cristallisées d'une sesquiTPS, l'épi-aristolochène synthase de *Nicotiana tabacum* (Starks *et al.*, 1997) et de trois monoTPSs, la bornyl diphosphate synthase de *Salvia officinalis* (Whittington *et al.*, 2002), la (4S)-limonène synthase de *Mentha spicata* (Hyatt *et al.*, 2007) et la 1,8-cinéol synthase de *Salvia fruticosa* (Kampranis *et al.*, 2007) sont disponibles et ont suggéré l'existence de deux domaines N- et C-terminaux. Elles révèlent que ces protéines ont toutes une structure tertiaire entièrement composée d'hélices- $\alpha$  reliées par de courtes boucles et coudes de connexion (Figure 7). Le domaine C-terminal possède une structure similaire à celles des TPSs fongiques et bactériennes (Lesburg *et al.*, 1997 ; Caruthers *et al.*, 2000 ; Rynkiewicz *et al.*, 2001 ; Christianson, 2006 ; Shishova *et al.*, 2007) et à celle des FPP synthases (Tarshis *et al.*, 1994) malgré l'absence de similarité de séquence, ce qui suggère l'existence d'un repliement commun des structures secondaires des TPSs et prényle transférases appelé 'terpene synthase fold' (Degenhardt *et al.*, 2009). Cette conservation du repliement du domaine C-terminal dans ces enzymes accompagnée d'autres caractéristiques communes comme le motif DDxxD et une fixation topologiquement identique des cations divalents, a conduit à la suggestion que ces deux familles d'enzymes ont évolué à partir d'un gène ancestral commun (Chen *et al.*, 1994 ; Christianson, 2006). Cependant, en dehors de la présence d'un court motif conservé lié à la fixation des cations métalliques (DDxxD), les similitudes de séquence entre les



TPSs sont dominées par les relations botanique des espèces indépendamment du substrat ou de la spécificité du produit (Bohlmann *et al.*, 1998a).



**Figure 7 : Diagramme en ruban de la limonène synthase cristallisée illustrant le domaine N-terminal (orange) et le domaine C-terminal du site actif (vert) (d'après Hyatt *et al.*, 2007)**

Le site actif des TPSs est une poche hydrophobe du domaine C-terminal. Il est formé par six hélices- $\alpha$  et est fermé vers l'extérieur par deux boucles qui sont situées à la surface de la protéine (Denghardt *et al.*, 2009). Ce site est organisé de manière à laisser la partie diphosphate du substrat à l'entrée du site catalytique où elle sera en contact avec le cation métallique ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  pour les enzymes d'Angiospermes et  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  pour certaines enzymes de Gymnospermes) catalysant la rupture de la liaison C-OP (Boeckelmann, 2008). Le domaine C-terminal catalyse la cyclisation du substrat ainsi que l'orientation et la stabilisation des multiples intermédiaires carbocationiques (Whittington *et al.*, 2002).

Le domaine N-terminal a une structure similaire aux noyaux catalytiques de certaines glycosyle hydrolases (Starks *et al.*, 1997). Peu d'éléments fonctionnels ont cependant été identifiés et ce domaine n'a pas de fonction clairement définie, bien que son extrémité N-terminale recouvre le site actif du domaine C-terminal au cours de la catalyse (Whittington *et al.*, 2002). Les résultats des analyses de mutations indiquent que ce domaine agit comme un échafaudage (scaffold) qui facilite le repliement correct du domaine C-terminal en configuration active (Köllner *et al.*, 2004).

### I.2.3. Classification

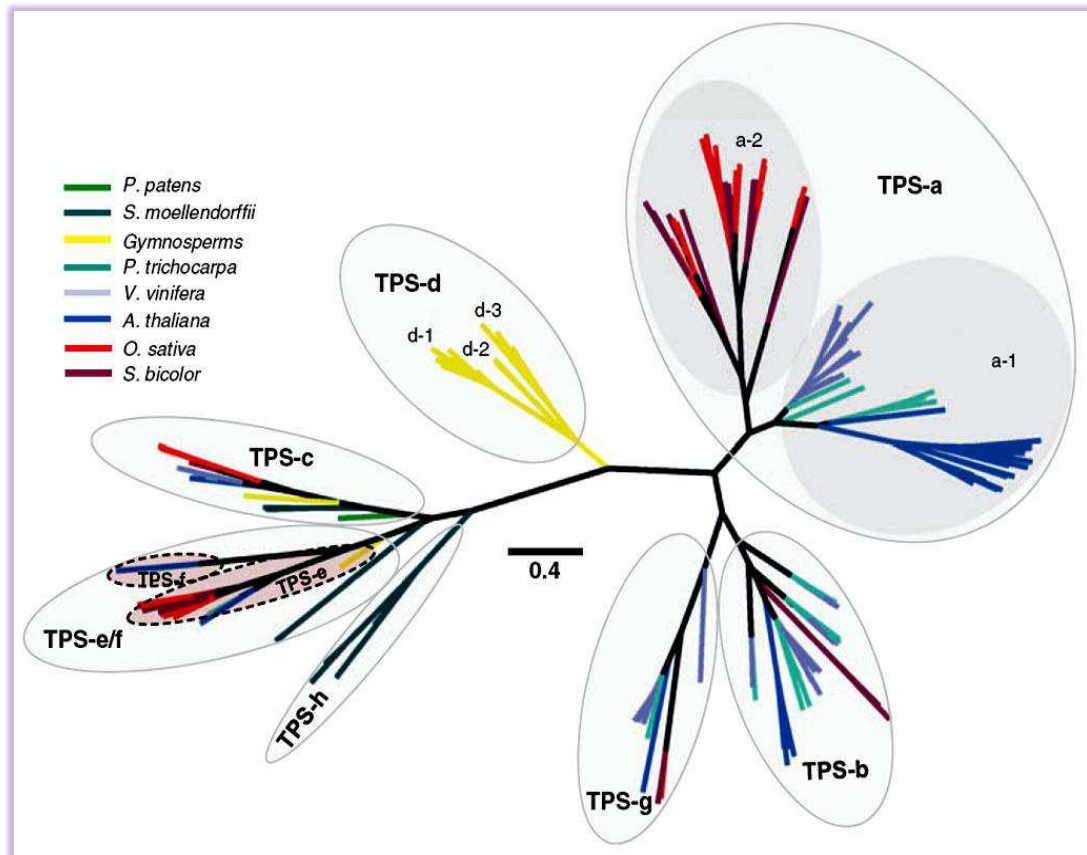
Plusieurs groupes de chercheurs ont suggéré que les TPSs végétales partagent une origine évolutive commune du fait de leur mécanisme réactionnel similaire, leurs caractéristiques structurales conservées, leurs similarités de séquences, la présence de motifs conservés et des nombres d'introns, et de tailles d'exons, similaires (Mau & West, 1994 ; Back & Chappell, 1995 ; Bohlmann *et al.*, 1998a ; Cseke *et al.*, 1998). En conséquence, plusieurs patrons de classifications des TPSs végétales ont été définis sur la base de ces critères.

#### I.2.3.1. Sous-familles (sous-groupes)

La comparaison des niveaux de similarité entre les séquences en aa a permis la subdivision de la famille des TPSs végétales en sous-familles, chaque sous-famille étant caractérisée par le partage d'un minimum de 40% de similarité entre ses membres. Initialement, cette classification fut composée de six sous-familles désignées TPSa à TPSf (Bohlmann *et al.*, 1998a).

Plus tard, Dudareva *et al.* (2003) ont isolé et caractérisé deux myrcène synthases et une (*E*)- $\beta$ -ocimène synthase des pétales du muflier (*Antirrhinum majus*). Ces monoTPSs du muflier ont été les membres fondateurs, avec l'enzyme AtTPS14 d'*Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2003), d'une nouvelle sous-famille, TPSg. Les membres de cette sous-famille ne possèdent pas le motif RRx8W, qui est un motif caractéristique et essentiel pour l'activité cyclase des monoTPSs, TPSd1 et TPSb (Savage *et al.*, 1994 ; Bohlmann *et al.*, 1998a, 1999 ; Aubourg *et al.*, 2002).

Très récemment, une nouvelle analyse cladistique reconnaît également sept sous-familles de TPSs, les anciennes, TPSa, b, c, d et g, une sous-famille e/f issue de la fusion des deux sous-familles originales TPSe et f, et une nouvelle sous-famille TPSh (Figure 8, Chen *et al.*, 2011). L'analyse phylogénétique des séquences suggère en effet que TPSf dérive évolutivement de TPSe. Ce sont les huit TPSs de *Selaginella moellendorffii* qui ont conduit à la création de la nouvelle sous-famille, TPSh car elles n'appartiennent pas aux sous-familles définies précédemment. A l'exception d'une seule de ces TPS, toutes contiennent l'un ou l'autre de ces deux motifs, "DxDD" et "DDxxD". La distribution fonctionnelle et taxonomique des sous-familles de TPSs végétales est résumée dans le Tableau 2.



**Figure 8 : Phylogénie générale des TPSs (d'après Chen *et al.*, 2011)**

Cette classification phylogénétique inclue les TPSs putatives en pléines longueurs de sept génomes séquencés de plantes (*Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* et *Sorghum bicolor*) et des TPSs caractérisées de Gymnospermes proviennent de plusieurs génomes.

**Tableau 2 : Distribution fonctionnelle et taxonomique des sous-familles de TPSs des plantes (d'après Chen *et al.*, 2011)**

Sous-famille	Groupe	Fonction*	Distribution
TPSa	TPSa1	SesquiTPS	Dicotylédones
	TPSa2	SesquiTPS	Monocotylédones
TPSb		MonoTPS, IspS	Angiospermes
TPSc		CDPS/KS, CDPS et autres DiTPS	Plantes terrestres
TPSd	TPSd1	surtout MonoTPS, SesquiTPS	Gymnospermes
	TPSd2	SesquiTPS	Gymnospermes
	TPSd3	surtout DiTPS, SesquiTPS	Gymnospermes
TPSe/f		KS, autres DiTPS, MonoTPS, SesquiTPS	Plantes vasculaires
TPSg		MonoTPS, SesquiTPS, DiTPS	Angiospermes
TPSh		DiTPS putative bifonctionnelle	<i>Selaginella moellendorffii</i>

\* CDPS, copalyle diphosphate synthase ; DiTPS, diterpène synthase ; IspS, isoprène synthase ; KS, kaurene synthase ; MonoTPS, monoterpène synthase ; SesquiTPS, sesquiterpène synthase.

En se basant sur les connaissances actuelles, les trois sous-familles, TPSa, TPSb et TPSg sont composées entièrement de gènes spécialisés pour la biosynthèse des mono-, sesqui- ou diterpènes exerçant des rôles dans les interactions écologiques des végétaux, plutôt que des rôles dans le métabolisme primaire végétal. La plupart des TPSs caractérisées de la sous-famille TPSa sont des sesquiterpène synthases (Chen *et al.*, 2011).

Cette sous-famille peut être divisée en deux groupes, TPSa1 et TPSa2, le premier étant spécifique des monocotylédones et le deuxième des dicotylédones. La sous-famille TPSb est aussi spécifique des plantes à fleurs (majoritairement des dicotylédones) et inclut des monoterpènes synthases et des isoprène synthases (Bohlmann *et al.*, 1998a ; Dudareva *et al.*, 2003). La sous-famille TPSg contient, comme mentionné ci-dessus, les monoterpènes synthases du muflier (Dudareva *et al.*, 2003), et la S-(+)-linalol synthase d'*Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2003). La sous-famille TPSd est composée de monoterpènes synthases de Gymnospermes (Bohlmann *et al.*, 1999 ; Martin *et al.*, 2004). Cette sous-famille est divisée à son tour en trois groupes, TPSd1, TPSd2 et TPSd3 sur la base de leurs similarités de séquences et de leur évaluation fonctionnelle (Martin *et al.*, 2004). Les membres de la sous-famille TPSf (linalool synthase de *Clarkia* et l'AtTPS04 [At1g61120 ; fonction inconnue] d'*Arabidopsis*) et les membres des sous-familles TPSe et TPSc (KS et CDPS, respectivement) ainsi que ceux de TPSd3 et TPSh contiennent un motif supplémentaire de 200 aa de fonction inconnue qui est absent des membres d'autres sous-familles (Bohlmann *et al.*, 1998a ; Trapp & Croteau, 2001b ; Aubourg *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2011). Les TPSs du métabolisme primaire, la CDPS (TPSc, Sun & Kamiya, 1994 ; Bensen *et al.*, 1995 ; Ait-Ali *et al.*, 1997) et la KS (TPSe, Yamaguchi *et al.*, 1996), ne sont que lointainement liées aux TPSs du métabolisme secondaire comme celles des sous-familles TPSa, TPSb et TPSd (Bohlmann *et al.*, 1998a). Jusqu'à présent tous les 8 membres de la sous-famille TPSh sont des diTPSs appartenant à l'espèce *S. moellendorffii* (Chen *et al.*, 2011).

### 1.2.3.2. Classes

L'organisation génomique (le nombre, la taille, le positionnement des introns, et le nombre et la taille des exons) des gènes de TPSs des Gymnospermes et d'Angiospermes a permis de les répartir en trois classes distinctes (Trapp & Croteau, 2001b). La classe I comprend les gènes des di- et sesquiTPSs des conifères et les gènes des diTPSs des Angiospermes spécifiquement impliqués dans le métabolisme primaire. Les gènes de TPSs de cette classe possèdent 11-14 introns et 12-15 exons de taille caractéristique. La classe II comporte les mono- et les sesquiTPSs des conifères. Ceux-ci contiennent 9 introns et 10 exons. La classe III comporte les mono-, sesqui-, et diTPSs des Angiospermes impliquées dans le métabolisme secondaire. Leurs gènes contiennent 6 introns et 7 exons.

Les Gènes des TPSs de la classe I possèdent également le domaine N-terminal conservé de 200 aa de fonction inconnue (Bohlmann *et al.*, 1998a,b) codé par les exons 4,

5 et 6, tandis que les autres gènes des deux autres classes sont dépourvus de ce domaine (et des exons 4, 5 et 6). Certains introns des gènes de TPS de la classe III (introns 3, 8, 11-14) sont conservés chez tous les gènes de TPS de plantes. Cependant, les gènes de cette classe et ceux de la classe II ont respectivement perdu les introns 1, 2, 7, 9 et 10 et les introns 1 et 2. Ces événements de perte séquentielle d'introns et d'exons internes suggèrent que le gène de TPS ancestral ressemblait à un gène actuel de diTPS de conifère et contenait au moins 12 introns et 13 exons (Trapp & Croteau, 2001).

Basé sur leurs mécanismes réactionnels et les produits formés, les TPSs de plantes peuvent être réparties aussi en deux classes : classe I et classe II, la CDPS étant la représentante de la classe II des TPSs. Cette dernière catalyse la formation du copalyl diphosphate (CPP) à travers la cyclisation induite par la protonation du GGPP. Cependant, les TPSs de plantes les plus courantes sont des TPSs de la classe I (Chen *et al.*, 2011). Dans l'étape initiale de la réaction enzymatique catalysée par les TPSs de la classe I, le prényl diphosphate est ionisé (formations d'un carbocation intermédiaire) par départ du groupement pyrophosphate. Une caractéristique étonnante des TPSs de cette classe est qu'une seule enzyme génère souvent de multiples produits à partir d'un seul substrat (Steele *et al.*, 1998 ; Christianson, 2006 ; Degenhardt *et al.*, 2009). L'activité des TPS de la classe I réside dans le domaine C-terminal et inclut les motifs "DDxxD" et "NSE/DTE" pour l'ionisation métal-dépendante du substrat prényl diphosphate. Cependant, l'activité des TPSs de classe II réside dans des domaines séparés et utilise le motif "DxDD" pour la cyclisation initiée par protonation du GGPP en CPP (Chen *et al.*, 2011).

#### I.2.4. Mécanismes réactionnels

Toutes les TPSs ont des propriétés assez semblables (Alonso & Croteau, 1993), et toutes fonctionnent par des mécanismes de réaction électrophile similaires à celui des prényltransférases (Poulter & Rilling, 1978 ; Poulter & Rilling, 1981). Mécanistiquement, les TPSs libèrent le groupe diphosphate du substrat isoprényle diphosphate (TPS classe I), ou dans certains cas protonent le GGPP (TPS classe II), pour générer un intermédiaire carbocationique très réactif au sein du site catalytique de l'enzyme (Starks *et al.*, 1997 ; Wise & Croteau, 1999 ; Christianson, 2006). Une telle activité est dépendante d'un cation métallique divalent qui déclenche le départ du groupe diphosphate du substrat, généralement le GPP, le FPP, ou le GGPP (Cane, 1999 ; Wise & Croteau, 1999 ; Davis & Croteau, 2000). Du fait de la forte réactivité des carbocations intermédiaires, les TPSs catalysent des isomérisations spécifiques, des réarrangements divers, des cyclisations (et

éventuellement des cyclisations secondaires) et enfin l'élimination d'un proton ou l'ajout d'une molécule d'eau pour stabiliser l'intermédiaire carbocationique et donner la large gamme de squelettes carbonés de terpénoïdes trouvés chez les plantes (Lesburg *et al.*, 1997 ; Starks *et al.*, 1997 ; Cane, 1999 ; Wise & Croteau, 1999 ; Davis & Croteau, 2000 ; Whittington *et al.*, 2002). La fonction la plus critique d'une TPS est de fournir la surface physicochimique nécessaire pour orienter le(s) substrat(s) souple(s) isoprénoïdique(s) dans le bon sens et avec la bonne conformation pour que, lors de la génération du premier intermédiaire carbocationique, une trajectoire spécifique de formation de liaison(s) carbone-carbone intermoléculaire(s), ou intramoléculaire(s), soit appliquée (Christianson, 2008). Dans ces réactions, cependant, la trajectoire initiale de formation de liaison carbone-carbone intramoléculaire est favorisée (Christianson, 2008). Il y a des enzymes de TPSs qui catalysent la formation d'un seul composé terpénique, "TPS à un produit". Mais la plupart des TPSs ont la capacité étonnante de synthétiser des mélanges de produits complexes à haute régio- et stéréospécificité "TPS à multiples produits" (Croteau, 1987 ; Cane, 1990). Dans ce qui suit, nous nous concentrerons principalement sur les mono- et sesquiTPSs, mais avec quelques mentions sur les diTPSs. Le fonctionnement des enzymes impliquées dans la production de triterpènes, tétraterpènes et polyterpènes n'est pas décrite.

Presque toutes les monoTPSs sont capables de catalyser les réactions d'isomérisation et de cyclisation du substrat, étapes qui nécessitent des interactions avec les cations divalents présents sur le même site actif (Croteau, 1987). Le linalyl diphosphate (LPP) est l'intermédiaire catalytique proposé pour la cyclisation des monoterpènes (Wise & Croteau, 1999). Dans ce cas, une ionisation (métal-dépendante) et une isomérisation préliminaire du précurseur GPP au (3*R*)- ou (3*S*)-LPP (selon le repliement (folding) initial du substrat) est nécessaire pour surmonter l'obstacle géométrique de cyclisation imposé par la double liaison 2,3-*trans* du GPP (Figure 9A). Après la formation de l'LPP, une rotation autour de la liaison C2-C3 pour fournir la configuration *cis* et une ionisation en C1 sont capitales pour initier la cyclisation C6-C1 pour produire le cation  $\alpha$ -terpinyle (intermédiaire universel initial critique dans la formation de tous les monoterpènes cycliques). Les squelettes bicycliques des monoterpènes sont générés à partir de cet intermédiaire par attaque nucléophile interne de la double liaison restante sur le carbocation (Figure 9A) (Hyatt, 2007). La formation du limonène et du terpinolène suit le chemin catalytique cyclisant le plus court car la réaction de cyclisation est directement suivie d'une réaction de déprotonation du cation  $\alpha$ -terpinyle (Rajaonarivony *et al.*, 1992 ; Colby *et al.*, 1993 ; Yuba *et al.*, 1996 ; Bohlmann *et al.*, 1997, 1999). Cependant, la formation des monoterpènes

acycliques (Figure 9B) n'exige pas nécessairement l'isomérisation du GPP en LPP, mais peut se produire directement par stabilisation du cation géranyle. Le cation géranyle subit alors une déprotonation pour donner, par exemple, le (*E*)- $\beta$ -ocimène (Chen *et al.*, 2003 ; Dudareva *et al.*, 2003 ; Fäldt *et al.*, 2003 ; Arimura *et al.*, 2004b) ou le myrcène (Fischbach *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2003 ; Dudareva *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2004 ; Bohlmann *et al.*, 1997, 2000). Le géranyl cation peut également subir une addition d'une molécule d'eau pour former le géranol (Iijima *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2005) ou le linalol (Dudareva *et al.*, 1996 ; Jia *et al.*, 1999 ; Crowell *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2003 ; Aharoni *et al.*, 2004 ; Martin *et al.*, 2004). Cependant, il est également concevable que le linalol, le myrcène et le (*E*)- $\beta$ -ocimène proviennent aussi du cation linalyle (Figure 9B) (Degenhardt *et al.*, 2009).

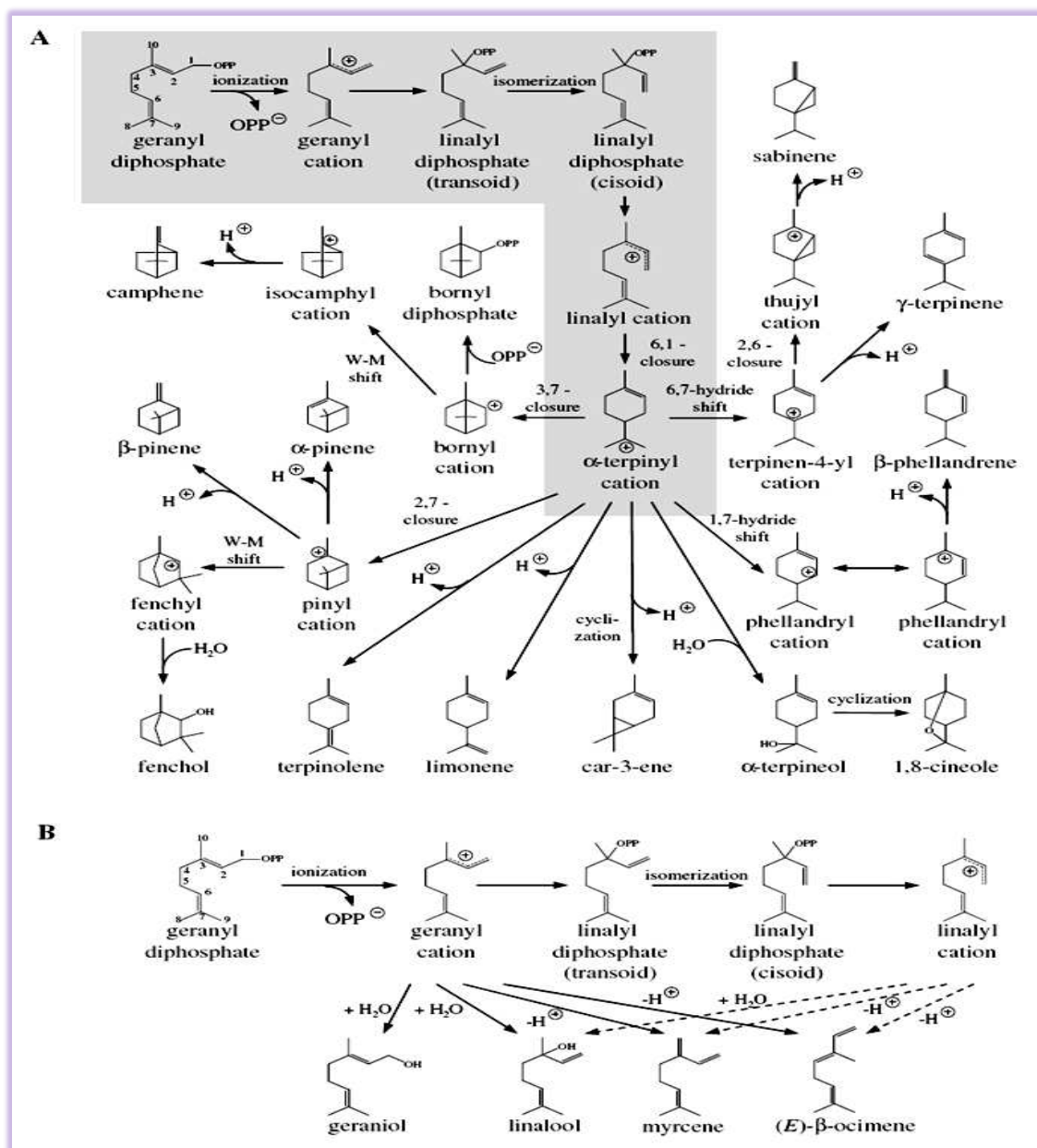
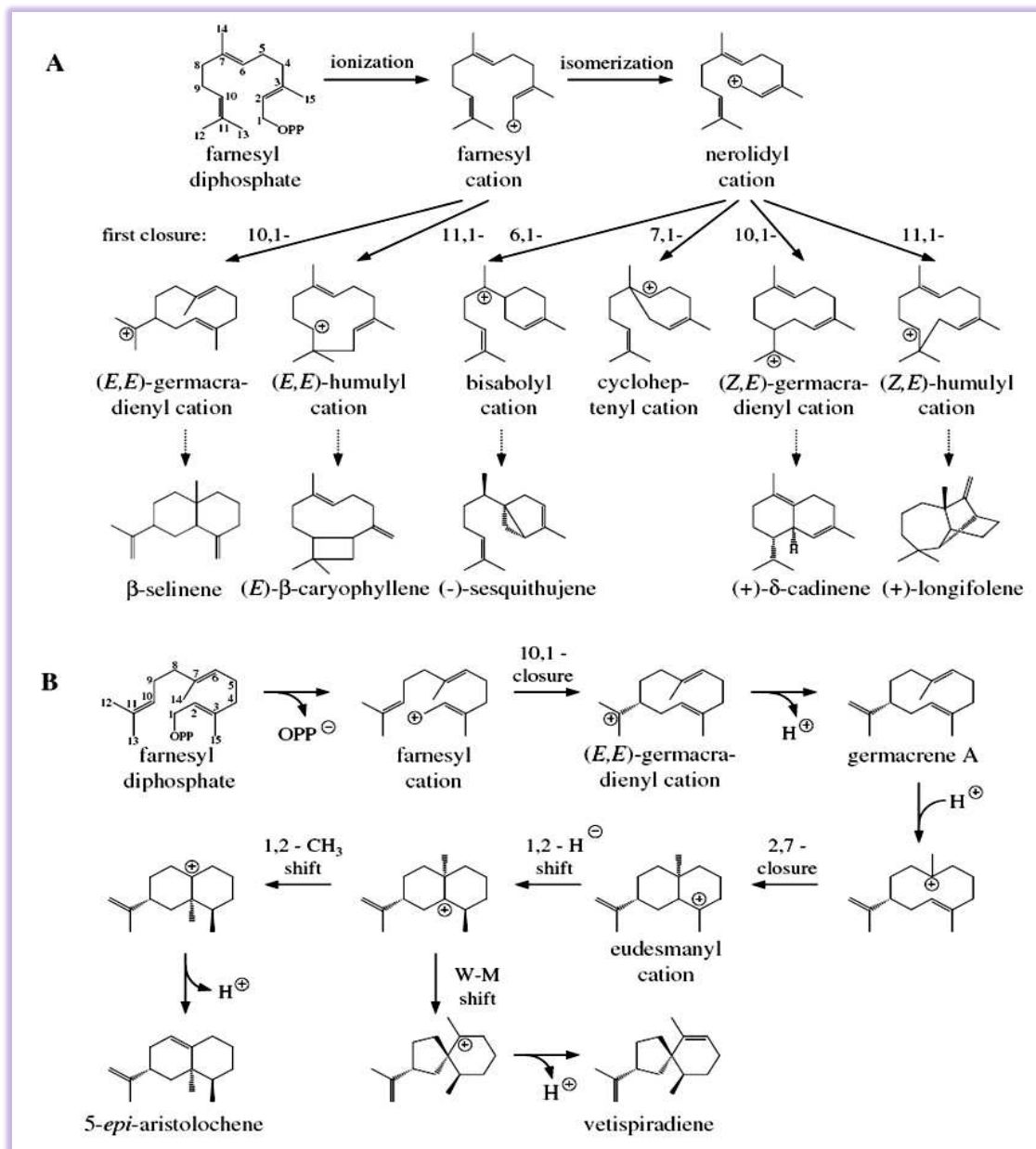


Figure 9 : Mécanismes réactionnels des monoTPSs cycliques (A) et des monoTPSs acycliques (B) initiés par l'ionisation du substrat GPP (d'après Degenhardt *et al.*, 2009)

Les sesquiTPSs catalysent la formation des sesquiterpènes à partir du FPP (Figure 10). Leurs mécanismes réactionnels sont similaires à ceux des monoTPSs et sont basés sur la formation d'intermédiaires carbocationiques. Cependant, le large squelette carboné du FPP (5 carbones de plus) et la présence de trois, et non deux, doubles liaisons augmente considérablement le nombre de cyclisations possibles et donc la diversité structurale des sesquiterpènes. Les réactions initiales de cyclisation peuvent être divisées en deux types (Figure 10A). Un type implique une cyclisation du farnésyl cation initialement formé en cation (*E,E*)-germacradiényle (cycle à 10 carbone) ou en cation (*E*)-humulyle (cycle à 11 carbone). Étant donné la grande taille de ces cycles, la (*E*)-géométrie de la double liaison C2-C3 n'est plus un obstacle pour la cyclisation. Le deuxième type de cyclisation se produit après l'isomérisation préliminaire de la double liaison C2-C3 pour donner le cation nérolidyle, en analogie directe avec l'isomérisation du GPP au cation linalyle dans le mécanisme réactionnel des monoTPSs (Cane & Iyengar, 1979 ; Cane *et al.*, 1981 ; Cane & Yang, 1994 ; Cane & Tandon, 1995 ; Alchanati *et al.*, 1998). Sous sa configuration *cis*, le cation nérolidyle peut subir une attaque cyclisante par la double liaison centrale ou distale pour former les intermédiaires, cation 1,6-bisabolyle, cation 1,7-cyclohéptanyle, cation 1,10-(*Z,E*)-germacradiényle ou cation 1,11-(*Z,E*)-humulyle (Figure 10A). La diversité des sesquiterpènes s'appuie également sur des cyclisations supplémentaires qui peuvent impliquer l'attaque électrophile du carbocation sur l'une des deux autres doubles liaisons donnant une large gamme de squelettes carbonés. En plus du phénomène de cyclisation, les sesquiTPSs peuvent catalyser plusieurs types de réarrangements de l'intermédiaire carbocationique similaires à ceux observés avec les monoTPSs, y compris des contractions de cycles (Back & Chappell, 1995 ; Martin *et al.*, 2004), des déplacements d'hydrure, des migrations de méthyle (Tholl *et al.*, 2005) et/ou des réarrangements de Wagner-Meerwein. L'intermédiaire carbocationique est finalement aussi stabilisé soit par une déprotonation soit par une fixation (capture nucléophile) d'une molécule d'eau (Degenhardt *et al.*, 2009). La production de sesquiterpènes acycliques tels que l' $\alpha$ -farnésène se produit par déprotonation du FPP directement après sa première ionisation.



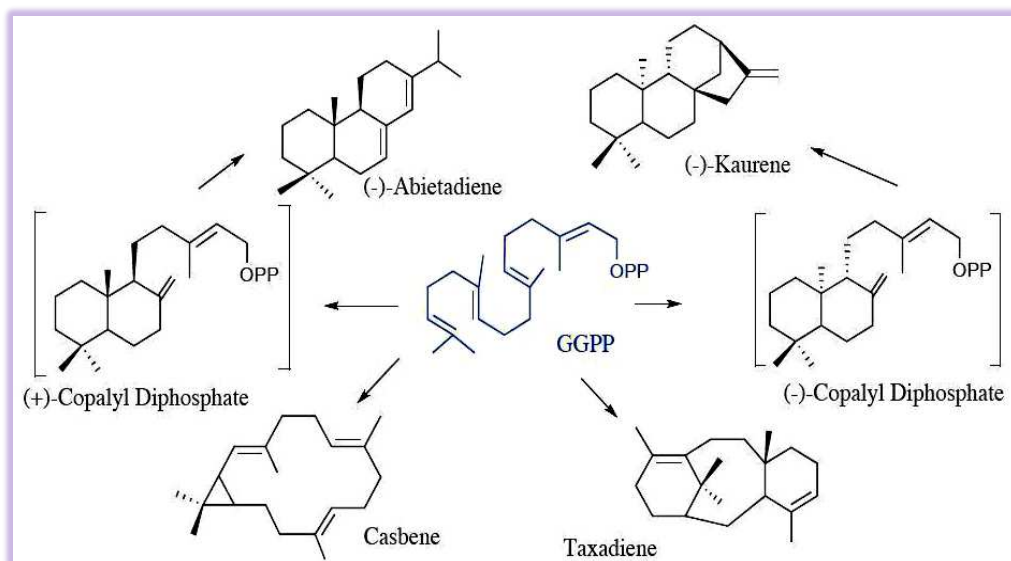


**Figure 10 : Mécanismes réactionnels des sesquiterpènes initiés par l'ionisation du substrat FPP (d'après Degenhardt *et al.*, 2009)**

Le carbocation résultant de la perte du groupement pyrophosphate peut suivre plusieurs chemins réactionnels et potentiellement subir une gamme de cyclisations, dont certaines sont précédées par l'isomérisation d'un intermédiaire, le nerolidyl cation (A). Le mécanisme de réaction de la 5-*epi*-aristolochène synthase s'effectue via un intermédiaire neutre, le germacrène A, qui est re-protoné pour former des produits de réaction bicycliques (B). La numérotation des atomes de carbone des produits et intermédiaires se réfère à celle du FPP.

Les diTPS catalysent la formation d'une variété de produits linéaires, mono- et polycycliques depuis le précurseur GGPP à 20-carbones (West, 1981). Les réactions de biosynthèse des diterpènes, comme celles des mono- et des sesquiterpènes, peuvent être initiées par le départ du groupement diphosphate suivi de la formation d'un carbocation et de ses éventuels réarrangements (attaque électrophile de doubles liaisons, déplacements d'hydrures, migrations de méthyles, réarrangements de Wagner-Meerwein). Les diterpènes

macrocycliques, comme le casbène (Dueber *et al.*, 1978), le cembrène (Guo & Wagner, 1995) et le taxadiène (Koepp *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 1996) sont formées par des cyclisations analogues à celles des mono- et sesquiterpènes (Figure 11). Cependant, le fonctionnement catalytique des diTPS peut être également initié par un mécanisme de protonation du GGPP suivi de mécanismes de réarrangement et de stabilisation du carbocation similaires à ceux des mono- et sesquiTPSs. Le groupement pyrophosphate n'étant pas affecté lors de ce type de catalyse, les produits formés le possèdent toujours. Lors de la biosynthèse du (-)-kaurène (Figure 11), précurseur des hormones végétales de la classe des gibbérellines, la (-)-CDPS catalyse la cyclisation du GGPP en (-)-CPP par un mécanisme de protonation-déprotonation (Sun & Kamiya 1994 ; Ait-Ali *et al.*, 1997). Lors d'une deuxième étape, une autre enzyme, la KS (Yamaguchi *et al.*, 1996) transforme cet intermédiaire ((-)-CPP) en (-)-kaurène via un mécanisme d'ionisation par perte du groupement pyrophosphate puis de cyclisation (Figure 11) (Duncan & West 1981 ; Railton *et al.*, 1984).



**Figure 11 : Biosynthèse des diterpènes impliquant l'ionisation et la cyclisation direct du GGPP, et la cyclisation préliminaire en CPP par protonation de la double liaison terminale (modifier d'après Bohlmann *et al.*, 1998)**

### I.2.5. Expression et régulation

Les terpénoïdes sont impliqués dans plusieurs fonctions écologiques et physiologiques. Leur profil d'accumulation est ainsi modifié au cours du développement des plantes et en réponse aux stress biotiques et abiotiques de l'environnement pour répondre aux besoins de la plante. Dans la majorité des cas, les variations des profils

d'accumulation sont directement la résultante de variations des profils d'expression des gènes de TPSs (Tholl, 2006). La régulation de la biosynthèse des terpénoïdes des plantes est complexe et s'inscrit en général sous deux grandes catégories, un contrôle spatial, tissulaire, et un contrôle temporel, ontogénique ou suite à un stress (McGarvey & Croteau, 1995).

#### ***1.2.5.1. Régulation spatiale***

La biosynthèse des terpènes chez les plantes est communément plus abondante au niveau de structures histologique spécifiques où de grandes quantités de terpénoïdes hydrophobes sont produites, accumulées et éventuellement sécrétés ou émis (voir section sites de biosynthèse). Les terpènes volatils sont souvent émis depuis un des tissus floraux au moment le plus opportun pour attirer les pollinisateurs. Par exemple, Dudareva *et al.* (2003) ont démontré que la biosynthèse et l'émission du (*E*)- $\beta$ -myrcène et de l'ocimène depuis les fleurs du muflier (*Antirrhinum majus*) sont en corrélation avec les expressions spécifiques des gènes des monoTPSs correspondantes dans les lobes supérieurs et inférieurs des pétales durant le grossissement du bouton floral. Le linalol, impliqué dans l'attraction des pollinisateurs chez *Clarkia breweri*, est produit principalement dans les pétales de la fleur (Pichersky *et al.*, 1994). Les caroténoïdes sont produits dans les chromoplastes des fruits de poivrons rouges (*Capsicum anuum*) lors de la maturation (Camara & Brangeon, 1981 ; Bartley & Scolnik, 1995).

#### ***1.2.5.2. Régulation temporelle***

Les régulations circadienne et développementale de l'émission des terpénoïdes volatils ont été rapportées chez différentes espèces (Lu *et al.*, 2002 ; Aharoni *et al.*, 2003 ; Dudareva *et al.*, 2003). La composition et le taux d'émission des composés volatils émis par les fleurs et les feuilles (dont ceux dont la production est induite par des herbivores) varient sensiblement en fonction de la photopériode (Paré & Tumlinson, 1997a, b ; de Moraes *et al.*, 2001 ; Aharoni *et al.*, 2003 ; Dudareva *et al.*, 2003 ; Arimura *et al.*, 2004a). Ils présentent un rythme journalier avec des maxima coïncidant avec l'activité des pollinisateurs potentiels (Jakobsen *et al.*, 1994 ; Helsper *et al.*, 1998 ; Kolosova *et al.*, 2001) ou l'activité alimentaire des ravageurs (Dudareva *et al.*, 2004). Chez *Artemisia annua*, l'émission du  $\beta$ -pinène fluctue en fonction du rythme jour-nuit et est généralement plus élevée dans la journée que dans la nuit (Lu *et al.*, 2002). L'expression des gènes de monoTPSs du muflier cités ci-dessus suit également un cycle journalier contrôlé par une

horloge circadienne ou régulée par la lumière (Kolosova *et al.*, 2001 ; Dudareva *et al.*, 2004). Outre cette régulation rythmique, la production des terpénoïdes à des taux élevés est aussi déclenchée par les dommages provoqués sur les membranes comme les blessures mécaniques ou la présence de pathogènes. Huber *et al.* (2004) proposent que l'herbivorie puisse provoquer des changements biochimiques permanents dans la voie de biosynthèse des terpénoïdes et dans l'expression des gènes des TPSs. Les monoterpènes et les sesquiterpènes émis en tant que volatils contribuent aux défenses indirectes contre les herbivores, alors que les diterpènes et quelques sesquiterpènes fournissent une protection directe à travers la formation de phytoalexines (Phillips & Croteau, 1999). Quelques gènes de TPSs responsables de l'émission des terpènes induits par les herbivores sont connus chez plusieurs espèces d'Angiospermes (Shen *et al.*, 2000 ; Schnee *et al.*, 2002 ; Fäldt *et al.*, 2003 ; Arimura *et al.*, 2004a, b).

Dans presque tous les aspects du développement et de la physiologie des tissus végétaux, des facteurs de transcription jouent un rôle majeur dans la régulation de la biosynthèse des terpénoïdes (van der Fits & Memelink, 2000 ; Xu *et al.*, 2004). Il a été démontré que la régulation de l'expression des TPSs était principalement transcriptionnelle (Tholl, 2006). De bonnes corrélations ont également été mesurées entre la composition des HEs et les concentrations relatives, et absolues, des transcrits des TPSs chez différentes lignées d'*Origanum vulgare* (Crocoll *et al.*, 2010). Les facteurs de transcription "WRKY" sont impliqués dans de nombreux processus dont les réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Eulgem *et al.*, 2000 ; Zhang & Wang, 2005). Chez le coton, l'élément boîte-W (W-box) de la fixation du facteur de transcription "WRKY" est présent dans le promoteur du gène de la (+)- $\delta$ -cadinène synthase-A (*CADI-A*). Le facteur WRKY du coton, *GaWRKY1* a été repéré comme régulateur de l'expression de *CADI-A*. Il participe également à la régulation de biosynthèse des sesquiterpènes aldéhydes comme le gossypol (Xu *et al.*, 2004). Les éléments boîte-W, ont également été identifiés dans les promoteurs des gènes de TPSs chez d'autres plantes, y compris la 5-épi-aristolochène synthase du tabac (Yin *et al.*, 1997) et des gènes putatifs des TPSs d'*Arabidopsis* et le riz (Xu *et al.*, 2004). Les analyses d'expression des gènes de TPSs d'autres plantes en combinaison avec leurs analyses fonctionnelles ont indiqué que ces TPSs sont régulées aussi par des mécanismes post-transcriptionnel et/ou post-traductionnel. Dans les feuilles de peuplier, la régulation saisonnière des émissions d'isoprène semble, en partie, être contrôlée au niveau post-traductionnel car les taux de protéines sont élevés tout au long de l'année bien que l'activité enzymatique diminue significativement au cours de l'automne

(Mayrhofer *et al.*, 2005). La biosynthèse de terpènes semble donc être complexe et régulée à différents niveaux selon les espèces et les synthases concernées.

### I.2.6. Evolution

Les informations disponibles à ce jour suggèrent que l'évolution des TPSs est rapide et conduit à une modification du nombre de copies de gènes et à une modification des produits formés (Trapp & Croteau, 2001b ; Aubourg *et al.*, 2002 ; Sharkey *et al.*, 2005). La comparaison des séquences et des mécanismes réactionnels des trois premières TPSs clonées et caractérisées chez les plantes, la limonène synthase (monoTPS, Colby *et al.*, 1993), l'épi-aristolochène synthase (sesquiTPS, Facchini & Chappell, 1992), et la casbène synthase (diTPS, Mau & West, 1994) a rapidement révélé que ces gènes sont liés bien qu'originaires d'espèces végétales phylogénétiquement éloignées. Cette conclusion a été soutenue par l'analyse génomique très limitée portant sur le nombre et l'emplacement des introns (Mau & West 1994 ; Back & Chappell 1995 ; Chappell, 1995a, 1995b). L'hypothèse actuelle basée sur l'arbre phylogénétique précédent (voir sous-familles des TPSs) suggère que les TPSs végétales impliquées dans le métabolisme secondaire ont une origine ancestrale commune à partir d'une TPS impliquée dans le métabolisme primaire. Ce modèle actuel de l'évolution de TPSs a été soutenu par Trapp et Croteau, (2001b) suite à leur analyse de l'organisation génomique de TPSs. En accord avec leur origine commune, toutes les TPSs des Gymnospermes et des Angiospermes qui partagent une structure d'ensemble commune sont dérivées d'une TPS ancestrale à trois domaines qui ressemble à l'abietadiène synthase des Gymnospermes (qui à son tour ressemble à la CDPS/KS de *P. patens*, Chen *et al.*, 2011). Cette évolution a eu lieu avant la séparation des Angiospermes et des Gymnospermes (Bohlmann *et al.*, 1998a ; Trapp & Croteau, 2001b), il y a environ 300 millions d'années (Doyle, 1998).

L'analyse phylogénétique des séquences de TPSs suggère que la diTPS associée à la biosynthèse des gibbérellines, ainsi que celles liées à la biosynthèse des diterpénoïdes antibiotiques, chez les plantes, les champignons et les bactéries partagent probablement une origine évolutive commune (Morrone *et al.*, 2009). Cette analyse indique en effet que la CDPS et la KS des Gymnospermes et Angiospermes sont issues de la duplication d'un gène CDPS/KS ancestral suivi d'une néofonctionalisation qui a impliqué la perte d'activité d'un de ces domaines dans un gène et la perte de l'autre domaine dans l'autre copie de gène (Keeling *et al.*, 2010). Les variations de la structure à trois domaines dans les nombreuses enzymes bien caractérisées de la famille des TPSs végétales peuvent être expliquées par la

perte d'un domaine particulier comme pour la KS ou la CDPS ou par la perte d'activité associée à un domaine particulier dans les différentes lignées évolutives de TPSs. Ces variations expliquent également la longueur variable des TPSs végétales d'environ 600 à 900 acides aminés.

Il est probable également que les TPSs ancestrales étaient moins spécialisées fonctionnellement que les enzymes modernes et qu'elles étaient capables d'utiliser plusieurs prényl diphosphate comme substrat pour la production de terpènes multiples. La transformation d'une diTPS en sesquiTPS implique non-seulement un changement de spécificité de substrat, mais aussi un changement de localisation subcellulaire par la perte du peptide de transit chloroplastique. L'évolution de certaines FPP synthases semble par contre avoir conduit à la formation d'enzymes capables de former des terpènes irréguliers (Hemmerlin *et al.*, 2003b ; Rivera *et al.*, 2001).

### **I.2.7. Expression hétérologue**

En raison du manque apparent de corrélation entre la structure primaire et la fonction des TPS, il n'est pas possible de prédire l'aptitude catalytique d'une TPS uniquement sur la base de la parenté de séquence. Ainsi, par exemple, les monoTPSs qui partagent 70-90 % d'identité en aa peuvent générer des produits très distincts, alors que des synthases ne partageant que 30 % d'identité en aa peuvent catalyser la même réaction de cyclisation (Bohlmann *et al.*, 1997). La simple comparaison des séquences avec les TPSs existantes sur les banques de gènes permet uniquement le placement d'une nouvelle séquence dans l'une des sept sous-familles de gènes de TPSs végétales mais ne permet pas la prédiction des produits qu'elle forme, et des fois même le substrat qu'elle utilise. L'analyse du polypeptide produit de manière hétérologue dans *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* en présence des divers substrats prényl diphosphate possibles (GPP, FPP ou GGPP) est pour l'instant le moyen le plus sûr de déterminer les spécificités de substrat et produit d'une TPS.

## **I.3. LE GENRE *LAVANDULA* L.**

Le genre *Lavandula* est l'un des plus importants genres de la famille des Lamiacées (Labiées, qui signifie "labié" en référence à la forme des lèvres des fleurs). Les Lamiacées constituent une large famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 7200 espèces et près de 236 genres répartis en 7 ou 8 sous-familles. Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, des arbustes et très rarement des arbres ou des lianes, largement répandus autour du

monde mais particulièrement dans les régions tempérées et méditerranéennes. Pour la plupart des genres, la section carrée de la tige, les feuilles opposées, et décussées, et les fleurs hermaphrodites avec calices persistants entourant, à maturité, un tétrakène sont une combinaison de caractères différenciant par rapport aux autres Angiospermes. De nombreuses espèces de cette famille (sous-famille des *Nepetoideae*) sont des plantes aromatiques source d'HEs très utiles pour l'aromathérapie, la parfumerie et l'industrie des cosmétiques. On y rencontre aussi beaucoup d'espèces mellifères et également des espèces cultivées comme plantes condimentaires et ornementales. Parmi les nombreux genres de *Lamiaceae* on peut citer : *Ajuga*, *Origanum*, *Lamium*, *Lavandula*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Melissa*, *Ocimum*, *Teucrium*, *Stachys*, *Thymus*, etc.

### Synonymes

Les synonymes de *Lavandula* L., d'après Upson (2002), sont *Stoechas* Mill., *Fabricia* Adans., *Chaetostachys* Benth., *Sabaudia* Buscal. et Muschl. et *Isinia* Rech. f. Le genre *Lavandula* L., est composé d'environ 39 espèces, de nombreux hybrides, et près de 400 cultivars enregistrés (Upson & Andrews, 2004). Comme beaucoup de Lamiacées, les lavandes sont connues pour leurs HEs riches en terpènes. Les espèces les plus connues et valorisées économiquement sont sans conteste *L. angustifolia*, *L. stoechas*, *L. latifolia* et l'hybride *L. x intermedia*.

### Etymologie

Le mot *lavande* dérive du verbe laver. Il est peut être issu de l'italien *lavando* (action de laver) mais peut remonter au latin *lavare* qui signifie laver et aussi se baigner, les Romains ayant utilisé des lavandes pour parfumer leurs bains (Ryley, 1998). Cette étymologie laisse penser que très tôt la lavande a été utilisée pour parfumer le linge fraîchement lavé. Des sachets de fleurs séchées sont traditionnellement placés dans les armoires pour éloigner les mites et parfumer la garde-robe. Mais il est également possible que *Lavandula* et lavande soient tirés du latin *livere* (qui signifie "pour être livide ou bleuâtre") qui en latin médiéval a donné le terme *lavindula*. La relation entre la lavande et le lavage qui n'est clairement explicitée qu'en 1568 serait alors une supposition secondaire (Murray *et al.*, 1933).

### **I.3.1. Taxonomie**

Le genre *Lavandula* appartient à la sous-famille des *Nepetoideae* sur la base du caractère hexaperturé des grains de pollen. Dans cette sous-famille, plusieurs tribus sont

reconnues et *Lavandula* était autrefois considéré comme un groupe distinct et isolé classé dans la tribu *Lavanduleae* (Endl.) Boiss contenant le seul genre *Lavandula* (Cantino *et al.*, 1992). Le genre *Lavandula* a récemment été inclus dans la tribu *Ocimeae* suite à une étude phylogénétique basé sur le polymorphisme de séquences d'ADN chloroplastique (Paton *et al.*, 2004). Comme pour les autres genres de cette tribu, l'origine de diversification des lavandes serait localisée en Asie.

La classification du genre *Lavandula* a subi de nombreuses modifications depuis Pline 76 avant J.C. et le nombre d'espèces décrites n'a cessé d'augmenter au fil des travaux botaniques. Historiquement, *L. stoechas*, *L. pedunculata* et *L. dentata* ont été décrites à l'époque romaine (Lis-Balchin, 2002). Au moyen âge, les espèces européennes ont été considérées comme deux groupes, ou deux genres, distincts, *Stoechas* (*stoechas*, *pedunculata*, *dentata*) et *Lavandula* (*spica* et *latifolia*), jusqu'à ce que Linné les combine. Il a seulement reconnu quatre espèces dans son "*Species Plantarum*" (1753), *L. multifida* et *L. dentata* en Espagne et *L. stoechas* et *L. spica* en Europe du Sud. *L. pedunculata* était incluse dans *L. stoechas*. Le genre est fréquemment mentionné dans de nombreux livres sur les plantes médicinales et de botanique, bien que la première monographie du genre "*De Lavandula*" ait été publiée en 1780 (Lundmark, 1780). Ce travail a reconnu cinq espèces et huit variétés. En 1790, *L. pinnata* et *L. carnososa* ont été reconnues. Cette dernière a été ensuite transférée au genre *Anisochilus*. La deuxième monographie du genre "*Histoire Naturelle des Lavandes*" écrite par Gingins (1826), a été d'une grande importance car c'est dans celle-ci que Gingins a recensé douze espèces et a proposé une classification infra-générique de trois sections (*Stoechas*, *Spica* (*Lavandula*) et *Pterostoechas*). Entre 1832 et 1836 le genre *Lavandula* a été enrichi d'une nouvelle section, *Chaetostachys* par Benthame. En 1848 dix-huit espèces étaient connues.

Une des premières classifications modernes majeures du genre *Lavandula* se trouve dans "*A Taxonomic Study of the Genus Lavandula*" de Chaytor (1937). Sa révision reconnaît vingt-huit espèces ainsi que de nombreux taxons infra-spécifiques répartis en cinq sections, *Stoechas*, *Spica*, *Subnuda*, *Pterostoechas* et *Chaetostachys*. Une nouvelle espèce, *L. somaliensis*, est décrite, de nombreuses nouvelles combinaisons ont été faites et une nouvelle section *Subnuda* a été installée. Cependant, toutes les principales formes cultivées et commercialisées résident dans les sections *Stoechas* et *Spica*. En 1949 Rozeira (1949) a révisé et modifié la section *Stoechas* en créant deux sous-sections, *Stoechas* et *Dentatae*.

Récemment, la classification phylogénétique du genre *Lavandula* a été réexaminée par Upson et Andrews (2004) (Figure 12). Cette étude a conduit à reconnaître 39 espèces différentes réparties en trois sous-genres *Fabricia*, *Sabaudia* et *Lavandula* et huit sections (les 5 d'origine de Chaytor, (1937), et trois nouvelles sections). En outre, de nombreux



hybrides et cultivars d'utilisation commerciale et horticole ont été formellement décrits. Cette organisation taxonomique a été réalisée sur la base de plus de 40 critères anatomiques mais aussi par une analyse phylogénétique basé sur la comparaison de séquences nucléaires (*Internal Transcribed Spacer* - séquence interne traduite) (Figure 13). Le premier grand groupe génétique interne au genre *Lavandula* correspond au sous-genre *Lavandula*, et le second *Fabricia*. Le groupe *Sabaudia* est moins clairement isolé (statistiquement soutenu) ainsi que la section *Hasikenses* au sein du sous-genre *Fabricia*. Au sein du sous-genre *Lavandula*, les sous-clades correspondent aux sections existantes sauf la section *Dentatae* qui est devenue une section à part, indépendante de la section *Stoechas*. Au sein du sous-genre *Fabricia*, les sous-clades correspondent aux sections *Pterostoechas*, *Subnuda* et *Chaetostachys*.

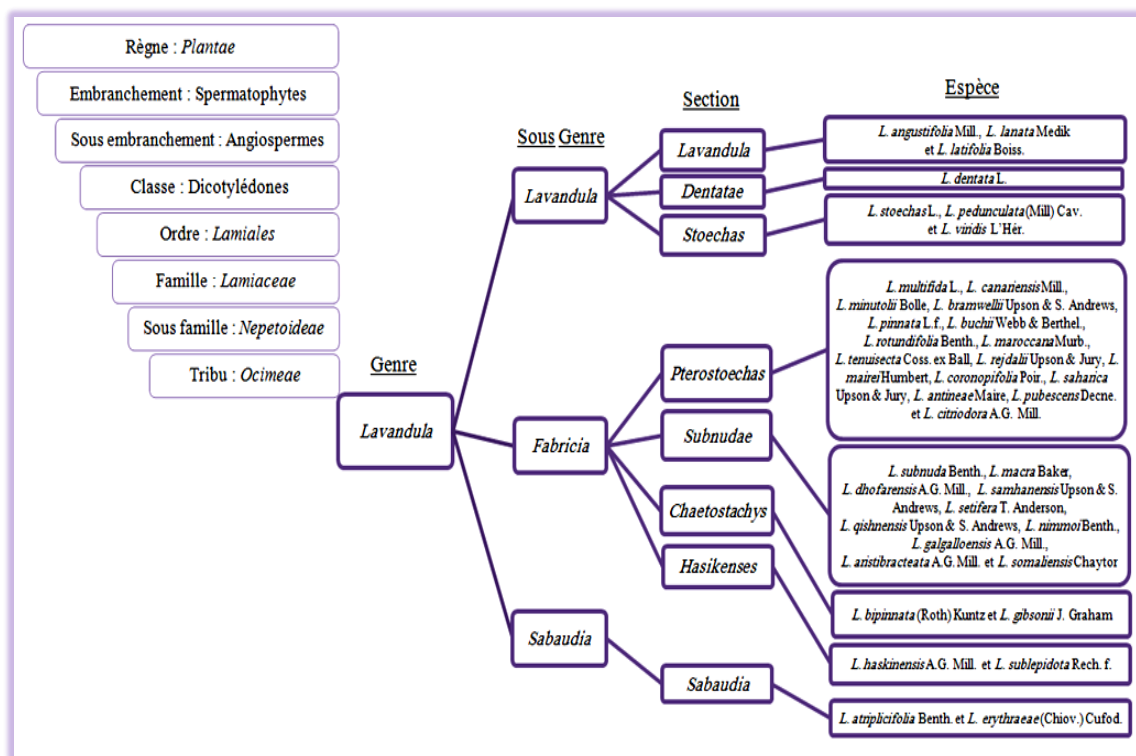


Figure 12 : Taxonomie du genre *Lavandula* (d'après Upson & Andrews, 2004)

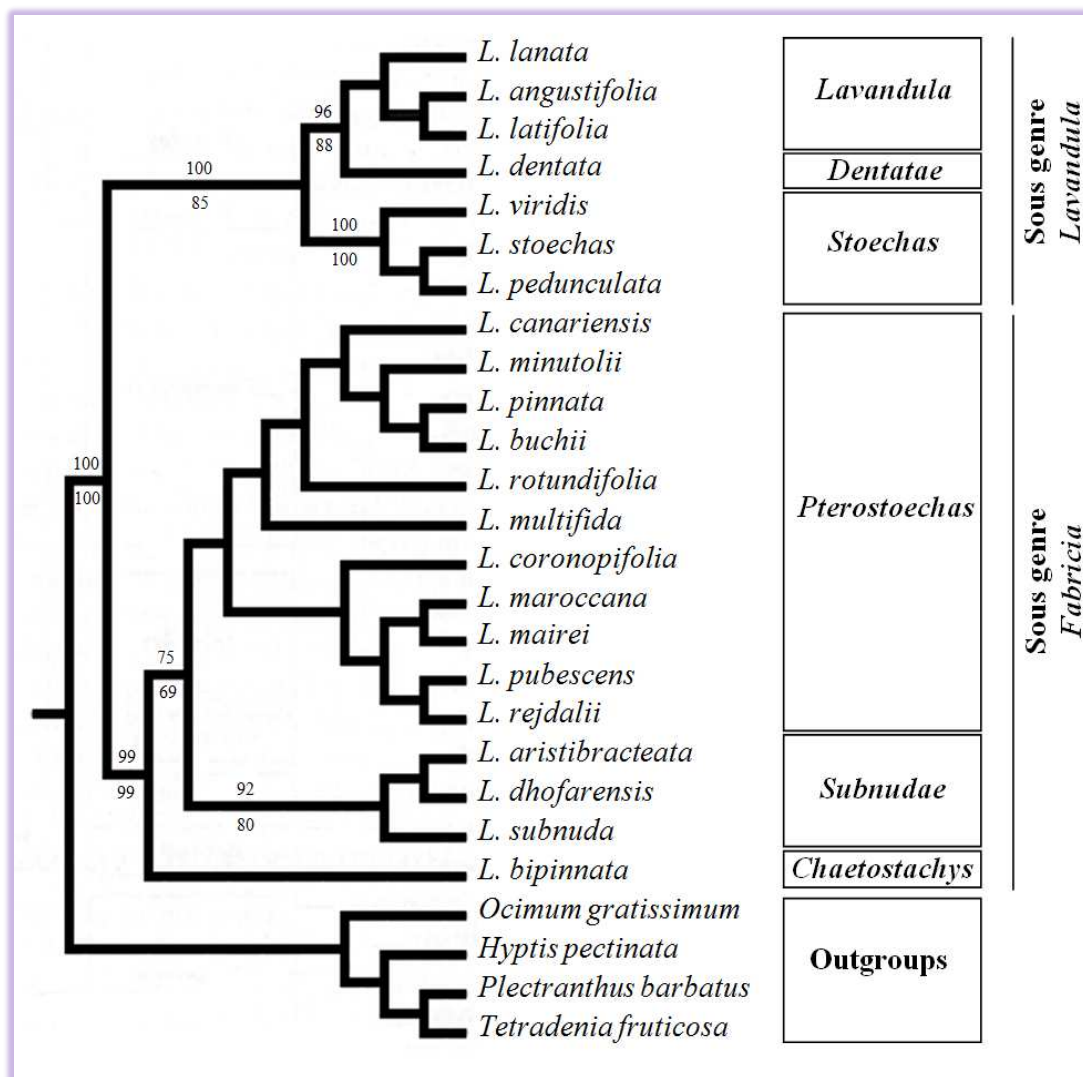


Figure 13 : Arbre de classification des espèces du genre *Lavandula* basé sur les séquences nucléaire ITS (d'après Upson & Andrews, 2004)

### I.3.2. Diversité morphologique

Le genre *Lavandula* est un groupe plutôt mitigé et divergent en termes de morphologie anatomique. Les morphologies des espèces sont probablement le résultat d'une répartition géographique très large et d'adaptations anatomiques à des milieux et des pollinisateurs différents. Ce genre se différencie des autres genres des Lamiacées par des étamines et un style totalement inclus dans le tube de la corolle et, spécifiquement pour les lavandes européennes, l'appendice obovale qui recouvre la pointe du calice (Tutin *et al.*, 1972 ; Coste & Flahault, 1998). Ce dernier caractère est absent chez de nombreuses espèces africaines ou asiatiques (Lis-Balchin, 2002). En plus des caractéristiques morphologiques macroscopiques, d'autres caractères moins visibles à l'œil entrent aussi en compte dans la détermination des espèces comme le nombre de chromosomes, la forme des grains de pollen (Suarez-Cervera & Seoane-Camba, 1986) ou encore celle des graines. La diversité

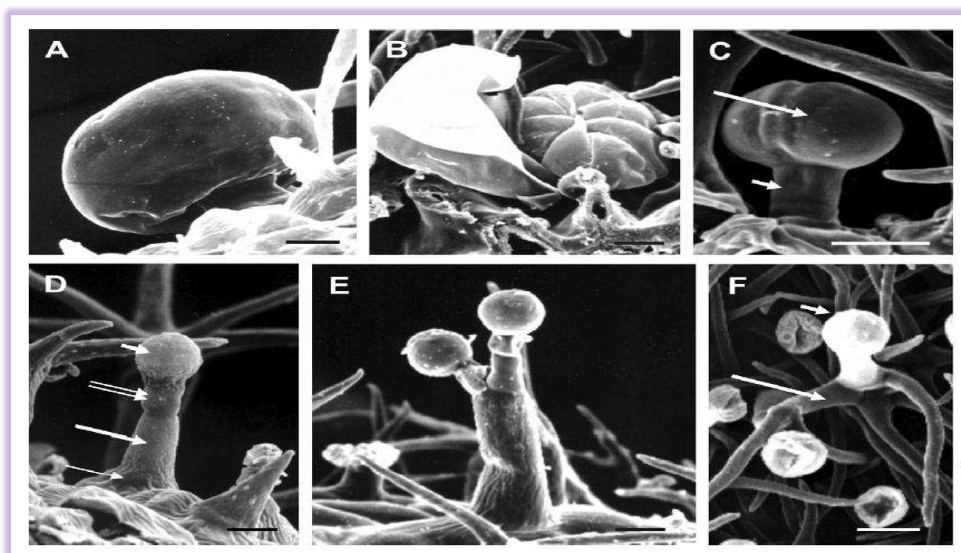
morphologique des lavandes a été entièrement revue et détaillée par Upson (2002) et Upson et Andrews (2004). L'aperçu de la description botanique des espèces de lavandes donné ci-dessous est entièrement basé sur ce qui est rapporté dans ces deux références sauf indication contraire. Il se concentre plus particulièrement sur la section *Stoechas* qui est le sujet de cette thèse, mais fait mention des autres sections.

### Port et trichomes

Les lavandes sont des sous-arbrisseaux ou parfois des arbustes vivaces atteignant jusqu'à 1.5 m de hauteur. Elles sont annuelles ou pluriannuelles. Beaucoup d'espèces sont caractérisées par un feuillage et des fleurs très aromatiques du fait de la présence d'HEs qui sont élaborées dans des glandes (trichomes) couvrant une grande partie de la plante. La caractérisation de ces trichomes a fait l'objet de plusieurs études chez de nombreuses espèces de Lamiacées y compris les lavandes. Ces études ont révélé une grande diversité de patron de distribution, de morphologie et de densité, qui constituent autant de caractères taxonomiques importants (Schnepf, 1968 ; El-Gazzar & Watson 1970 ; Heinrich *et al.*, 1983). Une observation en microscopie électronique à balayage des trichomes de feuilles a montré qu'il existe chez *L. pedunculata* 5 types de trichomes sécréteurs (Figure 14, Zuzarte *et al.*, 2010). Ce sont les trichomes peltés à 8 cellules de tête sécrétrices, les trichomes capités de type I avec une tête bicellulaires, les trichomes capités de type II avec une tête unicellulaires, les trichomes bifurqués et les trichomes ramifiés mixte (trichomes non-glandulaire et glandulaire). Une autre étude a montré que l'espèce *L. angustifolia* est caractérisée par 5 types de trichomes tecteurs et 4 types de trichomes sécréteurs (Couderc-Le-Vaillant *et al.*, 1990).

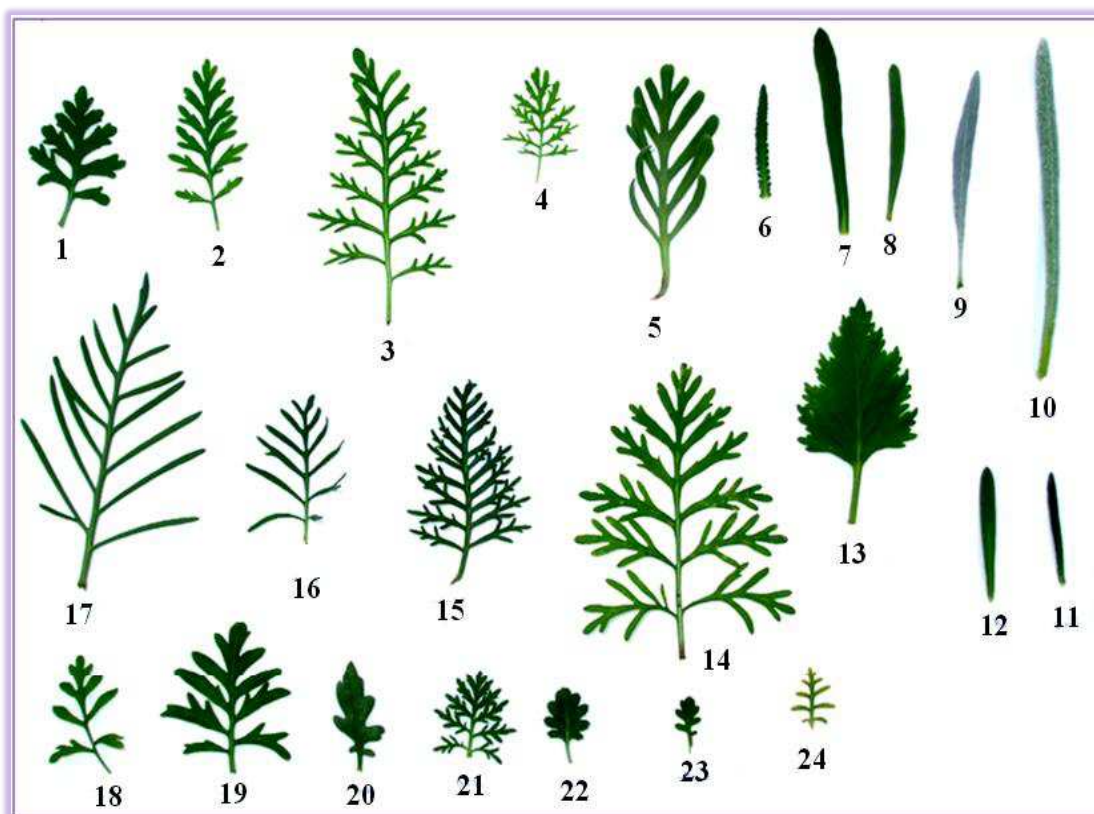
### Feuilles

La forme des feuilles est très variée (Figure 15). Elles sont persistantes, opposées, sessiles ou pétiolées, simples ou composées, poilues et le plus souvent grisâtres ou argentées et parfois vert sombre. Elles sont longues et étroites chez la plupart des espèces mais, chez certaines espèces, elles sont pennées ou pennées dentées et parfois pennées multiples et entièrement ou profondément découpées. Dans certaines des espèces d'Arabie les feuilles sont souvent absentes. Alors que les feuilles du sous-genre *Lavandula* et *Sabaudia* sont simples et allongées, celles du sous-genre *Fabricia* sont très diversement lobées et dentées.



**Figure 14 : Diversité de trichomes de *L. pedunculata* (d'après Zuzarte *et al.*, 2010)**

(A) Trichome pelté entièrement développé avec une tête enflée. (B) Stade sécréteur d'un trichome pelté montrant l'espace sous-cuticulaire sur les huit cellules sécrétrices. (C) Trichome capitulé de type I avec une tige courte (petite flèche) sous-tendant une tête bicellulaire (flèche). (D) Trichome capitulé de type II avec une cellule basale (flèche fine) sous-tendant une longue tige (grande flèche), une cellule du cou (flèche double) et une tête unicellulaire (petite flèche). (E) Trichome bifurqué. (F) Trichome ramifié mixte montrant les caractéristiques de trichomes non glandulaires (flèche longue) et glandulaire (petite flèche). Bars = 10  $\mu$ m.

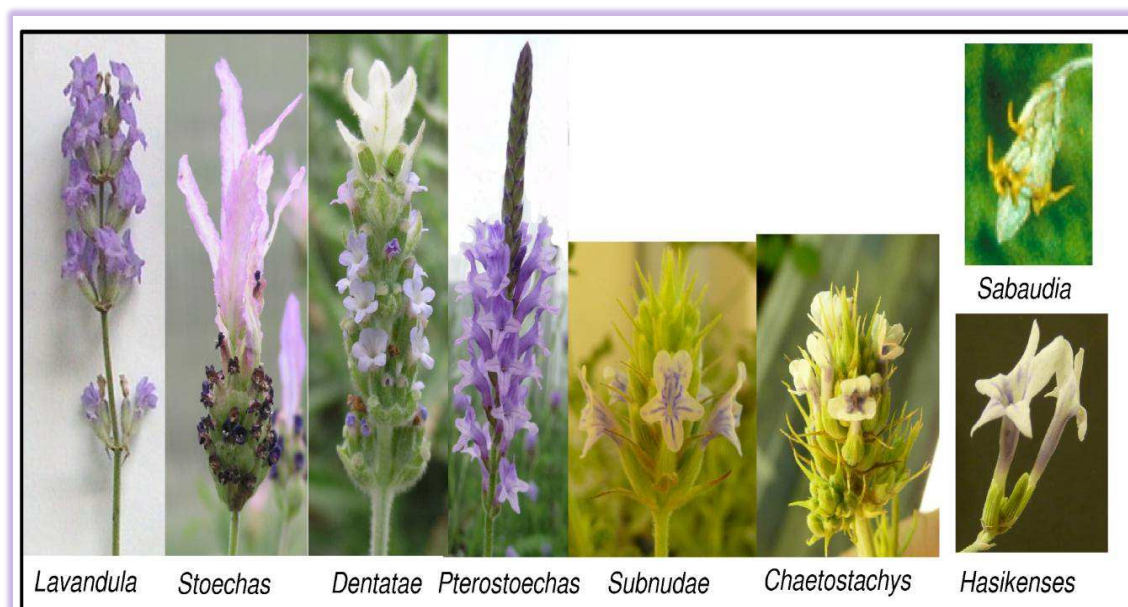


**Figure 15 : Diversité de formes et de contours des feuilles de certaines espèces du genre *Lavandula* (Collection BVPam)**

Toutes les feuilles sont présentées en tail naturelle. 1. *L. mairei*, 2. *L. multifida*, 3. *L. canariensis*, 4. *L. rejdalii*, 5. *L. pinnata*, 6. *L. dentata*, 7. *L. viridis*, 8. *L. latifolia*, 9. *L. angustifolia*, 10. *L. lanata*, 11. *L. pedunculata* subsp. *lusitanica*, 12. *L. stoechas*, 13. *L. rotundifolia*, 14. *L. aristibracteata*, 15. *L. minutolii*, 16. *L. antinea*, 17. *L. buchii*, 18. *L. maroccana*, 19. *L. citriodora*, 20. *L. subnuda*, 21. *L. pubescens*, 22. *L. samhanensis*, 23. *L. dhofarensis*, 24. *L. coronopifolia*.

### Inflorescences

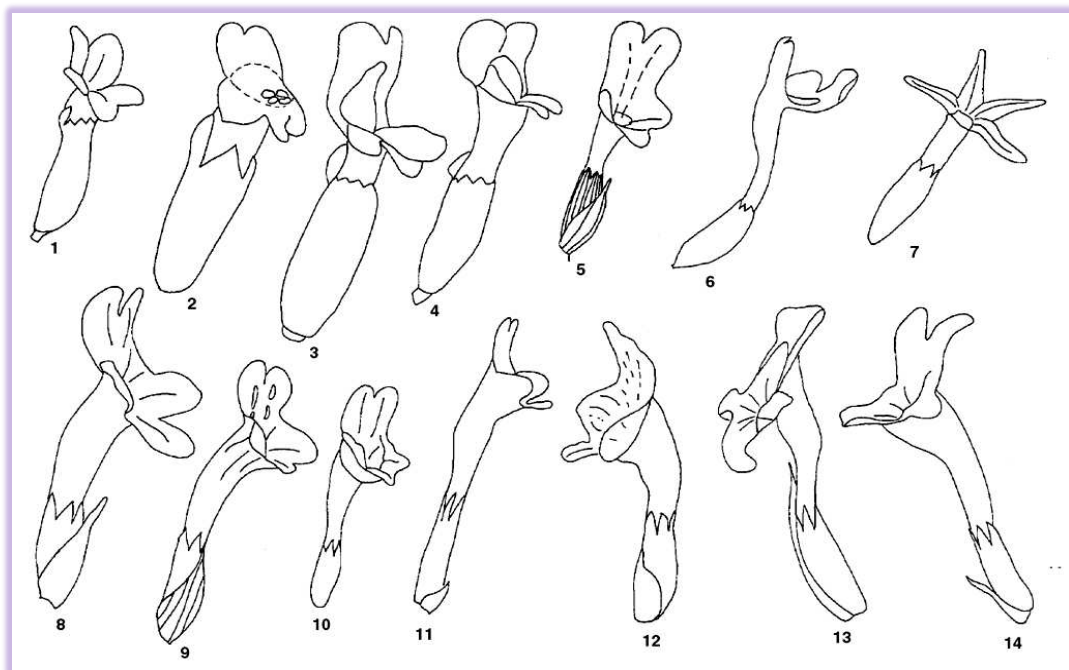
Contrairement aux feuilles, l'inflorescence constitue un point commun à l'ensemble des lavandes. Les fleurs, avec pédicelle, sont disposées en verticilles, tenues en grappes de cymes cylindriques ou quadrangulaires, à l'extrémité de tiges rarement feuillées. Elles peuvent être le plus souvent mauves, bleues, violettes pourpres, roses ou lilas et parfois blanches, probablement suite à une mutation. Enfin, les fleurs des espèces du sous-genre *Sabaudia* sont jaunes-marrons. Beaucoup d'espèces ne fleurissent qu'une seule fois dans l'année, d'autres deux fois comme *L. stoechas* et *L. pedunculata* (printemps et automne). D'autres fleurissent toute l'année comme *L. dentata*. L'inflorescence principale composée ressemblant à un épi est plus ou moins lâche (thyrses spiciforme). L'inflorescence secondaire est une cyme bipare et scorpioïde dans le sous-genre *Lavandula* ou uniflore dans les sous-genres *Sabaudia* et *Fabricia* (Figure 16) (Upson, 1997 ; Lis-Balchin, 2002). L'inflorescence est parfois surmontée par des bractées florales stériles colorées (les sections *Stoechas* et *Dentatae*, Figure 16). La majorité des espèces de lavandes ont des bractées et des cymes opposées décussées, ce qui donne à leurs épis une forme quadrangulaire, particulièrement bien visible dans la section *Pterostoechas*. Dans le sous-genre *Lavandula* les cymes à plusieurs fleurs donnent un aspect cylindrique aux thyrses (Figure 16). Dans les autres sections du sous-genre *Fabricia* ainsi que dans le sous-genre *Sabaudia* les bractées et les cymes sont organisées en spirale le long de l'axe floral (Figure 16).



**Figure 16 : Photographies des inflorescences (thyrses) représentatives de 8 sections du genre *Lavandula* (Collection BVpam sauf pour la section *Sabaudia* dont la photo est de Tim Upson (Upson, 2009))**

### Corolle

La corolle est constituée de 5 pétales soudés. Elle est souvent asymétrique, tubuleuse à la base et bilabée au sommet. Elle est soudée avec les 4 étamines. La lèvre supérieure est à deux lobes, l'inférieure à trois lobes et les lobes sont de taille variable (Figure 17). Seules exceptions à cette règle, les espèces du sous-genre *Sabaudia* présentent des corolles constituées de 5 pétales soudés en étoile. Le tube de la corolle est plus ou moins long. Dans la section *Stoechas* le tube est presque totalement inséré dans le calice. Dans les sections *Lavandula* et *Dentatae* la longueur du tube visible est égale à celle du calice. Enfin, dans toutes les sections du sous-genre *Fabricia* la partie visible du tube est trois fois plus longue que le calice, faiblement ou fortement à deux lèvres. Les quatre étamines sont inclinées (courbant vers le bas), généralement didynamous (deux paires d'étamines inégales en longueur), la paire antérieure étant plus longue et incluse dans le tube. Le stigmate est unique, bilobé ou capité. Les lobes nectarifères sont positionnés en face des ovaires. Les glandes sécrétrices d'HE ne sont présentes que sur la face inférieure de la corolle.

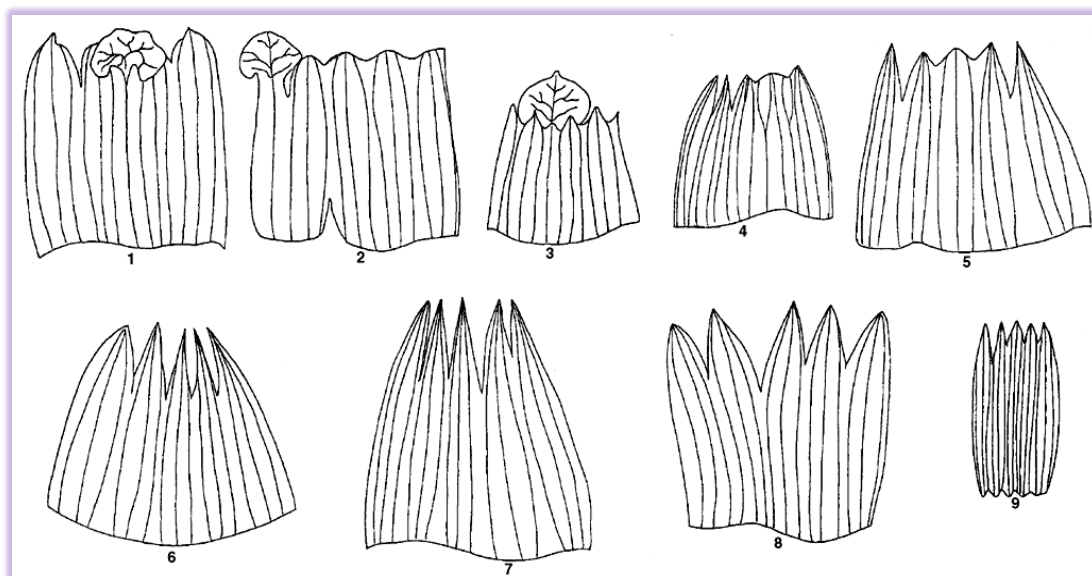


**Figure 17 : Variation de la morphologie des corolles (fleurs) de certaines espèces du genre *Lavandula* (d'après Upson, 2002)**

Toutes les corolles sont présentées x 100 sauf pour 1, 2, 3 et 14 sont x 160. 1. *L. dentata* var. *dentata*, 2. *L. viridis*, 3. *L. latifolia*, 4. *L. lanata*, 5. *L. multifida*, 6. *L. bipinnata*, 7. *L. atriplicifolia*, 8. *L. canariensis*, 9. *L. pubescens*, 10. *L. tenuisecta*, 11. *L. coronopifolia*, 12. *L. maroccana*, 13. *L. aristibracteata*, 14. *L. subnuda*.

### Calice

Le calice est tubulaire court et à cinq lobes qui se terminent par 5 dents inégales. Il est persistant, régulier ou avec deux lèvres (bilabiée), la lèvre supérieure ayant alors trois lobes et la lèvre inférieure deux lobes. Les deux lèvres sont plus ou moins égales en taille ou la lèvre postérieure est plus large ou modifiée en un appendice à huit, treize ou quinze nervures. Les nervures des sépales inférieurs sont toutes portées à l'apex. La variation de forme des calices offre de nombreux indices importants pour diagnostiquer les sections et espèces (Figure 18). Dans le sous-genre *Lavandula* le lobe médian de la lèvre supérieure forme une extension qui recouvre l'ouverture du calice avant l'épanouissement de la fleur ainsi qu'après la tombée de la corolle. Le sous-genre *Sabaudia* fait exception avec un calice régulier. Chez quelques lavandes comme *L. angustifolia* le calice est le site préférentiel de la production de l'HE du fait de la très forte densité de trichomes sécréteurs (Couderc-Le-Vaillant *et al.*, 1990).



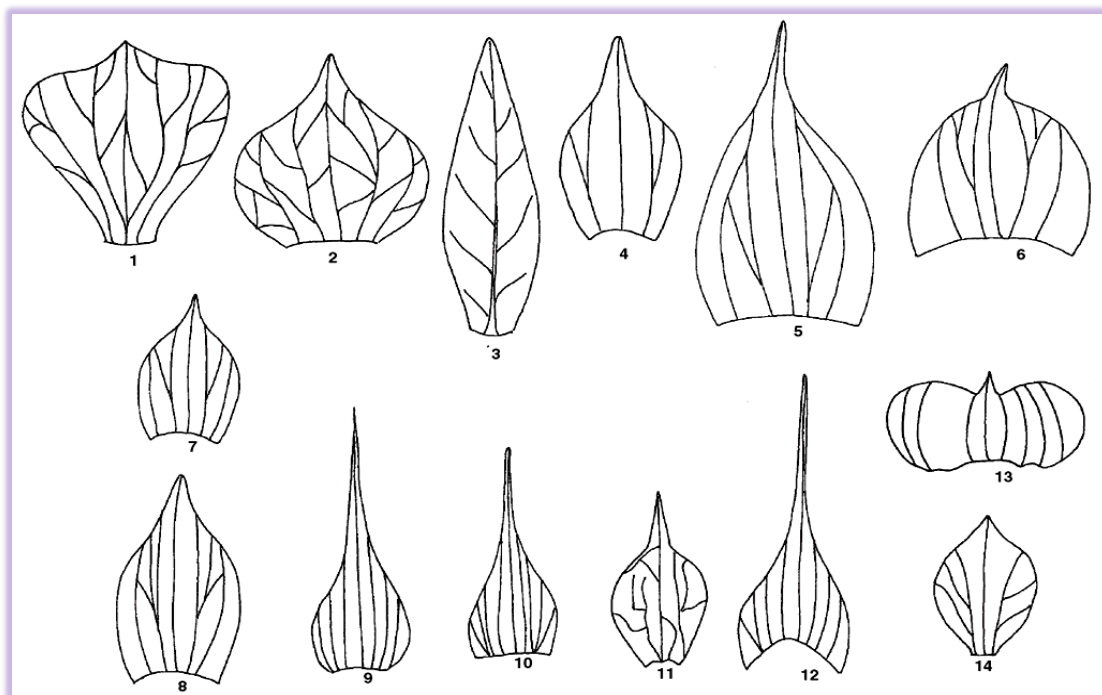
**Figure 18 : Variation des calices (lobes) de certaines espèces du genre *Lavandula* (d'après Upson, 2002)**

Tous les calices sont présentés x 250 sauf pour 3 et 4 qui sont x 160 et pour 9 qui est x 75. **1.** *L. stoechas* subsp. *stoechas*, **2.** *L. angustifolia*, **3.** *L. dentata* var. *dentata*, **4.** *L. multifida*, **5.** *L. mairei* var. *mairei*, **6.** *L. pubescens*, **7.** *L. subnuda*, **8.** *L. bipinnata*, **9.** *L. hasikensis*.

### Bractéoles et bractées

Les bractéoles sont petites, souvent négligeables. Les bractées sont portées au niveau des points de ramification, à la base de chaque cyme de fleurs. Chez les espèces *L. stoechas* et *L. dentata*, des bractées très développées sont également présentes à l'apex de l'inflorescence (Figure 16). Ces dernières sont allongées, colorées, stériles et très attractives pour les pollinisateurs (Herrera, 1997). Les cymes sont sous-tendues par des

bractées qui varient en taille, forme et nervation selon les taxons et qui peuvent avoir une valeur taxonomique au sein du genre *Lavandula* (Figure 19). Dans les sections *Dentatae* et *Stoechas*, les bractées sont trapézoïdales avec une pointe courte alors qu'elles sont triangulaires dans la section *Subnudae* avec une pointe très allongée. Les nervures des bractées sont parallèles dans le sous-genre *Fabricia* alors qu'elles sont réticulées dans les deux autres sous-genres.



**Figure 19 : Exemples illustrant la diversité des formes des bractées de certaines espèces du genre *Lavandula* (après Upton, 2002)**

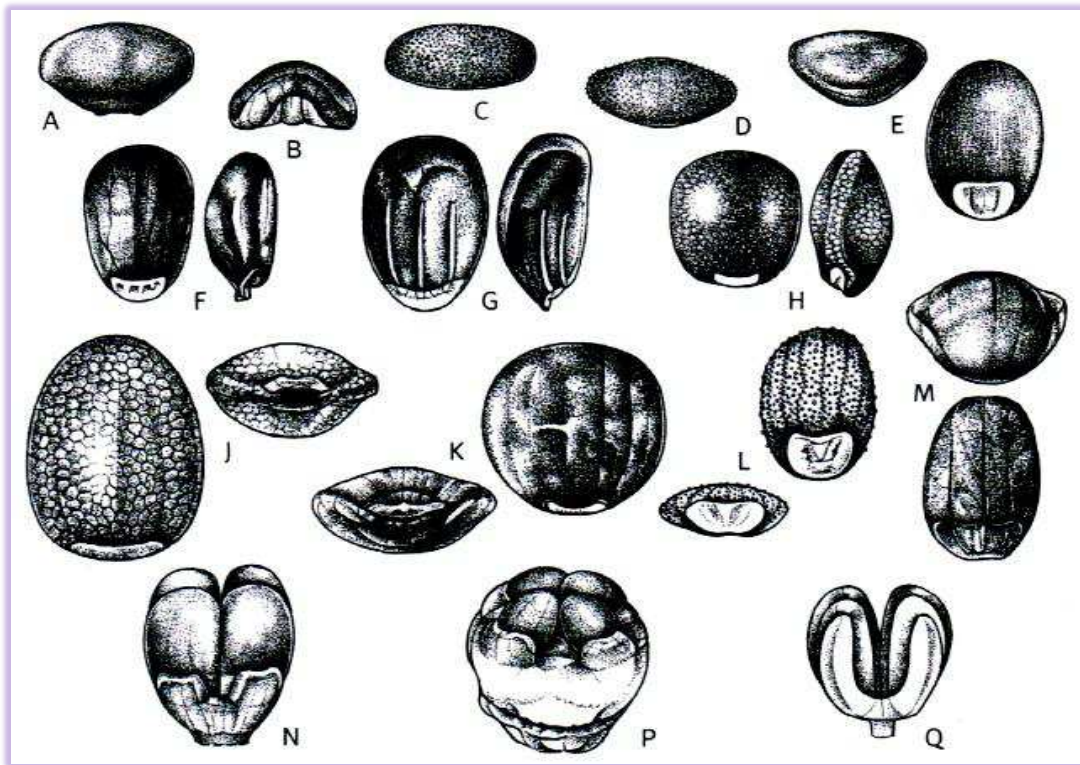
Les bractées sont présentées x 60 pour 2, x 100 pour 1, 8, 13 et 14, x 160 pour 3, 4, 9, 10, 11 et 12 et x 250 pour le reste. 1. *L. dentata* var. *dentata*, 2. *L. viridis* (bractée supérieure), 3. *L. latifolia*, 4. *L. multifida*, 5. *L. canariensis*, 6. *L. maroccana*, 7. *L. coronopifolia*, 8. *L. mairei* var. *mairei*, 9. *L. aristibracteata*, 10. *L. subnuda*, 11. *L. somaliensis*, 12. *L. bipinnata*, 13. *L. hasikensis*, 14. *L. atriplicifolia*.

### Fruits (graines)

Le fruit des Lamiacées est un fruit sec indéhiscent de type akène et plus exactement appelé “nucule”. Certains types d’akène peuvent être facilement identifiés et ont une valeur taxonomique au sein du genre *Lavandula* au niveau sectionnel. Les akènes des lavandes sont secs, à une seule graine et à péricarpe ligneux. La macro- et la micromorphologie des akènes (Figure 20) sont souvent une source riche de données taxonomiques. La forme, la couleur, le type de la cicatrice d’abscission, la présence ou l’absence des cicatrices latérales et leurs longueurs, la taille et la production du mucilage ont longtemps été utilisés dans le genre *Lavandula*, principalement comme caractères permettant de différencier les sections (Chaytor, 1937). La Microscopie électronique à balayage a été utilisée également pour



étudier l'ornementation de surface. Un caractère d'intérêt présent sur beaucoup d'akènes de lavandes, notamment dans les sections *Pterostoechas*, *Chaetostachys* et *Subnuda*, est porté par les petits corps globuleux blancs qui couvrent la surface de l'akène et qui sont particulièrement denses sur la cicatrice.



**Figure 20 : Exemples illustrant la diversité des formes des akènes (nucules) de certaines espèces du genre *Lavandula* (d'après Upson & Adrews, 2004)**

A. *L. canariensis* subsp. *canariensis* x30, B. *L. bipinnata* x8, C. *L. atriplicifolia* x18, D. *L. subnuda* x24, E. *L. dhofarensis* subsp. *dhofarensis* x18.5 vu du côté, vu de dessus, x27, F. *L. angustifolia* subsp. *angustifolia* x11, G. *L. latifolia* x6.5, H. *L. dentata* var. *dentata* x13.5, J. *L. stoechas* subsp. *stoechas* x18, K. *L. viridis* x12.5, L. *L. multifida* x12, M. *L. aristibracteata* vu de fin x27, vu de face x14, N. *L. mairei* var. *mairei* x16, P. *L. mairei* var. *antiatlantica* x17.5, Q. *L. bipinnata* x7.5.

A-D. vu de dessus, E. vu de face et de dessus, F-H. vu de face et de côté, J-M. vu de face et de fin. N, P et Q., nucules sur le disque de nectar illustrant la disposition inverse des lobes du nectar.

### I.3.2.1. Section *Stoechas* Ging. (*L. stoechas* *Sensu Lato*)

Les taxons de la section *Stoechas* représentent un groupe distinct de petits arbustes aromatiques ligneux arborant des feuilles linéaires lancéolées. Ce groupe comprend certaines des plus spectaculaires lavandes. Parfois connues sous le nom de 'lavande française' ou 'espagnole', elles se distinguent par de longues bractées ressemblant à des oreilles de lapin au sommet de l'inflorescence. Ce sont en fait de grandes bractées florales colorées stériles très attractives pour les abeilles et autres insectes pollinisateurs. Ces grandes bractées apicales diffèrent de celles de *L. dentata* (section *Dentatae*), le seul taxon de lavande portant également des bractées apicales, en étant complètement stériles et en présentant une différenciation nette entre les bractées fertiles et les bractées stériles.

Les taxons de la section *Stoechas* possèdent d'autres caractéristiques différentiantes. Les lobes de la corolle sont tous similaires en taille. Le tube de la corolle dépasse à peine du calice. Les bractées sont ovales, larges, à légèrement obovales, et les stigmates sont capités. Les akènes brun-rouge sont largement elliptiques ou circulaires, ne portent qu'une petite cicatrice basale et produisent tous du mucilage. Le nombre de chromosomes dans tous les taxons étudiés est de  $2n = 30$ .

*L. stoechas* appartient à la section *Stoechas* du sous-genre *Lavandula* du genre *Lavandula*, ainsi que *L. pedunculata* et *L. viridis*. Les caractéristiques morphologiques de ces trois espèces sont étroitement liées les unes aux autres et une personne inexpérimentée peut facilement confondre ces espèces. Les lavandes de la section *Stoechas* ont probablement été les premières à être utilisées pour leurs HEs. Les Romains, les Grecs et les Arabes ont tous reconnu ses propriétés médicinales, antiseptiques et nettoyantes. La composition de cette section en espèces, sous-espèces, formes et hybrides est comme suit :

- L. stoechas* L.
  - subsp. *stoechas*
    - f. *leucantha* (Ging.) Upson & S. Andrews
    - f. *rosea* Maire
  - subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira
- L. pedunculata* (Mill) Cav.
  - subsp. *pedunculata*
  - subsp. *cariensis* (Boiss.) Upson & S. Andrews
  - subsp. *atlantica* (Braun-Blanq.) Romo
  - subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco
  - subsp. *sampaiana* (Rozeira) Franco
- L. viridis* L'Hér.

#### Hybrides

- L. x cadevallii* Sennen (*L. pedunculata* subsp. *pedunculata* x *L. stoechas* subsp. *stoechas*)
- L. x alportelensis* P. Silva, Fontes & Myre (*L. stoecha* subsp. *luisieri* x *L. viridis* )
- L. x limae* Rozeira (*L. pedunculata* subsp. *lusitanica* x *L. viridis* )
- L. x maderensis* Benth. (*L. pedunculata* subsp. *pedunculata* x *L. viridis* )
- L. pedunculata* subsp. *atlantica* x *L. pedunculata* subsp. *pedunculata*
- L. stoechas* x *L. viridis*

Au vue des fortes similitudes entre les taxons de la section *Stoechas* et des difficultés historiques à les différencier, nous les considérerons dans ce manuscrit comme *L. stoechas* *Sensu Lato* par opposition au seul taxon *L. stoechas* actuellement reconnu sous ce nom et alors dénommé, *L. stoechas* *Sensu Stricto*.

#### 1.3.2.1.1. L'espèce *L. stoechas* L.

*L. stoechas* (syn. *Stoechas officinarium* Moench) est communément appelée 'lavande française', 'lavande italienne', 'lavande espagnole', 'lavande des stoechades', 'lavande

maritime’, ‘lavande papillon’ ou ‘lavande à toupet’. Elle a été historiquement la première lavande à être formellement décrite et elle est aussi la lavande dont le territoire géographique est le plus vaste. Elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen (Europe méridionale, l’Afrique du Nord et le Moyen Orient) avec une petite disjonction sur la frontière Lybie-Egypte (Figure 21). Actuellement, elle a été introduite et est cultivée en Bretagne, Nouvelle Zélande et en Australie.

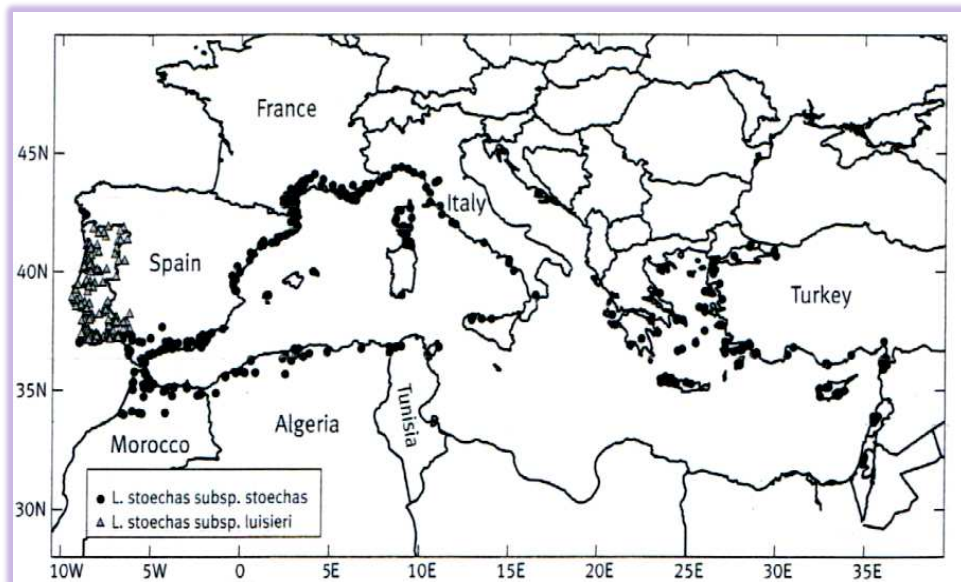
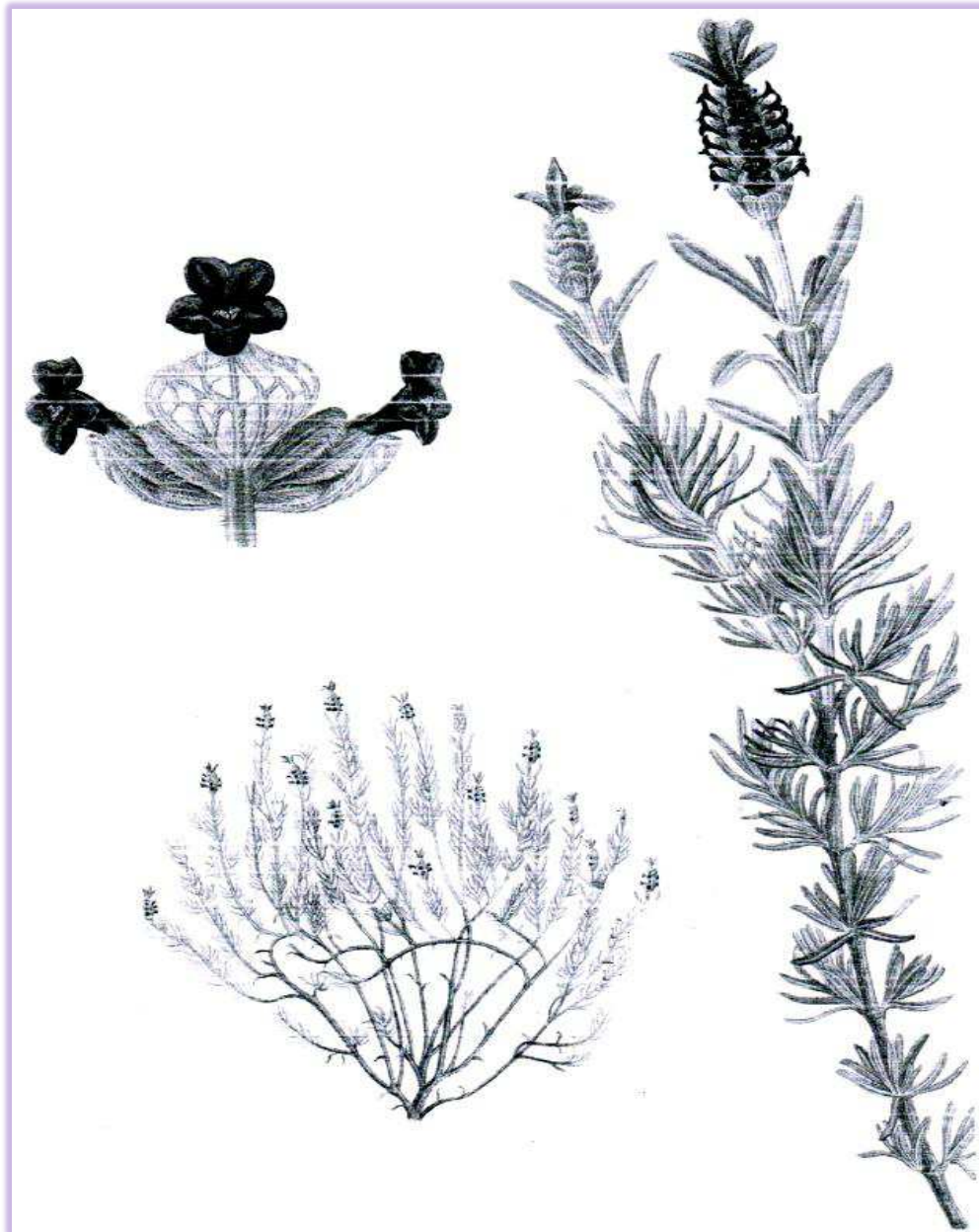


Figure 21 : Distribution géographique de *L. stoechas* (d’après Upson & Andrews, 2004)

*L. stoechas* (Figure 22) se présente sous la forme d’un arbrisseau ou d’un buisson très aromatique et très ramifié pouvant atteindre un mètre de haut avec une lourde odeur semblable à celle du pin. Les feuilles opposées de 2-4 cm de long sont sessiles, tomenteuses, oblongues, lancéolées, linéaires, étroites et recourbées sur les bords et sont souvent grises. Les inflorescences de coupe carrée sont sessiles, compactes et surmontées d’une couronne de bractées florales violettes, élargies, stériles, obovales ou spatulées de 1 à 2 cm de longueur. Les bractées fertiles sont largement ovales à obovales-subtrilobées, brièvement acuminées, membraneuses, veinées et plus courtes que le calice. Le Calice est sessile, à treize nervures avec des lobes moyens modifiés en un appendice. La Corolle est de couleur violet foncée ou mauve. Les variétés blanches sont nommées forme *leucantha* Ging. et les variétés de fleurs rose-rouge ou rose sont appelées forme *rosea* Maire. Les fruits sont sans intérêt économique comme tous ceux de la famille. Ils permettent cependant la production de graines. Les taxons de la section *Stoechas* s’hybrident facilement pour donner de nombreux taxons variant. Contrairement à beaucoup d’autres

lavandes, cette lavande préfère les sols siliceux et les terrains acides. Elle supporte la mi-ombre et tolère le froid jusqu'à  $-5^{\circ}\text{C}$ . La floraison, plus précoce que chez les autres lavandes, se déroule d'avril à mai puis en automne.



**Figure 22 : *Lavandula stoechas*, tige fleurie x 1 et cyme agrandie x 4 (d'après Upson & Andrews, 2004)**

*L. stoechas* est une espèce végétale bien connue et utilisée à travers toute la région méditerranéenne pour ses vertus médicinales principalement attribués à sa teneur en HE. Elle était utilisée par les médecins musulmans qui la considéraient comme céphalique (tonique), résolvente, désobstruante, et carminative. Ils la prescrivent pour lutter contre des infections pulmonaires et pour l'expulsion des humeurs bilieuses et flegmatiques (Said,

1996). En Crète, l'HE et l'infusion des feuilles sont utilisées par des thérapeutes traditionnels comme spasmolytiques, contre le diabète, les douleurs menstruelles féminines, les calculs rénaux, l'antrax, l'otite, l'hypertension et la matière végétale brute est également utilisée comme insectifuge (Skoula *et al.*, 1996). La plante est également utilisée dans la médecine populaire comme antispasmodique dans les douleurs des coliques (Usmanghani *et al.*, 1997 ; Nadkarni, 1982), expectorant, stimulant, (Giray *et al.*, 2008) et pour les différentes maladies du système nerveux central, comme l'épilepsie et la migraine. Elle est appelée 'le balai du cerveau' (Nadkarni, 1982). Elle est d'ailleurs utilisée sous forme de fumigation pour soigner "le mal des sinus" (Simonpoli *et al.*, 1993). Cette lavande a aussi des effets positifs sur les plaies, les infections urinaires, les maladies cardiaques et l'eczéma (Baytop, 1999). Finalement, elle possède également des vertus analgésiques, sédatives, antiseptiques (Baytop, 1999) et antimicrobiennes (Asimgil, 1997).

La composition chimique de l'HE de *L. stoechas* a été largement étudiée sur une grande partie de son aire de répartition déjà très large (voir section 'HE des lavandes' ci-dessous). L'HE est obtenue par entraînement à la vapeur d'eau ou par hydrodistillation des inflorescences ou de l'ensemble des parties aériennes de la plante. Des vertus antiseptiques, antiinflammatoires, cicatrisantes et antivirales lui sont généralement attribuées (Baldovini *et al.*, 1998). L'HE obtenue à partir des sommités fleuries a été utilisée comme remède contre les affections coliques et pulmonaires, pour soulager les maux nerveux de tête, les affections hépatiques et pour le nettoyage des plaies (Gülçin *et al.*, 2004). Bien que *L. stoechas* fût la première lavande à être utilisée en parfumerie, son HE est aujourd'hui délaissée en raison de son odeur fortement camphrée et de la concurrence importante des autres lavandes qui se pretent mieux à la culture intensive et dont l'odeur est plus agréable. La forte teneur en camphre généralement observée limite ses applications en cosmétologie.

En Algérie, *L. stoechas* est très connue sous le nom local "Helhal" et est largement distribuée à travers toute la périphérie nord du pays. Dans la médecine populaire algérienne, les parties aériennes, surtout les inflorescences, sont utilisées comme un agent antiseptique et stimulant (Mahmoudi, 1982). Dans la cuisine, elles sont également utilisées comme herbe culinaire pour préparer un type particulier de couscous.

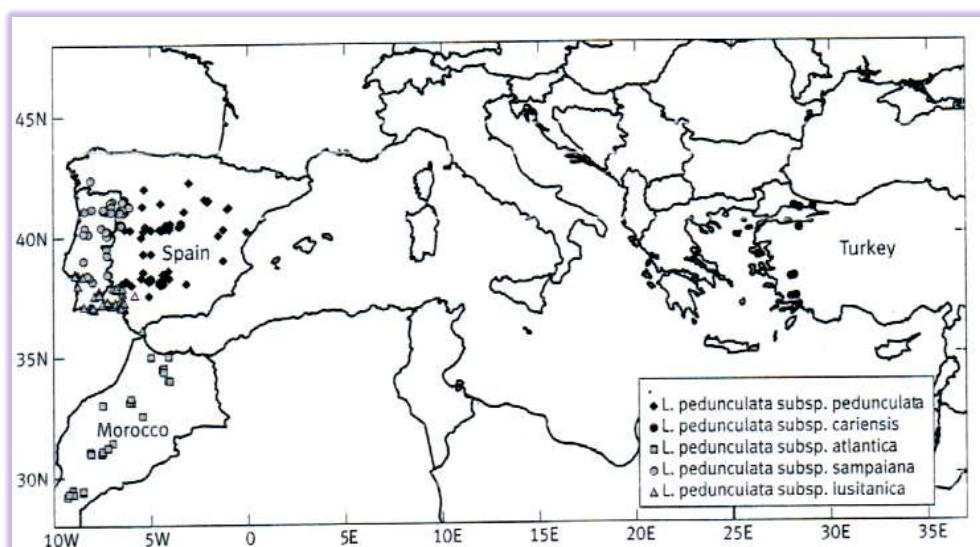
En France, elle est commune dans le Périgord, la Dordogne, sur le littoral méditerranéen et en Corse. Seule la sous-espèce *stoechas* est présente (Gamisans & Jeanmonod, 1993).

### I.3.2.1.2. L'espèce *L. pedunculata* (Mill) Cav.

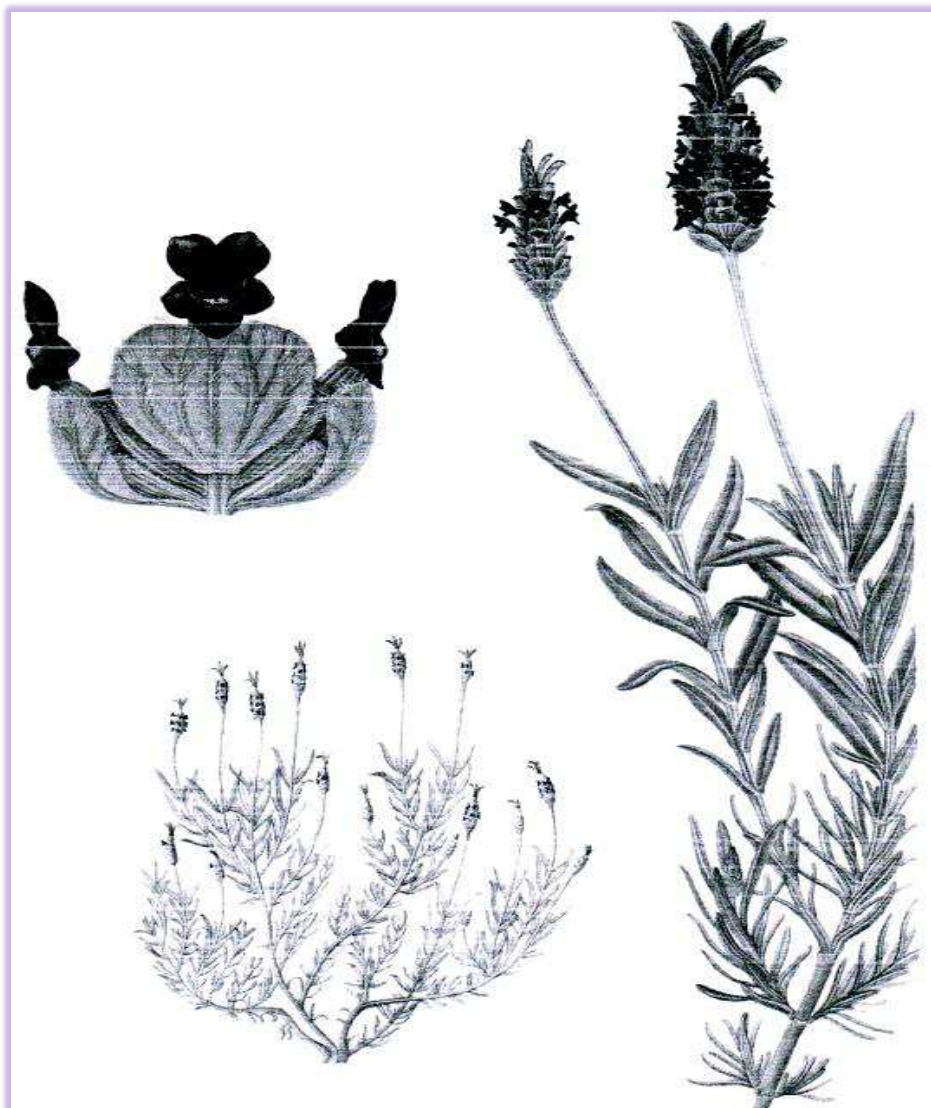
Du fait des fortes ressemblances morphologiques entre *L. stoechas* et *L. pedunculata*, ces deux taxons ont été autrefois considérés comme une même espèce. *L. pedunculata* a été élevé au rang d'espèce par Miller en 1768 sous le patronyme *Stoechas pedunculata* puis par le botaniste espagnol Cavanilles en 1802 sous son patronyme actuel, *L. pedunculata*. La répartition géographique de ses sous-espèces est intrigante (Figure 23). La subsp. *pedunculata* est localisée en Espagne et au nord-est du Portugal, la subsp. *lusitanica* et la subsp. *sampaiana* sont localisées dans le sud-ouest de l'Espagne et du Portugal, la subsp. *atlantica* au Maroc et la subsp. *cariensis* en Turquie.

Les pédoncules longs et glabres des inflorescences font de *L. pedunculata* une lavande très attractive et distincte de *L. stoechas*. L'épithète "*pedunculata*", fait référence aux longs pédoncules. La forme de la corolle permet également de distinguer *L. stoechas* de *L. pedunculata*. *L. stoechas* possède des pétales de taille égale alors que ceux de *L. pedunculata* et de ses sous-espèces sont de tailles différentes (Figure 24). La forme des bractées fertiles diffère également. Les sommets de ceux de *L. pedunculata* sont arrondis ou sont parfois apiculés au moins sur la partie inférieure de la hampe florale, tandis que ceux de *L. stoechas* ont un apex aigu distinct.

*L. Pedunculata* tolère des froids allant jusqu'à  $-10^{\circ}\text{C}$ . Elle pousse à 700-1500 m d'altitude sur sols acides à légèrement calcaires. Au Portugal, elle est très populaire en médecine traditionnelle, lors de cérémonies religieuses, ainsi qu'à des fins mellifères et ornementales (Zuzarte *et al.*, 2010). Une étude récente a montré que les HEs ont une importante activité antifongique, en particulier le chémotype à haute teneur en 1,8-cinéol et camphre (Zuzarte *et al.*, 2009).



**Figure 23 : Distribution géographique de *L. pedunculata* (d'après Upson & Andrews, 2004)**



**Figure 24 : *Lavandula pedunculata*, tige fleurie x 1 et cyme agrandie x 4 (d'après Upson & Andrews, 2004)**

*Sous-espèce L. pedunculata subsp. lusitanica (Chaytor) Franco*

*L. pedunculata* subsp *lusitanica* est originaire de l'Ibérie occidentale, dans le sud du Portugal et le sud-ouest de l'Espagne. Elle est commune sur les sols sablonneux dans les zones côtières, mais se trouve aussi à l'intérieur des terres. L'épithète *lusitanica* dérive de *Lusitania*, l'ancien nom de la partie ouest de la péninsule ibérique. Elle est souvent nommée la 'lavande espagnole à feuilles étroites'. C'est un arbuste ayant des tiges dressées ou ascendantes à 50 cm. Les feuilles sont étroitement elliptiques et gris-vertes. Les inflorescences sont compactes, subcylindriques à ovales. Les bractées fertiles sont larges, rondes, à réniformes, parfois obovales à apex obtus, ou apiculées à pétiolées et distinctement obovales à forme de losange au sommet. La période de la floraison se situe de mars à mai (juin) à l'état sauvage.

La pubescence longue et laineuse des calices et des bractées fertiles, la distingue immédiatement de la subsp. *pedunculata* qui se caractérise par des poils courts et ramifiés. L'inflorescence est généralement courte et subcylindrique à ovale (seulement 2-3 x plus long que large). Ceci permet de la distinguer de la subsp. *sampaiana* qui a des inflorescences longues. Les bractées apicales de la subsp. *lusitanica* sont également différentiantes car elles sont bleu-violettes tandis qu'elles sont violet-pourpre chez la subsp. *sampaiana*.

#### 1.3.2.1.3. L'espèce *L. viridis* L'Hér.

*L. viridis*, communément appelée 'lavande verte' ou 'lavande blanche' se caractérise par d'étonnantes fleurs blanches qui rendent cette lavande nettement différente. La couleur blanche des fleurs fait partie d'un syndrome généralement associé aux insectes pollinisateurs volant la nuit comme les papillons de nuit même si cela n'a jamais été démontré pour cette espèce. Les fleurs blanches fanent pour rapidement prendre une teinte brune.

C'est une espèce endémique du sud-ouest de l'Espagne et du sud du Portugal. Elle vit dans un maquis ouvert à assez basse altitude et à Madère (Figure 25). Cette espèce pousse dans des conditions sèches sur les sols pauvres, acides et dégradés de l'Algarve et l'Alentejo (Amaral Franco, 1983). Elle est intermédiaire, d'un point de vue anatomique, entre *L. stoechas* et *L. pedunculata*. Elle forme typiquement un petit arbuste, de 60-80 cm de hauteur, avec des épis floraux robustes brièvement pétiolés portant des bractées vertes stériles au sommet (Figure 26). Les feuilles sont largement linéaires, lancéolées, très vertes avec une haute densité glandulaire qui lui confère une sensation collante et une forte odeur citronnée. L'inflorescence mesure jusqu'à 8 cm de long. Les bractées stériles sont largement ovales, assez courtes et longues de 2-3 cm. Les bractées fertiles sont obovales à largement ovales et de couleur vert-blanche. La floraison a lieu au printemps et en automne. Les akènes circulaires sont plus larges que ceux des autres espèces, constituant un caractère spécifique de l'espèce. Cette espèce de lavande supporte la mi-ombre et elle ne tolère le gel que jusqu'à -5°C. Elle est cultivée comme plante ornementale. Tout, ou partie de la plante peut être utilisé comme herbe culinaire (Kourikn, 1998) et les feuilles séchées sont utilisées à des fins médicinales à Madère.



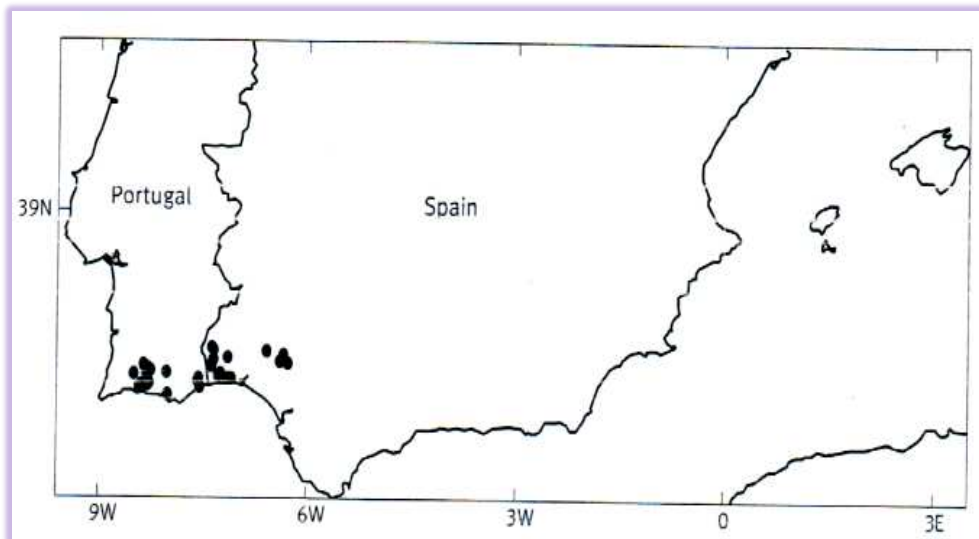


Figure 25 : Distribution géographique de *L. viridis* dans la Péninsule Ibérienne (d'après Upson & Andrews, 2004)

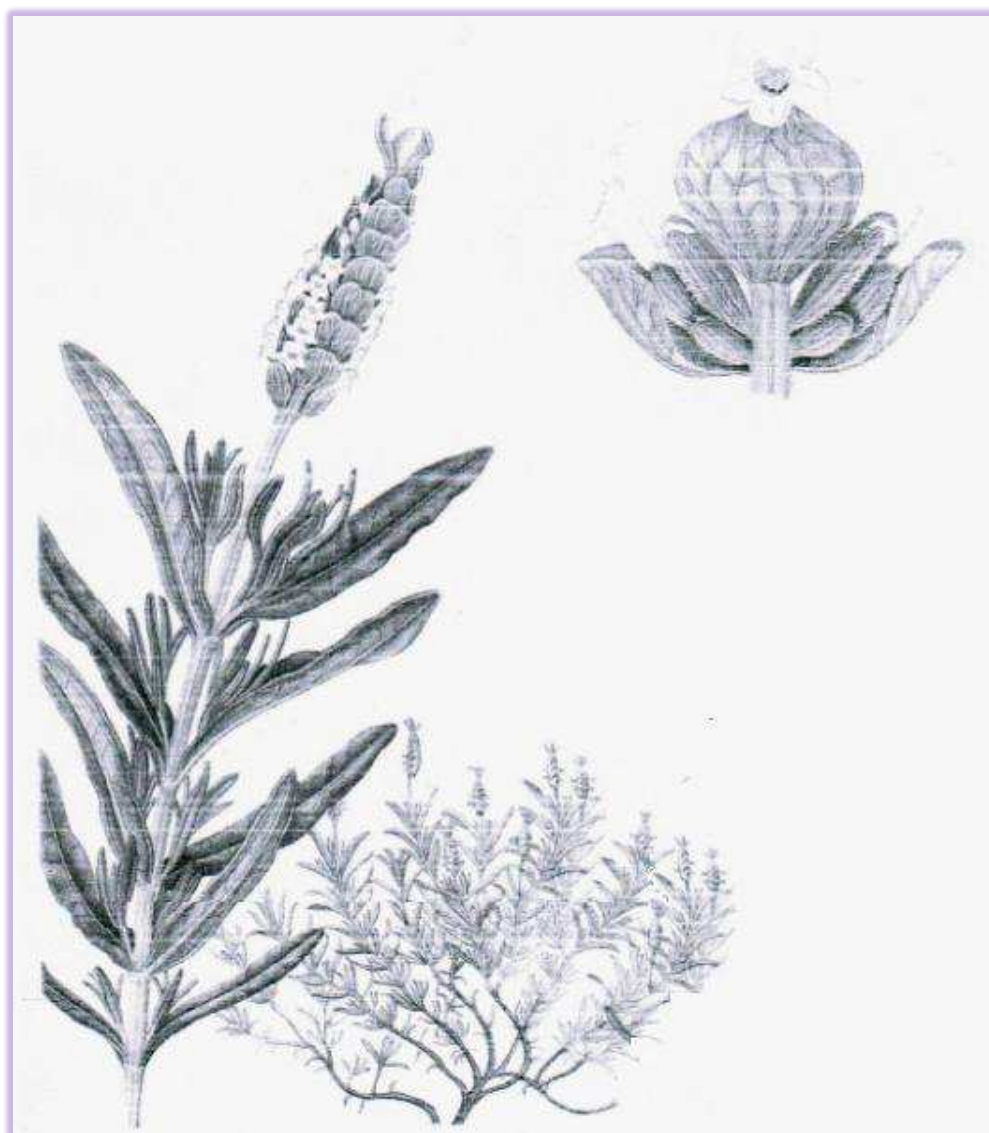
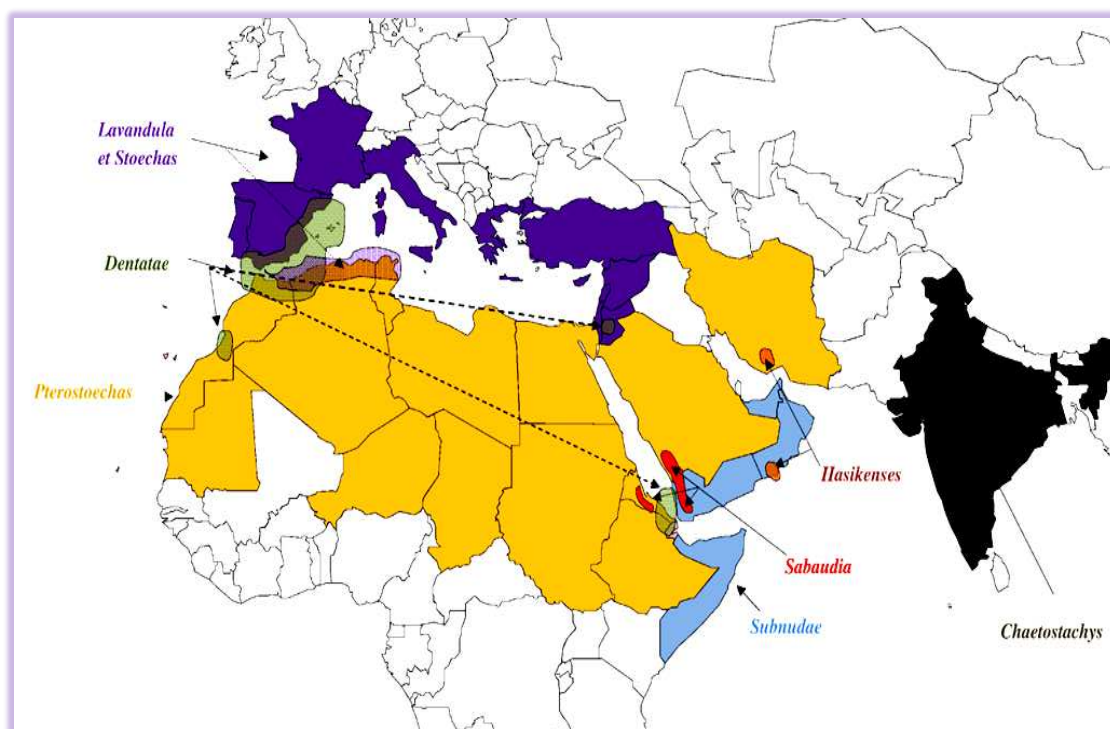


Figure 26 : *Lavandula viridis*, tige fleurie x 1 et cyme agrandie x 4 (d'après Upson & Andrews, 2004)

### I.3.3. Répartition géographique

En général, les lavandes poussent et s'épanouissent mieux dans des terrains secs, bien drainés, légers, sablonneux et pierreux en plein soleil (Grieve, 1971). Les lavandes poussent surtout sur des sols calcaires à l'exception des espèces des sections *Stoechas* et *Dentatae* qui préfèrent les sols siliceux. Toutes les espèces de lavande ont besoin de peu, voire pas d'engrais, et d'une bonne circulation d'air dans les zones de forte humidité. L'excès d'humidité est leur pire ennemi.

Le genre *Lavandula* appartient à l'ancien monde, avec une aire de répartition naturelle qui s'étend de la Macaronésie (îles du Cap Vert, Canaries et Madère) à travers l'Afrique du Nord et tropicale, l'Europe Méditerranéenne, le moyen orient, la péninsule Arabique, l'Iran occidental jusqu'au Sud-est de l'Inde (Figure 27) (Lis-Balchin, 2002). Les 39 espèces du genre *Lavandula* sont donc réparties sur trois continents, l'Afrique, l'Europe et l'Asie. Parce que des formes cultivées ont été plantées dans des jardins du monde entier, plusieurs espèces se rencontrent à l'état sauvage bien au-delà de leur aire naturelle de répartition. Ce sont des échappées de culture. Comme plusieurs espèces sont sympatriques et peuvent générer des hybrides fertiles, il est possible que la grande diversité des espèces de certaines espèces de lavande soit issue d'hybridations inter-spécifiques.



**Figure 27 : Schématisation de l'aire de répartition des sections du genre *Lavandula* (d'après Guïton, 2011)**

Les pays sont de la couleur de la section majoritairement présente. Pour certaines sections dont la répartition est plus restreinte, une zone de couleur indique les principales zones de présence. **Jaune** : Section *Pterostoechas*, **Bleu foncé** : Sections *Lavandula* et *Stoechas*, **Noire** : Section *Chaetostachys*, **Bleu clair** : Section *Subnudae*, **Vert** : Section *Dentatae*, **Rouge** : Section *Sabaudia* et **Orange** : Section *Hasikenses*.

La paléogéographie suggère des liens possibles entre l'ensemble des zones de l'aire de répartition actuelle du genre *Lavandula* (Meulenkamp & Sissingh, 2003). Davis et Hedge (1971) remarquent que le genre *Lavandula* est un exemple de lien floristique entre le sud-ouest de l'Asie et le nord-ouest de l'Afrique au même titre que les genres *Helianthemum*, *Cuminum* et *Salvia*. Actuellement, le plus grand nombre d'espèces de lavandes (44 %) est dans la zone ouest de l'aire de répartition et représente certainement une diversification plus récente.

La distribution actuelle des lavandes est probablement en lien avec les changements climatiques et/ou la tectonique des plaques, mais ceci n'explique pas la présence de lavandes sur les îles volcaniques de l'océan atlantique qui n'ont jamais été en relation avec le continent. Les lavandes ont donc colonisé ces îles via une dispersion à longue distance probablement par des pinsons ou d'autres espèces d'oiseaux granivores (Upson & Andrews, 2004) ou par le transport des graines facilité par les Alizés ou les forts courants marins (Juan *et al.*, 2000).

En Algérie, ce genre est représenté par sept espèces spontanées, *L. stoechas*, *L. multifida*, *L. coronopifolia*, *L. pubescens*, *L. dentata*, et les plus récemment décrites *L. antineae* et *L. sahariensis* (Quezel & Santa, 1963 ; Upson & Andrews, 2004). Certaines sont rares et disséminées en haute montagne ou cantonnées dans le grand Sahara. D'autres sont au contraire particulièrement abondantes et répandues sur de grandes étendues. *L. stoechas* est la seule de ces espèces qui pousse également en France à l'état sauvage.

#### **I.3.4. Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique**

La plupart des espèces du genre *Lavandula* sont très odorantes. Certaines sont même cultivées pour leurs HEs qui sont extraites par distillation à la vapeur à partir de tissus floraux ou foliaires. Commercialement, plus de 462 tonnes d'HEs sont produites annuellement à partir d'espèces du genre *Lavandula* (Morhy *et al.*, 1970 ; Lawrence, 1992). La popularité persistante et la valeur commerciale de la lavande a été confirmée quand elle a été nommée "l'herbe de l'année 1999" par le réseau de la culture et la commercialisation d'herbes médicinales, aromatiques et à parfum aux Etats-Unis d'Amérique (Evelegh, 1996). Leurs HEs sont de haut intérêt économique dans les industries des parfums, des cosmétiques, des arômes agro-alimentaires, pharmaceutiques et de nos jours également dans l'aromathérapie (Boelens, 1995 ; Lis-Balchin, 2002 ; Upson & Andrews, 2004). Les propriétés médicinales et parfumantes des HEs de lavande sont essentiellement attribuées aux terpénoïdes volatils qu'elles contiennent. Ce sont les monoterpènes et les

sesquiterpènes qui donnent en effet aux HEs des lavandes leurs parfums et propriétés caractéristiques (Flores *et al.*, 2005). La proportion des principaux terpènes dans l'HE est un critère d'évaluation de la qualité de l'HE (AFNOR, 1996). Les teneurs relatives de ces substances jouent un rôle important dans le choix de telle ou telle variété par l'herboriste ou l'industriel (Grayer *et al.*, 1996). Les espèces les plus couramment utilisées, et ayant une valeur industrielle et médicinale, sont *L. angustifolia*, *L. latifolia*, *L. stoechas*, *L. x intermedia*, *L. dentata*, *L. dhofarensis*, *L. fragrans* et *L. multifida* (Gámez *et al.*, 1987 ; Cavanagh & Wilkinson, 2002 ; Upson & Andrews, 2004). La plus couramment cultivée est la lavande vraie ou anglaise, *L. angustifolia*. Une large gamme de cultivars a été développée (Grieve, 1971). Les lavandins, *L. x intermedia* (*L. angustifolia* x *L. latifolia*) sont également très cultivés à des fins commerciales, car leurs inflorescences ont tendance à être plus grandes que celles de la lavande anglaise et les plantes ont tendance à être plus faciles à cultiver et récolter, mais l'HE de lavandin est cependant considérée comme ayant une qualité inférieure à celle de la lavande anglaise, avec un parfum moins doux (Lis-Balchin, 2002). Aujourd'hui, des multi-tonnes de quantités de lavande, lavandin et lavande aspic sont produites en France, Bulgarie, Chine, Espagne, Russie, Ukraine, Moldova, l'ex Yougoslavie, Australie, Argentine et Bretagne (Upson & Andrews, 2004). En 2009, les surfaces cultivées en France étaient de près de 15 000 ha pour le lavandin et 4000 ha pour la lavande. En Algérie, à un moment donné, des quantités limitées des HEs de lavandes ont été produites. Selon Peyton (1983) la production était d'environ 10 tonnes pendant le début des années 1980. *L. stoechas*, est de moindre importance comme source d'HEs, mais, avec ses hybrides, cette espèce est de plus en plus populaire en tant que plante ornementale (Upson & Andrews, 2004). Des quantités limitées (moins de 1 tonne) de *L. stoechas* sont produites en Espagne à partir de plantes sauvages. L'HE, qui est riche en fenchone, est principalement utilisée en aromathérapie (Upson & Andrews, 2004). La majorité des travaux de développement variétal et de recherche sur la composition et la biosynthèse des HEs de lavandes ont été conduits sur la lavande vraie et le lavandin (Cavanagh & Wilkinson, 2002).

Les lavandes sont parmi les plantes médicinales les plus utilisées. Des preuves documentées de l'utilisation des lavandes comme agent thérapeutique remontent jusqu'aux anciens Romains, Grecs et Arabes (Evelegh, 1996). Les lavandes étaient utilisées par les Romains pour conserver le linge et parfumer les bains. Les différentes lavandes ont certains usages en médecine traditionnelle et certains constituants chimiques similaires. Cependant, il y a quelques différences dans les usages thérapeutiques rapportés pour les

différentes espèces. Par exemple, la plupart des lavandes semblent avoir des actions carminatives mais *L. stoechas* est traditionnellement utilisée contre les maux de tête, *L. latifolia* comme abortive et *L. angustifolia* comme diurétique. (Agricultural Research Service, 2000). Par ailleurs, les infusions des parties aériennes d'un certain nombre d'espèces de lavande sont utilisées comme antiseptiques ou pour des actions carminatives, sédatives, spasmolytiques, antidouleurs ainsi que comme des agents de cicatrisation (Gamez *et al.*, 1990 ; Buchbauer, *et al.*, 1991 ; Schulz, 2005). Certaines espèces ont un effet acaricide (Lis-Balchin, 2002). Les Lavandes ont une faible toxicité et des HEs non-diluées peuvent être utilisées pour traiter certaines brûlures et avoir des effets bénéfiques sur la cicatrisation. Cependant, des cas de dermatite allergique après contact direct avec la peau ont été rapportés (Lis-Balchin, 2002)

On peut faire infuser des fleurs de lavande dans du lait et l'utiliser ensuite pour la préparation de glaces ou de crèmes à la lavande. Les brins sont aussi utilisés dans les vallées, notamment celle de l'esteron, près de Nice, pour confectionner une liqueur particulièrement forte en bouche, et aux vertus antiseptiques, digestives et calmantes. Dans l'industrie agro-alimentaire, les HEs de lavande sont employées dans les boissons aromatiques, les crèmes glacées, les bonbons, les pâtisseries, et les gommes à mâcher (Kim & Lee, 2002).

Récemment, l'aromathérapie est devenue de plus en plus populaire. La lavande y est utilisée comme relaxant (Ghelardini *et al.*, 1999 ; Lis-Balchin & Hart, 1999). Les aromathérapeutes considèrent l'HE de *L. angustifolia* comme la plus bénéfique, avec des cultivars sauvages cultivés à haute altitude. La preuve scientifique est encore manquante pour un possible effet de détente générale après une inhalation (Lis-Balchin, 2002).

Les espèces du genre *Lavandula* sont aussi des plantes mellifères qui génèrent des miels de couleurs et odeurs propres à chaque espèce. Les fleurs de la lavande fine (*L. angustifolia*), la lavande aspic (*L. latifolia*), le lavandin (*L. x intermedia*) et la lavande stéchas (*L. stoechas*) constituent des sources majeures de nectar pour les abeilles (Guyot-Declerck, 2002). De nombreuses plantes de lavande sont également vendues comme plantes ornementales pour les jardins populaires dont *L. latifolia*, *L. pinnata*, *L. lanata*, *L. multifida*, *L. dentata* *L. stoechas* et *L. pedunculata* avec leurs nombreux cultivars (Grieve, 1971 ; Lis-Balchin, 2002). Enfin, il a été mentionné que certaines lavandes sont aussi utiles dans l'agriculture biologique comme bioinsecticides. Elles constituent des cultures de choix dans les terres arides (González-Coloma *et al.*, 2006).

### I.3.5. Phytochimie

#### I.3.5.1. Huiles essentielles

Toutes les espèces et les hybrides du genre *Lavandula* sont des plantes très aromatiques qui produisent des mélanges complexes d'HEs produites et stockées dans des glandes sur la surface des fleurs et des feuilles (Lis-Balchin, 2002). Les HEs de ces espèces sont parmi les 20 HE les plus importées par les Etats-Unis depuis 1985 (Boelens, 1995 ; Weiss, 1997). Il n'est donc pas surprenant que les connaissances phytochimiques sur les lavandes soient centrées sur leurs HEs.

##### I.3.5.1.1. Variation inter-spécifique

Les études sur la composition chimique des HEs des espèces du genre *Lavandula* montrent qu'elles sont plus riches en monoterpènes qu'en sesquiterpènes et que ces deux groupes de molécules constituent la majeure partie des HEs. Parmi les 39 espèces de lavande connues, seulement 13 espèces ont fait l'objet d'analyses de la composition chimique de l'HE (Tableau 3). Les Etudes des constituants volatils des espèces de lavande ont révélé la présence de plus de 200 constituants chimiques, beaucoup d'entre eux étant présents sous forme de trace. Certaines espèces telles que *L. stoechas* synthétisent plus de 100 terpènes différents alors que d'autres espèces telle que *L. canariensis* expriment une diversité terpénique beaucoup plus faible. *L. stoechas* a été plus particulièrement étudiée du fait de son aire de répartition large et de son utilisation traditionnelle très ancienne. Globalement, les espèces du sous-genre *Lavandula* sont les plus étudiées à cause de l'intérêt commercial de leurs HEs. En ce qui concerne les sous-genres *Fabricia* et *Sabaudia*, seules les compositions des HEs de *L. multifida*, *L. canariensis*, *L. pinnata*, *L. coronopifolia* et *L. bipinnata* ont été rapportées dans la littérature (Tableau 3) et ce bien que certaines espèces des sous-genres *Fabricia* et *Sabaudia* dont la composition de l'HEs est inconnue soient utilisées depuis longtemps en médecine traditionnelle (El-Hilaly *et al.*, 2003 ; Upson & Andrews, 2004).

##### I.3.5.1.2. Variation intra-spécifique

La composition chimique des HEs de différentes espèces, hybrides et cultivars de lavande montrent non-seulement des différences interspécifiques, mais aussi des différences intra-spécifiques où différentes populations expriment des chémotypes différents. Par exemple, *L. stoechas* a été étudiée dans différents pays méditerranéens (Crète, Espagne, Corse, Chypre, Grèce, Turquie, Maroc, Algérie et Tunisie) avec des résultats variables (Tableau 3) (Kokkalou, 1988 ; Garcia-Vallejo 1992 ; Valentini *et al.*,

1993 ; Skoula *et al.*, 1996 ; Baldovini *et al.*, 1998 ; Gören *et al.*, 2002 ; Zrira & Benjilali, 2003 ; Bouzouita *et al.*, 2005 ; Dob *et al.*, 2006a). En 1992, une importante étude menée par García-Vallejo a montré une variation chez certaines espèces de lavandes sauvages de différentes régions de l'Espagne. Ainsi, des variations intra-spécifiques chez *L. dentata* récoltées dans différents endroits en Algérie (Bousmaha *et al.*, 2006) et chez *L. multifida* de différents sites du Maroc (Bellakhdar *et al.*, 1985) ont été rapportées (Tableau 3). Ces variations sont soit qualitatives (composés différents) soit quantitatives (proportions différentes de certains composés). En plus, ces variations sont généralement d'ordre individuel ou d'ordre populationnel. Ces variations peuvent parfois être dues à des différences climatiques, géographiques ou saisonnières ou simplement à la quantité d'arrosage ou la fertilisation utilisée. Elles peuvent également avoir une origine génétique, ce qui est observé quand des plantes d'origines géographiques différentes sont cultivées à proximité l'une de l'autre. Finalement, ces variations peuvent être également attribuées aux méthodes d'extraction des HEs et dans le cas des HEs commerciales, au degré de mélange et de falsification.

Les composés terpéniques sont caractéristiques des espèces de lavande et constituent des marqueurs chémotaxonomiques utiles pour distinguer des espèces et même des sous-espèces. Par exemple, *L. stoechas* subsp. *luisieri* est le seul taxon de lavande produisant les monoterpènes irréguliers, le *cis*- et le *trans*- $\alpha$ -nécrodol et l'acétate de *trans*- $\alpha$ -nécrodol (Garcia-Vallejo *et al.*, 1994 ; Lavoine-Hanneguelle & Casabianca, 2004 ; Sanz *et al.*, 2004 ; Baldovini *et al.*, 2005 ). Ces monoterpènes n'ont, été détectés que chez certains insectes (Millar *et al.*, 2005). Dans le genre *Lavandula*, aucune étude n'a encore mis en parallèle des variations chémotypiques avec des variations génétiques. Ainsi, bien que des études sur la variabilité génétique des populations de *L. stoechas*, *L. multifida* (Chograni *et al.*, 2008), *L. angustifolia* (Segur-Fantino *et al.*, 1988) et *L. latifolia* (Herrera & Bazaga, 2007) existent, elles n'ont pas décrites la composition terpénique des HEs des plantes étudiées.

**Tableau 3 : Variations inter-spécifiques et intra-spécifiques des principaux constituants des HEs des espèces du genre *Lavandula* dans la littérature**

Sous-genre	Section	Espèce	Origine	Organe	Principaux constituants (%)	Références
<i>Lavandula</i>	<i>L. angustifolia</i>	Australie	-	-	linalol (8-41) acétate de linalyle (6-20) terpinène-4-ol (4-12)	An <i>et al.</i> (2001)
		Corée	Feuilles et fleurs	-	linalol (18-43) acétate de linalyle (2-35)	Kim & Lee (2002)
		Isfahane (Iran)	Feuilles	-	1,8-cinéol (65.4) bornéol (11.5) camphre (9.5)	Hajhashemi <i>et al.</i> (2003)
		Tegrane (Iran)	Partie aérienne fleurie	-	linalol (32-35) acétate de linalyle (13-14) acétate de lavandulyle (10-15)	Fakhari <i>et al.</i> (2005)
		Xinjiang (China)	-	-	linalol (44.54) géraniol (11.02) acétate de lavandulyle (10.78)	Cong <i>et al.</i> (2008)
		Lituanie	-	-	acétate de linalyle (26.5) linalol (20.9)	Venskutonis <i>et al.</i> (1997)
		Australie	-	-	acétate de linalyle (40-41) linalol (29-36)	Moon <i>et al.</i> (2007)
	<i>L. lanata</i>	Mainz (Allemagne)	-	-	camphre (50.4) 1,8-cinéol (36)	Yassaa & Williams (2005)
		Comunidad Valenciana (Espagne)	Feuilles	-	1,8-cinéol (20-54) camphre (11-43) linalol (0-54)	Munoz-Bertomeu <i>et al.</i> (2007)
		Jaén province (Espagne)	Fleurs	-	linalol (27-41) 1,8-cinéol (28-34) camphre (10-23)	Salido <i>et al.</i> (2004b)
<i>Lavandula</i>	<i>Dentatae</i>	<i>L. dentata</i>	-	Culture <i>in vitro</i>	1,8-cinéol (25.6) fenchol (18.5) camphre (15.2) bornéol (13.2)	Sudriá <i>et al.</i> (1999)
		Cherchel (Algérie)	Partie aérienne fleurie	-	1,8-cinéol (38.4) cis-verbenol (4.3)	Dob <i>et al.</i> (2006b)
		Beni-Saf (Algérie)	Fleurs, feuilles et tiges	-	$\beta$ -pinène (6-26) 1,8-cinéol (0.9-36) trans-pinocrvéol (3-9)	Bousmaha <i>et al.</i> (2006)
		Talazart (Maroc)	Partie aérienne	-	1,8-cinéol (41.28) sabinène (13.89)	Imelouane <i>et al.</i> (2009)
<i>Lavandula</i>	<i>Stoechas</i>	<i>L. stoechas</i>	Corse (France)	-	fenchone (14-75) camphre (2-56) 1,8-cinéol (3-14) acétate de myrtényle (1-4)	Ristorcelli <i>et al.</i> (1998)
		Crète	Feuilles et fleurs	-	fenchone (44-48) 1,8-cinéol (5-16) camphre (4-6) acétate de myrtényle (2-9)	Skoula <i>et al.</i> (1996)
		Cherchel (Algérie)	Feuilles et fleurs	-	fenchone (31) camphre (22) <i>p</i> -cymène (6)	Dob <i>et al.</i> (2006a)
		Cagliari (Italie)	Fleurs, feuilles et tiges	-	fenchone (59-72) camphre (9-15) acétate de myrtényle (3-5)	Angioni <i>et al.</i> (2006)
		Australie	-	-	camphre (48) fenchone (21) 1,8-cinéol (9)	Moon <i>et al.</i> (2007)
		Kairouane (Tunisie)	Feuilles	-	fenchone (68.2) camphre (11.2) 1,8-cinéol + limonène (4.9)	Bouzouita <i>et al.</i> (2005)

Suite du tableau à la page suivante...



Tableau 3 : (Suite)

Sous-genre	Section	Espèce	Origine	Organe	Principaux constituants (%)	Références
Lavandula	Stoechas	<i>L. stoechas</i> ssp. <i>atlantica</i>	Rabat (Maroc)	Partie aérienne fleurie	camphre (39.2) fenchone (9.2) camphène (6.7) $\alpha$ -pinène (6.5)	Zrira & Benjilali (2003)
		<i>L. stoechas</i> ssp. <i>stoechas</i>	Rabat (Maroc)	Partie aérienne fleurie	fenchone (30.5) camphre (18.2) 1,8-cinéol (8.6)	Valentini <i>et al.</i> (1993)
			Chypre	Partie aérienne fleurie	fenchone (28-51) camphre (4-39)	
		<i>L. stoechas</i> ssp. <i>luisieri</i>	Seville (Espagne)	Partie aérienne fleurie	acétate $\alpha$ -necrodyle (17-27) 1,8-cinéol (6-16) acétate de lavandulyle (4-5)	Lavoine-Hanneguelle & Casabianca (2004)
			Toledo et Seville (Espagne)	Feuilles et fleurs	camphre (1-53) 5-Methylene-2,3,4,4-tetramethylcyclopent-2-enone (5-38) fenchone (1-22) 1,8-cinéol (0.4-20)	González-Coloma, <i>et al.</i> (2006)
		<i>L. pedunculata</i>	Portugal	Partie aérienne fleurie	fenchone (6-44) camphre (8-34) 1,8-cinéol (5-34)	Zuzarte <i>et al.</i> (2009)
		<i>L. viridis</i>	-	Culture <i>in vitro</i>	1,8-cinéol (18-25) camphre (9-15) $\alpha$ -pinène (8-14)	Nogueira & Romano (2002)
Barranco do Velho et Salir (Portugal)	Partie aérienne fleurie		1,8-cineole (34-42) camphor (13) $\alpha$ -pinène (9) linalol (7-6)	Zuzarte <i>et al.</i> (2011)		
Fabricia	Pterostoechas	<i>L. multifida</i>	Tunisie	Partie aérienne fleurie	carvacrol (31.81) $\beta$ -bisabolene (14.89) acrylic acid dodecyl ester (11.43)	Chograni <i>et al.</i> (2010)
		<i>L. canariensis</i>	Sydney (Australie)	Partie aérienne	carvacrol (23.6) $\beta$ -bisabolene (20.8) (E,E)- $\alpha$ -farnesene (11.3)	Pala-Paul <i>et al.</i> (2004)
		<i>L. pinnata</i>	Madère (Portugal)	Fleurs, feuilles et tiges	$\beta$ -Phellandrene (12-32) $\alpha$ -phellandrene (6-16) $\beta$ -caryophyllene (11)	Figueiredo <i>et al.</i> (1995)
		<i>L. coronopifolia</i>	Amman (Jordanie)	Feuilles et fleurs	linalol (20-41) 1,8-cinéol (7-25) camphre (11-19) terpinène-4-ol (10-11)	Aburjai <i>et al.</i> (2005)
	Chaetostachys	<i>L. bipinnata</i>	Dharwad (Inde)	Feuilles	trans-carvéol (18.93) menthol (8.89) pulégone (8.45) camphre (7.09)	(Hanamanthagouda <i>et al.</i> (2009)

### I.3.5.2. Flavonoïdes

Parmi les nombreux composés chimiques connus chez les lamiacées, les flavonoïdes se sont révélés avoir une valeur taxonomique particulière aussi bien au sein du genre que de la famille des Lamiacées (Ferrerres *et al.*, 1986 ; Tomas-Barberan *et al.*, 1988 ; Xavier & Andary, 1988 ; El-Garf *et al.*, 1999). La première étude exhaustive sur les flavonoïdes des feuilles de lavande a été entreprise par Upson *et al.* (2000). Cette étude a montré que l'accumulation de certains flavonoïdes soutenait sur le regroupement infra-spécifique et les liens à l'intérieur du genre. Les glycosides de flavone 8-O-hydroxylés, rares dans la famille Lamiacées et dans la sous-famille des *Nepetoideae*, ont été trouvés uniquement dans le genre *Lavandula* (El-Garf *et al.*, 1999). Ils sont exclusifs des sections du sous-genre *Fabricia* et du sous-genre *Sabaudia*. La présence de certains flavonoïdes a apporté un soutien fort à l'existence de trois sous-genres.

Les principaux constituants des flavonoïdes des feuilles des espèces *Lavandula* sont des flavone glycosides. Six sous-classes différentes sont représentées (Tableau 4). Ce sont des flavones glycosides simples, les flavones C-glycosides, les 6-hydroxyflavone 7-glycosides et les 8-hydroxyflavone 7- et 8-glycosides. Leur répartition entre les taxons montre une certaine valeur taxonomique. Ce profil flavonoïdique complexe est typique des membres de la famille des Lamiaceae avec notamment la présence fréquente de flavones avec hydroxylation supplémentaire aux positions 6- et 8-.

**Tableau 4 : Distribution de différentes classes de flavonoïdes dans le genre *Lavandula* (d'après Upson & Andrews 2004)**

Section	flavone 7-O- monoglycosides	flavone di-O- glycosides	6-hydroxy- flavone 7-O- glycosides	flavone C- glycosides	8-hydroxy- flavone 8-O- glycosides	8-hydroxy- flavone 7-O- glycosides
<i>Lavandula</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Dentata</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Stoechas</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Pterostoechas</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Subnuda</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Chaetostachys</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Sabaudia</i>	+	-	-	-	-	+

### I.3.6. Les gènes de TPSs de Lavandes

Très peu de données moléculaires existent pour les lavandes. Seulement 6 TPSs ont été clonées et caractérisées chez les lavandes. En utilisant la stratégie de PCR basée sur des homologies de séquence avec les TPSs d'autres espèces végétales, deux monoTPSs, la

limonène synthase (*LaLIMS*) et la linalol synthase (*LaLINS*) et une sesquiTPS, la bergamotène synthase (*LaBERS*) ont été clonées depuis les feuilles et les fleurs de *L. angustifolia* (Landmann *et al.*, 2007, accessions GeneBank DQ263740, DQ263741 et DQ263742, respectivement). En plus, une séquence non-publiée de linalol synthase (accession GeneBank ABD77417.1) a été clonée chez *L. latifolia* et déposée dans GenBank. Très récemment, et toujours à partir des fleurs de *L. angustifolia*, une  $\beta$ -phéllandrène synthase, *La $\beta$ PHLS*, et une TPS inactive, *LaTPS-I* dépourvue du motif "DDxxD" essentiel à la catalyse ont été clonées (Demissie *et al.*, 2011). Toutes ces TPSs sont capables de synthétiser plusieurs terpènes à l'exception de la *LaLINS* qui ne fait que du linalol. *LaLINS* et *LaLIMS* n'acceptent que le GPP comme substrat alors que *LaBERS* accepte le GPP et le FPP et *La $\beta$ PHLS* accepte le GPP et le NPP. On retrouve un lien évolutif possible entre *LaLIMS* et *LaBERS* par perte du peptide d'adressage chloroplastique présent sur la partie N-terminale et par élargissement du nombre de substrats possibles (Landmann *et al.*, 2007). En plus, Lane *et al.* (2010) ont construit une banque d'ADNc de 14213 séquences exprimées dans les feuilles et fleurs de *L. angustifolia*. Basé sur l'homologie avec des séquences présentes dans GenBank, cette collection d'ADNc contient des orthologues de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des terpénoïdes, MEP et MVA ainsi que 25 séquences de gènes de TPSs potentielles et 4 séquences de prényl transférases potentielles. Juste avant de déposer cette thèse, Demissie *et al.* (2012) ont cloné et caractérisé une 1,8-cinéol synthase (*LiCINS*) chez *L. x intermedia* ainsi que ces orthologues chez *L. angustifolia* et *L. latifolia*.

#### I.4. LES OBJECTIFS DE LA THESE

Les herbes aromatiques ont une longue histoire d'usage en médecine traditionnelle. Les terpénoïdes sont des produits importants, non-seulement en raison de leur importance écologique, mais aussi du fait de leur importance économique dans les industries cosmétique, agroalimentaire, pharmaceutique et aromathérapeutique sous forme d'HEs. Les plantes à HE montrent habituellement une composition chimique variable pour des raisons à la fois génétiques et environnementales (Figueiredo *et al.*, 1997). Cette variabilité qui affecte la qualité et les proportions des constituants affecte par voie de conséquence l'activité biologique des HEs. Par conséquent, l'ingénierie métabolique ayant pour but d'augmenter la teneur des composés désirés a reçu une attention particulière ces dernières

années (Ye *et al.*, 2000 ; Lewinsohn *et al.*, 2001 ; Munoz-Bertomeu *et al.*, 2006). Des efforts ont été entrepris pour déchiffrer les voies de biosynthèse des terpènes et analyser le rôle spécifiquement joué par chaque enzyme (Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2002). La combinaison des données de chimie, biochimie et génomique offre une approche très puissante pour la découverte des ensembles complets de gènes et d'enzymes des voies de la biosynthèse des terpénoïdes (Bohlmann *et al.*, 2008a). Les TPSs catalysent la première étape de la biosynthèse des mono et sesquiterpènes à partir de substrats simples, GPP et FPP respectivement. Ces enzymes sont responsables de la grande diversité des squelettes carbonés des mono et sesquiterpènes, ces derniers pouvant éventuellement subir des modifications additionnelles par acétylation, hydroxylation, oxydation ou réduction. Les gènes de TPSs ont été isolés et caractérisés à partir de plusieurs espèces de Lamiacées, y compris des genres *Mentha* (Colby *et al.*, 1993 ; Crock *et al.*, 1997 ; Crowell *et al.*, 2002 ; Prosser *et al.*, 2006), *Perilla* (Yuba *et al.*, 1996 ; Hosoi *et al.*, 2004 ; Ito & Honda, 2007), *Salvia* (Wise *et al.*, 1998 ; Hoelscher *et al.*, 2003 ; Kampranis *et al.*, 2007) et *Ocimum* (Iijima *et al.*, 2004). Beaucoup de questions restent ouvertes sur les TPSs végétales et notamment les relations qui unissent leur fonction et leur structure. Peu d'exemples d'évènements évolutifs ayant conduit à une modification du chémotype d'une espèce végétale ont également été caractérisés. Au moment où cette étude a débuté, peu de facteurs moléculaires déterminant la biosynthèse et la composition des HEs des espèces de lavandes étaient connus. Même à l'heure actuelle, seulement 5 TPSs ont été clonées et caractérisées chez *L. angustifolia* (Landmann *et al.*, 2007 ; Demissie *et al.*, 2011 ; Demissie *et al.*, 2012) et une séquence de TPS de *L. latifolia* a été déposée sur GenBank. Aucune information fonctionnelle n'a encore été apportée sur les gènes de TPSs des espèces de la section *Stoechas* comme pour beaucoup d'autres lavandes. Des expériences ont été conçues pour étudier la diversité des terpénoïdes volatils produits par *L. stoechas* *Sensu Lato* d'un point de vue de leurs structures chimiques, leurs activités biologiques et leur origine biosynthétique. Les Objectifs de la présente étude ont été :

- ✚ de mieux caractériser la diversité et la variabilité chimique l'HE de *L. stoechas* par l'analyse d'un nombre important d'échantillons issus d'une même zone géographique en Algérie.

- ✚ d'évaluer l'activité biologique des HEs des populations Algériennes de *L. stoechas* étudiées ci-dessus : (i) activité antioxydante à l'aide de deux tests, le test DPPH et le test  $\beta$ -carotène/acide linoléique ; (ii) activité antibactérienne et antifongique envers 16 microorganismes pathogènes de l'homme et phytopathogènes afin de valider son utilisation traditionnelle ; (iii) certaines corrélations entre la composition chimique des HEs et leurs activités biologiques ont finalement été établies.
  
- ✚ d'identifier la composition chimique des COVs de *L. stoechas Sensu Lato* (*L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis*) afin de déterminer la biodiversité chémotypique au sein de la section *Stoechas* du *Lavandula*.
  
- ✚ d'isoler, de cloner, de séquencer et d'exprimer fonctionnellement chez *Escherichia coli* des gènes encore inconnus de TPSs de ces trois *Stoechas* afin de suggérer l'origine moléculaire de leurs différences chémotypiques. Ceux-ci ont été réalisés en utilisant des amorces dégénérées désignées sur des motifs conservés de TPSs.

**CHAPITRE II**  
**MATERIELS**  
**ET METHODES**

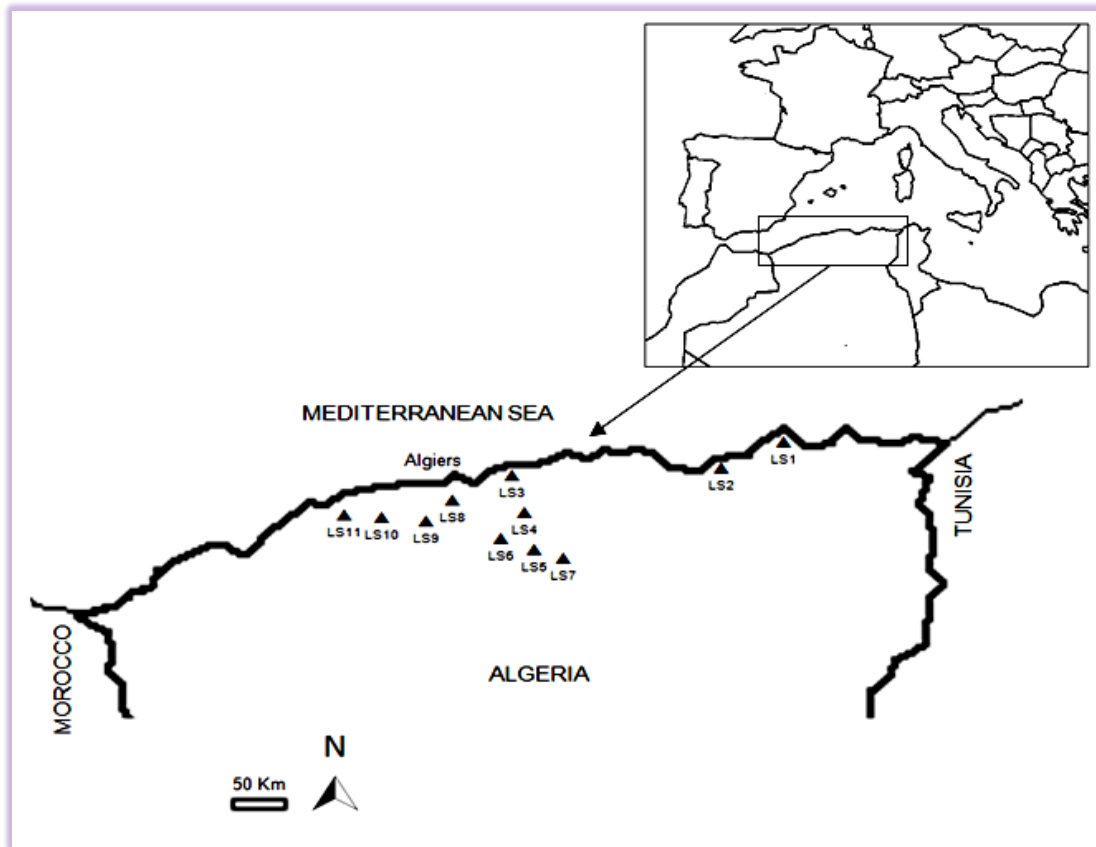
## II.1. Matériel végétal

Les parties aériennes de *L. stoechas* L. (feuilles + inflorescences) ont été collectées au maximum de la floraison (printemps 2007) à partir de populations sauvages pour l'étude comparative des populations algériennes de *L. stoechas*. En Algérie, les populations naturelles de *L. stoechas* sont situées au nord du pays, le long de la côte méditerranéenne. Au total, onze populations ont été collectées au hasard dans cette zone de distribution (Tableau 5, Figure 28). L'ensemble du matériel végétal pour analyse chromatographique a été récolté en mars 2007 pour éviter d'éventuelles variations saisonnières de la composition chimique de l'HE. L'authentification botanique de l'espèce a été réalisée à l'herbier du Département de botanique, à l'Ecole Nationale d'Agronomie (ENA), d'Alger, où des spécimens ont été déposés. L'identité des espèces a été également confirmée selon les clés botaniques dans la "Flore de l'Algérie" (Quezel & Santa, 1963).

**Tableau 5 : Sites de collecte (avec les abréviations) et principales caractéristiques écologiques des biotopes de 11 populations algériennes de *L. stoechas* qui ont servi de source d'HE dans la présente étude**

Code de population	Localité	Site de collection	Zone bioclimatique <sup>a</sup>	Pluviométrie (mm/an)	Coordonnées géographiques		
					Latitude N	Longitude E	Altitude (m)
LS1	Skikada	Aïn-Chéraïa	MH	905	36°51'21"	6°43'12"	478
LS2	Jijel	Iragheune	MH	1200	36°49'22"	5°45'45"	66
LS3	Boumerdes	Boumerdes	MH	900	36°45'49"	3°28'59"	88
LS4	Bouira	Lakhdaria	CH	660	36°34'12"	3°34'11"	128
LS5	Bouira	Ain Bessam	CH	660	36°17'53"	3°39'38"	685
LS6	Bouira	Guerrouma	CH	660	36°23'44"	3°26'23"	481
LS7	Bouira	Taguedit	CSA	400	36°09'01"	3°41'21"	200
LS8	Blida	Hammam Melouane	MH	600	36°28'16"	2°49'46"	346
LS9	Médéa	Benchicao	CH	615	36°11'53"	2°50'55"	1122
LS10	Ain Defla	Ain Defla	MSA	470	36°09'14"	2°03'59"	383
LS11	Chlef	Chlef	MSH	420	36°09'54"	1°19'25"	162

<sup>a</sup> Zone bioclimatique : HM = humide méditerranéenne, HC = humide continentale, SAC = semi-aride continentale, SAM = semi-aride méditerranéenne, SHM = subhumide méditerranéenne



**Figure 28 : Origine géographique des 11 populations algériennes de *L. stoechas* utilisées dans cette étude**

Les codes des populations sont les mêmes que ceux du Tableau 5.

Les graines de la lavande espagnole (*L. pedunculata*, Sous-espèce *lusitanica*) ont été aimablement fournies au BVpam en 2006 par Mr. B. Pasquier (directeur du Conservatoire National des Plantes à Parfum, Médicinales, Aromatiques et Industrielles "CNPMAI", Milly la Forêt, Paris, France). Les graines de cette espèce ont été collectées par lui-même en 2003 dans des populations sauvages situées à basse altitude dans l'ouest du Portugal (3916526N, 0833117WO, 54 m d'altitude, près de Alpiarça 78 km de Lisbonne).

Les graines de la lavande verte (*L. viridis*) ont été aimablement aussi fournies au BVpam en 2006 par Mr. B. Pasquier. Les graines de cette espèce ont été collectées en 2003 par lui-même dans des populations sauvages situées dans le sud ouest du Portugal (3719279N, 0832062WO, 440 m d'altitude, entre Monchique et Alferce, 255 km de Lisbonne).

Les graines de la lavande papillon (*L. stoechas*) ont été aimablement fournies en 2006 par le Dr. A. Saadi (doyen de la Faculté des Sciences, Université de Chlef, Algérie). Les



graines de cette espèce ont été récoltées en 2006 depuis une population sauvage située dans le nord de l'Algérie (362406N, 11816E, 40 m d'altitude, près de Ténès 200 km d'Alger).

## II.2. Souches de microorganismes

### Bactéries pathogènes cibles

Une sélection de bactéries pathogènes a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des HEs des populations de *L. stoechas*. Il s'agit notamment des bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* (E13), *Escherichia coli* (E195), *Escherichia coli* (ATCC 25925), *Escherichia coli* (K12), *Klebsiella pneumoniae* (E40), *Klebsiella pneumoniae* (KP19), *Salmonella enterica* (E32), *Acinetobacter baumannii* (E16) et *Pseudomonas aeruginosa* (CIP A22) et d'une bactérie à Gram positif, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Toutes ces souches bactériennes appartiennent à la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger (Algérie).

### Champignons filamenteux cibles

Les champignons filamenteux utilisés lors de l'évaluation de l'activité antifongique des HEs des populations de *L. stoechas* sont *Aspergillus Niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* f. sp lini (n° Fohn 3-5) et *Mucor ramannianus* (NRRL 1829). Toutes les cultures pures de champignons appartiennent à la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger (Algérie).

### Levures cibles

Nous avons également utilisé la levure *Candida albicans* (souche A et B) lors de tests d'activité antifongique. Toutes les cultures pures de ces deux souches de levure dérivent de l'isolat clinique de patients humains à l'hôpital Zmirli d'Alger.

### Bactéries de clonage

Différentes souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées dans des expériences de clonage. Pour le clonage de routine dans le vecteur pGEM-T easy, les bactéries chimiocompétentes d'*E. coli*, souches DH5 $\alpha$  et JM109 (Tableau 6) ont été utilisées. La souche TOP10 (Tableau 6) chimiocompétente a été utilisée pendant le clonage des TPSs en pleine longueur ou des TPSs pseudomatures comme une phase transitoire lors de la préparation des vecteurs d'expressions par la technique Gateway.

**Tableau 6 : Génotypes et origines de souches d'*E. coli* de clonage et d'expression utilisées**

Souche <i>E. coli</i>	Génotype	Origine
DH5 $\alpha$	[F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ ]	Promega
JM109	[ <i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>relA1, supE44, <math>\Delta</math>(lac-proAB), (F', traD36, proAB, laqI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15)</i> ]	Promega
TOP10	[F <sup>-</sup> <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i> ]	Invitrogen
Rosetta (DE3) pLysS	[F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm (DE3) pLysSRARE, Cam<sup>R</sup></i> ]	Novagen

### Bactéries d'expression

La bactérie *E. coli* souche Rosetta (DE3) pLysS (Tableau 6) a été utilisée comme système d'expression permettant la synthèse de l'ARN-polymérase T7 par induction avec l'isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) afin de produire la protéine recombinante. Elle comporte une résistance chromosomique au chloramphénicol. Cette souche Rosetta a été conçue pour augmenter l'expression de protéines recombinantes d'origine eucaryote dont les gènes correspondant contiennent des codons rarement utilisés chez *E. coli*. Cette souche contient ainsi un plasmide fournissant les ARNt correspondant à 6 codons rares (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA). La souche pLysS exprime le lysozyme T7, qui inhibe l'activité basale de l'ARN polymérase T7, optimisant de ce fait la régulation du niveau d'expression.

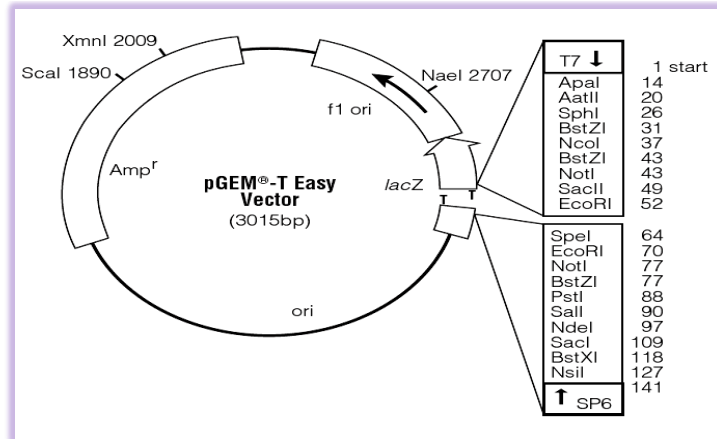
### II.3. Produits chimiques et vecteurs génétiques

Tous les produits chimiques et les solvants sont de qualité biologie moléculaire, généralement achetés auprès de Sigma-Aldrich ou Fluka (Allemagne). Les standards purs utilisés lors de l'identification par GC des composés volatils ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Allemagne), Pyrant Bertrand (France) ou Roth (Allemagne). L'huile essentielle pure de *Pogostemon cablin* utilisée comme standard pour le  $\beta$ -élémane et le germacrène A, a été achetée dans une pharmacie locale, saint Etienne (France). La synthèse d'oligonucléotides (amorces) a été réalisée par la société Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne).

Le plasmide pGEM-T easy (Promega, Figure 29) est un vecteur de clonage à haut nombre de copies avec une résistance à l'ampicilline disponible sous forme linéaire. Ce plasmide permet une insertion directe et rapide (sans recours à des enzymes de restriction)

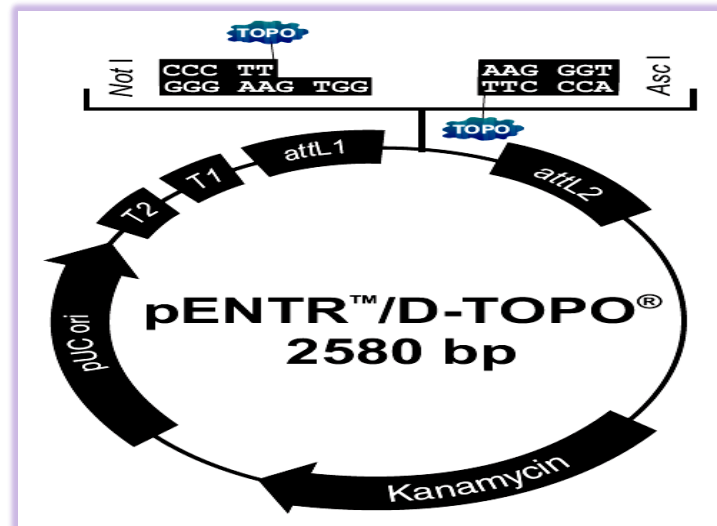
des produits de PCR ayant une base désoxyadénosine aux extrémités 3' grâce à la désoxythymidine aux extrémités 3' du plasmide lui-même. En plus, ce plasmide possède un gène *lacZα* sous le contrôle du promoteur *Plac*.

Le plasmide pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Figure 30) est un vecteur donneur compatible à la technologie Gateway pour l'obtention du clone d'entrée avec une résistance à la kanamycine. Ce plasmide permet un clonage rapide et directionnel du produit PCR d'intérêt avec la topoisomérase I liée au plasmide.



**Figure 29 : Vecteur pGEM-T easy (Promega) avec un site de clonage multiple ouvert comportant les deux thymidines (T) libres**

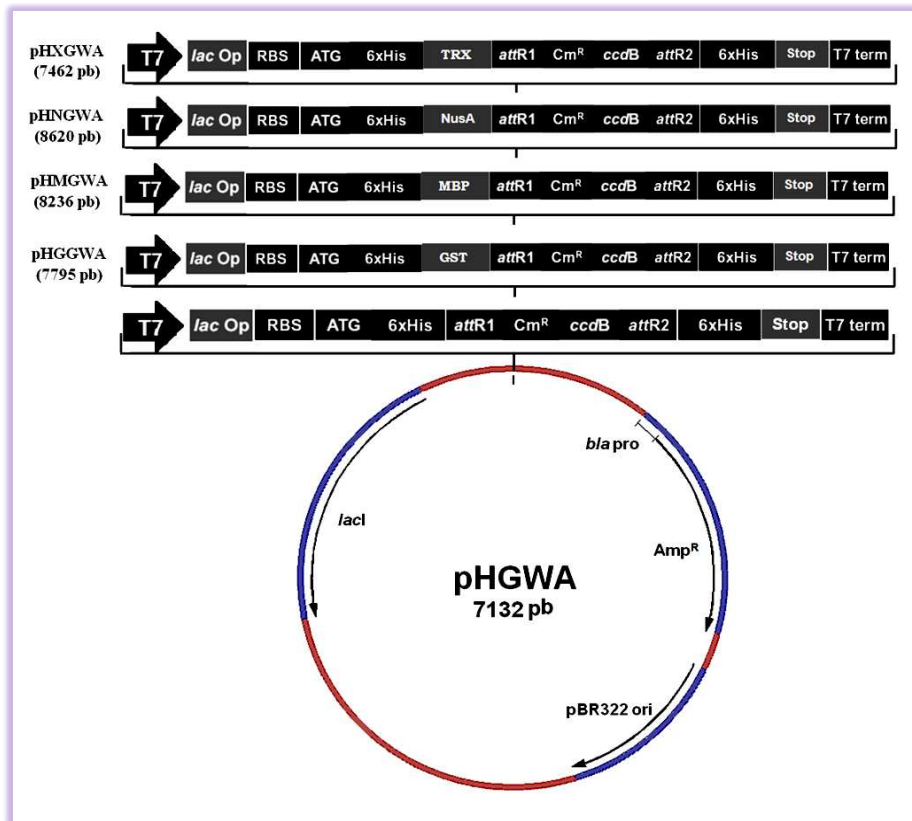
T7, promoteur ARN polymérase T7. SP6, promoteur ARN polymérase SP6. Amp<sup>r</sup>, gène de résistance à l'ampicilline. Ori f1, origine de réplication du phage f1. lacZ, promoteur + gène lacZ.



**Figure 30 : Vecteur donneur pENTR/D-TOPO (Invitrogen) avec deux sites de clonage directionnel**

*attL1* et *attL2*, sites du site spécifique de recombinaison avec le vecteur de destination Gateway. TOPO, deux sites de clonage directionnel. pUC ori, origine de réplication pour grand nombre de copie de plasmide. T1 et T2, séquences de terminaison de la transcription. Kanamycin, gène de résistance à la kanamycine.

Les plasmides d'expression utilisés lors de cette recherche sont : pHGWA, pHGGWA, pHMGWA, pHNGWA et pHXGWA (Figure 31). Ces plasmides ont été construits par Busso *et al.*, (2005) dérivant du vecteur pET22b (Merck) pour l'expression des protéines recombinantes dans des cellules procaryotes. Ces plasmides possèdent un opérateur *lac* pour la répression de l'expression des gènes jusqu'à l'induction par l'IPTG. Ces vecteurs d'expression ont été utilisés pour l'expression hétérologue des TPSs de lavandes.



**Figure 31 : Séries de vecteurs de destination (d'expression) avec une cassette *attR1/attR2* de recombinaison Gateway**

T7, Promoteur ARN polymérase T7. 6xHis, Séquence codante du tag hexa-histidine. Cm<sup>R</sup> et Amp<sup>R</sup>, Gènes de résistance au chloramphénicol et à l'ampicilline, respectivement. RBS, site de liaison au ribosome. ATG : codon d'initiation de la traduction. *lac Op*, opérateur *lac*. *attR1* et *attR2*, sites de recombinaison. Stop, Codon stop. *ccdB*, Gène codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches bactériennes. T7 term, terminaison T7. *lacI*, séquence encodante pour *lacI*. *bla pro*, promoteur *bla*. pBR322 ori, origine de réplication pBR322. Dans cette série de plasmides les protéines de fusion sont : GST ; glutathione *S*-transferase, MBP; maltose binding protein, NusA; N-utilizing substance A, TRX; thioredoxin.

## II.4. Conditions de culture

### *L. stoechas Sensu Lato*

Afin de disposer de matériel biologique frais, les différentes espèces de Lavandes précitées ont été semées et cultivées dans les serres du laboratoire. Les graines sont

plantées sur des plaques alvéolées d'un diamètre de 2 cm dans un substrat dit "de bruyère" (matière sèche 60 % du produit brut -sable, écorce de pin-, matière organique 25 % du produit brut -humus forestier-, pH 5.0 ; conductivité 28 mS/m, capacité de rétention 600 ml/l) avec une granulométrie faible pour faciliter l'enracinement ainsi que la rétention d'eau. Ce substrat de bruyère sera utilisé tout au long des phases de culture. Après environ 1 mois, lorsque les jeunes plants sont suffisamment racinés, ils sont repotés dans des godets (7 cm) pour augmenter le volume de racines et favoriser le développement des parties aériennes. Lorsque les plants ont atteint un volume racinaire trop conséquent pour le volume du conteneur nous procédons à un ultime repotage dans des conteneurs d'un volume de 10 litres. Cette phase de production permet d'obtenir des pieds adultes très florifères et une croissance végétative continue pendant 2 ans. Durant cette phase les plantes sont cultivées en chambre de culture avec un cycle jour/nuit de 16 h de jour à 25°C sous une luminosité de  $68 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , soit environ 5000 Lux, et de 8 h d'obscurité à 22°C. L'arrosage était fait pot à pot en laissant au moins une période sèche par semaine.

Parallèlement, des plantes de *L. pedunculata* ont été cultivées en système hydroponique sous les mêmes conditions de température et d'éclairage décrites précédemment. Le pH de la solution nutritive (Hogland & Arnon, 1950) a été maintenu à 6,5 par l'ajout de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ou de KOH. Ce système hydroponique a été utilisé pour l'obtention rapide de jeunes feuilles saines utilisées dans l'étude moléculaire.

### Bactéries

Les bactéries de clonage ont été cultivées à 37°C sous agitation à 250 rpm en milieu Luria Bertani (LB) ou sur milieu gélatiné LB agar (10 g/l chlorure de sodium, 10 g/l tryptone, 5 g/l extrait de levure, 15g/l agar, pH 7). La bactérie *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS a été cultivée dans un milieu Turbo Broth (TB) modifié (1.2 % tryptone, 2.4 % extrait de levure, 0.4 % glycérol, 17 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 72 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) pour l'expression des TPSs de lavandes. Les bactéries cibles ont été cultivées sur milieu Gélose Nutritive (GN) (5 g/l Chlorure de sodium, 10 g/l peptone, 3 g/l extrait de viande, 3 g/l extrait de levure, 18 g/l agar, pH 7.3). Tous les milieux ont été autoclavés à 121 °C pendant 15 min à 2,1 bars. Des antibiotiques appropriés pour chaque souche, ou pour chaque plasmide, ont été ajoutés aux concentrations suivantes : ampicilline, 100  $\mu\text{g/ml}$ ; chloramphénicol, 34  $\mu\text{g/ml}$ ; kanamycine, 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Le stockage à court terme de bactéries (à savoir pour quatre semaines au maximum) a été obtenu en plaçant des boîtes de Pétri contenant des colonies bactériennes à 4 ° C. Pour le stockage à long terme, les stocks de glycérol ont été préparés par ajout de glycérol directement aux cultures liquides bactériennes, à une concentration finale de 50 % (v/v) avant d'être conservés à -80 °C.

## II.5. Extraction et caractérisation des huiles essentielles

### II.5.1. Hydrodistillation

Le matériel végétal (parties aériennes fleuries) des populations de *L. stoechas Sensu Lato* utilisé pour l'extraction des HEs est séché à l'ombre à température ambiante, puis rendu en poudre par broyeur et conservé dans des boîtes bien fermées. Dans le montage à hydrodistillation (Clevenger modifié), utilisé à l'échelle du laboratoire sous pression atmosphérique, une quantité de 500 g du matériel végétal est déposée dans un ballon à demi rempli d'eau (500 ml), relié à un réfrigérant. Le mélange eau distillée/plante est porté à ébullition par un chauffe-ballon pour générer une vapeur d'eau saturée en composés volatils. Le réfrigérant sert à condenser la vapeur en distillat (hydrolat) et l'extraction débute lorsque les premières gouttes tombent dans le collecteur et se poursuit pendant 3 heures. Le distillat est recueilli dans une ampoule de décantation et mis en mélange avec de l'éther diéthylique. L'HE se concentre alors dans la phase organique. La solution organique d'HE ainsi obtenue est séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) puis l'éther diéthylique est complètement évaporé sous vide. Les HEs obtenues ont été pesées et conservées à 4 °C dans des flacons en verre brun avant d'être analysées.

### II.5.2. Calcul de rendement en huile essentielle

Le rendement (Rdt) des extractions d'HEs de *L. stoechas* a été défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue et la masse de matière végétale utilisée selon la formule suivante :

$$\text{Rdt}_{\text{HE}} = [M/M_0] \times 100$$

Où :

Rdt<sub>HE</sub> : rendement de l'extraction d'HE en % ;

M : masse d'HE en gramme ;

M<sub>0</sub> : masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

### II.5.3. Extraction des volatils par macération dans l'hexane

Une masse de 2 g de feuilles fraîches ou sèches partiellement broyées de chaque lavande ont été mises en macération dans 3 ml d'hexane pendant une nuit au réfrigérateur à 4 °C. La phase supérieure d'hexane contenant les composés volatils est prélevée avec une pipette Pasteur puis passée à travers le sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) afin d'éliminer les traces d'eau. L'extrait hexane récupéré est concentré sous un courant d'azote puis conservé à 4 °C jusqu'à l'analyse par GC/MS.

### II.5.4. Analyse en GC/FID

Les composés volatils ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse grâce à un chromatographe Agilent doté d'un injecteur automatique et équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composés. Les conditions opératoires de ces analyses sont répertoriées dans le Tableau 7.

**Tableau 7 : Conditions opératoires GC/FID utilisées pour l'analyse des COVs des populations de *L. stoechas***

Composant	Particularité et température
Agilent HP modèle	6890
FID	250 °C
Injecteur	250 °C
Volume injecté	1 µl dans l'hexane
Mode	Split 1:20
Colonne 1	Capillaire, HP-1
Dimension de la Colonne	50 m, 0.32 mm, 0.25 µm
Gradient	80 → 2 °C/min → 295 °C (25 min)
Gaz vecteur	Hélium, 1.5 ml/min.
Colonne 2	Capillaire, INNOWAX-1
Dimension de la Colonne	60 m, 0.32 mm, 0.50 µm
Gradient	60 → 2 °C/min → 245 °C (25 min)
Gaz vecteur	Hélium, 1.3 ml/min.

### II.5.5. Analyse en GC/MS

Les spectres de masse des composés volatils ont été obtenus sur un spectromètre de masse à quadripôle et ionisation par bombardement électronique Agilent couplé à un chromatographe Agilent doté d'un injecteur automatique. Les informations concernant le type de colonne, le détecteur et les réglages du GC/MS sont résumées dans le Tableau 8.

**Tableau 8 : Conditions opératoires des analyses GC/MS**

Composant	Particularité et température	
	Populations algériennes de <i>L. stoechas</i>	Lavandes <i>Stoechas</i> , <i>Pogostemon cablin</i> et activité enzymatique des TPs
<b>GC</b>		
Agilent HP	6850 et 7890	6850
Injecteur	250 °C	250 °C
Volume injecté	0.2 µl dans l'hexane	2 µl dans l'hexane
Mode	Splitless	Splitless
Gaz vecteur	Hélium, 1.3 ml/min.	Hélium, 1 ml/min.
Colonne 1	Capillaire, HP-1	Capillaire, HP-5MS
Dimension de la colonne	50 m, 0.32 mm, 0.25 µm	30 m, 0.25 mm, 0.25 µm
Gradient	60 → 3 °C/min → 280 °C (10 min)	60 → 3 °C/min → 246 °C (4 min)
Colonne 2	Capillaire, INNOWAX-1	
Dimension de la colonne	60 m, 0.32 mm, 0.50 µm	
Gradient	60 → 3 °C/min → 245 °C (25 min)	
<b>MS</b>		
Agilent HP	5975 et 5975C, respectivement	5973
Ionisation	Impact électronique à 70 eV	Impact électronique à 70 eV
Balayage automatique	HP-1, 30-350 amu à 2.4 scan/s INNOWAX-1, 30-400 amu à 2.4 scan/s	25-350 amu à 2.4 scan/s
Source d'ion	230 °C	230 °C
MS, quadrupole	150 °C	150 °C

### II.5.6. Identification des composés volatils

L'identification des composés volatils a été faite par GC/FID et GC/MS après une double séparation des échantillons sur plusieurs types de colonne capillaires polaire (HP-INNOWAX-1) et apolaires (HP-1 et HP-5MS). Le nom d'une molécule était trouvé en comparant les spectres de masse (SM) obtenus aux bases de données électroniques WILEY 275 et NIST 05, ainsi qu'avec la bibliographie notamment Adams (2007) et Joulain et König (1998) en parallèle avec l'utilisation des indices de rétention (IR). Ces IRs sont calculés sur les deux types de colonne apolaire et polaire en utilisant les temps de rétention (TR) des alcanes d'un mélange de *n*-alcanes (C8 - C40, Fluka) analysé dans les mêmes conditions chromatographiques (van Den Dool & Kratz, 1963) selon l'équation suivante :

$$IR = 100 \times Z + 100 \times n [(t_{RS} - t_{RZ}) / (t_{R(Z+n)} - t_{RZ})]$$

Où :

$t_{RS}$  : temps de rétention absolu du soluté étudié ;

$t_{RZ}$  : temps de rétention absolu de l'alcane à *Z* atomes de carbone qui précède le soluté ;

$t_{R(Z+n)}$  : temps de rétention absolu de l'alcane à (*Z*+*n*) atomes de carbone qui suit le soluté ;

*n* : différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (généralement *n* = 1).

Lorsque nous disposions des standards commerciaux purs, nous avons vérifié que le TR, l'IR et le SM du standard pur correspondaient bien, respectivement, au TR, IR et SM du composé à identifier.



### II.5.7. Quantification des composés volatils

Pour les HEs des populations algériennes de *L. stoechas*, les pourcentages relatifs des composés volatils séparés ont été calculés à partir de données des aires des pics en GC/FID générées par une intégration électronique sans l'utilisation de facteurs de correction. Les valeurs rapportées sont la moyenne de trois valeurs obtenues à partir de trois injections de chaque échantillon d'huile. La concentration de chacun des composés volatils, a été calculée en utilisant l'eugénol comme étalon interne (COV de lavandes *Stoechas*).

## II.6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles des populations de *L. stoechas*

### II.6.1. Criblage rapide de l'activité antioxydante par chromatographie sur couche mince (CCM)

Comme décrit par Cuendet *et al.* (1997), cinq microlitres de chaque HE diluée à 1:10 dans de l'hexane, de hydroxytoluène butylé (BHT) et d' $\alpha$ -tocophérol ont été spotés sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice (Silicagel 60 F254, Merck). Le développement de la plaque s'effectue dans une cuve en verre contenant la phase mobile, d'acétone/hexane (1:30, v/v). Pour la révélation des spots, la plaque de CCM a été pulvérisée avec une solution de DPPH à 0.2% dans l'éthanol et laissée dans le noir à température ambiante pendant 30 min. Seuls les spots changeants la couleur du pourpre au jaune sur un fond violet ont été notés en tant que constituants à activité positive de piégeage de radical libre de DPPH. En parallèle l'activité antioxydante de fenchol, 1,8-cinéol, camphre, eugénol et carvacrol a été criblée dans ce système.

### II.6.2. Evaluation de l'activité de piégeage du radical libre par la méthode de DPPH

Il s'agit de la méthode la plus largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des drogues végétales. Ce test vise à mesurer la capacité de l'huile à piéger le radical relativement stable, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Le piégeage des radicaux libres de DPPH provoque un changement de couleur de la solution initiale du violet foncé au jaune suite à la réduction du DPPH en DPPH-H (diphényl-picrylhydrazine). Selon, Brand-Williams *et al.* (1995), à 5 ml d'une solution éthanolique de DPPH fraîchement préparée (0,004 %), 50  $\mu$ l de diverses concentrations de chaque HE (2 - 44 mg/ml) et de chaque standard (0,005 - 16 mg/ml) ont été ajoutés. Les mélanges sont agités au vortex et incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. La disparition de DPPH a

été suivie par spectrophotométrie à 517 nm contre un blanc (solution d'éthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre (JASCO-V530). Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical libre DPPH a été calculé avec la formule suivante :

$$I\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}})/A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Où :

$A_{\text{blanc}}$  : absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'huile ;

$A_{\text{échantillon}}$  : absorption de l'échantillon contenant une dose d'HE testée.

La valeur de la concentration inhibitrice  $IC_{50}$  représente la dose de l'HE qui cause la neutralisation de 50 % des radicaux de DPPH. L' $IC_{50}$ , utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante par DPPH, a été estimée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (I %) en fonction des concentrations (C). Tous les tests ont été effectués en triplicata et les valeurs d' $IC_{50}$  ont été reportées en tant que moyenne  $\pm$  SD.

### II.6.3. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode $\beta$ -carotène/acide linoléique

C'est l'une des méthodes complémentaires utilisées pour le criblage de substances antioxydantes. Elle est basée sur le principe que l'acide gras insaturé, acide linoléique, s'oxyde spontanément avec les espèces réactives de l'oxygène "Reactive Oxygen Species" (ROS) présentes dans l'eau riche en oxygène. Alors, les produits de réaction déclenchent la transformation du  $\beta$ -carotène en sa forme incolore. Le degré de décoloration est mesuré par spectrophotométrie et utilisé comme une estimation de l'activité antioxydante (AA). La méthode utilisée est celle décrite par Dapkevicius *et al.* (1998). Une solution stock de mélange émulsion  $\beta$ -carotène/acide linoléique a été préparée comme suit : 0,5 mg de cristaux de  $\beta$ -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme et 1 ml de cette solution a été transféré dans un ballon contenant 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween-40. Après l'élimination complète de chloroforme par évaporation, 100 ml d'eau distillée enrichie en oxygène a été ajoutée sous agitation vigoureuse. Des aliquotes de 2.5 ml de ce mélange ont été transférés dans une série de tubes à essai contenant 350  $\mu$ l d'HE diluée dans de l'éthanol qui donne une concentration finale de 2 g/l. Après une agitation vigoureuse, les tubes ont été incubés à 50 °C pendant 2 h. Un tube témoin négatif a été construit en remplaçant l'HE par l'éthanol. L'absorbance a été finalement mesurée à 490 nm contre un blanc (émulsion sans  $\beta$ -carotène). Les activités antioxydantes (AA %) ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$AA \% = [1 - (A_0 - A_t / A'_0 - A'_t)] \times 100$$

Où :

$A_0, A'_0$  : absorbance respective de l'échantillon et du contrôle à  $t = 0$  min ;

$A_t, A'_t$  : absorbance respective de l'échantillon et du contrôle à  $t = 2$  h.

Tous les tests ont été effectués en triplicata et les pourcentages d'inhibition (AA %) ont été reportées en tant que moyenne  $\pm$  SD

## **II.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des populations de *L. stoechas***

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les microorganismes tests ont été déterminées *in vitro* en utilisant la méthode conventionnelle de dilution d'agar (Sökmen *et al.*, 2004). Des dilutions en série des HEs ont été préparées avec la gélose nutritive, stérile, fondue et enrichie avec le glucose (10 g/l) et le Tween-80 (0.5 %, v/v) pour couvrir une gamme de concentration de 0.16 à 24 mg/ml. Les solutions de gélose nutritive obtenues ont été immédiatement coulées dans des boîtes de Pétri après agitation. Ces boîtes ont été mises à sécher à température ambiante puis inoculées par spot de 2  $\mu$ l de chaque suspension de microorganisme cible en deux répétitions. Les suspensions de microorganisme ont été préparées à partir de cultures de 24 h pour les bactéries et de 72 h pour les champignons et ont été ajustées à environ  $10^6$  CFU/ml. Le même test a été effectué sans HE comme témoin négatif. Les boîtes inoculées ont été incubées à 30 °C/24 h pour les bactéries et à 30 °C/48 h pour les champignons. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance du microorganisme.

## **II.8. Obtention des extraits d'ADN, ARN et ADNc**

### **II.8.1. Extraction de l'ADN génomique des feuilles de lavandes**

Deux méthodes d'extraction ont été employées au cours de ce travail. L'ADNg de *L. pedunculata* a été extrait selon un protocole dérivé de Doyle et Doyle (1987). Cette méthode d'extraction utilise du CTAB et nous avons modifié le protocole initial en ajoutant deux étapes de lavage à l'éthanol après la précipitation faite avec de l'isopropanol. En règle générale, 100 mg de tissu (poids frais de feuilles jeunes) sont broyés dans l'azote liquide, puis additionnés de 1 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM à pH 7,5 ; NaCl 1,4 M ; EDTA 20 mM ; 2% CTAB). Après 90 min d'incubation à 65°C, 450  $\mu$ l d'une

solution de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés. Une centrifugation de 10 min à 3700 g est réalisée et la phase aqueuse est récupérée. L'ajout d'un volume identique d'isopropanol permet la précipitation de l'ADNg. Après centrifugation à 12800 g pendant 1 min, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70%. Cette étape de lavage est répétée deux fois. Le culot d'ADNg obtenu est séché sous hotte Sorbonne, puis repris dans 40 µl d'eau stérile. D'autres part, le kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) est utilisé pour les extractions d'ADNg de *L. stoechas* et *L. viridis* sur environ 40 mg de poudre de feuilles jeunes broyé dans l'azote liquide. Cette technique repose sur la purification d'ADNg grâce à un tampon d'extraction spécifique et une colonne retenant les ADNs suivant le protocole décrit par le fabricant. Dans tous les cas l'ADNg extrait est conservé au congélateur à -20 °C.

### II.8.2. Extraction d'ADN plasmidique bactérien

Deux méthodes d'extraction ont été employées au cours de ce travail, en fonction de l'utilisation souhaitée des ADNs plasmidiques. S'ils sont destinés au séquençage, l'extraction et la purification s'effectuent grâce au kit Pure Yield Plasmid Miniprep (Promega) selon le protocole décrit par le fabricant. Souvent un volume de 2 ml, prélevé d'une culture bactérienne *E. coli* âgée d'une nuit à 37 °C et agité à 150-250 rpm dans le milieu LB contenant les antibiotiques appropriés, est utilisé pour cet effet. La purification repose sur la fixation des acides nucléiques sur une colonne contenant une matrice les retenant spécifiquement, puis d'un ou plusieurs lavages de la matrice précédant l'étape d'élution dans l'eau. Si les ADNs plasmidiques sont destinés à une utilisation de routine de laboratoire, 2 ml de culture bactérienne sont centrifugés pendant 2 min à 3700 g. Le culot bactérien est repris avec 100 µl d'une solution de lyse (glucose 50 mM ; EDTA 10 mM pH 8 ; Tris-HCl 25 mM pH 8 ; lysozyme 4 mg/ml) et incubé 5 min à température ambiante. Après la lyse des bactéries, 200 µl d'une solution basique (SDS 1% (w/v) ; NaOH 0,2 N) sont ajoutés. L'ensemble est incubé 5 min dans la glace, puis additionné de 150 µl d'une solution acide (acétate de potassium 3M, pH 4.8) et placé à nouveau dans la glace pendant 5 min. Après une centrifugation à 12800 g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est récupéré et 500 µl d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) sont ajoutés. Une centrifugation de 5 min à 12800 g est réalisée, puis la phase aqueuse est récupérée et additionnée de 1 ml d'éthanol absolu. L'ensemble est laissé 5 min à température ambiante pour permettre la précipitation de l'ADN. Après 5 min de centrifugation à 12800 g, le

surnageant est éliminé et le culot est lavé par 1 ml d'éthanol à 70 %, puis séché sous hotte Sorbonne. Le culot (ADN plasmidique) obtenu est repris dans 50 µl d'une solution de Tris-RNase (Tris 10 mM pH 7.5 ; RNase 40 µg/ml). L'ADN plasmidique purifiée est stocké à -20 °C.

### II.8.3. Extraction des ARN totaux

Les feuilles jeunes de lavandes *Stoechas* prélevées et congelées dans l'azote liquide sont broyées afin d'extraire les ARNs totaux. A cet effet le kit d'extraction NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel) a été utilisé. Cette technique repose sur la purification des ARNs grâce à un tampon d'extraction spécifique et une colonne retenant les acides nucléiques, couplée à une digestion sur la colonne à la DNase. Le protocole suivi est celui décrit par le fournisseur à l'exception de l'éluion des ARNs sans traitement à la DNase dans la colonne alors que l'incubation des ARNs avec la DNase dans la colonne est mentionnée par le fournisseur. Donc, les ARNs sont élués avec 40 µl d'eau 'nucléase free' et sont ensuite traités à la DNase (voir plus bas II.8.4.).

Spécifiquement pour la réalisation de la banque RACE, une purification supplémentaire des ARNs poly-A (ARNm) à partir des ARN totaux a été réalisée par le kit Indirect Quick Messenger RNA (Talent) selon les instructions du fabricant.

Lorsqu'on travaille avec l'ARN, il est très important d'éviter la contamination avec les RNase pendant la procédure d'isolement d'ARN et de s'assurer que toutes les solutions sont dépourvues de RNase. Par conséquent, tous les matériaux utilisés pour l'extraction d'ARN et pour l'électrophorèse sur gel ont été lavés avec une solution d'élimination de RNase. Afin de minimiser les contaminations possibles par la RNase, des gants ont été toujours portés et ont été souvent changés au cours de l'extraction d'ARN.

### II.8.4. Synthèse d'ADN complémentaire

Malgré les précautions prises lors de l'extraction des ARN, il est possible que les extraits contiennent des traces d'ADNg. Il est donc nécessaire de les traiter pour éliminer l'ADN restant. Dans un volume final de 100 µl, 10 µg d'ARN sont additionnés de 10 µl de tampon RQ1 10X (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8, Promega), d'1 µl de DNase (RQ1 5 U/µl, Promega) et d'1 µl d'inhibiteur de RNase (RNasin 40U/µl, Promega). Le mélange réactionnel est incubé pendant 1h à 37 °C. A l'issue, 100 µl d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1) à pH 8 sont ajoutés, puis

une centrifugation à 12800 g pendant 10 min à 4 °C est réalisée et la phase aqueuse est récupérée. Cette étape, effectuée deux fois, permet l'élimination des protéines. Les ARN sont précipités avec 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,8) et 2 volumes d'éthanol absolu, pendant 2 h à -20 °C. Après 30 min de centrifugation à 12800 g à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 100 µl d'éthanol à 70 %, puis centrifugé à nouveau pendant 10 min à 12800 g à 4 °C. Cette étape de lavage est réalisée deux fois. Les culots d'ARN obtenus sont séchés sous hotte Sorbonne, puis repris dans 10 µl d'eau stérile. Les ARN traités à la DNase sont utilisés immédiatement ou conservés à -80 °C.

Les ARNm totaux contenus dans l'extrait ARN totaux sont rétro-transcrits (RT) en ADNc afin d'effectuer des amplifications par PCR. Un total de 2 µg d'ARN totaux traités à la DNase sont additionnés de 0.5 µg d'oligo (dT) (Promega) dans un volume final de 11 µl, et sont incubés 5 min à 70 °C pour permettre la dénaturation des ARN, puis placés immédiatement dans la glace pendant 30 sec. La réaction de rétro-transcription est réalisée en ajoutant, pour un volume final de 25 µl, du tampon M-MLV 5x (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 8.3, Promega), 1 mM de chaque dNTP, 400 U de reverse transcriptase M-MLV (Promega) et 60 U d'inhibiteur de RNase, RNasin (Promega). Le mélange réactionnel est incubé à 42 °C pendant 1 h, puis 5 min à 95 °C pour inactiver la reverse transcriptase. Les ADNc simple brin sont conservés à -20 °C.

### II.8.5. Dosage et contrôles de la qualité des acides nucléiques

Le dosage et le contrôle de la qualité des acides nucléiques sont réalisés après chaque extraction par spectrophotométrie, à l'aide d'un spectrophotomètre (Biowave II), par électrophorèse sur gel d'agarose ou par PCR.

La concentration d'acides nucléiques extraits est déterminée par une mesure de la densité optique (DO) à 260 nm. Pour ces mesures des échantillons d'ADN ou d'ARN ont été dilués 1:100, en admettant que 1 unité de DO<sub>260 nm</sub> équivale à 40 µg/ml d'ARN ou 50 µg/ml d'ADN (Sambrook *et al.*, 1989). Aussi il convient de rechercher une éventuelle contamination protéique pour évaluer la pureté des acides nucléiques. Pour cette raison on effectue une seconde mesure de DO à 280 nm. Un extrait d'acides nucléiques d'une bonne pureté doit avoir un rapport DO<sub>260 nm</sub>/DO<sub>280 nm</sub> compris entre 1,6 et 2, alors qu'un rapport au-dessous de 1.6 est trop bas et indique une contamination avec des protéines. Une éventuelle contamination par du phénol, peut être recherchée en mesurant l'absorption à 270 nm.

Un dépôt sur gel est effectué afin d'apprécier la qualité et d'estimer la quantité des ARNs totaux extraits par comparaison avec l'intensité du marqueur de taille (voir plus bas II.6.4.).

L'absence d'ADN contaminant dans les extraits d'ARN peut-être vérifiée en réalisant une réaction de PCR avec un couple d'amorces spécifiques de l'ADNg et n'amplifiant pas l'ARN (*e.g.* défini sur un intron). Après migration sur gel d'électrophorèse et révélation aux UV il ne doit pas y avoir de bande visible. Sinon, l'extrait contenant de l'ADNg doit être retiré de l'étude.

## II.9. Amplifications par PCR

### II.9.1. Définition des amorces

Lors de cette recherche, plusieurs couples d'amorces ont été utilisés pour la réalisation de PCR, RACE-PCR, PCR-marche génomique et RT-PCR semi-quantitative (Tableau 9). Pour l'isolement des séquences partielles de gènes putatifs de TPS à partir de feuilles de *L. pedunculata*, des amorces dégénérées ont été utilisées en PCR. Ces amorces dégénérées ont été désignées par correspondance aux zones conservées après alignement de 62 séquences protéiques de mono- et de sesquiTPSs de Lamiacées disponibles dans GenBank (NCBI) en février 2008. Au total, cinq amorces dégénérées sens (TPS1F, TPS2F, TPS3F, TPS4F et TPS5F) et trois amorces dégénérées antisens (TPS6R, TPS7R et TPS8R) ont été définies manuellement sur sept zones conservées avec une dégénérescence la plus faible possible (absence de Leu, Arg et Ser).

Toutes les amorces spécifiques sont désignées à l'aide du logiciel bioinformatique Primer3 version 0.4.0 accessible en ligne à <http://frodo.wi.mit.edu/> (Rozen & Skaletsky, 2000), afin que pas ou peu d'amorces ne s'hybrident entre elles et ne forment des dimères. Ainsi, autant que possible, les amorces sens et antisens ont été conçues pour avoir des températures de fusion similaires (TM). Dans certains cas les amorces spécifiques ont été désignées manuellement par correspondance directe aux nucléotides de la matrice. Ainsi les amorces spécifiques sens (TPS1exF, TPS2exF et TPS3exF) utilisées en technique Gateway ont été définies manuellement en incorporant une séquence spécifique (CACC) pour l'insertion directionnelle dans le vecteur d'entrée et une autre (TTGGTTCCGCGTGGATCC) pour la digestion par la thrombine lors de la purification des protéines de TPS.

**Tableau 9 : Liste des amorces utilisées pour les amplifications d'ADN**

Amorce <sup>a</sup>	Séquence <sup>b</sup> (5' → 3')	Utilisation
TPS1dF	TGGGA(CT)(GT)I(CT)(AG)A(CT)TA(CT)ATICA	Isolement des séquences partielles de gènes de TPS putatifs
TPS2dF	(GT)GITT(CT)(CT)TIGA(CT)GCITA(CT)G	
TPS3dF	CA(AG)GCI(AC)CICA(AG)CA(AG)(GC)AIGA	
TPS4dF	GA(CT)GA(CT)(AG)TITA(CT)GA(CT)(AG)TITA(CT)GG	
TPS5dF	GA(CT)GA(CT)A(CT)IT(AT)(CT)GA(CT)(AG)(AC)ITA(CT)G	
TPS6dR	CC(AG)TAIA(CT)(AG)TC(AG)TAIA(CT)(AG)TC(AG)TC	
TPS7dR	A(CT)IGC(CT)TTIG(AT)IAC(AG)TCICC	
TPS8dR	(CT)C(CT)T(CT)(AG)TTIA(AGT)(AG)TC(CT)TTCCA	
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	Vérification et séquençage du vecteur pGEM-T easy avec insert
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
AP1	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	Stratégie RACE-PCR
AP2	ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC	
LpTPS1FP	TGCTCATGATGTTCTCAAAGACAAGGG	RACE-3'
LpTPS2FP	CATGCAGTGCTGTCCCAGATCATCG	
LpTPS3FP	CGCAACCCACTATGCCATTGAATCTC	
LpTPS1RP	AACATTGGACTGCTTTCGGCACATCG	RACE-5'
LpTPS2RP	TTACGGAGGCAAAGTGGTACTACAGTGG	
LpTPS3RP	AGGAAGATCCTACGCAACCCACTATGCC	
LpTPS1fullF	AGAGGATTAACAACCCCATCC	Isolement des ADNc <i>LpFENS1</i> , <i>LpPINS2</i> et <i>LpGEAS3</i> en plein longueur
LpTPS1fullR	GCTCCATTATTCATGTTAATCGAGG	
LpTPS2fullF	CTTAACATTTCTGCAGC	
LpTPS2fullR	AACACTGAAACATGAGC	
LpTPS3fullF	CTCGCAAATTTCTCTCTAGC	
LpTPS3fullR	CTTCTAGATTTGAATAGGATCCACG	
LpTPS1pseuF	GATGAAACCCGACGCTCTG	Isolement des ADNc <i>LsFENSpm</i> , <i>LvFENSpm</i> , <i>LsPINSpm</i> et <i>LvPINSpm</i> pseudomatures
LpTPS1pseuR	TTAGGCGTATGGCTTGAACATC	
LpTPS2pseuF	GATGAAACGCGACGCTCCG	
LpTPS2pseuR	TCAGTCATATGGCTCGAACATG	
LpTPS3full2F	ATGGCTCAACCAAGAAGCAG	Isolement des ADNc <i>LsGEAS</i> et <i>LvGEAS</i> en plein longueur
LpTPS3full2R	CTAGATTTGAATAGGATCCACGAAC	
TPS1SPR	TTGTGTGCCTTGTCAAGTACTTCTCTTCC	Amplification des peptides signaux par marche génomique
TPS2SPR	CTGTGTGCCTTGTACGTAATATCTTCC	
AP1-GW	GTAATACGACTCACTATAGGGC	
FENSsemiF	GATCCGATGAAACCCGACGCTCTG	Analyse par la RT-PCR semi-quantitative
FENSsemiR	TTAGGCGTATGGCTTGAACATC	
PINSsemiF	GATCCGATGAAACGCGACGCTCC	
PINSsemiR	TCAGTCATATGGCTCGAACATG	
GEASsemiF	ATGGCTCAACCAAGAAGCAG	
GEASsemiR	CTAGATTTGAATAGGATCCACGAAC	
ActF	CCACAATCAAGACCAAGAGGACAATC	Amplification de la β-actine
ActR	CGCCAGGGACCACGGTTG	
TPS1exF	CACCTTGGTTCCGCGTGGATCCGATGAAACCCGACGCTCTG	Préparation des constructions pour l'expression hétérologue de TPS des groupes FENS, PINS et GEAS
TPS1exR	TTAGGCGTATGGCTTGAACATC	
TPS2exF	CACCTTGGTTCCGCGTGGATCCGATGAAACGCGACGCTCC	
TPS2exR	TCAGTCATATGGCTCGAACATG	
TPS3exF	CACCTTGGTTCCGCGTGGATCCATGGCTCAACCAAGAA GCAG	
TPS3exR	CTAGATTTGAATAGGATCCACGAAC	

<sup>a</sup> Pour les motifs cibles et les positions des amorces dégénérées (TPS1dF, TPS2dF, TPS3dF, TPS4dF, TPS5dF, TPS6dR, TPS7dR et TPS8dR) sur l'ADNc de la limonene synthase voir Figure 47). <sup>b</sup> I = inositol.



### II.9.2. Conditions réactionnelles

Quelque soit le fragment à amplifier, les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont réalisées dans des microtubes à paroi mince de 0.2 ml en utilisant un thermocycleur Eppendorf série Mastercycler ou BioRad série MyCycler avec plusieurs composants (Promega) résumées en Tableau 10. Les amplifications ont été effectuées selon le programme mentionné dans le Tableau 11. L'ADN polymérase Gotaq (Promega) a été utilisée pour toutes les PCR de routine tandis que l'ADN polymérase Pfu (Promega) à haute fidélité a été utilisée pour les PCR où les erreurs de copiage devaient être gardées au minimum.

**Tableau 10 : Eléments des réactions d'amplification par PCR**

Elément	Volume par réaction
Tampon*	4.0 µl
dNTPs (0.1 mM)	0.4 µl
Amorce sens (10 µM)	1-2.5 µl
Amorce antisens (10 µM)	1-2.5 µl
GoTaq ou Pfu Polymérase (5 U/µl)	0.2-0.25 µl
ADN (typiquement 25 ng/µl)	2.0 µl
H <sub>2</sub> O	Au total de 25 µl

GoTaq 5x, 50 mM Tris-HCl pH 9, 250 mM KCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>; Pfu 10x, 200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg/ml SAB "nuclease-free", 1 % Triton X-100

**Tableau 11 : Conditions des réactions d'amplification par PCR classique**

Cycle	Température <sup>a</sup>	Durée <sup>b</sup>
Dénaturation	94 °C	5 min
Dénaturation	94 °C	30 sec
Hybridation	Variable	45 sec
Elongation	72 °C	Variable
Elongation finale	72 °C	7 min

x 30-40 cycles

<sup>a</sup> Température variable selon le couple d'amorce utilisé. <sup>b</sup> Durée variable selon la polymérase utilisée, GoTaq 1 min/kb, la pfu 2 min/1kb.

### II.9.3. Stratégie RACE et marche génomique

Les extrémités 5' et 3' des ADNc codants pour les TPSs sont obtenues en effectuant des RACE-PCR. Pour cela, le kit Marathon d'amplification des ADNc (Clontech) a été utilisé en suivant les instructions du fabricant. Brièvement, les ARN Poly-A totaux des feuilles de *L. pedunculata* ont été utilisés comme matrice pour générer la banque RACE. Cette banque est composée d'ADNc doubles brins ligaturés aux adaptateurs Marathon

d'ADN aux extrémités 5' et 3' avec un cocktail d'enzymes approprié. Pour réduire les amplifications non-spécifiques, la PCR "Touchdown" a été appliquée aux échantillons selon les recommandations du fabricant. Cette PCR utilise, pour les premiers cycles, une température d'hybridation supérieure à la température optimale des amorces. Cycle après cycle, la température est diminuée jusqu'à ce qu'elle atteigne la température spécifique ("Touchdown") d'hybridation des amorces (Tableau 12). En plus, l'hybridation des amorces et l'élongation se déroulent en même temps. Lors de ces PCR des combinaisons entre les amorces spécifiques (LpTPS1FP, LpTPS2FP, LpTPS3FP, LpTPS1RP, LpTPS2RP et LpTPS3RP, Tableau 9) aux fragments séquencés des gènes de TPSs et l'amorce AP1 ou AP2 (Tableau 9) ont été utilisés. Les produits de la RACE-PCR de tailles attendues ont été suivis sur gel d'agarose et traitée comme ci-dessous pour le clonage et le séquençage.

**Tableau 12 : Conditions des réactions d'amplification par RACE-PCR "Touchdown"**

Cycle	Température	Durée	
Dénaturation	94 °C	30 sec	
Dénaturation	94 °C	5 sec	} x 5 cycles
Elongation	72 °C	4 min	
Dénaturation	94 °C	5 sec	} x 5 cycles
Elongation	70 °C	4 min	
Dénaturation	94 °C	5 sec	} x 20-25 cycles
Elongation	68 °C	4 min	
Elongation finale	68 °C	7 min	

La marche génomique par PCR est une approche rapide et sensible, apparentée à la RACE, qui sert à trouver une séquence inconnue d'ADN génomique adjacente à une autre connue. L'application de cette méthode a été faite en utilisant le kit GenomeWalker Universal (Clontech) selon les instructions du fabricant. Elle a été utile dans les cas des TPSs de lavande pseudomatures, pour le séquençage des peptides de transit chloroplastique, dont on ne possède que les séquences situées en aval du motif RRx8W inclus.

#### II.9.4. Détermination de l'expression des gènes de TPSs

La quantification relative de l'expression des gènes codants pour les TPSs de lavandes *Stoechas* a été réalisée grâce à l'utilisation de la RT-PCR semi-quantitative. Cette RT-PCR

est une technique rapide qui permet de quantifier de façon relative un ADN présent dans un échantillon. Afin de normaliser l'expression des gènes d'intérêts, la quantification relative de l'expression du gène codant pour la  $\beta$ -actine sert de référence. Les amorces sont désignées spécifiquement pour la PCR semi-quantitative (Tableau 9) avec l'aide du logiciel Primer3 (voir au-dessus II.9.1.). A partir de 3  $\mu$ g d'ARNs totaux de feuilles des lavandes *Stoechas*, les ADNc ont été synthétisés et utilisés comme matrice. Les PCRs de quantification relatives de l'expression des gènes de TPSs en parallèle avec celui de la  $\beta$ -actine ont été réalisées selon les conditions réactionnelles décrites ci-dessus (même section).

#### II.6.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour la séparation de fragments d'ADN et d'ARN, des électrophorèses sont réalisées en gel d'agarose 1 % (p/v) préparé dans le tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1x (pH 8, 40 mM Tris base, 40 mM acide acétique glacial, 1 mM EDTA) contenant 0.6  $\mu$ g/ml de bromure d'éthydiu. Les échantillons déposés sur le gel (1  $\mu$ l à 15  $\mu$ l) sont au préalable mélangés au tampon de charge 6 x (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03 % bleu de bromophénol, 0.03 % xylène cyanol, 60 % glycérol, 60 mM EDTA, Promega), afin d'assurer leur sédimentation au fond des puits et de suivre la progression de la migration. La migration est effectuée dans du tampon TAE 1x à voltage constant (85-100 V). Lorsqu'un champ électrique est appliqué au gel en présence d'une solution tampon (TAE), les fragments d'ADN, chargés négativement, migrent vers l'électrode positive, à une vitesse dépendant de leur taille, de la concentration en agarose utilisée et du voltage appliqué. L'addition de bromure d'éthidium (BET, 0.5  $\mu$ g/ml final), un agent intercalant fluorescent qui se fixe à l'ADN en s'introduisant entre les paires de bases, permet de visualiser l'ADN sous UV après migration. Des marqueurs de poids moléculaires (1 kb DNA ladder, 100 pb DNA ladder, Promega) sont également déposés afin d'estimer la taille des fragments. Les molécules d'ADN et d'ARN sont révélées en utilisant un transilluminateur UV (254 nm) puis les gels sont photographiés.

#### II.6.5. Purification des fragments d'ADN

Afin de purifier les fragments d'ADN d'intérêt, une migration dans un gel d'agarose à 0.8% TAE contenant le BET est effectuée. Les bandes de gel contenant les fragments d'ADN de taille attendue sont découpés avec un scalpel puis purifiées. La purification est

réalisée avec le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) en suivant les instructions recommandées par le fabricant. Dans le cas où les réactions de PCR amplifient un fragment unique, la purification est réalisée directement depuis le mélange réactionnel avec le même kit. La quantité du fragment d'ADN purifié est estimée par spectrophotométrie.

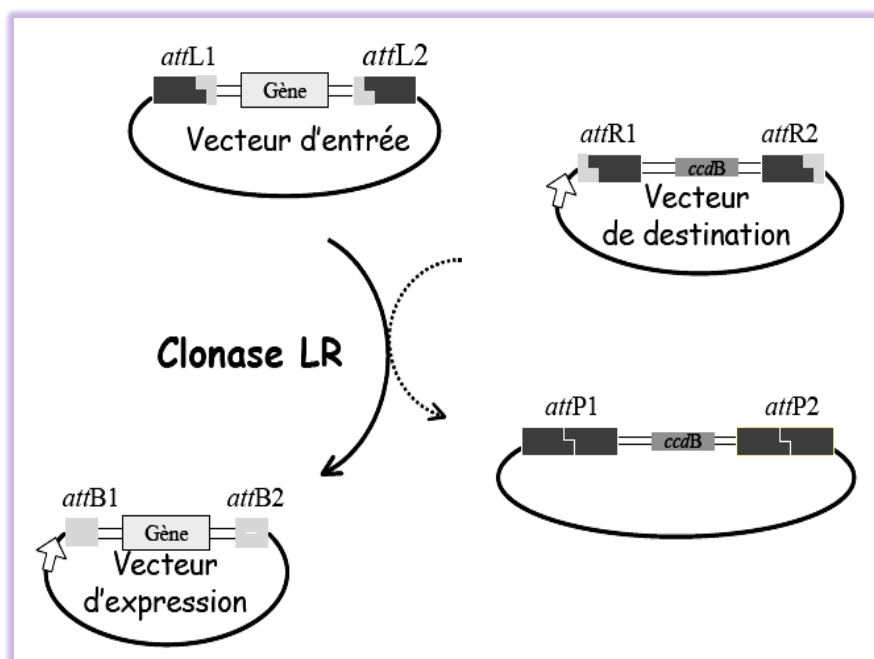
## II.10. Techniques de clonage

### II.10.1. Clonage de routine pour séquençage

Le vecteur pGEM-T easy a été utilisé pour le clonage pour séquençage. L'insertion des fragments PCR amplifiés par la polymérase d'ADN GoTaq ou pfu dans le plasmide pGEM-T easy est effectuée sans passer par une étape de digestion enzymatique. Ce système implique que les produits PCR doivent posséder une adénine en 3' pour être clonés dans ce vecteur. Les PCR avec amorces dégénérées sont réalisées avec la polymérase GoTaq (Promega) qui ajoute spontanément une adénine en 3' des produits de PCR. Une réaction de "A-tailing", consistant à rajouter une adénine en 3' aux produits de PCR, est nécessaire en cas de l'utilisation de la pfu polymérase d'ADN qui génère des produits PCR dépourvus d'adénine en 3'. Pendant la "A-tailing" les adénines en 3' sont ajoutées par une GoTaq dans un mélange réactionnel contenant le fragment d'ADN, les dATP et un tampon de réaction. La réaction de ligation des produits de PCR dans le pGEM-T easy est réalisée dans un volume final de 5 µl contenant du tampon de ligation 10x (300 mM Tris-HCl pH 7.3, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP, Promrga), 25 ng de vecteur, 15 ng d'insert et 1.5 U d'ADN ligase T4 (Promrga). Le mélange réactionnel est incubé une nuit à 4 °C. L'enzyme est inhibée par passage à 70 °C pendant 5 min.

### II.10.2. Clonages par technologie Gateway

La technologie Gateway a été utilisée pour le clonage des TPSs de lavandes *Stoechas* afin de sur-exprimer leurs protéines recombinantes dans *E. coli*. Cette méthode permet la recombinaison directionnelle d'un produit PCR et d'un vecteur donneur grâce à une réaction de recombinaison par une topoisomérase *I*. Le produit de cette première recombinaison, appelé vecteur d'entrée (donneur), sert de matrice à une seconde recombinaison (dite de "LR") avec un vecteur de destination pour obtenir un vecteur d'expression (Figure 32).



**Figure 32 : Représentation schématique du système Gateway**  
*attL* et *attR*, sites de recombinaison. *ccdB*, gène codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches bactériennes.

Les cadres de lecture ouverts (ORF) des TPSs étudiées (sesquiTPSs en pleine longueur et monoTPS tronquées de lavandes *Stoechas*) ont été amplifiés par PCR par la Pfu polymérase d'ADN à haute fidélité. Les amorces sens (Tableau 9) utilisées pour ces amplifications ont été définies en incorporant en 5' un site de recombinaison (CACC) pour permettre le clonage directionnel suivi par une séquence codante pour le site de clivage à la thrombine. Tandis que, les amorces antisens sont pourvues d'un codon stop en 5' (Tableau 9).

Le vecteur pENTR/D-TOPO (Figure 30) est lié de manière covalente à une enzyme topoisomérase *I* qui joue successivement les rôles des enzymes de restriction et de ligation. Cette enzyme permet le clonage directionnel de produits PCR en quelques minutes sur la paillasse grâce à la reconnaissance du site CACC. A cet effet, un mélange réactionnel de 0.5 - 4  $\mu$ l de produit PCR + 1  $\mu$ l d'une solution salée + 1  $\mu$ l vecteur pENTR/D-TOPO + H<sub>2</sub>O à un volume final de 6  $\mu$ l est réalisé pour produire pENTR/D-TOPO/TPS pour chaque TPS. Grâce à la recombinaison LR des clones d'expression contenant les régions codantes complètes de TPSs en phase avec la séquence du vecteur codante pour la protéine de fusion N-terminale et pour l'étiquette poly-His sont générés. La réaction de recombinaison LR a été réalisée entre le vecteur d'entrée recombinant contenant la boîte *attL* (pENTR/D-

TOPO/TPS) et un vecteur de destination contenant la boîte *attR* à l'aide du kit Clonase II (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. Les vecteurs de destination (d'expression) utilisés sont pHGWA, pHGGWA, pHMGWA, pHNGWA et pHXGWA (Figure 31, Busso *et al.*, 2005). Les construits obtenus (*e.g.* pHXGWA/*LpFENS*) servent à la transformation de la souche TOP10 d'*E. coli*, pour la propagation des plasmides afin de réaliser un séquençage de vérification. Une fois réalisées, les séquences des constructions sont vérifiées (cadres de lecture en phase) et les vecteurs d'expression recombinants sont conservés à -20 °C pour une utilisation ultérieure en expression hétérologue.

### II.10.3. Transformation bactérienne

La transformation bactérienne est effectuée par choc thermique. Le mélange de 5 µl de produit de ligation avec 50-100 µl de bactéries chimiocompétentes (DH5α ou JM109, Promega), incubées préalablement dans la glace, est incubé 30 min dans la glace avant d'être transféré dans un bain marie à 42°C pendant 45 sec où les bactéries sont transformées par choc thermique. Après un passage de 2 min dans la glace, puis 5 min à température ambiante, les bactéries sont récupérées dans 1 ml du milieu LB liquide (10 g/l chlorure de sodium, 10 g/l tryptone, 5 g/l extrait de levure, pH 7) sans antibiotique. Ensuite, elles sont incubées à 37 °C pendant 1 h sous agitation à 200 rpm, pour permettre l'expression du gène de résistance. Le culot bactérien, obtenu après une centrifugation de 2 min à 680 g, est remis en suspension dans environ 100 µl de surnageant. Les bactéries sont étalées sur milieu LB agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 8 mmol d'IPTG et 2 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) (Horwitz *et al.*, 1964), et placées une nuit à 37 °C. Les clones sont sélectionnés selon leur couleur grâce à l'α-complémentation de la β-galactosidase (Ullmann *et al.*, 1967). Les bactéries ayant incorporé un plasmide vide seront bleues puisqu'elles traduiront l'intégralité de la β-galactosidase et pourront libérer le composé chromogène contenu dans le X-Gal. Celles ayant incorporé un plasmide contenant un insert seront Lac<sup>Z</sup> et formeront des colonies blanches du fait de la création, par l'introduction de l'insert, d'un déphasage du cadre ouvert de lecture dans la séquence codant pour la partie N-terminale de la β-galactosidase. Les colonies blanches sont sélectionnées et mises en culture dans 5 ml de milieu LB additionné d'ampicilline à 100 µg/ml et cultivées pendant une nuit à 37 °C sous agitation à 250 rpm.

Il faut noter que lors du clonage par Gateway, et après transformation de la souche TOP10, seules les bactéries porteuses d'un vecteur de destination recombiné vont croître.

En effet, la cassette de contre-sélection (*ccdB*) présente dans les vecteurs non recombinés (vides) est toxique pour les bactéries (e.g. DH5 $\alpha$ , TOP10 F $''$ , TOP10). Lorsqu'il s'exprime, *ccdB* provoque l'insertion d'une arginine dans la protéine A de la gyrase, bloquant ainsi les processus de réplication de l'ADN.

#### II.10.4. Séquençage d'ADN

Les séquences d'ADN sont déterminées dans les deux directions par le service de séquençage automatique de la société Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne). Les résultats du séquençage sont téléchargés, via le compte du BVpam siégré dans le site <http://www.eurofinsdna.com/home.html>, sous forme de chromatogrammes dont chaque pic correspond à une base ou sous forme FASTA. Pour une réaction de séquençage, les produits PCR ou les plasmides ont été préalablement purifiés et ensuite préparés en parallèle si nécessaire avec des amorces spécifiques à des concentrations d'après les recommandations d'envoi au séquençage. Une fois que les séquences sont obtenues, elles sont ensuite soumises à différents logiciels pour analyses bioinformatique (*in silico*).

### II.11. Expression hétérologue de TPSs de lavandes *Stoechas* et mesure d'activité

#### II.11.1. Expression hétérologue de TPSs

Pour l'expression hétérologue des gènes putatifs de TPS de lavandes *Stoechas*, la souche Rosetta (DE3) pLysS d'*E. coli* a été utilisée. Cette souche présente deux avantages majeurs pour la production de TPSs. Tout d'abord elle possède le plasmide pRARE qui code des ARNt pour 6 codons eucaryotes rares dans les bactéries *E. coli*. De plus, elle possède le plasmide pLysS qui code pour le lysozyme T7 permettant de réduire le niveau basal de production et donc de s'affranchir de tout problème de toxicité qui pourrait être associé à la production de TPSs. L'expression du gène d'intérêt commence quand un grand nombre de copies de plasmide est présent. A cet effet, des bactéries Rosetta (DE3) pLysS, sont transformées avec les constructions d'expression (voir II.10.2.) selon le même protocole utilisé précédemment pour la transformation des bactéries de la souche DH5 $\alpha$  ou JM109 (voir II.10.3.). Les bactéries Rosetta (DE3) pLysS sont ensuite étalées sur milieu LB agar avec 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline et 34  $\mu$ g/ml de chloramphénicol, et placées une nuit à 37 °C. Seules les bactéries recombinantes se développent sur ce milieu sélectif. Plusieurs colonies sont sélectionnées aléatoirement. La présence de l'insert dans ces colonies est vérifiée par PCR, en utilisant les amorces spécifiques pour chaque TPS ayant permis

d'amplifier les fragments clonés. Des clones de Rosetta (DE3) pLysS recombinantes ont été sélectionnés et cultivés pendant une nuit à 37 °C sous agitation à 120 rpm dans 5 ml de LB, contenant les antibiotiques appropriés. Pour chaque expérience d'induction, 4 ml d'une préculture fraîche a été inoculée dans 200 ml de milieu TB contenant toujours les antibiotiques appropriés et mise en culture sous les conditions précédentes. Lorsque la  $DO_{600nm}$  des cultures atteint une valeur comprise entre 0.4 et 0.8, la surexpression de la protéine recombinante est déclenchée suite à une induction par IPTG à une concentration finale de 0,2 mM. Juste après induction les cultures sont incubées pendant une nuit à 16 °C sous agitation à 120 rpm.

### **II.11.2. Extraction de protéines de TPSs recombinantes**

Toutes les étapes d'extraction et de purification ont été effectuées à 4° C ou dans la glace afin d'obtenir des TPSs recombinantes natives avec une activité enzymatique intacte. Après surexpression de la protéine recombinante de TPS, les cultures bactériennes de 200 ml sont centrifugées à 5000 g, pendant 15 min. Le culot cellulaire est repris dans 10 ml de tampon natif de liaison (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, 5 % glycérol, 5 mM DTT, pH 8) additionné d'inhibiteurs de protéase et de lysozyme. La lyse des bactéries est renforcée par sonication. L'extrait bactérien est ensuite centrifugé 20 min à 10000 g. Le surnageant ainsi obtenu constitue la fraction de protéines contenant la protéine d'intérêt en conditions natives.

### **II.11.3. Purification partielle de protéines de TPSs recombinantes par chromatographie d'affinité sur résine de nickel**

La chromatographie d'affinité sur résine de Nickel utilise un adsorbant NTA (Nitrilo-Tri-Acetic acid), complexant le métal (Nickel), fixé sur une résine sépharose (Clontech). La protéine recombinante, qui interagit par des interactions électrostatiques avec le Nickel par l'étiquette poly-His (6 His), peut être ainsi retenue sur la résine. Dans notre cas l'élution spécifique de la protéine recombinante est assurée grâce à la digestion par la thrombine.

Aux 8 ml de surnageant récupérés précédemment sont ajoutés environ 300 µl de gel de Nickel agarose, préalablement lavé et équilibré 3 fois avec 8 ml de tampon natif de liaison. Cette suspension est placée sous agitation douce à 100 rpm pendant 1 h. Après centrifugation du mélange à 2000 g pendant 5 min le surnageant est éliminé et la résine est



lavée 5 fois avec 8 ml de tampon de lavage natif (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 8) intercalé par des centrifugations à 2000 g pendant 5 min. Ensuite, au dernier lavage le tampon de lavage natif est complètement éliminé et la résine fixant les TPSs recombinantes est mise en digestion avec 10 U de thrombine dans 200 µl de tampon natif de liaison pendant une nuit à 4 °C. Lors de la préparation des constructions d'expression (voir II.10.2.) un site de liaison à la thrombine a été introduit entre l'étiquette poly-His et le gène d'intérêt. Cette protéase reconnaît spécifiquement la séquence Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, et clive la liaison Arg-Gly. Les TPSs recombinantes séparées des protéines de fusion sont utilisées immédiatement dans des tests d'activité enzymatique. La purification des protéines de Rosetta (DE3) pLysS sans vecteur d'expression a été réalisée en parallèle comme contrôle négatif.

#### II.11.4. Dosage colorimétrique des protéines

La technique utilisée pour la quantification des protéines est la méthode spectrophotométrique décrite par Bradford *et al.* (1976) en utilisant le réactif de Protein Assay (BioRad). Cette technique se base sur la fixation du bleu de Coomassie R250 sur les protéines (interaction de type ionique) causant le déplacement du maximum d'absorption du colorant de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu). Les DO des échantillons sont mesurées à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Biowave II. En utilisant une gamme étalon réalisée avec des quantités croissantes (0 à 1 mg) de l'albumine de sérum de bœuf (BSA), il est possible de calculer la quantité de protéine présente dans les échantillons.

#### II.11.5. Electrophorèse sur gel dénaturant (SDS-PAGE)

Les protéines sont incubées en présence de SDS qui les dénature et leur confère une charge globale négative par formation de micelles mixtes protéines-détergent. Elles sont ensuite séparées sous l'influence d'un champ électrique en fonction de leur masse moléculaire, par passage à travers les mailles du réseau de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les électrophorèses des fractions protéiques obtenues lors de la purification des TPSs de lavandes ont été réalisées sur gel de polyacrylamide à 10 % (épaisseur 0.75 mm) en condition dénaturantes selon la méthode Laemmli (1970).

Les échantillons protéiques solubles sont dissous dans un tampon de charge (Laemmli, 1970), appelé tampon de Laemmli (Tableau 13). Les échantillons sont chauffés pendant 5 mn à 95 °C avant d'être déposés sur gel d'électrophorèse.

**Tableau 13 : Recettes du tampon de Laemmli, gels de SDS-PAGE et tampon de migration**

<b>Tampon de Laemmli</b>		
Composant	Composition	
Tris pH 6.8	62.5 mM	
SDS	3 %	
Glycérol	10 %	
Bleu de bromophénol	0.001 %	
$\beta$ -Mercaptoéthanol	1.25 %	
<b>Gels d'électrophorèse</b>		
Composant	Composition	
	Gel de concentration	Gel de séparation
Acrylamide/Bisacrylamide	5 %	15 %
Tris pH 6.8	125 mM	/
Tris pH 8.8	/	375 mM
SDS	0.1 %	0.1 %
Persulfate d'ammonium (PSA)	0.1 %	0.1 %
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0.1 %	0.04 %
<b>Tampon de migration</b>		
Composant	Composition	
Tris pH 8.8	25 mM	
Glycine	192 mM	
SDS	0.1 %	

Les extraits bruts de TPS et les différentes fractions d'élution ont été analysés par des méthodes classiques sur gel de SDS-PAGE. Les gels ont été préparés et coulés selon le protocole illustré dans le Tableau 13. La polymérisation s'effectue en ajoutant extemporanément le TEMED et le persulfate d'ammonium. Les gels sont constitués d'un gel de séparation et d'un gel de concentration. Le matériel utilisé est le système Mini-Protean 3 (BioRad).

Les échantillons sont déposés dans un volume maximal de 20  $\mu$ l. Après chargement des échantillons dans les puits, la migration est effectuée à 90 V dans le gel de concentration, puis à 180 V dans le gel de séparation dans du tampon de migration Tris-Glycine-SDS (Tableau 13).

Après migration, les protéines sont colorées en agitant doucement le gel d'acrylamide pendant une heure dans une solution de coloration (bleu de Coomassie R 250 0.2 %, éthanol 25 %, acide acétique 10 %). Ensuite, le gel est décoloré par une solution d'éthanol 20 %, acide acétique 10 % deux fois pendant 30 min. Une phase finale de décoloration est réalisée pendant une nuit dans l'eau distillée. Le bleu de Coomassie permet de détecter des quantités de protéines supérieures à 50 ng.

### II.11.6. Mesure *in vitro* de l'activité de terpène synthases de lavandes *Stoechas*

Les mesures de l'activité des TPSs ont été réalisées dans des flacons en verre (Sodipro) dans un volume final de 500 µl contenant de 10 à 20 µg de TPS recombinantes, tampon de réaction (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 % glycérol, 1 mM DTT, 1 mg/ml SAB) et les cofacteurs (10 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM MnCl<sub>2</sub>). La réaction est déclenchée par l'addition de 50 µM GPP ou FPP ou GGPP en tant que substrat et le mélange est recouvert avec 500 µl d'hexane.

Après une période d'incubation de 3 à 18 h au bain marie à 30 °C, le mélange est vortexé vigoureusement pour extraire les terpènes puis centrifugé pendant 35 min à 2000 g pour la séparation des phases. La phase supérieure d'hexane est recueillie, séchée à travers le sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), concentrée sous un courant d'azote et analysée par GC/MS pour la détection des produits enzymatiques. Des contrôles négatifs ont été réalisés dans les mêmes conditions en utilisant les protéines purifiées depuis Rosetta (DE3) pLysS sans vecteur d'expression ou en utilisant des TPSs chauffées à 95 °C pendant 15 min.

## II.12. Analyses bioinformatiques et statistiques de données

### II.12.1. Alignement de séquences

Les séquences nucléotidiques ou d'acides aminés ont été alignées par paire ou plus en utilisant l'algorithme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) du logiciel BioEdit version 7.0.9.0. (Hall, 1999). Ce logiciel a été configuré en options full multiple alignement et bootstrap NJ tree = 1000, et paramètre par défaut pour les Gap penalties. Puis, pour affiner l'alignement des séquences entre elles, quelques corrections manuelles ont été apportées en utilisant la fonction Edit du logiciel. L'alignement de séquences a été sauvegardé au format FASTA pour pouvoir être transféré vers d'autres logiciels.

### II.12.2. Analyses BLAST

Des recherches d'homologie ont été effectuées afin de pouvoir identifier les ADNs isolés. Les bases de données moléculaires sont riches en séquences de gènes de TPSs. Des BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, 1997) nucléotidiques ou protéiques, entre les séquences de nos échantillons et celles de la base de données GenBank, ont été réalisés sur le site BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) du NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). L'algorithme renvoie certains paramètres qui permettent de déterminer s'il y a une cohérence entre les alignements. Plus la E-value (probabilité que la

séquence similaire retrouvée l'ait été par hasard) est faible, plus l'alignement est significatif. Ainsi, en cas de besoin, des séquences nucléotidiques ou protéiques ont été téléchargées en format FASTA depuis le site NCBI.

### II.12.3. Prédiction de peptide de transit chloroplastique (CTP)

L'outil bioinformatiques ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) du centre d'analyse des séquences biologiques (CBS) de l'Université technique de Danemark (DTU) a été utilisé dans ce travail pour la prédiction de la présence d'un peptide signal de nos TPSs de lavandes. Le serveur ChloroP 1.1 (accessible gratuitement en ligne à <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>), prédit la présence de peptides de transit chloroplastique (CTP) dans les séquences protéiques et la localisation des sites potentiels de clivage de CTP.

### II.12.4. Autres prédictions

La prédiction des ORFs, des poids moléculaires et des compositions en acides aminés de séquences nucléotidiques ou protéiques des TPSs de lavandes a été réalisées en utilisant le logiciel BioEdit. Les valeurs protéiques théoriques des points isoélectriques (pI) ont été calculées en utilisant l'outil bioinformatique pI disponible dans le site web ExPASy à [http://web.expasy.org/compute\\_pi](http://web.expasy.org/compute_pi) (Bjellqvist *et al.*, 1993).

### II.12.5. Analyses phylogénétiques

La première analyse phylogénétique a été réalisée avec 62 séquences protéiques de TPSs de Lamiacées disponibles sur GenBank en février 2008 (Figure 45). A l'aide du logiciel CLC viewer 4, les séquences ont été alignées selon un algorithme d'alignement propre à ce logiciel, et un arbre a été généré par l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). L'analyse de "bootstraps" a été calculée à partir de 100 répétitions.

Pour la deuxième analyse phylogénétique (Figure 52), la version 4 du software MEGA (Tamura *et al.*, 2007) a été utilisée après une étape d'alignement initiale de séquences de TPSs effectuée par ClustalW (BioEdit). Les séquences d'acides aminés choisies de TPSs caractérisées fonctionnellement et représentant les différentes sous-familles de TPSs (TPSa - TPSH) ont été récupérées de la base de données GenBank (NCBI). Les séquences de TPSs de lavandes *Stoechas* clonées dans ce travail, *LpFENS*, *LpPINS*, *LpGEAS*, *LsFENS*,

*Ls*PINS, *Ls*GEAS, *Lv*FENS, *Lv*PINS et *Lv*GEAS, sont également répertoriées dans la base de données du GenBank sous les numéros d'accès, JX501511, JX501512, JX501513, JX501514, JX501515, JX501516, JX501517, JX501518 et JX501519, respectivement. L'arbre et la longueur des branches ont été obtenus selon l'algorithme "neighbor-joining" (NJ, (Saitou & Nei, 1987) basé sur le nombre de substitution par site. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode de correction de Poisson (Zuckerandl & Pauling, 1965). La solidité de la topologie de l'arbre de NJ a été évaluée à l'aide d'une analyse de "bootstrap" avec 5000 répliques. Les distances par paire de différents alignements ont été calculées par ressemblance maximum en utilisant le logiciel MEGA.

### II.12.6. Analyses statistiques

L'analyse typologique (distance euclidienne et méthode 1-r de Pearson) pour mettre en évidence l'existence de chémotypes, a été réalisée avec le logiciel STATISTICA version 5.1 (Stat Soft, Inc, Tulsa, OK, USA) sur les données quantitatives (composition en pourcentage déterminé par GC/FID) de quatre constituants principaux des HEs de 11 échantillons de populations algériennes de *L. stoechas*.

Pour l'identification des composés de l'HE potentiellement associés à des activités biologiques, les coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés entre les abondances des composés et les activités biologiques en question. Pour faciliter l'interprétation des résultats, les valeurs  $IC_{50}$  de l'activité antioxydante estimée par le test au DPPH ont été transformées en  $100-IC_{50}$  pour avoir des valeurs qui augmentent avec l'augmentation du pouvoir antioxydant. La signification de la corrélation par paires de composants de l'HE a été testée après correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. Le niveau de signification a été fixé à  $\alpha = 0.05$  et  $p < 0.005$  a été accepté comme significatif.

**CHAPITRE III**  
**RESULTATS**  
**ET DISCUSSION**

**III.1. Variation et biodiversité des HEs accumulées par des populations algériennes de *L. stoechas***

**III.2. Activités biologiques des HEs accumulées par des populations algériennes de *L. stoechas***

**III.3. Variation et biodiversité des COVs chez *L. stoechas*  
*Sensu Lato***

**III.4. Biosynthèse des terpènes chez *L. stoechas*  
*Sensu Lato***

### **III.1. Variation et biodiversité des HEs accumulées par des populations algériennes de *L. stoechas***

#### **III.1.1. Introduction**

Les huiles essentielles (HEs) sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés des plantes par plusieurs techniques. L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau restent les moyens les plus employés pour produire les HEs, en particulier à des fins commerciales. Le volume d'HE récupéré est variable, chez une même plante, en fonction de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. Parmi les composants majoritaires des HEs, les terpènes sont les plus couramment rencontrés. Ils possèdent un rôle écologique important. Par ailleurs, les plantes aromatiques productrices d'HEs, ont fait l'objet de diverses recherches en particulier dans le domaine de la parfumerie et des industries agroalimentaire et pharmaceutique.

La diversification de la production d'HEs ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée et celle-ci passe par la connaissance de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur commercialisation. La caractérisation de ces substances naturelles nécessite la mise en œuvre de diverses techniques analytiques qui permettent non seulement d'apprécier sa valeur marchande, mais aussi de réaliser le contrôle de la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité vis-à-vis d'une norme pré-établie. L'étude des HEs est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. L'Algérie, de part sa position géographique, possède plusieurs facteurs de pédogenèse et des zones bioclimatiques contrastées auxquels s'ajoutent des ressources hydriques. Tous ces facteurs sont favorables au développement des cultures intensives des plantes aromatiques et médicinales.

Conventionnellement, l'identification des constituants des mélanges naturels peut être réalisée à l'aide de différentes techniques analytiques, en fonction de l'objectif fixé, de la complexité du mélange et de la nature des constituants. L'analyse des HEs est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. L'approche la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la chromatographie gazeuse permettant l'individualisation des constituants, avec une technique de visualisation, généralement la



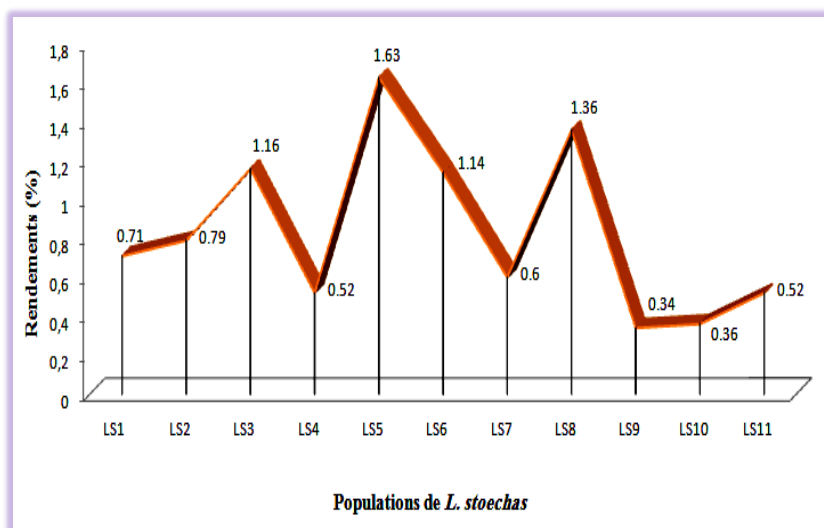
spectrométrie de Masse, permettant l'identification des constituants par comparaison des données de masses des produits de fragmentation avec celles de produits de référence ou celles contenues dans des banques de spectres. Les données de spectres de masse sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention des produits d'intérêt et de ceux d'une gamme étalon d'alcane. Des molécules structurellement proches peuvent en effet présenter des spectres de masse similaires et un gradient chromatographique ne peut pas séparer l'ensemble des substances d'un mélange. La probabilité que deux substances aient le même indice de rétention et le même spectre de masse est cependant rare (sauf pour des stéréoisomères). La combinaison de ces deux informations est donc nécessaire pour assoir une identification de composé.

*L. stoechas* est l'espèce de lavande qui possède la plus grande aire de répartition puisqu'elle couvre presque tout le pourtour méditerranéen sauf un petit arc à l'est allant du Liban à la Lybie. Son centre de biodiversité, et probablement d'origine, est le sud de la péninsule ibérique (Upson & Andrews, 2004). Si 2 sous-espèces (*stoechas* et *luisieri*) y cohabitent, une seule, *L. stoechas* subsp. *stoechas* en sort. Cette espèce de lavande est très courante dans la partie nord de l'Algérie où elle se rencontre de manière spontanée à des altitudes assez variables. Elle est utilisée dans de nombreuses régions d'Algérie pour ses HEs ou sous forme d'herbe séchée pour des préparations alimentaires comme celle du couscous. Elle n'est pas cultivée mais prélevée dans le compartiment sauvage. Des analyses compositionnelles réalisées sur de nombreuses populations sauvages ont démontré l'existence de plusieurs chémotypes poussant des fois de manière sympatrique. Ces données sont cependant très fragmentées d'un point de vue géographique et sont quasiment absentes pour des populations d'origine algérienne. Les analyses entreprises ici ont eu pour but d'améliorer les connaissances actuelles sur la composition chimique des HEs de *L. stoechas* et de déterminer si des variations chémotypiques existent au sein des populations algériennes. Les HEs des parties aériennes fleuries récoltées sur onze populations couvrant l'aire de répartition de cette espèce en Algérie (Tableau 5, Figure 28), ont été extraites puis soumises à des analyses compositionnelles par GC/FID et GC/MS. Ces résultats ont donné lieu à une publication (Benabdelkader *et al.*, 2011, Annexe I).

### III.1.2. Résultats

#### III.1.2.1. Rendements en huile essentielle de 11 populations algériennes de *L. stoechas*

Les extractions par hydrodistillation conventionnelle des parties aériennes fleuries de *L. stoechas* ont été optimisées puis réalisées dans des conditions opératoires strictement identiques sur 11 populations algériennes sauvages. Ces extractions ont fourni des HES ayant des colorations variables allant du jaune claire au jaune relativement foncé mais ayant toujours une très forte, et persistante, odeur caractéristique de *L. stoechas*. Les rendements en HES des populations de *L. stoechas* sont exposés dans la Figure 33. Les valeurs représentent la moyenne des rendements d'extraction obtenus sur 3 extractions indépendantes sauf pour les populations LS1, LS2, LS7 et LS11 pour lesquelles une seule extraction a été réalisée. Les 11 populations étudiées ont présenté des rendements variables, allant de 0.34 % à 1.63 % (m/m, poids sec). Il est à noter que les meilleurs rendements (1.14 - 1.63 %) ont été obtenus sur les populations LS5, LS8, LS3 et LS6. Toutes ces populations sont situées dans la région nord-centre d'Algérie pas loin d'Alger la capitale (LS5 et LS6 de la wilaya de Bouira, LS8 de la wilaya de Blida et LS3 de la wilaya de Boumerdes, Figure 28). Cependant, d'autres populations de la même région de Bouira avaient des rendements faibles. C'est le cas des populations LS4 et LS7 qui avaient des rendements respectifs de 0.52 % et 0.60 %. Ainsi, les populations LS4, LS5, LS6 et LS7 récoltées presque de la même localité (wilaya de Bouira), présentaient une variabilité importante de rendements, s'étendant de 0.52 % à 1.63 %.



**Figure 33 : Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HES de populations algériennes de *L. stoechas***

### III.1.2.2. Composition chimique des huiles essentielles de 11 populations algériennes de *L. stoechas*

Les HEs des populations de *L. stoechas* originaires de 11 localités différentes d'Algérie ont été soumises à des analyses détaillées par GC/FID et GC/MS. L'identification des constituants a été réalisée par l'utilisation des indices de rétention (IR) sur colonne polaire et apolaire, par l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs et par la comparaison de ces données à celles de bases de données électroniques, WILEY et NIST, de bases bibliographiques (Adams, 2007 ; Joulain & König (1998) et celles obtenues sur des composés standards purs. Les constituants identifiés sont listés dans le Tableau 14 selon leur ordre d'élution sur la colonne apolaire HP-1. Leurs indices de rétention sur deux colonnes capillaires, apolaire HP-1 et polaire INNOWAX-1, leurs pourcentages relatifs (quantification basée sur les analyses GC/FID sur colonne HP-1) ainsi que les méthodes d'identification sont également répertoriées dans le Tableau 14.

Ces analyses chimiques ont permis d'identifier 121 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0.01 %. Ces 121 composés ont une aire cumulée qui correspond à 69.88 - 91.2 % des aires cumulées de l'ensemble des constituants des HEs. Au minimum 73 composés sont identifiés dans l'HE extraite de la population LS6 et au maximum 111 pour celle extraite de la population LS8. Au meilleur de notre connaissance, 83 de ces composés sont détectés ici pour la première fois dans une HE de *L. stoechas* algérienne et 54 n'avaient jamais été rapportées sur aucune HE de *L. stoechas* (voir composés portant l'exposant <sup>e</sup> et <sup>f</sup>, respectivement, dans le Tableau 14). De plus, 66 constituants ont été communément détectés dans les onze populations, alors que les autres composés n'ont été détectés que dans une, ou un sous-jeu de, population.

**Tableau 14 : Compositions chimiques des huiles essentielles des parties aériennes fleuries de onze populations algériennes sauvages de *L. stoechas***

Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (%)											Identification <sup>d</sup>	
			LS1	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11		
Benzaldehyde <sup>e</sup>	929	1546	- <sup>g</sup>	-	-	-	-	-	-	-	tr <sup>h</sup>	-	-	-	GC, MS
$\alpha$ -Pinene	932	1037	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-	-	-	GC,MS, CoGC
$\alpha$ -Fenchene	943	1077	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	GC,MS
Camphene <sup>f</sup>	945	1088	tr	-	-	-	-	-	-	-	0.11	-	-	-	GC,MS
Verbenene <sup>f</sup>	948	1147	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	GC,MS, CoGC
Hexanoic acid <sup>e,f</sup>	949	1860	0.37	-	0.11	0.29	-	-	-	-	0.3	0.19	0.13	GC,MS	
1-Octen-3-ol <sup>f</sup>	959	1463	0.07	-	-	0.07	-	-	-	0.02	0.14	0.07	-	GC,MS	
$\beta$ -Pinene	972	1129	-	-	-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	GC,MS, CoGC	
2,3-Dehydro 1,8-cineole <sup>e,f</sup>	979	1211	-	-	-	-	-	-	-	0.04	-	-	-	GC,MS	
Lavander lactone <sup>e,f</sup>	998	1700	0.21	0.1	0.13	0.06	0.08	0.26	0.17	0.06	0.16	0.12	0.11	GC,MS	
$\alpha$ -Phellandrene	999	1185	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-	-	-	GC,MS	
Benzyl alcohol <sup>e,f</sup>	1004	1881	0.19	-	0.09	0.07	-	-	0.15	0.04	0.24	0.11	0.05	GC,MS	
$\delta$ -3-Carene	1007	1173	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-	-	GC,MS, CoGC	
<i>o</i> -Cymene <sup>f</sup>	1010	1287	-	0.05	0.2	0.12	0.03	-	0.11	0.06	-	0.19	0.22	GC,MS	
$\alpha$ -Terpinene	1011	1202	-	0.07	0.2	0.12	0.11	-	0.09	0.03	-	0.12	0.02	GC,MS, CoGC	
<i>p</i> -Cymene	1013	1295	-	0.08	tr	tr	0.1	-	0.44	0.22	-	-	-	GC,MS, CoGC	
Limonene <sup>f</sup>	1023	1219	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	GC,MS, CoGC	
<b>1,8-Cineol</b>	1023	1229	<b>0.16</b>	<b>8.71</b>	<b>8.49</b>	<b>4.28</b>	<b>4.19</b>	<b>2.21</b>	<b>1.3</b>	<b>7.51</b>	<b>2.63</b>	<b>5.69</b>	<b>7.85</b>	GC,MS, CoGC	
<i>o</i> -Cresol <sup>e,f</sup>	1034	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	0.07	0.05	-	MS	
<i>p</i> -Cresol <sup>e,f</sup>	1046	2062	0.08	tr	tr	0.05	-	-	0.05	0.07	0.09	-	-	GC,MS	
$\gamma$ -Terpinene	1050	1269	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.03	tr	tr	tr	MS	
<i>trans</i> -Thujan-4-ol <sup>f</sup>	1054	1482	0.05	-	-	-	0.11	0.12	0.07	0.11	tr	0.06	0.11	GC,MS	
<i>cis</i> -Linalool oxide (furanoid) <sup>f</sup>	1058	1463	0.26	0.41	0.21	0.5	0.25	1.15	0.37	0.39	0.45	0.45	0.38	GC,MS	
Camphenilone <sup>e,f</sup>	1060	1486	0.12	0.06	tr	0.05	tr	tr	0.11	0.02	0.04	0.05	0.07	GC,MS	
<b>Fenchone</b>	1068	1427	<b>11.27</b>	<b>37.48</b>	<b>24.11</b>	<b>24.14</b>	<b>36.76</b>	<b>16.35</b>	<b>14.56</b>	<b>34.48</b>	<b>26.52</b>	<b>29.92</b>	<b>32.42</b>	GC,MS, CoGC	
<i>p</i> - $\alpha$ -Dimethyl styrene <sup>e,f</sup>	1073	1463	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-	GC,MS	
<i>trans</i> -Linalool oxide (furanoid) <sup>f</sup>	1073	1491	0.34	0.4	0.22	0.39	0.29	1.01	0.29	0.33	0.38	0.35	0.35	GC,MS	

Suite du tableau à la page suivante...

Tableau 14 (suite)

Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (%)											Identification <sup>d</sup>	
			LS1	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11		
Terpinolene	1080	1308	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.01	tr	tr	tr	MS
Nonanal <sup>e,f</sup>	1082	1414	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	tr	MS
Linalool	1084	1561	0.36	0.48	0.15	0.5	0.23	1.06	0.45	0.15	0.46	0.37	0.53	GC,MS, CoGC	
<i>cis</i> -Thujan-4-ol <sup>f</sup>	1084	1569	0.06	-	-	-	0.1	-	-	0.11	0.07	0.1	0.1	GC,MS	
Hotrienol <sup>e,f</sup>	1084	1627	0.12	0.07	tr	-	0.03	tr	tr	0.01	tr	0.1	tr	GC,MS	
Phenethyl alcohol <sup>e,f</sup>	1084	1936	0.12	tr	0.43	0.1	0.09	0.13	0.24	0.04	0.05	0.12	0.27	GC,MS, CoGC	
$\alpha$ -Thujone <sup>e,f</sup>	1087	1463	0.08	0.16	0.19	0.15	0.14	0.14	0.25	0.08	0.29	0.2	0.14	GC,MS	
$\alpha$ -Fenchol	1099	1607	0.42	1.37	0.61	0.75	1.01	0.58	0.93	1.0	1.3	0.79	0.8	GC,MS, CoGC	
Chrysanthenone <sup>f</sup>	1100	1505	0.1	0.13	0.16	0.22	0.06	0.01	0.65	0.13	tr	0.09	0.09	GC,MS	
<i>cis</i> - <i>p</i> -2,8-Menthadien-1-ol <sup>f</sup>	1104	1649	0.05	0.11	0.06	tr	0.08	-	-	0.08	-	-	-	GC,MS	
$\alpha$ -Campholenal <sup>f</sup>	1105	1510	0.16	0.22	0.24	0.17	0.29	0.13	0.27	0.15	0.21	0.23	0.19	GC,MS	
<i>cis</i> -Pinan-2-ol <sup>e,f</sup>	1107	-	0.05	0.19	0.19	0.11	-	0.16	0.11	0.15	0.15	0.23	0.22	MS	
Nopinone <sup>e,f</sup>	1108	1616	tr	0.12	0.01	0.07	-	0.05	0.1	0.19	0.1	0.08	0.14	GC,MS	
<b>Camphor</b>	1121	1556	<b>9.77</b>	<b>5.81</b>	<b>1.94</b>	<b>17.12</b>	<b>15.50</b>	<b>21.8</b>	<b>11.56</b>	<b>8.69</b>	<b>8.99</b>	<b>13.19</b>	<b>14.52</b>	GC,MS, CoGC	
<i>trans</i> -Pinocarveol <sup>f</sup>	1124	1683	0.42	0.37	1.61	0.24	0.22	0.22	0.94	0.24	0.33	0.37	0.29	GC,MS	
<i>cis</i> -Verbenol <sup>f</sup>	1125	1675	0.45	0.56	0.45	0.3	0.22	0.34	0.36	0.28	0.46	0.54	0.48	GC,MS	
Sabina ketone <sup>e,f</sup>	1125	1668	0.04	0.07	0.12	tr	0.03	0.01	0.05	0.06	0.06	0.06	0.11	GC,MS	
<b><i>trans</i>-Verbenol<sup>f</sup></b>	1127	1699	<b>3.0</b>	<b>2.33</b>	<b>0.11</b>	<b>1.0</b>	<b>0.83</b>	<b>0.76</b>	<b>0.7</b>	<b>0.03</b>	<b>1.29</b>	<b>1.33</b>	<b>0.58</b>	GC,MS	
$\alpha$ -Phellandrene-8-ol <sup>e,f</sup>	1130	1727	tr	0.18	tr	0.13	tr	-	-	tr	tr	tr	0.13	GC,MS	
<i>exo</i> -Methyl-camphenilol <sup>e,f</sup>	1133	1625	0.14	0.09	0.21	0.1	0.18	0.09	0.35	0.1	0.14	0.1	0.1	GC,MS	
Pinocarvone <sup>f</sup>	1139	1604	0.19	0.31	0.14	0.3	0.13	0.13	0.25	0.3	0.17	0.19	0.26	GC,MS	
$\beta$ -Phellandrene-8-ol <sup>e,f</sup>	1145	1735	0.16	0.15	0.02	0.52	0.19	0.15	0.25	0.32	0.18	0.16	tr	GC,MS	
$\delta$ -Terpineol <sup>e,f</sup>	1146	1699	0.05	0.5	0.64	0.16	0.13	0.76	0.45	0.26	0.34	0.57	0.88	GC,MS, CoGC	
<i>cis</i> -Linalool oxide (pyranoid) <sup>e,f</sup>	1148	1762	0.51	0.18	tr	0.18	0.1	0.29	0.15	0.17	0.29	0.42	0.16	GC,MS	
Borneol	1150	1720	1.13	0.2	0.21	0.71	0.73	0.52	0.95	0.32	0.63	0.87	0.29	GC,MS, CoGC	
Lavandulol	1150	1688	0.20	0.11	0.21	0.09	0.08	0.11	0.13	0.11	0.3	0.29	0.18	GC,MS, CoGC	
<i>trans</i> -Linalool oxide (pyranoid) <sup>e,f</sup>	1152	1783	0.42	0.21	tr	0.18	0.15	0.2	0.28	0.16	0.35	0.37	0.23	GC,MS	
<i>p</i> -Methylacetophenone <sup>e,f</sup>	1154	1803	0.18	0.16	0.28	0.11	0.11	0.29	0.4	0.18	0.18	0.22	0.18	GC,MS	

Suite du tableau à la page suivante...

Tableau 14 (suite)

Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (%)											Identification <sup>d</sup>
			LS1	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11	
<i>m</i> -Cymene-8-ol <sup>e,f</sup>	1155	1867	<b>0.14</b>	<b>0.23</b>	<b>2.06</b>	<b>2.02</b>	<b>1.7</b>	<b>0.42</b>	<b>0.42</b>	<b>3.21</b>	<b>0.79</b>	<b>0.11</b>	<b>0.81</b>	GC,MS
<i>p</i> -Cymene-8-ol	1160	1874	<b>2.64</b>	<b>1.32</b>	<b>2.0</b>	<b>1.81</b>	<b>1.60</b>	<b>1.31</b>	<b>1.78</b>	<b>2.77</b>	<b>2.74</b>	<b>1.53</b>	<b>1.83</b>	GC,MS
Terpinene-4-ol	1162	1622	<b>0.32</b>	<b>0.5</b>	<b>1.17</b>	<b>0.31</b>	<b>0.18</b>	<b>0.3</b>	<b>2.14</b>	<b>0.4</b>	<b>0.35</b>	<b>0.35</b>	<b>0.5</b>	GC,MS, CoGC
Myrtenal <sup>f</sup>	1170	1665	0.43	0.5	0.48	0.36	0.33	0.27	0.43	0.36	0.56	0.49	0.47	GC,MS
$\alpha$ -Terpineol	1172	1715	0.22	0.55	0.62	0.21	0.3	0.41	0.37	0.41	0.53	0.39	0.96	GC,MS, CoGC
Methyl chavicol <sup>e,f</sup>	1175	1705	-	0.26	0.64	0.16	0.17	-	0.28	0.09	0.05	0.23	0.15	GC,MS
Myrtenol	1179	1821	0.59	0.66	0.56	0.41	0.3	0.47	0.66	0.56	1.13	0.8	0.64	GC,MS
Verbenone	1180	1749	<b>2.67</b>	<b>2.18</b>	<b>1.22</b>	<b>1.78</b>	<b>1.43</b>	<b>0.7</b>	<b>1.36</b>	<b>2.07</b>	<b>1.49</b>	<b>1.22</b>	<b>0.9</b>	GC,MS
<i>trans</i> -Piperitol <sup>e,f</sup>	1191	1775	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-	-	GC,MS
<i>trans</i> -Carveol <sup>f</sup>	1197	1860	0.88	0.81	0.69	0.42	0.59	0.48	0.71	0.4	0.86	0.57	0.54	GC,MS
<i>exo</i> -2-Hydroxycineole <sup>e,f</sup>	1198	1881	0.18	tr	0.22	0.09	0.03	0.04	0.35	0.14	0.55	0.49	0.34	GC,MS
$\alpha$ -Fenchyl-acetate <sup>f</sup>	1207	1495	tr	0.37	0.12	0.12	0.15	0.2	0.28	0.36	0.21	0.31	0.25	GC,MS
Cuminaldehyde <sup>f</sup>	1213	1821	tr	0.06	0.15	0.26	0.13	tr	0.08	0.08	0.23	0.05	0.28	GC,MS
Carvone	1215	1769	0.52	0.74	0.83	0.34	0.52	0.46	0.71	0.58	0.71	0.67	0.79	GC,MS, CoGC
<i>cis</i> -Piperitone oxide <sup>e,f</sup>	1222	-	0.74	0.09	0.48	0.29	0.29	0.13	0.58	0.45	0.59	0.31	0.15	GC,MS
2-Phenylethyl acetate <sup>e</sup>	1225	1839	0.08	-	0.4	tr	tr	-	0.08	0.12	0.29	0.12	0.17	GC,MS, CoGC
<i>trans</i> -2-Hydroxy pinocamphone <sup>e,f</sup>	1226	-	0.18	-	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	MS
Piperitone <sup>f</sup>	1226	1764	0.11	-	-	0.08	0.18	-	0.19	-	-	-	-	GC,MS
<i>trans</i> -Piperitone oxide <sup>e,f</sup>	1232	-	0.85	0.26	tr	0.1	0.33	0.3	0.32	0.11	0.3	0.22	0.1	GC,MS
Geraniol <sup>e,f</sup>	1233	1866	0.14	0.09	-	0.23	-	-	0.29	0.17	0.21	0.12	0.28	GC,MS, CoGC
Perillaldehyde <sup>e,f</sup>	1245	1829	0.18	0.13	0.17	0.13	0.14	0.21	1.31	0.12	0.27	0.26	0.18	GC,MS
Cuminol <sup>e,f</sup>	1263	2134	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	0.25	0.18	GC,MS
Thymol <sup>f</sup>	1267	2213	tr	-	-	0.09	-	-	-	tr	tr	tr	tr	GC,MS, CoGC
$\alpha$ -Necrotyl acetate <sup>f</sup>	1269	1601	-	-	0.83	-	-	-	1.34	-	-	-	-	GC,MS
Bornyl acetate	1270	1612	<b>2.82</b>	<b>0.47</b>	<b>0.46</b>	<b>2.36</b>	<b>3.03</b>	<b>3.73</b>	<b>4.0</b>	<b>1.61</b>	<b>1.52</b>	<b>3.12</b>	<b>0.92</b>	GC,MS, CoGC
Lavandulyl acetate	1271	1606	0.13	tr	tr	tr	0.05	tr	tr	0.08	0.11	0.11	0.08	GC,MS, CoGC
Undecanone-2 <sup>e,f</sup>	1273	1619	-	-	0.61	0.4	tr	-	-	-	-	-	-	GC,MS
Carvacrol <sup>f</sup>	1276	2240	tr	-	-	0.24	-	-	-	0.02	tr	tr	tr	GC,MS, CoGC

Suite du tableau à la page suivante...

Tableau 14 (suite)

Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (%)											Identification <sup>d</sup>
			LS1	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11	
Inconnu (MM150 et MM164)	1276	-	0.46	-	2.03	1.6	2.18	0.58	0.51	2.39	1.32	0.27	1.25	MS
Filifolide A <sup>e,f</sup>	1278	-	0.58	0.14	tr	0.12	tr	-	-	0.06	0.17	0.11	tr	MS
<b>Myrtenyl acetate<sup>f</sup></b>	1305	1704	<b>1.27</b>	<b>0.61</b>	<b>2.17</b>	<b>1.69</b>	<b>1.62</b>	<b>2.54</b>	<b>1.72</b>	<b>1.01</b>	<b>2.51</b>	<b>1.68</b>	<b>2.14</b>	GC,MS, CoGC
Piperitenone <sup>f</sup>	1308	1967	0.14	tr	tr	0.08	tr	tr	tr	0.03	0.09	tr	tr	GC,MS
Eugenol <sup>e,f</sup>	1327	2196	0.20	0.08	0.13	0.19	-	0.08	0.44	0.04	0.29	0.23	0.08	GC,MS, CoGC
Inconnu (MM168)	1351	2157	1.02	-	-	0.21	0.36	0.44	0.29	0.13	0.19	0.21	0.14	MS
Cyclosativene <sup>f</sup>	1369	1506	0.06	0.11	0.1	0.24	0.07	-	-	0.11	-	0.16	0.07	GC,MS
$\alpha$ -Copaene	1377	1517	tr	tr	tr	0.06	-	-	-	0.06	-	0.08	0.06	GC,MS, CoGC
Sativene <sup>e,f</sup>	1391	1569	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-	GC,MS
<i>trans</i> - $\beta$ -Caryophyllene <sup>f</sup>	1419	1628	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	GC,MS, CoGC
<i>allo</i> -Aromadendrene <sup>f</sup>	1459	1681	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-	GC,MS
$\beta$ -Selinene <sup>e,f</sup>	1482	1750	0.21	0.11	-	0.05	-	-	0.11	0.05	-	0.13	-	GC,MS
Dihydroactinidiolide <sup>e,f</sup>	1486	-	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MS
<i>epi</i> -Cubebol <sup>e,f</sup>	1488	1967	0.57	0.52	0.15	0.47	0.17	0.33	0.14	0.26	0.34	1.0	0.52	GC,MS
Ledene <sup>f</sup>	1491	1730	0.16	0.15	-	0.36	-	-	-	0.09	0.28	0.25	0.14	GC,MS
$\alpha$ -Muurolene	1494	1753	0.16	0.25	-	0.19	-	0.13	0.14	0.10	0.17	0.13	0.08	GC, MS, CoGC
$\gamma$ -Cadinene	1508	1792	0.05	0.03	0.12	0.06	tr	0.01	0.02	0.04	0.1	0.26	0.06	GC,MS
Cubebol <sup>e,f</sup>	1509	1914	0.38	0.71	0.44	0.25	0.16	0.29	0.32	0.29	0.38	0.15	0.67	GC,MS
Calamenene <sup>f</sup>	1510	1860	0.15	tr	0.21	0.2	tr	0.12	0.1	0.12	0.08	0.21	0.11	GC,MS
$\delta$ -Amorphene <sup>e,f</sup>	1511	1730	0.23	0.59	0.18	0.46	tr	0.17	0.22	0.15	0.2	0.59	0.32	GC, MS
$\delta$ -Cadinene	1515	1787	0.11	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.04	0.04	0.12	0.06	GC,MS
Cadina-1,4-diene <sup>e,f</sup>	1525	1816	0.18	tr	-	0.14	-	-	-	0.06	-	0.12	-	GC,MS
$\alpha$ -Calacorene <sup>e,f</sup>	1529	1946	-	tr	-	0.18	-	0.16	-	0.12	0.11	0.2	-	GC,MS
Myrtenyl valerate <sup>e,f</sup>	1542	-	0.69	0.56	0.33	0.26	0.22	0.45	0.24	0.1	0.14	0.41	0.2	GC,MS
<i>cis</i> - $\alpha$ -Copaene-8-ol <sup>e,f</sup>	1550	2077	0.54	0.57	0.7	0.28	0.39	1.24	-	0.38	0.3	0.45	1.06	GC,MS
Palustrol <sup>e,f</sup>	1562	1973	0.27	tr	0.17	0.15	tr	0.21	0.15	0.11	tr	0.14	tr	GC,MS

Suite du tableau à la page suivante...

Tableau 14 (suite)

Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (%)											Identification <sup>d</sup>
			LS1	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11	
Spathulenol	1565	2157	0.22	tr	0.23	0.19	tr	0.31	0.27	0.08	0.27	0.16	0.28	GC,MS
Caryophyllène oxyde	1571	2024	0.81	0.55	0.98	0.31	0.53	2.22	0.6	0.52	0.48	0.65	0.46	GC,MS
Globulol	1576	2095	0.82	0.98	0.59	0.2	0.28	0.67	0.52	0.45	0.57	0.73	0.38	GC,MS
<b>Viridiflorol<sup>f</sup></b>	1583	2103	<b>7.38</b>	<b>4.88</b>	<b>6.81</b>	<b>4.34</b>	<b>3.58</b>	<b>7.14</b>	<b>6.44</b>	<b>3.01</b>	<b>3.8</b>	<b>5.07</b>	<b>2.89</b>	GC,MS
<b>Ledol<sup>f</sup></b>	1593	2065	<b>1.01</b>	<b>1.70</b>	<b>1.96</b>	<b>2.09</b>	<b>0.5</b>	<b>1.8</b>	<b>1.96</b>	<b>0.47</b>	<b>1.28</b>	<b>1.24</b>	<b>0.99</b>	GC,MS
Inconnu	1594	-	3.27	1.23	2.09	0.56	1.57	4.48	4.09	1.36	1.22	1.77	0.86	
<i>epi</i> -Cubénol <sup>e</sup>	1616	2095	0.60	0.64	0.62	0.51	0.27	0.79	0.59	0.37	0.61	0.63	0.4	GC,MS
$\alpha$ -Cadinol <sup>f</sup>	1626	2203	0.43	0.36	0.7	0.55	0.41	0.92	0.51	0.3	0.52	0.5	0.38	GC,MS
$\alpha$ -Muurolole <sup>e,f</sup>	1630	2233	0.38	0.2	0.25	tr	tr	tr	0.31	0.08	tr	-	-	GC,MS
Cubénol <sup>e</sup>	1633	2101	0.22	0.22	0.06	0.1	-	-	0.07	0.06	-	0.09	-	GC,MS
$\beta$ -Eudesmol <sup>e,f</sup>	1636	2268	0.43	0.31	0.35	0.16	-	-	0.11	0.09	-	-	-	GC,MS
Sesquiterpène oxygéné (MM218)	1654	-	1.67	1.66	1.37	1.11	0.51	1.31	1.01	0.7	0.98	1.09	0.56	MS
$\alpha$ -Cyperone <sup>e,f</sup>	1725	2398	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC,MS
Sesquiterpène oxygéné (MM236)	1822	-	2.43	2.15	2.46	2.17	1.15	4.77	2.22	1.48	3.75	2.55	2.78	MS
Sesquiterpène oxygéné (MM236)	1829	-	1.83	1.73	1.98	1.75	0.92	3.83	1.98	1.2	3.05	1.99	2.11	MS
Monoterpènes hydrocarbonés			0.0	0.2	0.4	0.24	0.24	0.0	0.64	0.71	0.0	0.31	0.24	
Monoterpènes oxygénés			46.19	71.3	55.27	66.27	75.37	61.32	55.73	71.33	62.36	70.87	74.43	
Sesquiterpènes Hydrocarbonés			1.31	1.24	0.61	1.94	0.07	0.59	0.59	1.13	0.98	2.25	0.9	
Sesquiterpènes oxygénés			20.38	17.18	19.82	14.63	8.87	25.83	17.2	9.85	16.33	16.44	13.48	
Autres			2.0	0.55	2.41	1.78	0.29	0.21	1.24	0.63	1.74	1.33	0.85	
<b>Total identifié</b>			<b>69.88</b>	<b>90.47</b>	<b>78.51</b>	<b>84.86</b>	<b>84.84</b>	<b>87.95</b>	<b>75.4</b>	<b>83.65</b>	<b>81.41</b>	<b>91.2</b>	<b>89.9</b>	

<sup>a</sup>) L'ordre d'élution des constituants et leurs pourcentages sont donnés sur la colonne capillaire apolaire HP-1 avec une détection FID. <sup>b</sup>) IR = Indices de rétention sur la colonne apolaire HP-1. <sup>c</sup>) IR = Indices de rétention sur la colonne polaire INNOWAX-1. <sup>d</sup>) Méthode d'identification : GC, identification basée sur les indices de rétention ; MS, identification basée sur la comparaison des spectres de masse avec les banques électroniques WILEY et NIST et la littérature (Adams, 2007 ; Joulain & König, 1998) ; Co-GC, identification basée sur la co-injection de composés authentiques. <sup>e</sup>) Composants signalés pour la première fois dans l'huile essentielle de *L. stoechas*. <sup>f</sup>) Composants rapportés pour la première fois dans l'huile essentielle de *L. stoechas* Algérienne. <sup>g</sup>) - = Non détecté. <sup>h</sup>) tr = trace (< 0,01%). Les composés majoritaires et d'autres avec des pourcentages notables sont en gras.



Ainsi, ces analyses ont montré la prédominance de composés monoterpéniques oxygénés (alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, lactones, phénols, éthers phénoliques) avec une teneur combinée variant de 46.19 % à 75.37 %. Cette fraction est dominée soit par le fenchone (11.27 - 37.48 %) soit par le camphre (1.94 - 21.8 %). La Figure 34 représente les structures chimiques développées des composés majoritaires ainsi que de quelques composés détectés pour la première fois dans l'HE de *L. stoechas*. Les profils des monoterpènes oxygénés mettent en évidence l'importance du 1,8-cinéol dans les échantillons des HEs de la plupart des populations (0.16 - 8.71 %) où il a été détecté comme deuxième ou troisième composé majoritaire. Ensuite, ce sont l'acétate de bornyl (0.46 - 4.0 %), le *m*-cymène-8-ol (0.11 - 3.21 %), le *trans*-verbenol (0.03 - 3.0 %), le *p*-cymène-8-ol (1.31 - 2.77 %), le verbenone (0.7 - 2.67 %), l'acétate de myrtényl (0.61 - 2.54 %) et le terpinène-4-ol (0.18 - 2.14 %) qui sont les autres monoterpènes oxygénés les plus représentés. Les sesquiterpènes oxygénés représentent la deuxième classe de molécules la plus abondante (8.87 - 25.83 %). Parmi ceux-ci, le viridiflorol est le plus abondant, représentant de 2.89 % à 7.38 % des constituants des HEs, suivi par le ledol (0.47 - 2.09 %). Les sesquiterpènes hydrocarbonés et les monoterpènes hydrocarbonés sont très minoritaires dans toutes les HEs analysées, puisque aucune fraction des deux n'a été identifiée à un taux supérieur à 2.25 % (Tableau 14). Cependant, malgré le travail d'analyse réalisé, il reste encore un certain nombre de composés non identifiés (8.8 - 30.12 %).

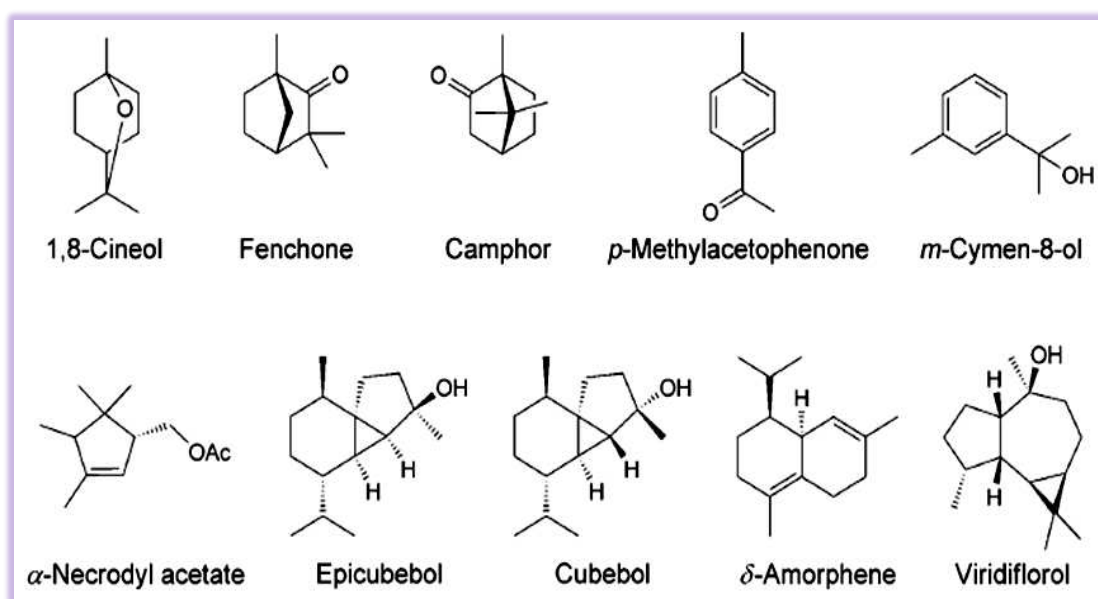
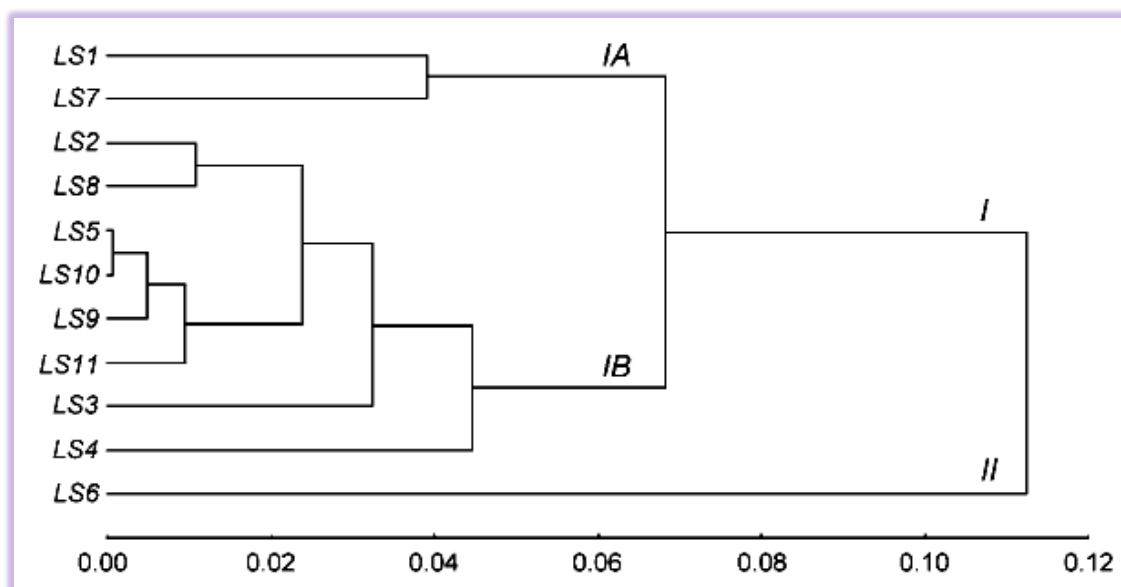


Figure 34 : Structures chimique des composés majoritaires et de certains composés détectés pour la première fois dans des HEs de *L. stoechas* d'Algérie

### III.1.2.3. Variabilité et biodiversité des huiles essentielles des 11 populations algériennes de *L. stoechas*

D'après les résultats présentés dans le Tableau 14, les HEs de populations algériennes de *L. stoechas* présentent une immense variation qualitative et quantitative. Bien qu'utilisé brièvement ici, l'analyse statistique est un outil puissant permettant de compléter les méthodes purement analytiques car elle permet notamment dans notre cas, de comparer les différents jeux de données chimiques obtenus sur des huiles essentielles différentes. Afin d'estimer la nature de la variabilité de la composition chimique de ces HEs, nous avons réalisé une analyse de classification hiérarchique. Cette analyse statistique est basée sur une matrice de la composition (%) des HEs limitée aux quatre principaux composants (le fenchone, le camphre, le 1,8-cinéol et le viridiflorol). Ces composés unis représentent une proportion de 28.58 % à 60.03 % du contenu total des l'HEs. La Figure 35 illustre le dendrogramme de la classification hiérarchique des HEs des onze populations de *L. stoechas* algériennes. Cette analyse sépare les populations algériennes de *L. stoechas* en deux principaux clusters. Le cluster *I* regroupe les HEs de toutes les populations excepté celle de la population LS6. Ces dix HEs regroupées ensemble sont caractérisées par le fenchone comme composant majoritaire, donc à chémotype fenchone. Cependant, l'HE de la population LS6 est caractérisée par le camphre comme composant majoritaire, donc à chémotype camphre (cluster *II*). L'analyse du cluster *I* a révélé l'existence d'une grande diversité chimique des HEs des populations à chémotype fenchone. Les populations de ce cluster sont globalement classées dans deux sous-clusters *IA* et *IB* (Figure 35). Le sous-cluster *IA* regroupe les HEs des populations LS1 et LS7 possiblement sur la base de leurs teneurs plus élevées de viridiflorol (7.38 et 6.44 %, respectivement) en parallèle avec des teneurs plus faibles en 1,8-cinéol (0.16 et 1.30 %, respectivement). Ainsi, au sein de ce cluster *I* les populations LS3 et LS4 sont relativement loin des autres populations probablement sur la base de leurs pourcentages en camphre qui est très faible dans l'HE de la population LS3 (1.94 %) et très fort dans l'HE de la population LS4 (17.12 %). Cependant, il est à noter que même si les HEs des populations LS2 et LS3 sont caractérisées par le 1,8-cinéol comme second composant majeur, elles ne sont pas groupées dans un groupe distinct au sein du sous-cluster *IB*.



**Figure 35 :** Dendrogramme de l'analyse hiérarchique de onze populations algériennes de *L. stoechas*

Cette classification est basée sur les teneurs (%) des quatre principaux constituants des HEs de ces populations, le fenchone, le camphre, le 1,8-cinéol et le viridiflorol (données issues du Tableau 14)

### III.1.3. Discussion

Les rendements d'extractions en HE de onze populations algériennes sauvages de *L. stoechas* ont présenté une variabilité remarquable (0.34 % à 1.63 %, Figure 33). Cette variabilité est peut être une des caractéristiques typiques de *L. stoechas* sauvage. Des populations espagnoles sauvages de *L. stoechas* ont également montré des variations aussi élevées en rendements en HE (Garcia-Vallejo, 1992). Des conclusions semblables ont également été faites sur des populations sauvages de Crète (Skoula *et al.*, 1996) et des îles de Corse (Baldovini *et al.*, 1998). Skoula *et al.* (1996) ont trouvé aussi que la teneur en HE des inflorescences est plus importante que celles des feuilles. Même si toutes ces études indiquent une forte variabilité dans la teneur en HE de populations sauvages de *L. stoechas*, elles sont toutes d'accord pour dire que cette espèce, comme quelques autres espèces de lavande est riche en HE et permet de la considérer comme une plante aromatique 'à HE' (Lis-Balchin, 2002).

Ces différences de rendement en HE peuvent être attribuées aux facteurs biotiques et abiotiques incontrôlés ou aux différences génétiques inhérentes comme précédemment décrit pour d'autres plantes productrices d'HE (Putievsky *et al.*, 1986 ; Figueiredo *et al.*, 1997). Les *Citrus* par exemple ont une teneur plus importante en HE lorsque la température est élevée (Bruneton, 1999). Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* sont

plus riches en HE sous l'effet de fertilisants (Alvarez-Castellanos & Pascual-Viilalobos, 2003). Selon Vekiari *et al.* (2002), la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en HE.

Les analyses par GC/FID et GC/MS ont prouvé que les HEs des populations algériennes de *L. stoechas* contiennent plus de composés oxygénés que de composés hydrocarbonés. En plus, ces composés oxygénés sont majoritairement monoterpéniques. Les HEs des espèces *Lavandula* sont généralement riches en monoterpènes (Lis-Balchin, 2002 ; Upson & Andrews, 2004). De plus, ces analyses ont mis en évidence la présence de deux chémotypes, le chémotype fenchone (LS1 - LS5 et LS7 - LS11) et le chémotype camphre (LS6) avec une forte variabilité de composition au sein du chémotype fenchone. En accord avec notre étude, les HEs extraites des populations de *L. stoechas* sont reconnues pour la complexité de leur composition chimique et la variabilité de leurs constituants. Si 1 à 3 composés sont majoritaires, elles renferment en parallèle un très grand nombre d'autres molécules, souvent présentes à l'état de trace. Des travaux antérieurs à la présente étude ont porté sur la variation de la composition chimique des HEs de *L. stoechas* de différentes régions méditerranéennes. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus sur d'autres populations nord africaines et du reste du bassin méditerranéen. Ces études ont révélé l'existence de plusieurs chémotypes. Le chémotype le plus décrit de *L. stoechas* est le chémotype fenchone/camphre enregistré au Maroc (Zrira & Benjilali, 2003), en Tunisie (Bouzouita *et al.*, 2005), en Espagne (Garcia-Vallejo, 1992), en Italie (Angioni *et al.*, 2006), en Crète (Grèce) (Skoula *et al.*, 1996), en Hatay (Turquie) (Dadalioglu & Evrendilek, 2004), à Chypre (Valentini *et al.*, 1993) et en Corse (France) (Ristorcelli *et al.*, 1998). Aussi, en accord avec nos résultats, les études qui ont comparé les différentes populations d'une zone géographique restreinte ont observé que le rapport entre le fenchone et le camphre peut varier considérablement et peut même s'inverser (Garcia-Vallejo, 1992 ; Valentini *et al.*, 1993 ; Skoula *et al.*, 1996 ; Baldovini *et al.*, 1998 ; Ristorcelli *et al.*, 1998 ; Zrira & Benjilali, 2003). Dans quelques unes de ces études, certaines populations du chémotype fenchone/1,8-cinéol ont été décrites dans la même région phytogéographique que des populations à chémotype fenchone/camphre comme en Espagne (Garcia-Vallejo, 1992) et en Crète (Skoula *et al.*, 1996). Dans cette dernière étude réalisée sur quatre populations sauvages de *L. stoechas* de la Crète, Skoula *et al.* (1996),

ont montré que les principaux constituants des HEs sont alternativement, ou en combinaison le fenchone, le camphre, le 1,8-cinéol, l' $\alpha$ -pinène et l'acétate de myrtényle. Ainsi, alors que le fenchone était un élément majeur de l'HE de toutes les quatre populations, trois étaient également riches en camphre et la quatrième en 1,8-cinéol. En Turquie, un chémotype à 1,8-cinéol/camphre a même été décrit (Arabaci & Bayram, 2005). Dans les HEs de deux de nos populations (LS2 et LS3), le 1,8-cinéol était le deuxième composé le plus abondant après le fenchone et représente plus de 8 % de la teneur totale de l'HE. Même si les analyses statistiques de notre échantillonnage ne supportent pas la distinction du chémotype fenchone/camphre du chémotype fenchone/1,8-cinéol en Algérie, il est clair d'après nos données que les populations ayant un contenu élevé de 1,8-cinéol ne sont pas limitées à la côte nord de la mer Méditerranée. Des populations ayant un taux élevé de 1,8-cinéol, peuvent également être trouvées dans le nord de l'Afrique. En revanche, tous ces chémotypes diffèrent complètement de celui publié par Gören *et al.* (2002) dont l'HE d'une *L. stoechas* originaire de Turquie se caractérisait plutôt par un profil jamais retrouvé ayant une forte teneur en pulégone (40.4 %), menthol (18.1 %) et menthone (12.6 %) en parallèle avec une absence totale de fenchone et de camphre.

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'HE des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypiques différents. L'exemple le plus étudié est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* présente dans le sud de la France. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'HE qui peut être soit le géraniol, l' $\alpha$ -terpinéol, le thuyanol-4, le linalol, le carvacrol ou le thymol (Thompson *et al.*, 2003). Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces : *Origanum vulgare* (Vokou *et al.*, 1993), *Mentha spicata* (Kokkini & Vokou, 1989), *Artemisia herba-alba* (Benjilali *et al.*, 1982 ; Salido *et al.*, 2004a) en sont des exemples.

Les 11 HEs de *L. stoechas* algériennes diffèrent également, et considérablement, d'autres HEs publiées de *L. stoechas*, dans la composition des substances minoritaires. Chez une autre population algérienne de *L. stoechas* (Dob *et al.*, 2006a), la présence de quantités élevées de *p*-cymène (6.5 %) a été révélée, parallèlement avec d'autres HEs de *L. stoechas* non-algériennes. Cependant, dans nos HEs le *p*-cymène a été, au mieux, détecté sous forme de trace (Tableau 14). Inversement, dans la même étude, Dob *et al.* (2006a) n'ont pas détecté la présence de l'acétate de myrtényle, composé relativement important

dans nos HEs (0.61 - 2.54 %). D'après la large étude de Garcia-Vallejo (1992) menée sur plusieurs populations de plusieurs espèces de *Lavandula* espagnoles et portugaises, l'acétate de myrtényle a été marqué comme composant caractéristique des HEs de *L. stoechas*. En plus, nos HEs diffèrent de toutes les autres HEs de *L. stoechas* par la présence d'un taux élevé de viridiflorol (2.89 - 7.38 %). Cependant, elles sont aussi caractérisées par l'absence totale de quelques composés comme l'acétate de linalyle, le  $\beta$ -phéllandrène, le longifolène et le germacrène D définis auparavant dans les HEs de *L. stoechas*. Cela s'explique probablement par la perte de ces composés lors de l'hydrodistillation surtout s'ils sont à l'état de trace. Guenther (1948), dans sa comparaison descriptive de plusieurs méthodes d'extraction d'HEs, souligne la possibilité d'hydrolyse de certains des composés des HEs lors de l'hydrodistillation. Guenther (1948) mentionne également la perte de certains composés qui sont solubilisés dans les eaux résiduelles.

Il est également important de noter la présence de l'acétate d' $\alpha$ -nécrodyde exclusivement dans les HEs des populations LS3 et LS7. Les COV faisant partie de la famille chimique des nécrodanes sont les molécules de lavande les plus spécifiques dans le règne végétal puisqu'elles ne sont connues que chez *L. stoechas* subsp. *luisieri* qui comporte dans son HE comme constituants majeurs le *cis* et le *trans*- $\alpha$ -nécrodol et l'acétate de *trans*- $\alpha$ -nécrodol (Garcia-Vallejo, 1992 ; Garcia-Vallejo *et al.*, 1994 ; Lavoine-Hanneguelle & Casabianca, 2004 ; Sanz *et al.*, 2004 ; Baldovini *et al.*, 2005). En dehors du règne végétal, cette substance n'a été détectée que chez certains insectes (Millar *et al.* 2005).

La différence de composition constatée entre les HEs des populations de *L. stoechas* de cette étude ou avec d'autres populations à travers le bassin méditerranéen est vraisemblablement liée à une régulation différentielle des divers constituants de l'HE par des facteurs abiotiques et biotiques. De nombreux facteurs externes peuvent influencer la composition chimique de l'HE. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'induire des modifications chimiques. Chez la *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofurane (Bruneton, 1999). Les études portant sur la variation de la composition chimique des HE en fonction du site de récolte, du cycle circadien et des saisons sont nombreuses (Assad *et al.*, 1997 ; Lopes *et al.*, 1997). L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants. A

titre d'exemple, il a été démontré que la composition de l'HE de feuilles d'*Ocimum gratissimum* varie considérablement en fonction de l'heure de la récolte (Vasconcelos *et al.*, 1999). L'influence du procédé d'extraction sur la labilité des constituants des HEs explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Le chauffage prolongé et puissant engendre en effet la dégradation de certaines de molécules aromatiques. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisation, mais aussi réarrangements, isomérisations, racémisations, oxydations, etc... et ce d'autant plus que la distillation est longue et le pH acide (Granger *et al.*, 1975).

## **III.2. Activités biologiques *in vitro* des HEs accumulées par des populations de *L. stoechas***

### **III.2.1. Introduction**

Les organismes vivants sont capables de produire des substances naturelles que l'homme exploite pour diverses raisons. Les plantes sont à elles seules une source immense de molécules chimiques complexes utilisées dans les parfums, l'agroalimentaire, et l'industrie pharmaceutique. Actuellement, la majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutique sont extraites directement de la plante entière ou de l'un de ces organes. Plusieurs de ces molécules, appelées métabolites secondaires, constituent des entités chimiques impliquées dans la protection contre les pathogènes et les ruminants ou agissent comme signaux chimiques.

Il a été démontré que les peuples utilisant une alimentation riche en antioxydants (Hertog *et al.*, 1993 ; Adamson *et al.*, 1999) sont moins exposés à des maladies cardiovasculaires (Vinson *et al.*, 1995) ou à certaines formes de cancer (Hertog *et al.*, 1993). Les antioxydants naturels sont apparus comme une alternative aux antioxydants de synthèses qui sont de moins en moins utilisés dans l'industrie alimentaire à cause de leurs effets secondaires nuisibles pour la santé humaine. Les antioxydants de synthèses les plus couramment utilisés sont le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le gallate de propyle (PG) et le *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) (Sherwin, 1990). Cependant, le BHA et le BHT sont suspectés d'être responsables de dommages au foie et d'induire certains cancers (Grice, 1986 ; Wichi, 1988). Par conséquent, le développement et l'utilisation d'antioxydants plus efficaces d'origine naturelle sont souhaités. Les antioxydants naturels peuvent protéger le corps humain contre les radicaux libres et retarder la progression de nombreuses maladies chroniques, ainsi que le rancissement oxydatif des lipides dans les aliments (Pryor, 1991 ; Kinsella *et al.*, 1993 ; Lai *et al.*, 2001 ; Gülçin *et al.*, 2003a, b). Les HE sont des sources potentielles de constituants chimiques naturels doués d'activité antioxydante. Les HE ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation (Okuda *et al.*, 1989 ; Teissedre *et al.*, 1996 ; Bohm *et al.*, 1998 ; Debra *et al.*, 2001 ;). Ainsi l'incorporation des HEs directement dans les aliments sous plusieurs formes contribue à préserver la qualité des aliments principalement par la prévention de la dégradation oxydative des constituants lipidiques



(Caillet & Lacroix, 2007). Malgré l'utilisation traditionnelle de l'HE de *L. stoechas*, son potentiel antioxydant n'a jamais été évalué.

Si la découverte des agents thérapeutiques antimicrobiens est l'une des plus grandes avancées médicales du XX<sup>ème</sup> siècle, la trop grande utilisation (souvent inadaptée et généralisée également) des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire depuis 50 ans a malheureusement entraîné la sélection de souches bactériennes multirésistantes. C'est le cas par exemple des bactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi, résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines. Il est maintenant clair que l'arsenal existant d'antibiotiques est insuffisant pour nous protéger à long terme. Par conséquent, il est nécessaire de rechercher de nouvelles sources non traditionnelles d'antibiotiques, notamment naturelles, permettant de développer des inhibiteurs qui agissent différemment de ceux classiquement utilisés. L'identification de nouveaux antimicrobiens se base sur la recherche de molécules capables d'induire la mort cellulaire des microorganismes en agissant simultanément sur plusieurs cibles cellulaires ou ayant de nouveaux mécanismes d'action. La complexité, et la diversité, moléculaire des HEs font de ces dernières des candidates privilégiées pour entreprendre de telles recherches. Les enquêtes sur les activités antimicrobiennes, le mode d'action et les utilisations potentielles des HEs végétales ont retrouvé l'impulsion et il semble y avoir une renaissance dans l'utilisation des méthodes traditionnelles de protection du bétail ainsi que dans la conservation des aliments. De ce fait, on a jugé utile d'évaluer l'activité antimicrobienne des HEs des 11 populations algériennes de *L. stoechas* étudiées dans le chapitre précédent afin de valoriser cette immense source naturelle d'une part et d'autre part de justifier son utilisation traditionnelle comme antiseptique en Algérie et le reste du bassin méditerranéen. Ces résultats ont donné lieu à une publication (Benabdelkader *et al.*, 2011, Annexe I).

## **III.2.2. Résultats**

### **III.2.2.1. Activité antioxydante des huiles essentielles de 11 populations de *L. stoechas***

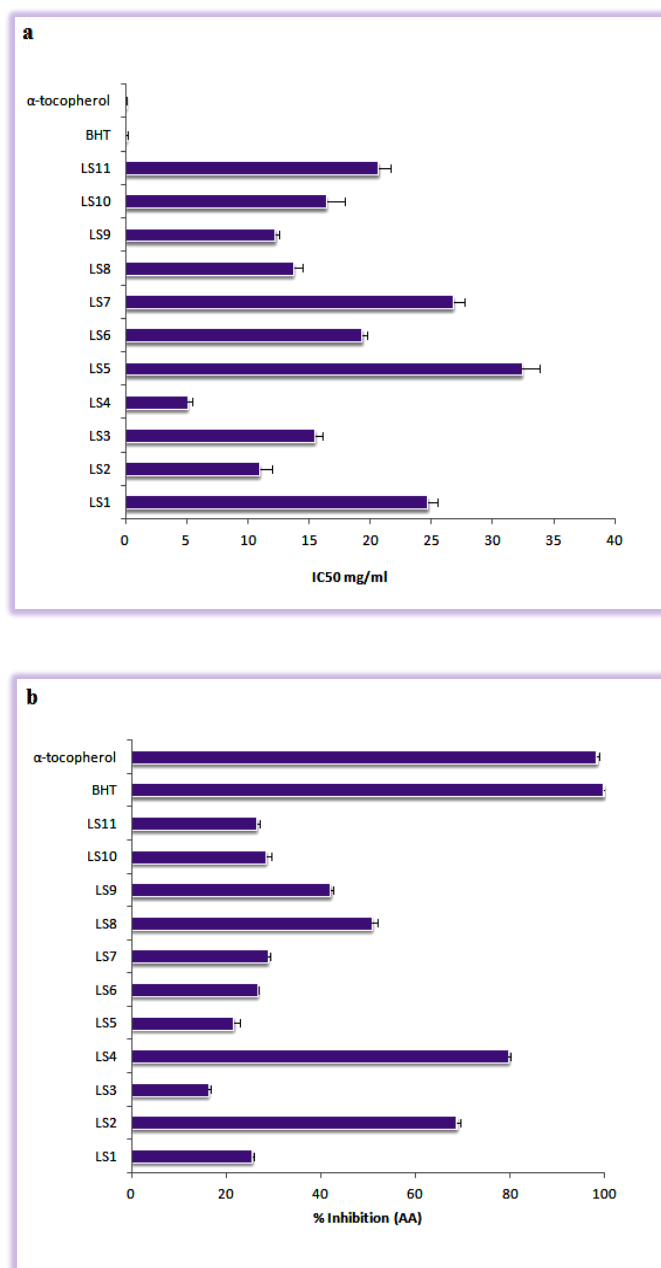
#### **III.2.2.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH**

L'activité antioxydante des HEs de *L. stoechas* évaluée par le test DPPH est exprimée en IC<sub>50</sub>. L'IC<sub>50</sub> est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé ou d'une HE, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante est grande. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> pour les 11 HEs de *L. stoechas*, ainsi que pour les composés de

référence, le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol, sont présentées dans la Figure 36. Sur la base de ce test, nos 11 HEs ont montré des différences significatives dans leur capacité de piégeage du radical libre (Figure 36a). Les HEs des populations LS4 et LS2 étaient les plus actives et pouvaient ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) violet en diphényl-picrylhydrazine jaune avec des  $IC_{50}$  de 5.10 mg/ml  $\pm$  0.32 et de 10.97 mg/ml  $\pm$  0.98, respectivement. Les HEs des populations LS5 et LS7 étaient les moins actives avec des  $IC_{50}$  respectifs de 32.42 mg/ml  $\pm$  1.46 et de 26.80 mg/ml  $\pm$  0.91. Les  $IC_{50}$  extrême diffèrent donc d'un facteur de 8. Lorsque l'activité antioxydante des huiles est comparée à celle des substances de référence (BHT et  $\alpha$ -tocophérol), toutes les HEs de *L. stoechas* étaient trouvées moins efficaces. L' $\alpha$ -tocophérol et le BHT présentent des  $IC_{50}$  très inférieure de 0.02 mg/ml  $\pm$  0.001 et 0.11 mg/ml  $\pm$  0.01, respectivement.

#### III.2.2.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du $\beta$ -carotène/acide linoléique

En tant que test complémentaire, le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène (également lié à l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique) a été utilisé. Ce test démontre des caractéristiques antioxydantes des produits naturels différentes de celles mises en lumière par le test DPPH. Ainsi, il peut révéler des substances antioxydantes différentes dans les extraits végétaux (Kulisic *et al.*, 2004). Selon ce test, l'activité antioxydante la plus élevée a été de nouveau associée à l'HE de la population LS4 (AA = 79.72 %  $\pm$  0.45) suivie par l'HE de la population LS2 (AA = 68.79 %  $\pm$  0.62) comme illustré dans la Figure 36b. Cependant, l'HE de la population LS3 est apparue moins active (AA = 16.32 %  $\pm$  0.46) tout comme l'HE de la population LS5 qui se classe toujours parmi les HEs les moins actives (AA = 21.60 %  $\pm$  1.20). Toutes les HEs ont été, néanmoins, des inhibiteurs moins puissants de l'oxydation du système  $\beta$ -carotène/acide linoléique que les substances de référence, le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol qui présentaient des activités AA = 99.86 %  $\pm$  0.19 et 98.40 %  $\pm$  0.38, respectivement.



**Figure 36 : Activité antioxydante des HEs des populations de *L. stoechas* (LS1 - LS11) et des standards contrôle (BHT et  $\alpha$ -tocophérol)**

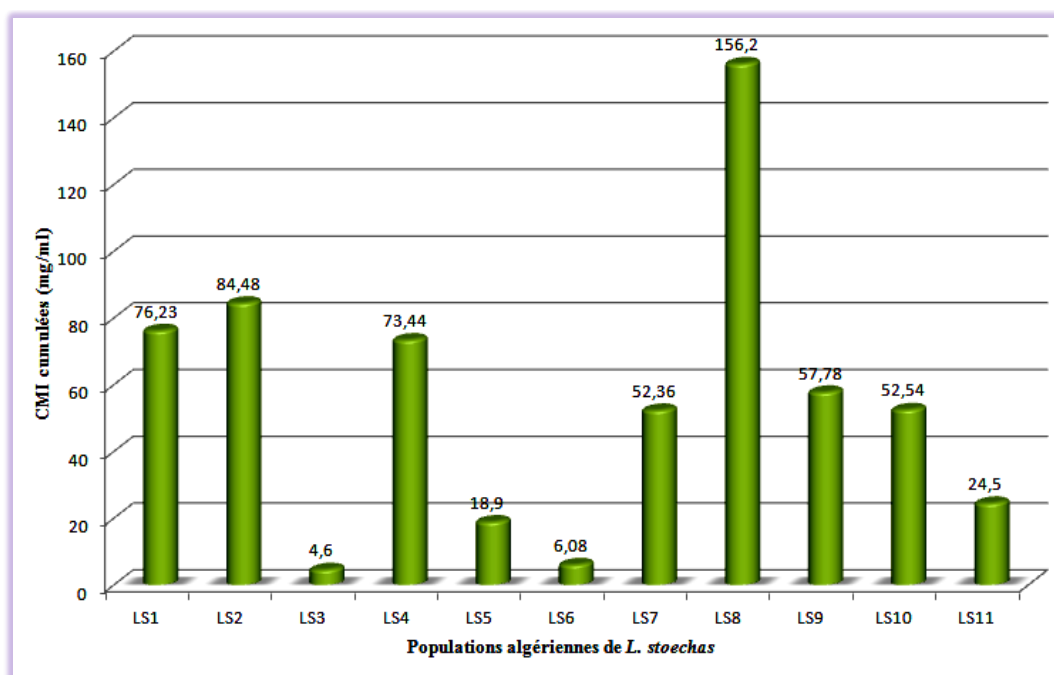
A) méthode du DPPH de piégeage des radicaux libres. B) méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène/acide linoléique. Les données sont fournies en tant que moyenne  $\pm$  S.D. (n = 3).

### III.2.2.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de populations de *L. stoechas*

Nous avons aussi estimé l'activité antimicrobienne *in vitro* des HEs des 11 populations de *L. stoechas* algériennes sur seize microorganismes pathogènes ou phyto-pathogènes. Lors de cette expérience, les tests ont été réalisés par la technique de microdilution en milieu solide car elle fournit des données quantitatives précises sous forme de concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats de ce criblage sont résumés dans le Tableau 15. Le tween-80 est ajouté dans le milieu pour améliorer la solubilité des HEs. Un milieu avec le tween-80 et l'eau distillée à la place des HEs a servi de contrôle négatif. Selon Aligiannis *et al.* (2001), l'activité antimicrobienne est considérée comme forte lorsque les valeurs de CMI sont comprises entre 0.05 mg/ml et 0.50 mg/ml, modérée quand elles sont entre 0.6 mg/ml et 1.50 mg/ml et faibles quand elles sont supérieures à 1.50 mg/ml. En accord avec la grande variabilité de leurs compositions chimiques, les HEs des 11 populations que nous avons testées ont été différenciellement efficaces envers les microorganismes cibles. Généralement, des valeurs de CMI variant entre 0.23 mg/ml et 11.36 mg/ml ont été obtenues sur les bactéries, entre 0.23 mg/ml et 8.52 mg/ml sur les champignons filamenteux et entre 0.16 mg/ml et 11.9 mg/ml sur les levures. Selon ce système d'évaluation, l'HE de la population LS3 présente, *in vitro*, une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des microorganismes testés. L'HE de la population LS6 a présenté la même tendance d'activité inhibitrice, à l'exception des champignons *A. flavus* et *F. oxysporum* et de la levure *C. albicans* (b) envers lesquels elle a été modérément active. L'HE de la population LS5 avait une activité antimicrobienne modérée envers toutes les bactéries et les champignons filamenteux avec une CMI maximale de 1.4 mg/ml. Cependant, cette HE avait une faible activité envers les deux souches de *C. albicans*. La Figure 37 présente les CMI cumulées de chaque HE de *L. stoechas* envers les seize souches testées. Globalement, les HEs des populations LS3, LS6, LS5 et LS11 étaient les plus actives avec des CMI cumulées respectives de 4.6 mg/ml, 6.08 mg/ml, 18.9 mg/ml et 24.5 mg/ml. Tandis que, les HEs des populations LS8, LS2, LS1 et LS4 étaient les moins actives avec des CMI cumulées très élevés (156.2 mg/ml, 84.48 mg/ml, 76.23 mg/ml et 73.44 mg/ml, respectivement).

**Tableau 15 : Activité antimicrobienne (CMI) des huiles essentielles des populations algériennes de *L. stoechas***

Microorganismes	CMI (mg/ml)										
	LS1	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11
Gram-negative											
<i>E. coli</i> E13	4.84	3.84	0.23	2.04	1.4	0.32	4.76	11.36	3.78	3.7	1.96
<i>E. coli</i> E195	6.05	> 7.68	0.23	> 8.16	0.7	0.32	1.19	8.52	3.78	5.18	1.96
<i>E. coli</i> ATCC 25925	1.21	1.28	0.23	0.51	0.7	0.32	1.19	8.52	2.16	1.48	1.96
<i>E. coli</i> K12	4.84	3.84	0.23	2.55	0.7	0.32	1.19	11.36	2.16	2.96	0.49
<i>K. pneumoniae</i> E40	4.84	> 7.68	0.23	> 8.16	0.7	0.32	1.19	8.52	2.7	0.74	0.49
<i>K. pneumoniae</i> Kp19	4.84	> 7.68	0.23	> 8.16	0.7	0.32	1.19	11.36	2.7	3.7	1.96
<i>S. enterica</i>	4.84	> 7.68	0.23	> 8.16	0.7	0.32	1.19	11.36	2.7	3.7	1.96
<i>P. aeruginosa</i>	1.21	> 7.68	0.23	> 8.16	0.7	0.32	1.19	8.52	2.16	4.44	1.96
<i>A. baumannii</i>	4.84	> 7.68	0.23	5.1	0.7	0.32	1.19	8.52	2.16	0.74	0.98
Gram-positive											
<i>B. subtilis</i>	4.84	3.84	0.23	2.55	0.7	0.32	1.19	11.36	2.16	1.48	0.98
Champignons filamenteux											
<i>A. niger</i>	6.05	4.48	0.46	2.55	0.7	0.32	5.95	8.52	2.7	5.18	1.96
<i>A. flavus</i>	6.05	5.12	0.46	2.55	1.4	0.64	5.95	8.52	2.7	5.18	1.96
<i>F. oxysporum</i> f. sp <i>lini</i>	4.84	2.56	0.23	2.04	1.4	0.64	5.95	8.52	2.16	3.7	0.98
<i>M. ramannianus</i>	4.84	2.56	0.23	2.04	1.4	0.32	1.19	11.36	2.16	1.48	0.98
Levures											
<i>C. albicans</i> (a)	6.05	4.48	0.46	2.55	3.5	0.16	5.95	8.52	10.8	3.7	1.96
<i>C. albicans</i> (b)	6.05	> 6.4	0.46	> 8.16	2.8	0.8	11.9	11.36	10.8	5.18	1.96

**Figure 37 : CMI cumulée de chaque HE des 11 populations de *L. stoechas* envers les seize souches cibles**

La Figure 38 présente les CMI cumulées des 11 HEs de *L. stoechas* sur chacune des souches de microorganisme testées. Les microorganismes étudiés n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis des HEs testées. Toutes les souches bactériennes se sont avérées sensibles aux HEs de *L. stoechas* contrairement aux souches fongiques. Avec des CMI cumulées respectives de 19.56 mg/ml, 28.56 mg/ml, et 29.65 mg/ml, *E. coli* (ATCC 25925), *M. ramannianus* et *B. subtilis* étaient les plus sensibles à l'action des HEs. Il est à noter également que les souches *E. coli* testées ont présenté une vulnérabilité variable envers les HEs. La souche *E. coli* (ATCC25925) était la plus sensible (CMI = 19.56 mg/ml) et la souche *E. coli* E195 était la plus résistante (CMI = 43.77 mg/ml). En revanche, Les deux souches de *C. albicans* (b) et (a) étaient les plus tolérantes aux HEs avec des CMI cumulées respectives de 65.87 mg/ml et 48.13 mg/ml en parallèle avec la bactérie *E. coli* E195 (CMI cumulée = 43.77 mg/ml). Il est à noter aussi que la levure *C. albicans* (a), malgré sa forte tolérance, a présenté une forte sensibilité à l'action de l'HE de la population LS6 avec une CMI la plus basse de 0.16 mg/ml (Tableau 15).

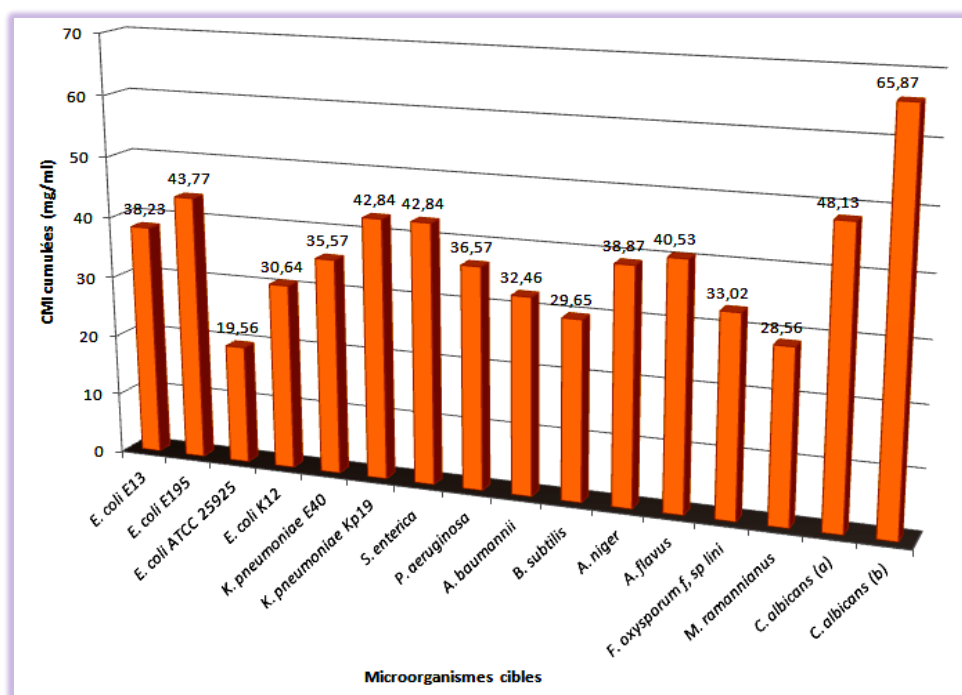


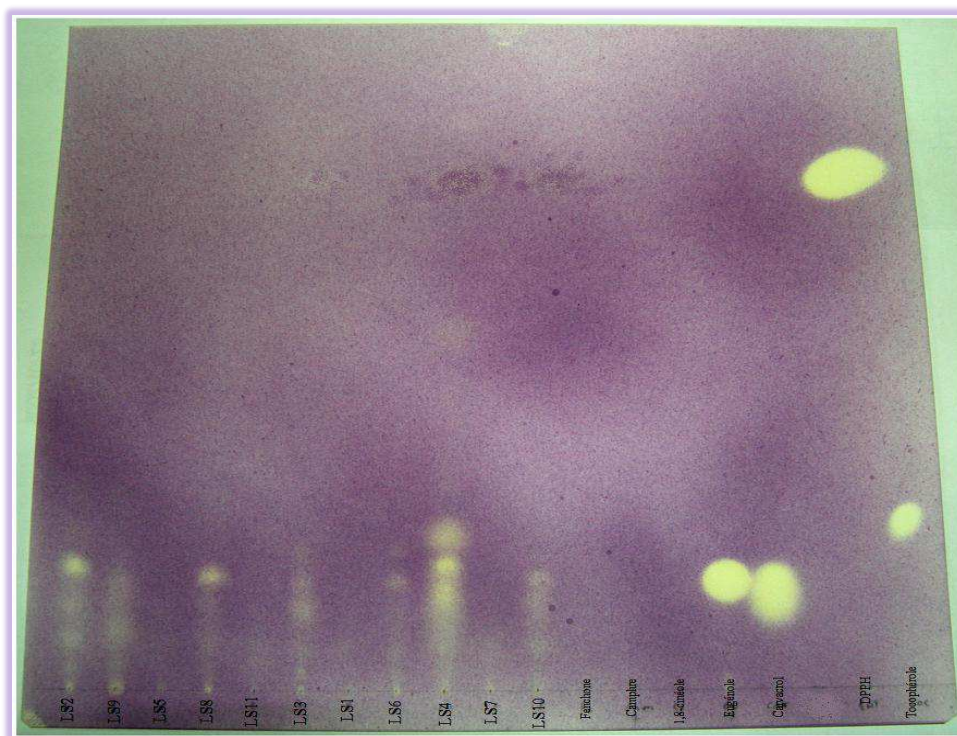
Figure 38 : CMI cumulées des 11 HEs de *L. stoechas* sur chaque souche de microorganisme cible

### III.2.3. Discussion

De nombreuses études ont montré que les activités biologiques des HEs des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique.

Plusieurs composés que nous avons détectés dans les HEs de *L. stoechas* ont déjà été décrits comme antioxydants lors de tests de criblage chimique. Il s'agit notamment de l'eugénol, du carvacrol, du thymol, du terpinolène, de l' $\alpha$ -terpinène, du  $\gamma$ -terpinène (Ruberto & Baratta, 2000) et du terpinène-4-ol (Lertsatitthanakorn *et al.*, 2006). Afin de voir si certains composés de l'huile exercent un rôle important dans l'activité antioxydante des HEs de *L. stoechas*, on a calculé le coefficient de corrélation de Pearson entre les 93 composés les plus abondants de nos HEs et les activités antioxydantes au regard des tests DPPH et  $\beta$ -carotène de nos 11 HEs. Cette analyse a prouvé qu'il n'y avait aucune corrélation significative entre les teneurs des quatre composants principaux (fenchone, camphre, 1,8-cinéol et viridiflorol) et les activités antioxydantes des HEs. Ce résultat est en accord avec les rapports précédents sur l'absence d'activité antioxydante de ces composés (Ruberto & Baratta, 2000). Seulement 4 substances présentes dans au moins 7 HEs ont donné des corrélations positives avec  $R^2 > 0.4$ . Ces substances sont le pinocarvone ( $R^2 = 0.583$  ;  $p = 0.006$ ), le  $\beta$ -phéllandrène-8-ol ( $R^2 = 0.511$  ;  $p = 0.013$ ) et l' $\alpha$ -muurolène ( $R^2 = 0.506$  ;  $p = 0.014$ ) avec le test  $\beta$ -carotène et le ledène ( $R^2 = 0.445$  ;  $p = 0.025$ ) avec le test DPPH. Malheureusement, ces composés ne sont pas disponibles sous forme pure. Nous n'avons donc pas pu confirmer expérimentalement ces corrélations. En plus, aucune étude n'a déjà tenté d'évaluer leur potentiel antioxydant. Néanmoins, des substances supplémentaires, même à l'état de trace, participent à l'activité antioxydante de certaines de nos 11 HEs. L'HE très antioxydante de la population LS4 a été la seule à contenir le thymol et le carvacrol. Ces deux substances sont connues pour leur pouvoir antioxydant remarquable (Ruberto & Baratta, 2000). Ainsi, la présence de carvacrol même à faible concentration dans les HEs peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH (Economou *et al.*, 1991). Il semble d'après ces résultats que l'activité antioxydante des HEs de *L. stoechas* algériennes peut être due à la présence de différentes molécules. En accord, l'HE qui contient le plus grand nombre de molécules antioxydantes s'est avérée être également la plus antioxydante. Cette conclusion est confirmée par une séparation par CCM des composés de nos 11 HEs suivie par une coloration sur plaque de couche mince

des zones antioxydantes avec une solution de DPPH à 2 % (Figure 39). Lors de cette expérience, l'HE la plus active (celle de la population LS4) a affiché le plus grand nombre de spots jaunes révélateurs des composés antioxydants. Ces spots incluent notamment le carvacrol (testé en parallèle comme standard). Les HEs les moins actives ont généré moins de spots jaunes. Ce screening a de plus confirmé les données de la littérature citées ci-dessus selon lesquelles les trois composés majoritaires (fenchone, camphre et 1,8-cinéol) des HEs de *L. stoechas* ont un faible pouvoir antioxydant.



**Figure 39 : Screening semi-quantitatif sur plaque de CCM de l'activité antioxydante au test DPPH des 11 HEs de *L. stoechas* en parallèle avec le fenchone, le camphre, le 1,8-cinéole, l'eugénol, le carvacrol, le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol**

Cette évaluation représente un premier rapport sur l'activité antioxydante des HEs de *L. stoechas*. Cependant, Gülçin *et al.* (2004) ont signalé une activité antioxydante des extraits aqueux et éthanoliques d'une population de *L. stoechas* originaire de Turquie. Différents extraits d'autres espèces du genre *Lavandula* ont également mis en évidence leur pouvoir antioxydant. Il s'agit notamment des extraits méthanoliques et acétate d'éthyle des cultures cellulaires de *L. vera* (Kovatcheva *et al.*, 2001), des extraits aqueux et méthanoliques des parties aériennes de *L. angustifolia* (Hohmann *et al.*, 1999) et de



différentes fractions issues des déchets industriels de *L. x intermedia* (Torras-Claveria *et al.*, 2007).

L'activité antimicrobienne des HEs des plantes a été signalée comme étant liée spécifiquement à la présence de composés antimicrobiens. Récemment, des tentatives ont été faites pour identifier les composés responsables d'une telle bioactivité. Les molécules oxygénées qui entrent dans la composition des HEs sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées qui sont, par contre, connues pour leurs faibles pouvoirs antimicrobiens (Kalemba & Kunicka, 2003). Les effets antimicrobiens sont liés, entre autre, à la présence de groupements hydroxyles libres qui permettent une bonne solubilisation de ces composés dans les milieux physiologiques aqueux (Knobloch *et al.*, 1989 ; Manohar *et al.*, 2001 ; Giordani *et al.*, 2004 ; Ben Arafa *et al.*, 2006). Certains de ces composés sont connus pour leur fort pouvoir antimicrobien du fait de leur grande solubilité dans l'eau et donc de leur forte capacité à accéder aux cellules microbiennes et à pénétrer les parois des cellules bactériennes et fongiques (Knobloch *et al.*, 1989). D'autres composés végétaux sont hydrophobes. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires des cellules microbiennes, assurant ainsi leur solubilisation dans la bicouche lipidique (Carson *et al.*, 2006). De ce fait, l'activité des molécules oxygénées des HEs dépend à la fois du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels (Kalemba & Kunicka, 2003). Parmi ceux-ci on cite à titre d'exemple, le camphre, le linalol, le 1,8-cinéol (Pattnaik *et al.*, 1997), le carvacrol, l'eugénol, le perillaldehyde (Burt, 2004), le terpinène-4-ol (Carson *et al.*, 2002), l'oxyde de caryophyllène, le spathulénol (Ulubelen *et al.*, 1994), le bornéol (Tabanca *et al.*, 2001), le viridiflorol, le *trans*-pinocarvéol, le lédol (Guinoiseau, 2010) et le myrténal (Angioni *et al.*, 2006) qui manifestent une puissante activité antiseptique. Les activités antimicrobiennes de nos 11 HEs de *L. stoechas* sont sans doute liées principalement à leurs profils chimiques et notamment à leurs fortes teneurs en composés oxygénés (Tableau 14).

L'HE de la population LS3 qui présentait le plus fort pouvoir antimicrobien était caractérisée par la présence dominante du fenchone. Le fenchone est, cependant, connu pour être peu, voire pas, actif (Lis-Balchin & Roth, 2000). Il ne peut donc être responsable des effets générés par les HEs sur les microorganismes. Les travaux de Ghalem et Mohamed (2008), ont indiqué que les composés majoritaires peuvent ne pas être

nécessairement responsables de l'activité antibactérienne des HEs. L'HE d'*Eucalyptus deglupta* (30 % de 1,8-cinéol et 5 % d' $\alpha$ -pinène) et l'HE d'*E. alba* (10 % de 1,8-cinéol et 2.5 % d' $\alpha$ -pinène) ont par exemple présenté le même spectre d'activité antibactérienne. Le même résultat a été obtenu pour l'activité antibactérienne de l'HE d'*E. camadulensis* (2 % de cryptone) en comparaison avec celle d'*E. deglupta* (20 % de cryptone). Cependant, plusieurs composés connus pour leurs activités antimicrobiennes sont présents dans nos HEs en tant que constituants majoritaires ou minoritaires. De ce fait, nous pouvons suggérer que la bonne activité antimicrobienne des deux HEs des populations LS3 et LS6 est peut être due à la richesse en 1,8-cinéol et viridiflorol pour la première et en camphre et viridiflorol pour la deuxième. Néanmoins, nos résultats d'analyse statistique (données non-présentées) n'ont pas révélé l'existence d'une corrélation significative entre la teneur d'une substance spécifique de l'HE et l'activité antimicrobienne de cette dernière envers l'une des souches testées. Cela est peut être dû au fait que plusieurs composés partagent une même activité antimicrobienne. Delaquis *et al.* (2002) ont estimé que l'activité antimicrobienne de certaines HEs pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à l'état de trace, tels que le nérol, le néral, le bornéol, le linalol, l'aldéhyde de cinnamyl, le carvacrol, le géraniol, le myrténal et l'eugénol connus pour avoir une activité antibactérienne. Même si leur faible teneur dans nos HEs suggère qu'ils leur confèrent un faible pouvoir antimicrobien, leur présence combinée peut être à l'origine d'un effet de synergie conférant à l'HE un pouvoir antimicrobien étonnamment important. Le *p*-cymène, une molécule hydrocarbonée sans activité antimicrobienne potentialise les effets antimicrobiens du carvacrol en facilitant la pénétration intracellulaire de ce dernier dans *B. cereus* (Ultee *et al.*, 2002). Viljoen *et al.* (2003) ont démontré que l'effet synergique peut être actif dans une association entre le 1,8-cinéol et le camphre. Des synergies du même ordre pourraient être impliquées dans l'action des HEs de *L. stoechas*. L'effet antimicrobien observé serait alors attribuable à une ou plusieurs molécules actives, présentes en forte ou faible proportion dans les HEs. De cette façon, différentes combinaisons de plusieurs composés actifs peuvent générer des activités biologiques équivalentes. Ceci est une suggestion intéressante car elle permettrait à des plantes de varier leur composition de composés organiques volatils pour s'adapter à diverses contraintes écologiques, tout en conservant un niveau inchangé de leur tolérance envers leurs principaux ravageurs.

Les résultats de cette étude sur les activités antimicrobiennes sont en accord avec d'autres rapports indiquant que les HEs de populations non-algériennes de *L. stoechas* possèdent également des activités antimicrobiennes. Il a été rapporté que l'huile volatile de plantes en provenance de Tunisie a une activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* (Bouzouita *et al.*, 2005). De même, des activités antibactériennes ont été signalées pour l'HE de *L. stoechas* sauvage de Turquie (Gören *et al.*, 2002 ; Dadalioğlu & Evrendilek, 2004), Cagliari, Italie (Angioni *et al.*, 2006) ou à partir de plantes cultivées en Australie (Moon *et al.*, 2007). Additionnellement, l'HE de *L. pedunculata*, une autres espèce de lavande de la section *Stoechas*, a démontré une activité antifongique significative contre des souches dermatophytes (Zuzarte *et al.*, 2009). Récemment, divers rapports ont documenté l'activité antimicrobienne de plusieurs espèces du genre *Lavandula*. Les HEs de *L. angustifolia* et *L. x intermedia*, ont des effets antifongiques remarquables contre *Aspergillus nidulans* et *Trichophyton mentagrophytes* (Moon *et al.*, 2007). Cependant, la comparaison de l'efficacité des HEs, ou des constituants individuels, à travers les différentes publications reste difficile à établir. Cette difficulté réside dans le fait que les paramètres expérimentaux (méthodes employées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, choix et conditions physiologiques des microorganismes, période de l'exposition du microorganisme à l'HE, dose de l'HE utilisée, émulsifiant utilisé pour la solubilisation de l'HE) diffèrent entre les études.

Les composés des HEs à activité antimicrobienne agissent selon plusieurs mécanismes. Leur premier site d'action sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique. Les composés phénoliques sont reconnus toxiques et auraient pour cible les enveloppes des microorganismes telles que la membrane plasmique et la paroi (Weber *et al.*, 1996). Certains agents antimicrobiens détruisent la membrane plasmique de manière irréversible conduisant ainsi à la mort cellulaire par un processus lytique (Denyer & Hugo, 1991 ; Hamouda & Baker, 2000 ; Song & Kim, 2003 ; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2006). D'autres agents ne lysent pas les cellules bactériennes mais compromettent l'intégrité structurale de la membrane plasmique en induisant une perte du matériel cytoplasmique (Carson *et al.*, 2002 ; Reichling *et al.*, 2002). Ils agiraient comme des  $\beta$ -lactamines dont le site d'action est la paroi bactérienne. D'autres molécules de l'huile, en se fixant aux sites protéiques de liaison des pénicillines, inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. D'autres accroissent leurs effets antibactériens en inhibant les  $\beta$ -lactamases. A des concentrations relativement faibles, les monoterpénols, grâce à leur

groupement hydroxyle et à leur cycle ouvert pour certains, agissent sur les enzymes impliquées dans la respiration cellulaire et modifient la perméabilité membranaire par action directe sur les porines et les phospholipides membranaires des procaryotes. A de fortes concentrations, ils provoquent une perte totale de l'homéostasie, ce qui entraîne la destruction des membranes cellulaires (Carson *et al.*, 2002). En plus, la cible des molécules antibactériennes des HEs serait probablement l'ADN bactérien. Leur action sur l'ADN serait favorisée par leur bonne diffusion à travers les membranes bactériennes (Guessenn *et al.*, 2008). Compte tenu de la diversité moléculaire des HEs, il semble plus probable que leur activité antimicrobienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes qui s'exercent conjointement sur différentes cibles cellulaires (Burt, 2004). D'après Kalemba et Kunicka (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux HEs dépend des propriétés de l'HE et du microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries Gram (+) sont plus sensibles aux HEs que les bactéries Gram (-). Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HEs confirment ce phénomène (Poole, 2001 ; Cimanga *et al.*, 2002 ; Burt, 2004). Selon ces auteurs la grande résistance des bactéries Gram (-) est liée, en partie, à la complexité de leur enveloppe cellulaire qui contient une double membrane, contrairement à la structure simple de la membrane des bactéries Gram (+).

### **III.3. Biodiversité des COVs et variation chémotypique chez *L. stoechas***

#### **Sensu Lato**

##### **III.3.1. Introduction**

La nature des composés organiques volatils (COVs) est influencée par des facteurs génétiques et écologiques et, de façon significative, par le mode d'extraction. Ainsi, une même plante peut sécréter des COVs biochimiquement différents selon les conditions environnementales et des groupes de plantes génétiquement distants peuvent différer de par leurs COVs. Une variation dans la nature chimique des COVs majoritaires entre deux groupes de végétaux ne différant pas, ou très peu, ou niveau botanique engendre la notion de chémotype (aussi désigné chimiotype). La notion de chémotype désigne donc une entité chimique distincte au sein d'une même espèce ou même au sein d'une section botanique étroite. Elle n'est pas basée sur la seule molécule majoritaire mais peut prendre en compte plusieurs molécules majoritaires. Elle ne concerne pas les très nombreuses molécules minoritaires.

La section *Stoechas* du genre *Lavandula* contient actuellement 3 espèces (*L. stoechas*, *L. pedunculata* et *L. viridis*) et 7 sous-espèces. Elle est clairement séparée du reste du genre de par, notamment, la présence de longues bractées colorées au sommet d'inflorescences cylindriques qui confère à ses membres le nom de lavandes ailées. Cependant, les contours taxonomiques ont été, et sont toujours, le sujet de débats. Le genre *L. stoechas* qui fut pourtant un des premiers genres de lavande à être créé fut découpé en sous-espèces dont certaines sont devenues des espèces autonomes. Les différences anatomiques entre les genres ainsi créés sont en fait minimales et portent souvent sur un seul paramètre comme la longueur de la tige portant l'inflorescence qui est significativement plus longue pour *L. pedunculata* et l'absence de poils et de pigmentation anthocyanée chez *L. viridis*. Les études décrivant la nature des COVs émis par les trois espèces de la section *Stoechas* n'ont pas permis de soutenir les différences taxonomiques au sein de la section. De nombreux chémotypes, souvent sympatriques, ont été décrits pour l'espèce à large distribution géographique *L. stoechas*. Les rares populations analysées des autres espèces présentent également des variations dans leurs COVs mais restent sur des gammes de COVs également décrites chez *L. stoechas*. Si nos études dans les deux sections précédentes ont uniquement porté sur des populations de *L. stoechas Sensu Stricto* car il s'agit du seul taxon présent en Algérie, les études suivantes visant à comprendre les bases moléculaires

de ces différences de chémotypes porteront sur l'ensemble de la section *Stoechas*. Nous avons appelé cet ensemble botanique *L. stoechas Sensu Lato* du fait des ambiguïtés taxonomiques récentes entre les taxons de cette section botanique et du fait de l'absence de délimitations claires entre eux de par leurs COVs.

Des exemples de taxons comme *L. stoechas Sensu Lato* qui présentent un polymorphisme de chémotypes sont courants dans le règne végétal. Les bases moléculaires de ces différences ne sont, cependant, jamais connues. Les connaissances sur les voies de biosynthèse des COVs ont pourtant considérablement augmenté ces dernières années. Mais avant de s'engager plus en avant dans une étude comparative des voies de biosynthèse de plantes aux chémotypes différents, il nous faut d'abord établir les différences précises qui existent entre pieds individuels ayant poussé dans un environnement similaire. En effet, les études publiées sur la composition chimique des HEs de *L. stoechas Sensu Lato* ont toujours été faites sur des HEs obtenues sur des populations sauvages distantes géographiquement et après distillation de lots de centaines d'inflorescences prélevées sur de très nombreux pieds au sein d'une population.

Pour s'assurer d'avoir des chémotypes très différents, nous avons analysé les COVs produits par 3 pieds de 3 espèces de la section *Stoechas* (*L. stoechas*, *L. pedunculata* et *L. viridis*) que nous avons fait pousser, et que nous avons échantillonné, dans des conditions similaires. Du fait du faible nombre d'études publiées sur la composition chimique des COVs de *L. pedunculata* et *L. viridis*, cette étude va considérablement augmenter notre connaissance dans ce domaine. Les résultats de la caractérisation chimique de cette partie de thèse serviront de base pour la dernière partie de cette thèse sur la biosynthèse des terpènes chez ces espèces de lavande.

### III.3.2. Résultats

Le Tableau 16 résume le compte-rendu global de nos résultats quant à la nature chimique des COVs. Les constituants identifiés sont listés suivant leur ordre d'élution sur une colonne HP-5MS. L'identification des COVs est réalisée par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention avec ceux de banques de données électroniques (WILEY et NIST) et ceux de données bibliographique (Adams, 2007) ou obtenus sur des standards disponibles.

**Tableau 16 : Composition chimique des COVs de feuilles des lavandes *Stoechas* (*L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis*)**

N°	Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (µg eq. eugénol/g poids sec) <sup>d</sup>			Identification <sup>e</sup>
				<i>L. pedunculata</i>	<i>L. stoechas</i>	<i>L. viridis</i>	
1	2-Methyl butyric acid <sup>h</sup>	832	832	- <sup>i</sup>	-	0.46±0.01	GC, MS
2	<i>trans</i> -3-Hexenol <sup>f,g,h</sup>	840	844	4.89±0.65	3.90±0.45	1.63±0.34	GC, MS
3	Tricyclene	922	921	-	2.11±0.27	1.28±0.08	GC, MS
4	$\alpha$ -Pinene	932	932	43.80±7.79	16.90±0.59	29.90±4.85	GC, MS, CoGC
5	2(5H)-Furanone, 5,5-dimethyl <sup>h</sup>	944	945	-	-	0.27±0.05	GC, MS
6	Camphene	948	946	6.52±1.76	35.55±1.91	20.02±1.98	GC, MS
7	Verbenene <sup>h</sup>	953	961	-	-	0.31±0.04	GC, MS, CoGC
8	Sabinene	971	969	2.15±0.15	1.65±0.50	4.61±0.79	GC, MS
9	1-Octen-3-one	974	972	-	-	5.89±0.97	GC, MS
10	$\beta$ -Pinene	977	974	5.80±1.36	5.72±0.02	10.99±2.05	GC, MS, CoGC
11	Methyl heptenone <sup>h</sup>	982	981	-	-	0.49±0.01	GC, MS
12	Myrcene	988	988	4.73±1.57	0.56±0.31	1.18±0.45	GC, MS, CoGC
13	Dehydro-1,8-cineole <sup>h</sup>	990	988	-	0.15±0.08	0.42±0.01	GC, MS
14	2-Octanol <sup>h</sup>	996	994	-	-	0.74±0.15	GC, MS
15	<i>trans</i> -3-Hexenyl acetate <sup>g,h</sup>	1003	1001	0.28±0.01	0.23±0.02	0.45±0.04	GC, MS
16	$\alpha$ -Phellandrene	1007	1002	0.82±0.15	0.19±0.03	0.30±0.04	GC, MS, CoGC
17	$\delta$ -3-Carene	1009	1008	-	0.24±0.01	-	GC, MS, CoGC
18	$\alpha$ -Terpinene <sup>f</sup>	1016	1014	1.13±0.56	-	-	GC, MS, CoGC
19	<i>p</i> -Cymene	1023	1020	2.84±0.58	0.52±0.08	1.11±0.12	GC, MS, CoGC
20	Limonene	1028	1024	32.74±0.66	5.97±0.18	3.85±0.63	GC, MS, CoGC
21	<b>1,8-Cineole</b>	1031	1026	<b>200.21±13.08</b>	<b>133.58±15.64</b>	<b>247.89±21.53</b>	GC, MS, CoGC
22	Lavender lactone	1034	1034	-	0.72±0.17	-	GC, MS
23	Phenyl acetaldehyde <sup>g,h</sup>	1041	1036	-	0.36±0.02	0.29±0.06	GC, MS
24	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimene <sup>h</sup>	1044	1044	1.13±0.31	-	0.72±0.21	GC, MS
25	$\delta$ -Terpinene <sup>f</sup>	1056	1054	0.91±0.14	-	0.24±0.01	GC, MS
26	Acetophenone <sup>h</sup>	1064	1059	-	-	0.46±0.03	GC, MS
27	<i>cis</i> -Sabinene hydrate <sup>f,g</sup>	1069	1065	17.10±1.54	9.05±1.43	24.80±2.83	GC, MS
28	Camphenilone	1083	1078	-	1.65±0.03	-	GC, MS
29	<b>Fenchone</b>	1084	1083	<b>624.56±64.50</b>	23.42±0.10	-	GC, MS, CoGC
30	<i>trans</i> -Linalool oxide (furanoid)	1086	1084	-	3.75±0.41	7.43±0.76	GC, MS
31	$\alpha$ -Terpinolene	1090	1086	4.97±0.30	-	-	GC, MS, CoGC
32	<b>Linalool</b>	1100	1095	68.04±5.97	21.63±5.92	<b>43.98±9.69</b>	GC, MS, CoGC
33	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1103	1098	-	-	3.23±0.09	GC, MS
34	Nonanal <sup>g</sup>	1104	1100	-	0.19±0.02	-	GC, MS
35	Phenylethyl alcohol <sup>h</sup>	1113	1106	-	0.15±0.07	5.11±1.46	GC, MS, CoGC
36	$\alpha$ -Fenchol	1118	1114	19.93±1.21	-	-	GC, MS, CoGC
37	Dehydrosabinaketone <sup>g,h</sup>	1119	1117	-	0.20±0.02	1.49±0.01	GC, MS
38	<i>trans</i> - <i>p</i> -2,8-Menthadien-1-ol <sup>h</sup>	1121	1119	-	-	0.80±0.01	GC, MS

Suite du tableau à la page suivante...

Tableau 16 (suite)

N°	Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition ( $\mu\text{g eq. eugéno}l/g \text{ poids sec}$ ) <sup>d</sup>			Identification <sup>e</sup>
				<i>L. pedunculata</i>	<i>L. stoechas</i>	<i>L. viridis</i>	
39	$\alpha$ -Campholenal	1122	1122	-	0.84 $\pm$ 0.32	7.29 $\pm$ 0.78	GC, MS
40	Chrysanthenone	1125	1124	-	0.26 $\pm$ 0.04	-	GC, MS
41	<i>cis</i> -Limonene oxide <sup>f,h</sup>	1132	1132	0.89 $\pm$ 0.19	-	0.40 $\pm$ 0.01	GC, MS
42	<i>cis-p</i> -2,8-Menthadien-1-ol <sup>f</sup>	1136	1133	2.84 $\pm$ 0.36	-	-	GC, MS
43	Nopinone <sup>h</sup>	1139	1135	-	0.77 $\pm$ 0.05	2.35 $\pm$ 0.11	GC, MS
44	<i>trans</i> -Pinocarveol <sup>h</sup>	1140	1135	3.52 $\pm$ 0.28	1.20 $\pm$ 0.33	11.88 $\pm$ 1.33	GC, MS
45	<i>trans</i> -Verbenol	1140	1140	3.19 $\pm$ 0.04	-	-	GC, MS
46	<b>Camphor</b>	1146	1141	<b>64.70<math>\pm</math>1.27</b>	<b>229.04<math>\pm</math>22.35</b>	<b>158.18<math>\pm</math>12.12</b>	GC, MS, CoGC
47	Camphene hydrate <sup>f,h</sup>	1154	1145	1.15 $\pm$ 0.36	-	0.87 $\pm$ 0.27	GC, MS
48	Pinocarvone	1160	1160	-	0.87 $\pm$ 0.37	16.54 $\pm$ 1.31	GC, MS
49	$\delta$ -Terpineol <sup>f,h</sup>	1162	1162	4.16 $\pm$ 0.53	4.10 $\pm$ 1.09	24.06 $\pm$ 4.21	GC, MS, CoGC
50	Lavandulol	1169	1165	32.31 $\pm$ 5.88	-	-	GC, MS, CoGC
51	Borneol	1171	1165	4.28 $\pm$ 0.52	4.14 $\pm$ 0.26	17.26 $\pm$ 1.62	GC, MS, CoGC
52	<i>trans</i> -Linalool oxide (pyranoid)	1173	1173	-	0.94 $\pm$ 0.04	-	GC, MS
53	Terpinene-4-ol	1179	1174	1.51 $\pm$ 0.77	2.16 $\pm$ 0.46	2.61 $\pm$ 0.43	GC, MS, CoGC
54	<i>p</i> -Methylacetophenone <sup>f,h</sup>	1183	1179	0.29 $\pm$ 0.15	1.05 $\pm$ 0.17	3.26 $\pm$ 0.18	GC, MS
55	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1186	1179	6.24 $\pm$ 0.09	1.06 $\pm$ 0.18	3.53 $\pm$ 0.33	GC, MS
56	Verbenone	1205	1204	5.53 $\pm$ 0.99	1.68 $\pm$ 0.32	18.05 $\pm$ 1.34	GC, MS, CoGC
57	2, <i>E</i> -Octenol acetate <sup>h</sup>	1210	1208	-	-	0.43 $\pm$ 0.02	GC, MS
58	<i>trans</i> -Carveol	1216	1215	3.71 $\pm$ 0.33	0.91 $\pm$ 0.26	5.50 $\pm$ 0.46	GC, MS
59	$\alpha$ -Fenchyl acetate	1218	1218	1.31 $\pm$ 0.67	-	-	GC, MS
60	<i>trans</i> -Geraniol <sup>f</sup>	1223	1224 <sup>1</sup>	0.51 $\pm$ 0.05	-	-	GC, MS, CoGC
61	<i>exo</i> -2-Hydroxycineole <sup>f,h</sup>	1226	1228 <sup>2</sup>	1.23 $\pm$ 0.25	0.63 $\pm$ 0.07	3.67 $\pm$ 0.17	GC, MS
62	<i>cis</i> -Carveol <sup>f,h</sup>	1231	1226	2.51 $\pm$ 0.29	-	1.41 $\pm$ 0.08	GC, MS
63	Carvone <sup>h</sup>	1242	1239	4.34 $\pm$ 0.33	0.94 $\pm$ 0.22	5.43 $\pm$ 0.22	GC, MS, CoGC
64	Linalyl acetate <sup>f</sup>	1248	1254	18.12 $\pm$ 2.39	-	7.38 $\pm$ 2.13	GC, MS, CoGC
65	2-Phenethyl acetate	1252	1254	-	0.68 $\pm$ 0.15	-	GC, MS, CoGC
66	Isopiperitenone <sup>f,g,h</sup>	1266	1266 <sup>3</sup>	0.51 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.05	GC, MS
67	Bornyl acetate	1282	1287	-	28.34 $\pm$ 2.63	-	GC, MS, CoGC
68	Lavandulyl acetate	1282	1288	59.85 $\pm$ 2.33	-	27.82 $\pm$ 0.90	GC, MS, CoGC
69	<i>p</i> -Cymen-7-ol <sup>g,h</sup>	1290	1289	-	-	1.59 $\pm$ 0.43	GC, MS
70	<b>Myrtenyl acetate<sup>h</sup></b>	1321	1324	0.62 $\pm$ 0.08	<b>59.51<math>\pm</math>0.62</b>	0.52 $\pm$ 0.10	GC, MS, CoGC
71	Neryl acetate <sup>f,g,h</sup>	1357	1359	1.49 $\pm$ 0.83	1.98 $\pm$ 0.12	0.77 $\pm$ 0.07	GC, MS
72	Cyclosativene	1365	1369	-	2.31 $\pm$ 0.81	-	GC, MS
73	$\alpha$ -Copaene	1373	1374	-	6.82 $\pm$ 2.36	-	GC, MS, CoGC
74	Geranyl acetate	1377	1379	-	1.29 $\pm$ 0.02	18.73 $\pm$ 2.62	GC, MS, CoGC
75	<i>trans</i> -Sobrero <sup>h</sup>	1381	1382 <sup>2</sup>	-	-	1.55 $\pm$ 0.06	GC, MS
76	Benzyl isovalerate <sup>h</sup>	1384	1385 <sup>4</sup>	-	-	0.98 $\pm$ 0.02	GC, MS
77	$\beta$ -Elemene* (Germacrene A) <sup>f,g,h</sup>	1387	1389	0.66 $\pm$ 0.07	2.80 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.21	GC, MS, CoGC

Suite du tableau à la page suivante...



Tableau 16 (suite)

N°	Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (µg eq. eugénol/g poids sec) <sup>d</sup>			Identification <sup>e</sup>
				<i>L. pedunculata</i>	<i>L. stoechas</i>	<i>L. viridis</i>	
78	Sativene <sup>f,h</sup>	1391	1390	1.04±0.13	0.80±0.03	0.40±0.01	GC, MS
79	2-Phenylethyl isobutyrate <sup>h</sup>	1391	1393	-	-	2.53±0.14	GC, MS
80	$\alpha$ -Gurjunene <sup>g</sup>	1403	1409	-	1.49±0.74	-	GC, MS
81	$\beta$ -Caryophyllene <sup>f</sup>	1416	1417	2.57±0.74	7.09±2.18	-	GC, MS, CoGC
82	Carvone hydrate <sup>h</sup>	1426	1422	-	-	2.57±0.57	GC, MS
83	<i>Z</i> - $\beta$ -Farnesene <sup>h</sup>	1431	1440	-	-	0.80±0.08	GC, MS
84	<i>n</i> -Octyl 2-methyl butyrate <sup>h</sup>	1433	1434 <sup>5</sup>	-	-	4.97±0.56	GC, MS
85	$\alpha$ -Humulene	1451	1452	-	0.96±0.50	-	GC, MS
86	<i>trans</i> - $\beta$ -Farnesene <sup>h</sup>	1452	1454	-	-	0.88±0.17	GC, MS
87	<i>Allo</i> -Aromadendrene	1456	1458	-	3.42±1.06	-	GC, MS
88	<i>epi</i> -Bicyclosesquiphellandrene <sup>f</sup>	1458	1452 <sup>6</sup>	1.04±0.38	-	-	GC, MS
89	$\alpha$ -Amorphene <sup>g</sup>	1472	1483	-	0.79±0.04	-	GC, MS
90	Germacrene D	1477	1484	0.91±0.59	5.73±2.18	12.43±0.72	GC, MS, CoGC
91	Eremophilene	1484	1483 <sup>7</sup>	46.14±5.96	-	-	GC, MS
92	Phenethyl 2-methylbutyrate	1484	1484 <sup>8</sup>	-	-	44.29±2.55	GC, MS
93	$\beta$ -Selinene <sup>f,h</sup>	1485	1489	0.91±0.22	1.95±0.83	10.96±0.90	GC, MS
94	Valencene <sup>f,h</sup>	1489	1496	0.33±0.01	8.90±2.95	6.46±0.32	GC, MS
95	$\alpha$ -Selinene	1492	1498	-	37.65±2.90	3.55±0.65	GC, MS
96	$\alpha$ -Muurolene	1495	1500	-	1.20±0.65	-	GC, MS, CoGC
97	$\alpha$ -Bisabolene <sup>h</sup>	1498	1506	-	-	10.28±5.48	GC, MS
98	$\delta$ -Amorphene <sup>f</sup>	1509	1511	0.73±0.42	-	-	GC, MS
99	$\gamma$ -Cadinene	1512	1513	-	12.48±1.75	2.09±0.59	GC, MS
100	$\delta$ -Cadinene <sup>h</sup>	1515	1522	-	14.59±0.87	2.35±0.69	GC, MS
101	<i>trans</i> -Calamenene <sup>f</sup>	1516	1521	0.59±0.31	-	-	GC, MS
102	Ethyl <i>p</i> -ethoxybenzoate <sup>h</sup>	1521	1521 <sup>9</sup>	-	-	1.82±0.35	GC, MS
103	<i>trans</i> -Cadina-1,4- diene <sup>h</sup>	1528	1533	-	2.90±1.27	4.98±2.49	GC, MS
104	$\alpha$ -Cadinene <sup>f,g,h</sup>	1533	1537	0.67±0.08	1.30±0.04	6.75±1.68	GC, MS
105	Selina-3,7(11)-diene <sup>g</sup>	1537	1545	-	7.14±1.81	18.42±4.49	GC, MS
106	Germacrene B <sup>f</sup>	1554	1559	0.26±0.07	-	2.70±0.67	GC, MS
107	<i>cis</i> - $\alpha$ -Copaene-8-ol	1559	-	-	33.65±2.15	-	MS
108	Palustrol	1566	1567	-	0.90±0.30	-	GC, MS
109	Dodecanoic acid <sup>h</sup>	1565	1565	-	-	1.22±0.11	GC, MS
110	<i>cis</i> -3-Hexenyl benzoate <sup>h</sup>	1568	1565	-	-	1.88±0.12	GC, MS
111	Germacrene D-4-ol <sup>g,h</sup>	1573	1574	-	3.74±1.10	1.28±0.10	GC, MS
112	Caryophyllene oxide	1577	1582	2.24±0.86	4.76±0.67	-	GC, MS
113	Globulol	1581	1590	-	0.95±0.21	-	GC, MS
114	Viridiflorol	1589	1592	-	22.01±2.95	-	GC, MS
115	Ledol	1600	1602	-	5.26±0.67	-	GC, MS
116	<i>E</i> -Sesquilandulol <sup>f,g</sup>	1623	1631	4.24±0.70	0.73±0.16	-	GC, MS

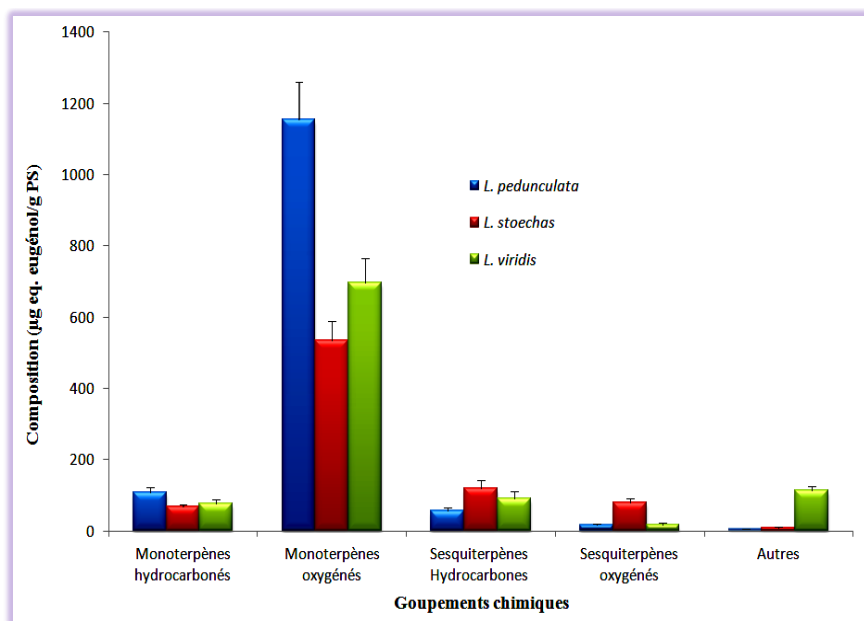
Suite du tableau à la page suivante...

Tableau 16 (suite)

N°	Constituant <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	Composition (µg eq. eugénol/g poids sec) <sup>d</sup>			Identification <sup>e</sup>
				<i>L. pedunculata</i>	<i>L. stoechas</i>	<i>L. viridis</i>	
117	2-Phenethyl hexanoate <sup>h</sup>	1639	1640	-	-	7.36±0.34	GC, MS
118	<i>t</i> -Muurolol	1640	1640	-	6.43±1.87	-	GC, MS
119	$\beta$ -Eudesmol <sup>f,h</sup>	1650	1649	9.92±0.84	1.40±0.02	4.39±0.66	GC, MS
120	Cinnamyl isovalerate <sup>g,h</sup>	1674	1670 <sup>10</sup>	-	0.53±0.03	3.94±0.41	GC, MS
121	$\alpha$ -Bisabolol	1683	1685	-	-	2.91±0.68	GC, MS
122	Juniper camphor	1692	1690 <sup>11</sup>	-	-	6.39±2.24	GC, MS
123	Aristolone <sup>h</sup>	1757	1762	-	-	1.87±0.17	GC, MS
124	Benzyl benzoate <sup>g,h</sup>	1761	1759	-	1.69±0.60	23.46±1.34	GC, MS
Monoterpènes hydrocarbonés				107.54±15.33	69.41±3.9	76.06±11.31	
Monoterpènes oxygénés				1154.36±105.18	535.26±53.6	698.2±66.7	
Sesquiterpènes hydrocarbonés				55.85±8.98	120.32±22.99	90.29±21.39	
Sesquiterpènes oxygénés				16.4±2.4	79.83±10.1	18.39±3.91	
Autres				5.46±0.81	9.55±1.58	115.37±9.42	
<b>Total identifié</b>				<b>1339.61±132.7</b> <b>(74.34 %)</b>	<b>814.37±92.17</b> <b>(89.09 %)</b>	<b>998.31±112.73</b> <b>(72.33 %)</b>	

<sup>a</sup>) Constituants listés par ordre d'élution sur la colonne capillaire HP-5MS. <sup>b</sup>) IR = Indices de rétention expérimentaux déterminés sur la colonne HP-5MS par co-injection d'une série de n-alcanes. <sup>c</sup>) IR = Indices de rétention tirés de la bibliographie : <sup>1</sup> Vujisic *et al.*, 2006 ; <sup>2</sup> Lalel *et al.*, 2003 ; <sup>3</sup> Alma *et al.*, 2004 ; <sup>4</sup> Grujic-Jovanovic *et al.*, 2004 ; <sup>5</sup> Javidnia *et al.*, 2005 ; <sup>6</sup> Zhao *et al.*, 2009 ; <sup>7</sup> Pino *et al.*, 2005 ; <sup>8</sup> Saroglou *et al.*, 2006 ; <sup>9</sup> Nogueira *et al.*, 2001 ; <sup>10</sup> Afsharypour & Jahromy, 2003 ; <sup>11</sup> Karioti *et al.*, 2004. <sup>d</sup>) Composition, en µg eq. eugénol/g poids sec, obtenue par la normalisation de l'air des pics (FID) en utilisant l'eugénol en tant que standard interne ; les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations ± l'erreur standard. <sup>e</sup>) Méthode d'identification : GC, identification basée sur les indices de rétention ; MS, identification basée sur la comparaison des spectres de masse avec les banques électroniques WILEY et NIST et la littérature (Adams, 2007) ; Co-GC, identification basée sur la co-injection des composés authentiques. <sup>f</sup>) Constituants rapportés pour la première fois dans les COVs de *L. pedunculata*. <sup>g</sup>) Constituants rapportés pour la première fois dans les COVs de *L. stoechas*. <sup>h</sup>) Constituants rapportés pour la première fois dans les COVs de *L. viridis*. <sup>i</sup>) - = Non détecté. <sup>\*</sup>) Le  $\beta$ -élémente est détecté ici en tant que produit de réarrangement thermique du germacrène A en injection à 250 °C.

Ces analyses chimiques ont conduit à l'identification de 124 constituants, dont 58 (74.34 %) chez *L. pedunculata*, 76 (81.37 %) chez *L. stoechas* et 87 (72.33 %) chez *L. viridis*. Parmi ces constituants 27, 18 et 52 sont détectés pour la première fois chez *L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis*, respectivement. Parmi les 124 constituants identifiés, 34 sont identifiés dans les COVs des trois lavandes conjointement. Dans les COVs des feuilles des trois lavandes, toutes les classes de composés sont représentées : terpènes, composés aromatiques et dérivés d'acide gras. Néanmoins, les monoterpènes oxygénés sont majoritaires puisqu'ils représentent 1154 µg eq. eugénol/g PS (*L. pedunculata*), 535 µg eq. eugénol/g PS (*L. stoechas*) et 698.2 µg eq. eugénol/g PS (*L. viridis*) des taux globaux des composés identifiés (Tableau 16, Figure 40). A noter aussi que la quantité totale de COVs est très importante dans les feuilles de *L. pedunculata* (1339.61 µg eq. eugénol/g PS ± 132.7) par rapport à celle des feuilles des deux autres lavandes *Stoechas* (814.37 µg eq. eugénol/g PS ± 29.17 pour *L. stoechas* et 998.31 µg eq. eugénol/g PS ± 112.73 pour *L. viridis*).



**Figure 40 : Teneurs et variation des classes chimiques des COVs de feuilles des lavandes *Stoechas***

La Figure 41 présente un histogramme facilitant la comparaison des constituants majoritaires des COVs entre nos trois lavandes et la Figure 42 présente leurs structures développées en parallèles avec d'autres composés identifiés dans les COVs des trois lavandes. Le fenchone ( $624.56 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 64.50$ ) est le constituant majoritaire des COVs de *L. pedunculata*, suivi du 1,8-cinéol ( $200.21 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 13.08$ ), linalol ( $68.04 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 5.97$ ), camphre ( $64.70 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 1.27$ ), acétate de lavandulyl ( $59.85 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 2.33$ ) et lavandulol ( $32.31 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 5.88$ ). Les COVs de *L. stoechas* possèdent une composition riche en camphre ( $229.04 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 22.35$ ) suivie de 1,8-cinéol ( $133.58 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 15.64$ ), acétate de myrtényl ( $59.51 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 0.62$ ), acétate de bornyl ( $28.34 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 2.63$ ), fenchone ( $23.42 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 0.10$ ) et linalol ( $21.63 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 5.92$ ). Par contre les COVs de *L. viridis* sont caractérisés par le 1,8-cinéol ( $247.89 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 21.53$ ) comme composé majeur suivi du camphre ( $158.18 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 12.12$ ), linalol ( $43.98 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 9.69$ ) et acétate de lavandulyl ( $27.82 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 0.90$ ). Mise à part l'absence du fenchone dans les COVs de *L. viridis*, l'absence du lavandulol dans les COVs de *L. stoechas* et *L. viridis*, l'absence de l'acétate de bornyl dans les COVs de *L. pedunculata* et *L. viridis* et l'absence de l'acétate de lavandulyl dans les COVs de *L. viridis*, nous retrouvons les mêmes constituants majoritaires dans les trois espèces mais

avec des teneurs différentes. De ce fait, *L. pedunculata* présente un chémotype fenchone, *L. stoechas* présente un chémotype camphre et *L. viridis* présente un chémotype 1,8-cinéol.

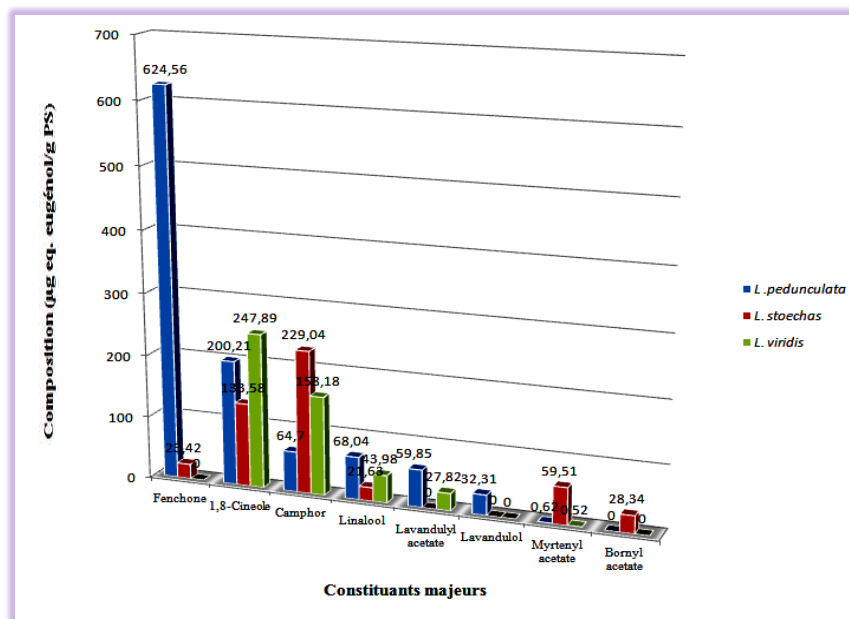
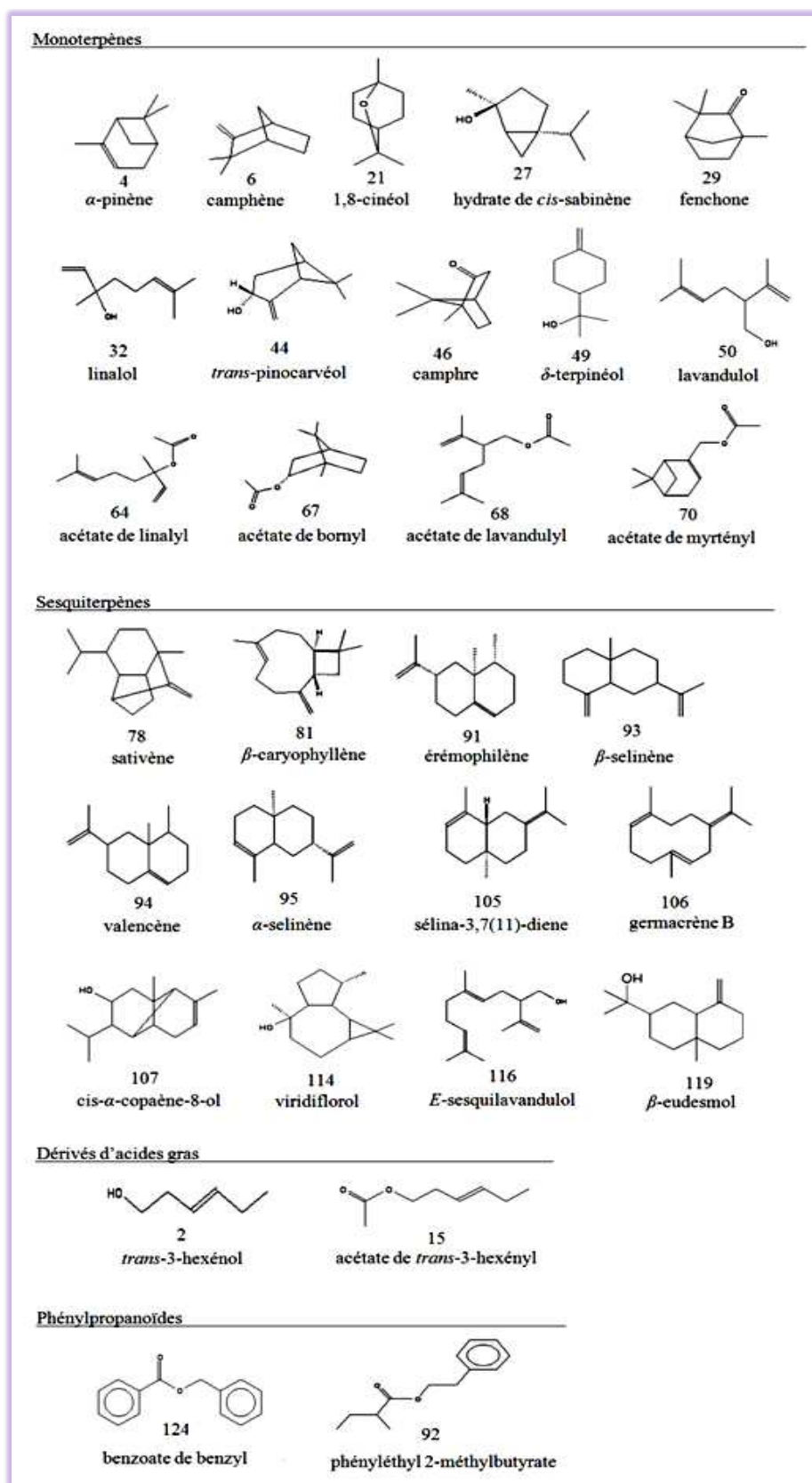


Figure 41 : Teneurs et variation des constituants majoritaires des COVs de feuilles des lavandes *Stoechas*

Les autres COVs sont présents en plus faibles proportions (Figure 40). Il s'agit majoritairement de monoterpènes hydrocarbonés, comme l' $\alpha$ -pinène ( $16.90 \pm 0.59 - 43.80 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 7.79$ ) et le camphène ( $6.52 \pm 1.76 - 35.55 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 1.91$ ) dans les trois lavandes, des sesquiterpènes hydrocarbonés comme l'éremophilène ( $46.14 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 5.96$ ), le sélina-3,7(11)-diène ( $18.42 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 4.49$ ) et l' $\alpha$ -sélinène ( $37.65 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 2.90$ ), respectivement chez *L. pedunculata*, *L. viridis* et *L. stoechas*, et enfin par des sesquiterpénols, comme le *cis*-copaène-8-ol ( $33.65 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 2.15$ ) et le viridiflorol ( $22.01 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 2.95$ ) strictement chez *L. stoechas* (Figure 42). Nous remarquons aussi que la teneur en composés non terpéniques est plus importante dans les COVs de *L. viridis* ( $115.37 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 9.42$ ), avec notamment la présence de phényléthyl 2-méthylbutyrate à  $44.29 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 2.55$  et benzyl benzoate à  $23.46 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 1.34$  (Figure 42). En plus, les COVs des feuilles des trois lavandes contiennent des dérivés d'acide gras comme le *trans*-3-hexénol et l'acétate de *trans*-3-hexényle (Figure 42).



**Figure 42 : Composés en formules développées identifiés dans les COVs de feuilles des lavandes *Stoechas***

Les numéros au-dessus des noms des composés correspondent à leur numérotation dans le Tableau 16

### III.3.3. Discussion

Un des résultats de cette étude est que seulement 34 des 124 composés identifiés l'ont été conjointement dans les trois lavandes *Stoechas*. Cela témoigne de la grande diversité de composition des COVs entre ces lavandes. La majorité d'entre eux étaient hydrocarbonés et oxygénés, avec des squelettes carbonés très variés. Qualitativement, la plupart des 34 constituants communs sont des monoterpènes hydrocarbonés ou oxygénés. Certains font partie des composés majeurs ce qui indique que ces trois espèces sont relativement proches génétiquement. Les teneurs de ces composés étaient cependant variables entre espèces. Les trois constituants majeurs étaient le fenchone, le 1,8-cinéol et le camphre. Il est clair qu'on est devant une variation chémotypique inter-spécifique au sein de la section *Stoechas* : *L. pedunculata* représente le chémotype fenchone, *L. stoechas* représente le chémotype camphre et *L. viridis* représente le chémotype 1,8-cinéol (Tableau 16, Figure 41). Cependant, ces lavandes sont plus diversifiées en leurs fractions sesquiterpéniques. En tout, quinze sesquiterpènes identifiés parmi les COVs de *L. pedunculata* avec la dominance d'érémophilène/ $\beta$ -eudesmol, 29 sesquiterpènes dans les COVs de *L. stoechas* avec la dominance de  $\alpha$ -selinène/*cis*- $\alpha$ -copaène-8-ol/viridiflorol, tandis que, 21 sesquiterpènes des COVs de *L. viridis* sont dominés par le sélina-3,7(11)-diène (Tableau 16, Figure 42). Un dernier résultat notable est que les COVs de *L. viridis* se distinguent de ceux des deux autres lavandes *Stoechas* par la présence exclusive de 14 composés non-terpéniques.

La composition chimique des COVs de *L. pedunculata* en culture au laboratoire est relativement proche de celle récemment décrite par Zuzarte *et al.* (2009) sur des populations sauvages portugaises. Elles présentaient également un chémotype fenchone. En plus, Zuzarte *et al.* (2009) ont mis en évidence un polymorphisme chimique intra-spécifique au sein des *L. pedunculata* portugaise avec la présence de deux autres chémotype, 1,8-cinéol et camphre. En parallèle, une étude ancienne réalisée par Garcia-Vallejo (1992) sur un grand nombre de populations de *L. pedunculata* portugaises et espagnoles a prouvé aussi le polymorphisme chimique des COVs au sein de l'espèce *L. pedunculata* avec la présence de trois chémotype, chémotype fenchone, chémotype camphre et chémotype 1,8-cinéol. Cependant, plusieurs monoterpènes (le lavandulol, l'hydrate de *cis*-sabinène et l'acétate de linalyle) et sesquiterpènes (le  $\beta$ -caryophyllène, le sativène, le germacrène B, le  $\beta$ -eudesmol, le *E*-sesquilandulol), sont présents dans les COVs de notre échantillon, alors qu'ils n'ont pas été observés dans le travail de Zuzarte *et al.* (2009) et de Garcia-Vallejo (1992). Ainsi, le profil des sesquiterpènes de notre

échantillon est dominé par l'érémophilène, tandis que, ceux analysés par Zuzarte *et al.* (2009) et Garcia-Vallejo (1992) sont dominés par l' $\alpha$ -cadinol. Ce composé n'a pas été détecté dans les échantillons des trois lavandes.

Les principaux COVs de nos échantillons de *L. stoechas* étaient le camphre, le 1,8-cinéol et l'acétate de myrtényle. Le fenchone, l' $\alpha$ -selinène, le *cis*- $\alpha$ -copaène-8-ol et le viridiflorol, tous des terpènes habituellement rencontrés chez *L. stoechas*, étaient également présents en quantités importantes. Cette composition chimique des COVs de *L. stoechas* en culture présente des similitudes avec celles rapportées pour des populations sauvages de *L. stoechas* originaires de plusieurs régions méditerranéennes, à savoir l'Espagne (Garcia-Vallejo, 1992), la Chypre (Valentini *et al.*, 1993), la Grèce (Kokkalou, 1988 ; Skoula *et al.*, 1996), la Corse (Ristorcelli *et al.*, 1998), l'Italie (Angioni *et al.*, 2006), la Turquie (Dadalioglu & Evrendilek, 2004), la Tunisie (Bouzouita *et al.*, 2005), l'Algérie (Dob *et al.*, 2006a) et le Maroc (Zrira & Benjilali, 2003). En comparaison avec les 11 populations sauvages algériennes étudiées dans la première section résultats, les plantes cultivées au laboratoire ont un profil de COV qui se rapproche le plus de la population LS6 avec également un chémotype camphre.

La composition chimique de COVs de *L. viridis* est très proche de celles publiées par Garcia-Vallejo, (1992), Nogueira et Romano, (2002), Zuzarte *et al.* (2011). Cependant, quelques différences sont observées lors de l'analyse qualitative et quantitative des constituants minoritaires. A notre connaissance, nous reportons pour la première fois la présence de quelques composés en quantité modérée tels que le  $\delta$ -terpinéol, le *trans*-pinocarvéol, le  $\beta$ -selinène, le valencène et le benzoate de benzyle (Tableau 16, Figure 42). Dans d'autres études précédentes réalisées par Garcia-Vallejo (1992) et Zuzarte *et al.* (2011), certains échantillons individuels ou collectifs de *L. viridis* originaires de différents sites du Portugal et de l'Espagne ont été analysés. La composition chimique de ces échantillons était toujours très semblable à celle de nos échantillons, le 1,8-cinéol et le camphre étant toujours les deux composants principaux. Une autre étude portant sur des plantes cultivées au champ de *L. viridis*, des plantes cultivées *in vitro* depuis des tiges et des plantes en micropropagation d'un même clone, ont révélé la présence de COVs globalement similaires entre ces lots de plantes (Nogueira & Romano, 2002). Le 1,8-cinéol et le camphre étaient toujours les composés les plus abondants.

Plusieurs études ont montré que les COVs de la plupart des espèces du genre *Lavandula* sont constitués principalement de composés monoterpéniques et que les autres

composés (principalement des sesquiterpènes) ne sont présents qu'avec des teneurs faibles. Les COVs de *L. lanata* analysés par GC et GC/MS ont ainsi montré que le camphre (46.6 %) et le lavandulol (29.2 %) étaient les principaux composés (Tomei *et al.*, 1995). Les études de Gamez *et al.* (1990) et Bousmaha *et al.* (2005, 2006) sur la composition des COVs de *L. dentata* ont révélé le 1,8-cinéol comme constituant principal (21% à 75% du total du COVs). La composition des COVs de *L. bipinnata* a montré le *trans*-carvéol (18.93 %), le pulégone (8.45 %) et le camphre (7.09 %) comme constituants principaux (Hanamanthagouda *et al.*, 2010). *L. angustifolia* est une des plantes aromatiques les plus importantes commercialement. L'acétate de linalyle, le linalol et le 1,8-cinéol en sont les COVs principaux, bien que leurs concentrations puissent varier selon le génotype de plante et la zone de culture (Venskutonis *et al.*, 1997 ; Hajhashemi, *et al.*, 2003 ; Cong *et al.*, 2008).

En résumé, cette étude confirme des travaux antérieurs et met en lumière plusieurs points intéressants. Elle confirme la présence de 3 chémotypes au sein de *L. stoechas* *Sensu Lato* qui sont basés sur des proportions différentes de fenchone, 1,8-cinéol et camphre. Elle confirme que les composés les plus abondants sont des monoterpènes oxygénés ou purement hydrocarbonés. En complément des études préalablement publiées sur ce groupe végétal, elle confirme que la plupart de ces composés sont communs aux 3 espèces de la section *Stoechas* mais diffèrent davantage des principaux COVs des autres espèces de lavande bien que ceux-ci soient aussi des monoterpènes. Les mêmes différenciations des chémotypes sont présentes aussi chez les 3 espèces actuellement reconnues dans la section *Stoechas*. Tout ceci conforte la faible différenciation taxonomique entre ces espèces (Upson & Andrews, 2004). Nos plantes étant cultivées de manière artificielle loin de leur aire de distribution, notre étude indique également que les composés monoterpéniques principaux ont une accumulation qui est peu modulée par les conditions environnementales. Les différences de COV des 3 taxons de la section *Stoechas* de cette étude se situent surtout au niveau des COVs minoritaires (sesquiterpènes et composés non-terpéniques). Ce sont aussi ces composés qui diffèrent entre nos analyses et celles des autres études. Même si les différences entre nos résultats et ceux d'autres études peut refléter des différences environnementales (plantes cultivées en dehors de leur aire naturelle et populations sauvages), ceci ne peut être le cas quand on compare les résultats obtenus sur les 3 taxons de cette étude car les plantes analysées étaient cultivées dans des conditions similaires. La plus grande variabilité des composés minoritaires reflète donc soit leur rôle écologique à



une échelle microgéographique, soit une forte sensibilité aux stimuli environnementaux, soit, à l’opposé, une absence de pression de sélection (et une liberté évolutive non-restreinte par sélection). De plus amples études seront nécessaires pour répondre à cette question. Par contre, ce que notre étude indique pour la première fois est que la grande diversité des COVs décrits dans des populations sauvages de *L. stoechas Sensu Lato* n’est pas du à l’analyse de mélanges de plantes présentant individuellement des profils en COV simplifiés et différents. Nous avons observé les mêmes profils de COVs dans des plantes différentes issues d’un même lot de graines d’une même population sauvage. Chaque plante possède, à peu de choses près la grande diversité en COVs de sa population d’origine. Une population à chémotype 1,8-cinéol/camphre, par exemple, n’est pas un mélange d’individus aux phénotypes 1,8-cinéol ou camphre. Une première question intrigante est donc de savoir comment une plante peut, avec son nombre de gènes limité, produire autant de COVs aussi différents dans leurs squelettes carbonés. Une seconde question est de savoir comment des individus d’une même espèce (ou groupe proche d’espèces comme celles de la section *Stoechas*) peuvent différer entre elles de part leur chémotype et par autant de COVs minoritaires alors qu’elles conservent en commun la majorité de leurs COVs majoritaires.

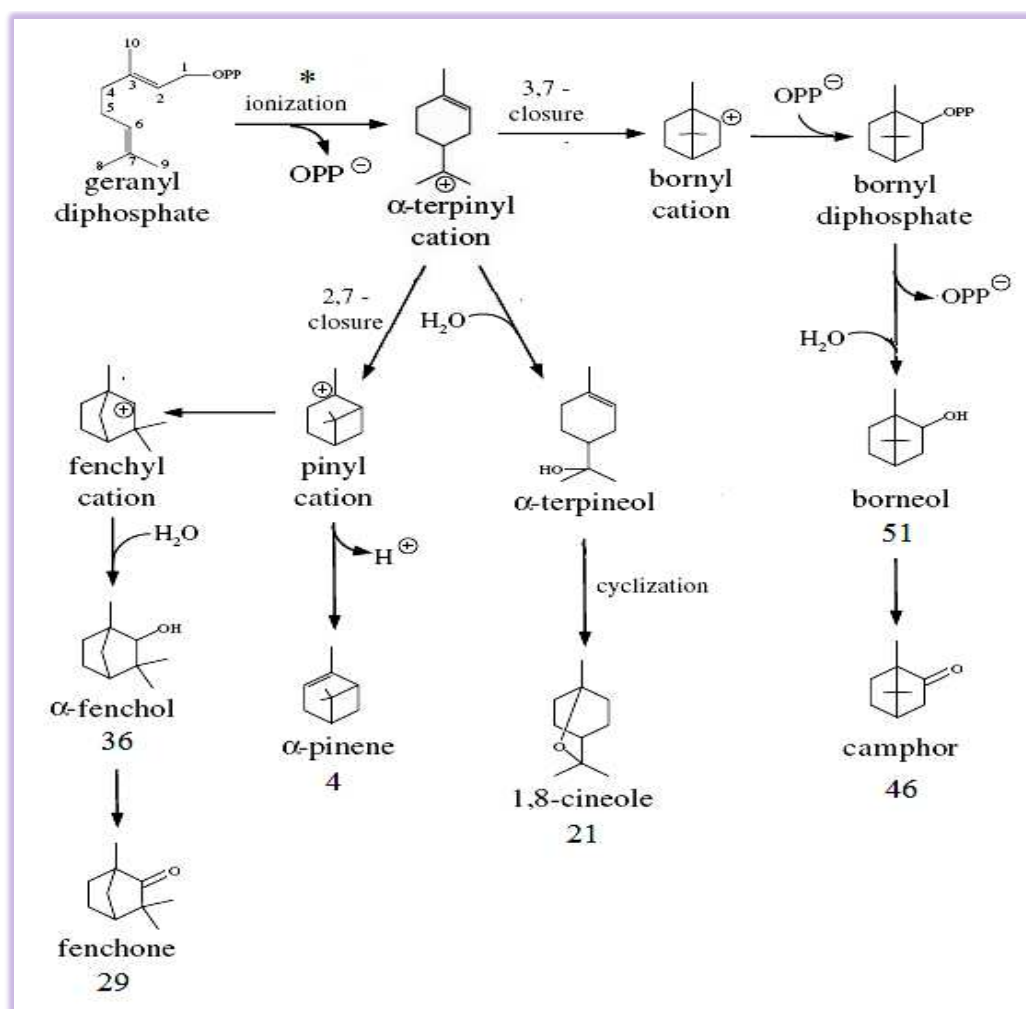
### **III.4. Biosynthèse des terpènes chez *L. stoechas Sensu Lato***

#### **III.4.1. Introduction**

Une des conclusions du chapitre précédent est que les trois plants de *L. stoechas Sensu Lato* en culture au laboratoire ont des profils sesquiterpéniques entièrement différents et diffèrent aussi par leur taux de fenchone. Ce composé représente plus de la moitié des composés organiques volatils (COVs) accumulés par *L. pedunculata* alors qu'il est à un taux très faible chez *L. stoechas* et non-déTECTABLE chez *L. viridis*. Ces trois espèces avaient cependant en commun des taux importants de deux autres formes bicycliques indépendantes de monoterpènes, le 1,8-cinéol et le camphre et des quantités significatives de nombreux monoterpènes dont une troisième forme de monoterpène bicyclique, l' $\alpha$ -pinène. Le but du travail présenté dans ce chapitre est de donner des bases moléculaires aux différences de COVs observées entre ces trois plantes de ces trois espèces pourtant proches taxonomiquement.

Durant ces dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés sur la connaissance des voies de biosynthèse des composés terpéniques. La grande diversité des squelettes carbonés des monoterpènes et sesquiterpènes est établie par l'action d'une seule famille d'enzyme, les terpènes synthases (TPS), à partir de deux substrats respectifs uniques et universels dans le règne végétal, le géranyl diphosphate (GPP) et le farnésyl diphosphate (FPP). Ceux-ci ne sont d'ailleurs que deux oligomères pyrophosphorylés de l'isoprène. Du fait du mode de catalyse de ces enzymes qui nécessite la création d'un intermédiaire carbocationique et qui peut subir de multiples réarrangements, il est fréquent que les membres de cette famille d'enzymes coproduisent plusieurs types de produits. Il est également fréquent que l'accès au site catalytique soit 'poreux' et laisse pénétrer une molécule d'eau durant la catalyse. Le fort pouvoir nucléophile de l'eau, et la capacité du site catalytique de de-protonner et orienter cette molécule d'eau, permettent à l'eau de neutraliser le carbocation intermédiaire et ainsi générer un produit hydroxylé. Les produits des mono- et sesquiTPS peuvent donc être soit hydrocarbonés, soit mono-hydroxylés. Les produits des TPSs peuvent ensuite être modifiés par oxydation ou être hydroxylés par des oxydases ou bien être acétylés par des acétyl transférases. Dans le cas des principaux monoterpènes de *L. stoechas Sensu Lato*, le 1,8-cinéol et l' $\alpha$ -pinène sont connus pour être des produits directs de l'action de TPS (McKay *et al.*, 2003 ; Phillips *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2004 ; Shimada *et al.*, 2005 ; Günnewich *et al.*, 2007 ; Kampranis *et al.*, 2007 ; Roeder

*et al.*, 2007) alors que le fenchone et le camphre sont des produits d'oxydation de deux produits de TPS, le fenchol (Croteau *et al.*, 1978 ; Croteau *et al.*, 1980) et le bornéol (Croteau & Karp, 1977, 1979 ; Croteau *et al.*, 1978 ; Wise *et al.*, 1998), respectivement (Figure 43). Au vue des faibles quantités de bornéol et fenchol détectées dans nos extraits, il est probable que les activités enzymatiques responsables de leur oxydation soient très actives chez *L. stoechas Sensu Lato*. Nous avons donc fait l'hypothèse que les différences de teneur en fenchone et de nature en sesquiterpènes entre nos taxons soient liées à une action différentielle d'une, ou plusieurs, mono- et sesquiTPS.



**Figure 43 : Biosynthèse d'α-fenchol, α-pinène, 1,8-cinéol, bornéol et du camphre à partir du géranyl diphosphate via le α-terpinyl cation**

Toutes les étapes réactionnelles sont catalysées par des TPSs (1,8-cinéol synthases, bornyl diphosphate synthase, bornéol synthase, fenchol synthase, pinène synthase) sauf pour la formation par oxydation du camphre et du fenchone qui sont catalysées, respectivement, par la bornéol déshydrogénase (Croteau *et al.*, 1978) et la fenchol déshydrogénase (Croteau *et al.*, 1980). \* La conversion du géranyl diphosphate en cation α-terpinyle comprend plusieurs étapes ne sont pas présentées. Les numéros au-dessous des noms des composés correspondent à leur numérotation dans le Tableau 16.

De nombreuses études fonctionnelles sur les TPS ont permis d'établir que des modifications artificielles de certains acides aminés indépendants de ceux nécessaires pour l'accomplissement du processus catalytique conduisent à une modification de la nature chimique des produits qu'elles forment (*e.g.* Cane *et al.*, 1996a, b ; Little & Croteau, 2002 ; Seemann *et al.*, 2002 ; Prosser *et al.*, 2004 ; Hyatt & Croteau, 2005). Quelques rares études ont suggéré que de telles mutations ponctuelles ont pu se produire lors des processus évolutifs et conduire à une évolution des profils de COVs. Ainsi, Kampranis *et al.* (2007) ont montré que le résidu Asn338 de la 1,8-cinéol synthase de *Salvia fruticosa* joue un rôle primordial dans la fixation d'une molécule d'eau et que sa mutation N338I comme présent dans les sabinène synthases de *S. officinalis* et *S. pomifera* empêche l'enzyme de *S. fruticosa* de produire des monoterpènes hydroxylés et la transforme en une sabinène synthase. Inversement, la mutation I338N sur la sabinène synthase de *S. pomifera* a permis à cette enzyme de produire des monoterpènes oxygénés dont le 1,8-cinéol. Seuls 48.3 % des produits formés par la 1,8-cinéol synthase de *S. fruticosa* N338I étaient du sabinène. Un double mutant possédant aussi la mutation A339T pour mieux mimer les séquences des sabinène synthases de *S. officinalis* et *S. pomifera* a augmenté le taux de conversion en sabinène à 62.1 %. Finalement, le décalage d'un résidu proline d'une position (I449P suivi de P450T), toujours pour rapprocher la séquence de *S. fruticosa* de celles de deux autres sauges a conduit à un taux de conversion de 86.8 %. Mais des mutations ponctuelles ne sont pas les seuls événements évolutifs pouvant expliquer une modification de chémotype. Lors d'une étude comparative des voies de synthèse des arômes des variétés de fraise cultivées *Fragaria ananassa* et de fraises sauvages *F. vesva*, Aharoni *et al.* (2004) ont observé que ces deux espèces possèdent toutes deux deux gènes de TPSs, nérolidol synthase et  $\alpha$ -pinène synthase, dans leurs génomes respectifs mais que l'expression du gène de nérolidol synthase n'est importante que chez *F. ananassa* et celui de  $\alpha$ -pinène synthase que chez *F. vesca*, justifiant ainsi la production de nérolidol et linalol chez la fraise cultivée et  $\alpha$ -pinène et produits dérivés (myrténol et acétate de myrtényl) chez la fraise sauvage. L'absence d'expression du gène d' $\alpha$ -pinène synthase dans l'espèce de fraise cultivée s'expliquait par la présence dans sa séquence d'une insertion de 2 pb (deux C) qui créent un codon stop juste après. Le faible niveau d'expression du gène de nérolidol synthase dans l'espèce de fraise sauvage était plus difficile à expliquer car les produits recombinants purifiés des deux gènes homologues possédaient la même activité enzymatique. Le gène de la fraise sauvage possédait cependant une différence structurale

majeure qui était un peptide d'adressage N-terminal à la mitochondrie et au plaste qui n'était pas traduit chez la fraise domestique (codons start alternatifs). De telles études sont cependant rares et, pour les deux qui ont été citées, ont concerné des espèces botaniquement distantes ou ayant été séparées par un processus de domestication. Elles ne permettent donc pas de prédire comment des chémotypes ont pu évoluer au sein d'une espèce ou entre espèces botaniquement très proches comme au sein de *L. stoechas* *Sensu Lato*.

Jusqu'en 2008 inclus, date à laquelle cette étude a été entamée, 92 monoTPSs depuis la limonène synthase (*Mentha spicata*, Colby *et al.*, 1993) et 113 sesquiTPSs depuis la 5-*epi*-aristolochène synthase (*Nicotiana tabacum*, Facchini & Chappell, 1992) avaient été isolées et clonées chez des végétaux (Degenhardt *et al.*, 2009). Parmi ces séquences, 62 appartenaient à des TPSs de Lamiacées dont 45 de monoTPSs et 17 de sesquiTPSs (Figure 44). La plupart de ces TPSs avaient été isolées des genres *Perilla* (17), *Mentha* (12), *Ocimum* (9) et *Salvia* (9). Trois gènes codant des monoTPSs et un gène codant une sesquiTPS de *Lavandula* avaient été caractérisés lorsque ce travail a débuté. Un premier chez *L. latifolia* a été déposé directement dans Genbank en 2006 et ensuite trois autres chez *L. angustifolia* (Landmann *et al.*, 2007). Landmann *et al.* (2007) ont isolé et caractérisé une limonène synthase (LaLIMS), une linalool synthase (LaLINS) et une bergamotène synthase (LaBERS) de fleurs de *L. angustifolia*. Ces TPSs expliquent la synthèse de 5 des mono- et sesquiterpènes les plus produits par cette espèce. Vers la fin de notre étude, et toujours à partir des fleurs de *L. angustifolia*, une  $\beta$ -phéllandrène synthase (La $\beta$ PHLS) a été clonée (Demissie *et al.*, 2011) suivi d'une 1,8-cinéol synthase (LiCINS) clonée est caractérisée depuis le lavandin *L. x intermedia* (Demissie *et al.*, 2012). Les deux parents, *L. angustifolia* et *L. latifolia*, possédaient des séquences 100 % similaires.

A l'heure actuelle, seulement 5 TPSs ont été clonées, caractérisées et publiées en détail chez *L. angustifolia* (Tableau 17). Comme aucune des monoTPS et sesquiTPS de lavandes déjà caractérisées ne génère les mono- et sesquiterpènes typiques des lavande *Stoechas*, nous n'avons pas utilisé leurs séquences comme matrice pour découvrir les TPS des lavandes *Stoechas*. Nous avons utilisé une approche basée sur l'usage d'amorces dégénérées et qui nous a permis de découvrir deux monoTPS et une sesquiTPS chez *L. pedunculata* et leurs homologues chez *L. stoechas* et *L. viridis*. L'étude fonctionnelle comparative des enzymes recombinantes pures correspondant à ces 9 gènes et l'évaluation de leurs niveaux d'expression ont ensuite permis d'expliquer l'origine de certaines

différences de COVs produits par ces 3 espèces. Les résultats de ce chapitre de thèse sont en cours de soumission pour publication.

**Tableau 17 : Récapitulatif de terpène synthases de lavandes**

TPS	Abréviation	Type	Produit	Référence
limonène synthase	LaLIMS	Mono	Limonène (39%) Terpinolène (22%) Camphène (16%) $\alpha$ -Pinène (14%) $\beta$ -Myrcène (8%) $\alpha$ -Phéllandrène (1%)	Landmann <i>et al.</i> (2007)
linalo synthase	LaLINS	Mono	Linalol (100%)	
bergamotène synthase*	LaBERS	Sesqui	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotène (74%) ( <i>E</i> )-Nérolidol (10%) ( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Bisabolène (6%) ( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesène (5%) $\beta$ -Sesquiphéllandrène (5%)	
		Mono	$\alpha$ -Pinène (30%) Sabinène (27%) Limonène (17%) $\beta$ -Pinène (11%) Camphène (8%) $\beta$ -Myrcène (7%)	
$\beta$ -phéllandrène synthase	La $\beta$ PHLS	Mono	$\beta$ -Phéllandrène (>86.1%) Limonène (??%)	Demissie <i>et al.</i> (2011)
1,8-cinéol synthase	LaCINS	Mono	1,8-cinéol (80%) Sabinène (7.9%) $\alpha$ -Phéllandrène (6.6%) Limonène (2.3%) $\alpha$ -terpinéol (1.7%)	Demissie <i>et al.</i> (2012)

\* La bergamotène synthase interagit avec le FPP comme une sesquiTPS et avec le GPP comme une monoTPS.

## III.4.2. Résultats

### III.4.2.1. Isolement de gènes de TPSs impliqués dans la biosynthèse des terpènes chez

#### *L. stoechas Sensu Lato*

#### III.4.2.1.1. Amplification de fragments de TPSs avec des amorces dégénérées sur l'ADNg de *L. pedunculata*

Nous avons d'abord développé manuellement des amorces dégénérées à partir de l'alignement des séquences protéiques de TPSs de Lamiacées, afin d'amplifier par PCR des gènes codant des TPSs. Pour cela, un arbre a été construit à partir de 62 séquences protéiques de TPSs de Lamiacées disponibles en février 2008, pour mettre en évidence d'éventuelles sous-classes d'enzymes. A l'aide du logiciel CLC, les séquences ont été alignées selon un algorithme d'alignement propre à ce logiciel, et un arbre (Figure 44) a été généré par l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). L'analyse de "bootstraps" a été calculée à partir de 100 répétitions. L'arbre obtenu

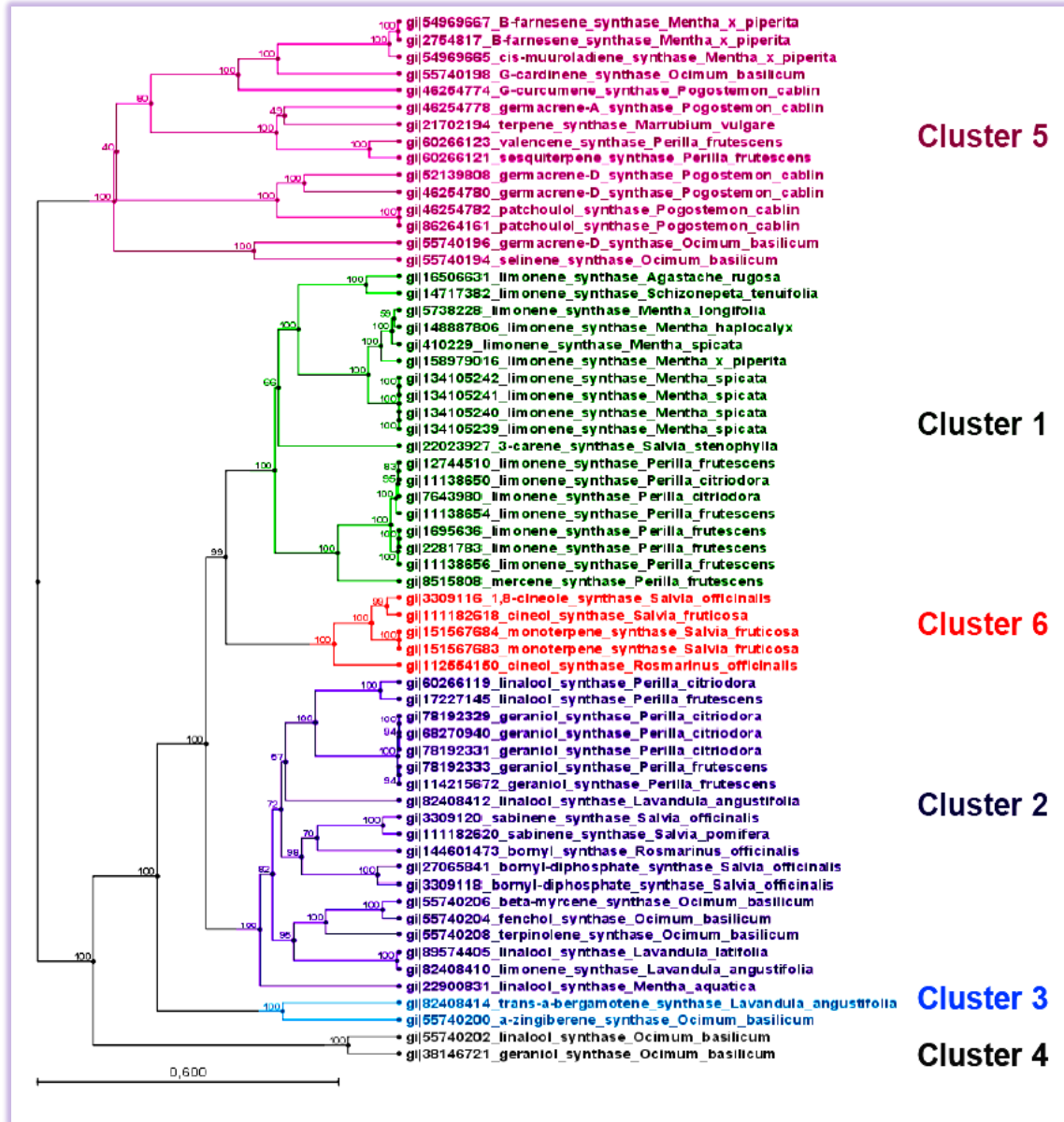
regroupe les TPSs selon les homologies de leurs séquences protéiques. D'autres algorithmes d'alignement de séquences ou d'agglomération ont également été testés (ClustalW, NJ) et ont donné des résultats très proches de ceux obtenus par CLC.

Le profil de cet arbre a permis de définir six clusters de TPSs (Figure 44) : les clusters 1, 2, 4 et 6 regroupent des monoTPSs, tandis que les clusters 3 et 5 regroupent des sesquiTPSs. Pour chaque cluster, les séquences protéiques ont été alignées dans le logiciel Bioedit en utilisant l'algorithme ClustalW. Ces alignements ont permis de dégager des régions conservées à partir desquelles des amorces dégénérées ont été définies pour tenter d'amplifier des fragments de gènes de lavandes. Les couples d'amorces ont été définis dans des zones conservées et pauvres en leucine, arginine et sérine car ces trois acides aminés sont issus d'une forte dégénérescence de codons. Les séquences nucléotidiques des amorces dégénérées ont ensuite été obtenues manuellement par la correspondance du code génétique (un exemple est montré sur la Figure 45). Elles ont été annotées "TPSxd", suivi de "F" (Forward) pour les amorces sens ou "R" (Reverse) pour les amorces antisens. Un total de huit amorces dégénérées (Tableau 9) ont ainsi été désignées et synthétisées, cinq sens (TPS1dF, TPS2dF, TPS3dF, TPS4dF et TPS5dF) et trois antisens (TPS6dR, TPS7dR et TPS8dR). La Figure 46 montre la position et la séquences en acides aminés des 8 amorces dégénérées sur la limonène synthase de *L. angustifolia*.

Nous avons ensuite défini à partir de quel organe il serait le plus judicieux de travailler pour réaliser le clonage des ADNc impliqués dans la synthèse des terpènes. Des analyses par GC/MS sur les extraits hexanes des feuilles et de différents organes floraux de *L. pedunculata* ont été réalisées afin d'établir les profils des COVs (résultats non montrés). Ces analyses nous ont permis de constater que les profils des COVs sont similaires entre ces différents organes. Les feuilles ont été choisies parce qu'elles sont pratiquement disponible tous au long de l'année. Feuilles et inflorescences sont utilisées de manière équivalente lors des usages traditionnels. L'espèce *L. pedunculata* a été sélectionnée pour l'obtention des premières séquences car les résultats du chapitre précédent montrent que c'est l'espèce qui accumule le plus grand nombre, et la plus grande quantité, de COVs. Elle a de plus un chémotype très typé par la présence de fenchone, une substance présente en faible quantité ou absente chez les deux autres espèces.

Il aurait été préférable d'effectuer nos premières PCRs directement à partir d'ADNc de feuilles pour n'obtenir que des séquences de TPSs exprimées dans ce tissu. Cependant, nos premiers résultats de PCR sur ADNc ont été un échec. Nous avons donc commencé à

amplifier des fragments de TPS avec des amorces dégénérées à partir d'ADNg de *L. pedunculata*. Cet ADN peut être obtenu très pur, et en grande quantité, à partir de feuilles de cette espèce cultivée en hydroponie.



**Figure 44 : Arbre de regroupement de 62 TPSs de Lamiacées**

Cet arbre est établi sur l'homologie des séquences en acides aminés disponibles en février 2008, en utilisant le logiciel CLC viewer 4. Sur la figure apparaissent les valeurs de bootstrap ainsi que les clusters de TPSs qui ont été définis. La barre d'échelle indique une divergence de séquence de 60%.



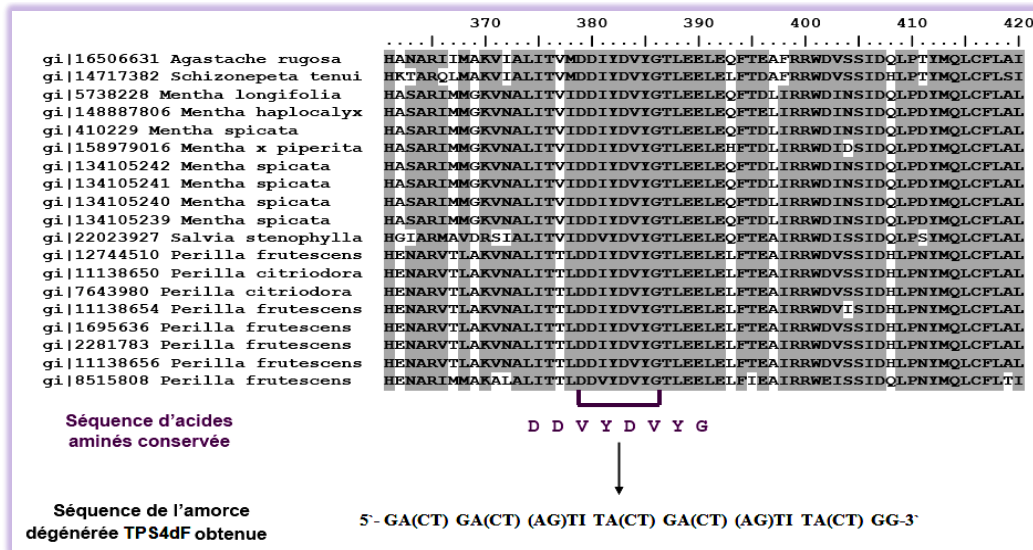


Figure 45 : Définition d'une amorce dégénérée sur une zone conservée

La figure représente l'exemple de définition de l'amorce dégénérée TPS4dF sur une zone conservée de l'alignement des séquences peptidique de TPSs du cluster 2.

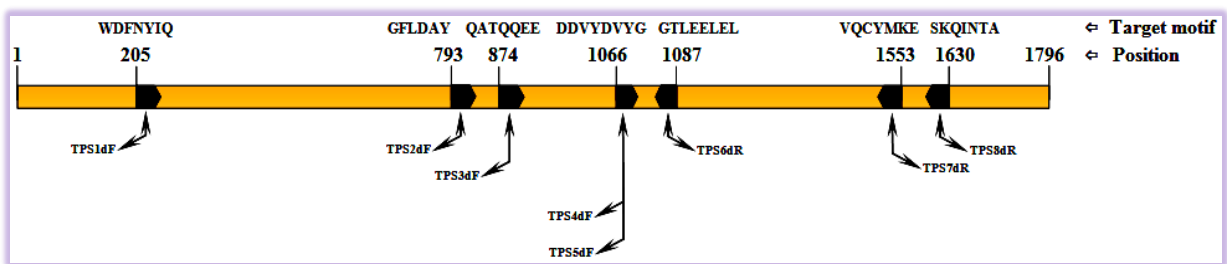


Figure 46 : Représentation schématique de la position et les motifs cibles des amorces dégénérées (TPS1dF, TPS2dF, TPS3dF, TPS4dF, TPS5dF, TPS6dR, TPS7dR et TPS8dR) utilisées pour l'amplification des gènes partiels de TPS de *L. pedunculata*

Les positions relatives des 8 amorces dégénérées sont indiquées sur la séquence nucléotidique de l'ADNc de la limonène synthase (la bar d'or) de *L. angustifolia* (DQ263740, Landmann *et al.*, 2007). L'échelle supérieure et les séquences protéiques montrent respectivement, les emplacements et les motifs cibles où les amorces dégénérées ont été conçues.

Plus d'une centaine d'amplifications ont été réalisées en faisant varier les paramètres du PCR tels que le volume et la température d'hybridation des amorces et le volume de l'ADNg. Toutes les combinaisons possibles de couples d'amorces ont été testées et ont permis d'amplifier un grand nombre de fragments de tailles diverses (200 pb à 950 pb). Ces fragments ont été clonés dans le vecteur pGEM-T easy qui a ensuite été inséré dans des bactéries *E. coli* (DH5 $\alpha$  ou JM109). L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pGEM-T easy va interrompre l'expression du peptide *lacZ*, empêchant les bactéries transformées par ce plasmide de digérer le X-Gal. Quand ce dernier est ajouté dans le milieu en présence d'IPTG (inducteur de *LacZ*), les bactéries possédant le plasmide avec le fragment d'ADN inséré apparaissent en blanc alors que celles qui n'ont pas incorporé de fragment PCR apparaissent en bleu. Ensuite, la présence de l'insert a été vérifiée par PCR sur les plasmides extraits en utilisant les amorces universelles (T7 et SP6) puis a été séquencé.

Après séquençage et pour identifier les clones positifs qui contenaient potentiellement des fragments de TPS, nous avons soumis toutes les séquences obtenues à des analyses par les différents types de BLAST (GenBank-NCBI). Après ces analyses de BLAST, il s'est avéré que les combinaisons d'amorces qui ont donné des produits d'amplification identifiés comme TPSs putatives sont les suivantes : TPS2dF/TPS6dR, TPS3dF/TPS6dR, TPS4dF/TPS7dR et TPS5dF/TPS8dR. Il s'est avéré aussi que seuls huit séquences partielles différentes entre elles présentaient des homologies avec les séquences de TPSs de plantes. Tous les fragments obtenus présentaient d'importantes homologies avec les séquences nucléotidiques de mono- et de sesquiTPSs. Cinq des 8 séquences (*LpMTPS1g-383*, *LpMTPS2g-768*, *LpMTPS3g-768*, *LpMTPS4g-792* et *LpMTPS5g-795*) étaient homologues à des gènes de monoTPSs connues, tandis que 3 des 8 séquences (*LpSTPS1g-894*, *LpSTPS2g-896* et *LpSTPS3g-909*) étaient homologues à des gènes de sesquiTPSs connues. Aucun fragment similaire aux diTPSs n'a été amplifié.

#### III.4.2.1.2. Amplification de fragments de TPSs sur ADNc de *L. pedunculata*

Dans un premier temps, nous avons tenté de confirmer l'expression de ces gènes partiels dans les feuilles de *L. pedunculata*. Sur les ARN extraits des feuilles de cette lavande, nous avons réalisé des RT-PCR à l'aide d'une seconde série d'amorces. Les 8 séquences partielles de gènes de TPSs putatives obtenues dans la section ci-dessus ont été d'abord 'épiciées *in silico* de leurs introns' à l'aide de l'algorithme BLAST et ensuite

utilisées pour la conception d'amorces spécifiques. Ces amorces spécifiques (Tableau 9) ont été utilisées dans des PCR pour amplifier des séquences partielles de TPSs sur ADNc de feuilles de *L. pedunculata*. Cette dernière démarche confirme ou infirme l'expression de nos 8 gènes de TPSs putatives. Toutes les couples ont permis l'amplification de fragment sauf un couple. De cela, le nombre de TPS putatives a été réduit à 7 car le huitième gène de TPS (*LpSTPS3g-909*) est non-exprimé sur des ADNc de feuilles (échec d'amplification sur ADNc). Ces séquences partielles amplifiées ont été séquencées et soumises à l'algorithme BLAST contre toutes les séquences présentes dans GenBank pour confirmer leur nature. En plus, ces séquences ont servi de matrice pour désigner d'autres amorces spécifiques qui seront ensuite utilisées pour l'amplification de leurs parties en amont et en aval par l'approche RACE-PCR.

#### III.4.2.1.3. Obtention de séquences complètes de TPS de *L. pedunculata* par RACE-PCR

Il s'agit ici d'obtenir des séquences complètes d'ADNc par la technique RACE-PCR. Cette technique permet de découvrir les séquences en amont et en aval d'une zone connue. Le kit RACE-PCR (Marathon) contient le bagage enzymatique nécessaire de la synthèse des ADNc doubles brins ainsi que l'enzyme de ligation qui sert à lier des adaptateurs aux extrémités des ADNc pour établir la banque RACE. A l'aide d'une amorce spécifique d'une zone connue d'un gène et d'une amorce complémentaire à l'adaptateur (AP1 et AP2, Tableau 9), il est possible d'amplifier par PCR la séquence inconnue comprise entre les deux. La longueur de cette séquence va dépendre de la position de l'amorce spécifique. C'est pourquoi on utilise en général plusieurs amorces spécifiques afin d'obtenir des produits de PCR de tailles différentes. De ce fait des amorces spécifique (*LpTPS1RP*, *LpTPS2RP* et *LpTPS3RP*, Tableau 9) sont désignées pour la 5'-RACE afin d'amplifier l'extrémité 5' et d'autres amorces spécifiques (*LpTPS1FP*, *LpTPS2FP* et *LpTPS3FP*, Tableau 9) sont désignées pour amplifier l'extrémité 3' (3'-RACE). Après l'application de la technologie RACE-PCR sur les 7 séquences partielles de gènes de TPSs putatives nous avons réussi à isoler trois extrémités 3' complètes (incluent la queue poly-A) et trois extrémités 5' complètes (UTR-5') de trois gènes de TPSs putatives. Enfin, a l'aide de trois couples d'amorce (*LpTPS1fullF/LpTPS1fullR*, *LpTPS2fullF/LpTPS2fullR* et *LpTPS3fullF/LpTPS3fullR*, Tableau 9) désigné sur les régions UTR-5' et UTR-3' découvertes par la RACE-PCR et non-transcrites, nous avons réussi à isoler par PCR trois

séquences entières d'ADNc que nous avons appelées *LpFENS*, *LpPINS* et *LpGEAS* (Figure 47). Elles sont respectivement issues des séquences partielles, *LpMTPS3g-768*, *LpMTPS4g-792* et *LpSTPS2g-896*. Chaque séquence a été insérée dans le plasmide pGEM-T easy, puis clonée et séquencée.

#### III.4.2.1.4. Obtention de gènes homologues de *LpFENS*, *LpPINS* et *LpGEAS* chez *L. stoechas* et *L. viridis*

Nous avons voulu vérifier l'existence de gènes homologues aux gènes de *TPSs* putatifs de *L. pedunculata* découverts dans la section ci-dessus. Au vue du lien botanique fort entre ces trois espèces, trois couples d'amorces distincts, *LpTPS1pseuF/LpTPS1pseuR*, *LpTPS2pseuF/LpTPS2pseuR* et *LpTPS3full2F/LpTPS3full2R* (Tableau 9), ont été désignés manuellement sur les séquences des gènes de *TPSs* putatives en pleine longueur isolés ci-dessus chez *L. pedunculata*. Ils ont ensuite été utilisés pour l'amplification par PCR sur des ADNc de feuilles de *L. stoechas* et de *L. viridis* puis le clonage pour séquençage. Deux couples d'amorces ont été utilisés pour amplifier des séquences tronquées sans peptide plastidial ("séquence pseudomature") de *LpFENS*, *LsFENSpm* et *LvFENSpm* et de *LpPINS*, *LsPINSpm* et *LvPINSpm*. Un seul couple d'amorce a été utilisé pour amplifier des séquences complètes de *LsGEAS* et *LvGEAS* (Figure 47). Par la suite, afin d'avoir les séquences complètes de *LsFENS*, *LvFENS*, *LsPINS* et *LvPINS* (Figure 47), les séquences nucléotidiques des peptides d'adressage plastidiaux adjacentes aux séquences tronquées "pseudomature" ont été amplifiés puis séquencés en utilisant la technique de marche génomique par PCR. Cette technique diffère de la technique RACE par l'usage d'ADNg comme matrice. L'ADNg est traité par différentes enzymes de restriction (généralement quatre) et, après ligation des adaptateurs aux extrémités, quatre banques d'ADNg digéré et ligaturé sont constituées. Après plusieurs séries de PCR sur les quatre banques en couplant l'amorce spécifique des adaptateurs (AP1-GW, Tableau 9) aux amorces spécifiques de nos gènes (*TPS1SPR* et *TPS2SPR*, Tableau 9), il a été possible d'amplifier les séquences génomiques manquantes correspondant aux peptides d'adressage plastidiaux. Après clonage des produits d'amplification PCR de *LsFENS*, *LsPINS*, *LsGEAS*, *LvFENS*, *LvPINS* et *LvGEAS* dans le plasmide pGEM-T easy, 5 clones distincts ont été séquencés. Ceci a mis en évidence des séquences de *TPSs* putatives à haut degré de similarité avec celles de *L. pedunculata*. A chaque gène de *L. pedunculata* correspondait un seul gène homologue chez les deux autres espèces de lavandes.

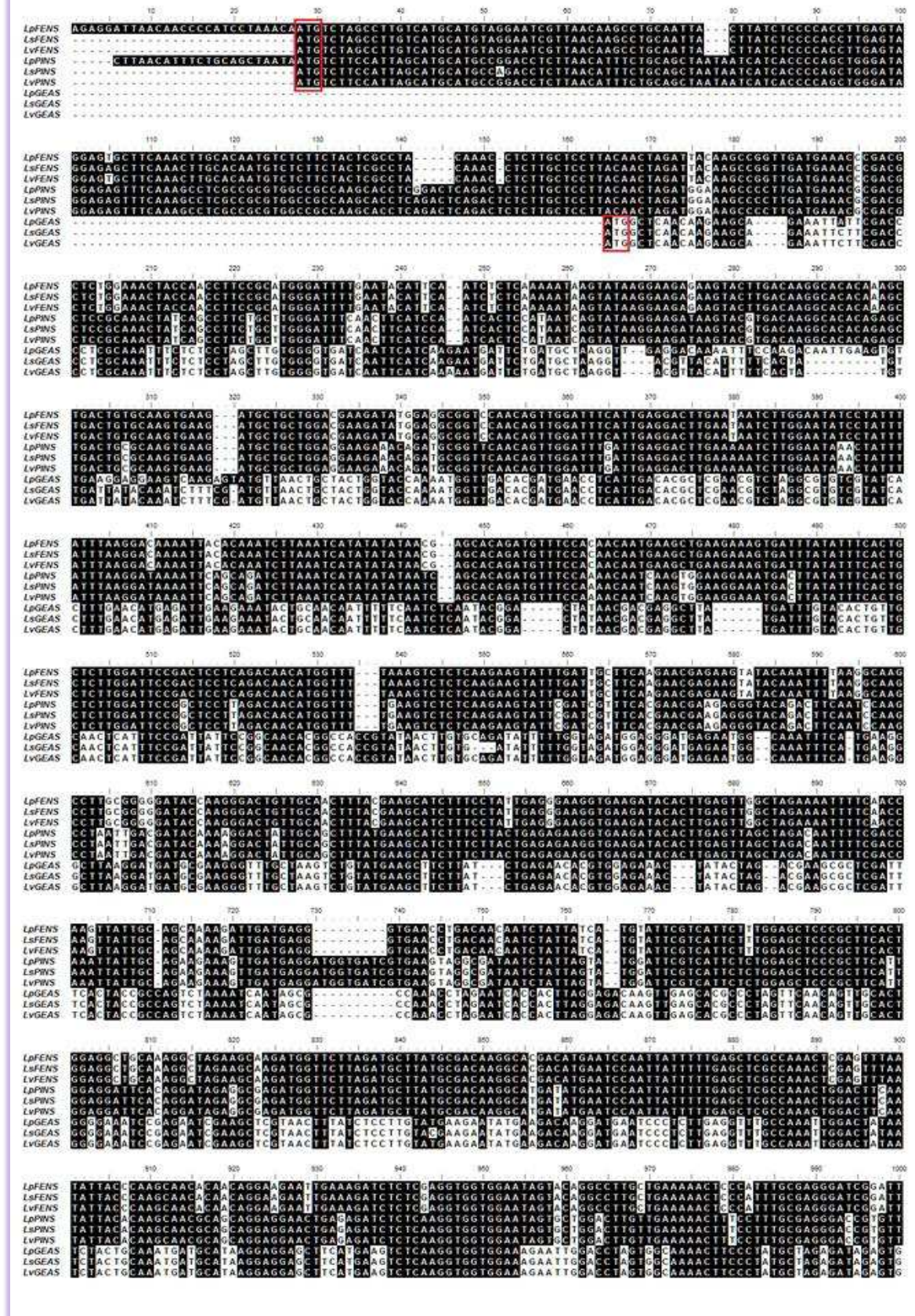


Figure 47 : Alignement des séquences d'ADNc des TPSS putatives de *L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis*

Les séquences nucléotidiques ont été alignées en utilisant le programme ClustalW (Bioedit). Les codons d'initiation et de stop sont indiqués par des boîtes rouges.

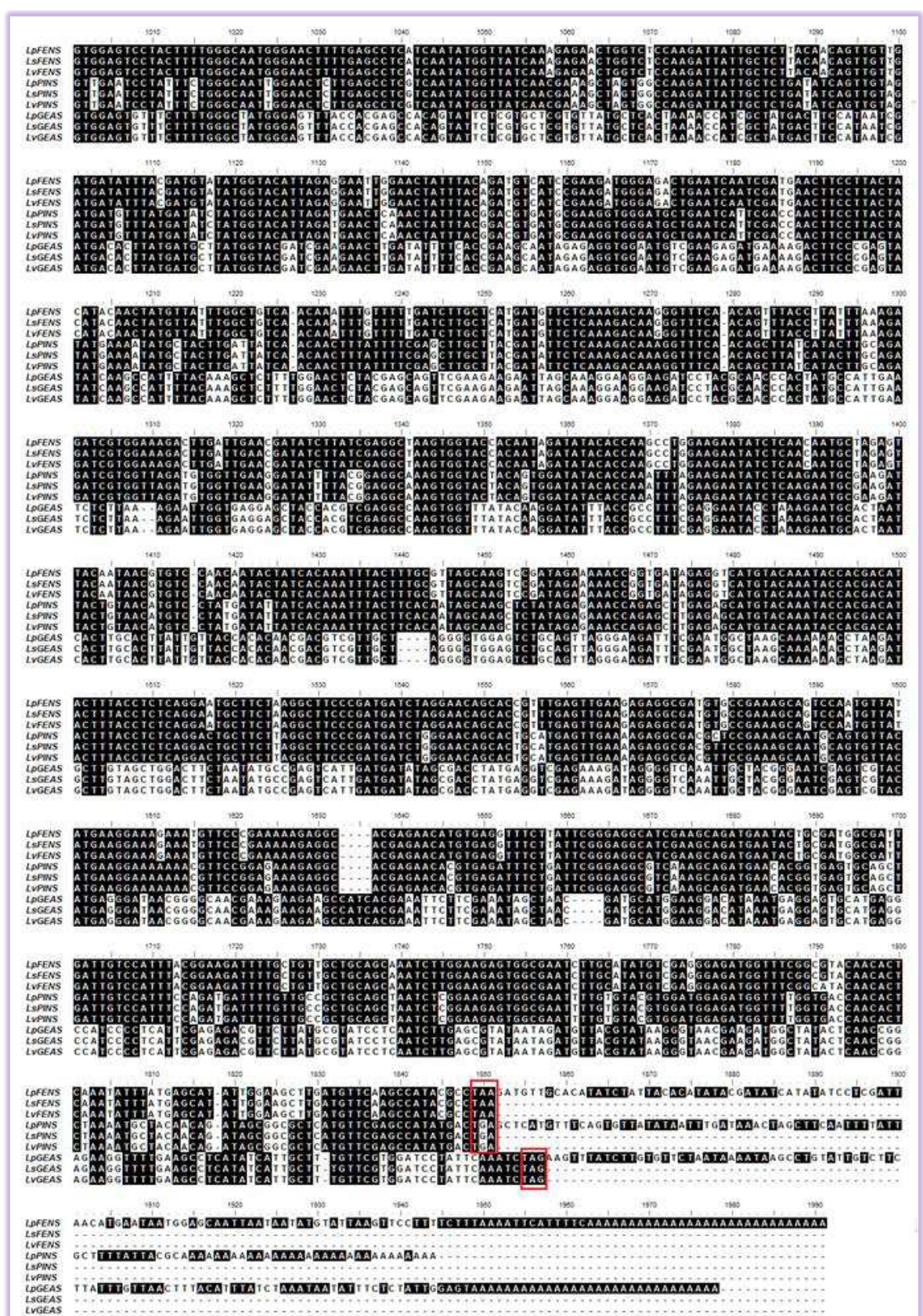


Figure 47 : (suite)

### III.4.2.2. Analyse des séquences de TPS putatives de *L. stoechas* *Sensu Lato*

Tous nos ADNc sont, à priori, complets. Leurs cadres de lecture (ORF) ont été identifiés avec un codon d'initiation ATG et un codon stop TAA ou TGA (Figure 47). Des alignements multiples des polypeptides prédits ont été effectués par BLAST sur des TPS présentes dans GenBank. Ces alignements ont confirmé la nature de nos ORFs. La prédiction d'un peptide signal d'adressage plastidial a été effectuée avec l'algorithme ChloroP. Ils correspondent à des extensions N-terminales sur les polypeptides, extensions qui sont facilement visibles lorsque de nombreuses monoTPS et sesquiTPS sont alignées. Ces signaux d'adressage chloroplastiques sont au N-terminal d'un motif conservé chez les monoTPSs, RRx8W (Bohlmann *et al.*, 1998a).

Les recherches de similarité de séquences ont été réalisées en utilisant plusieurs algorithmes BLAST sur les séquences nucléotidiques ou protéiques disponibles dans GenBank (NCBI). Les séquences nucléotidiques et les séquences prédites d'acides aminés de l'ensemble de nos 9 séquences en pleine longueur ont démontré des homologies à des gènes de TPS connus pour être responsables de la biosynthèse de terpènes chez les plantes et d'autres organismes. Plus précisément, les groupes de séquences correspondant à nos FENS et PINS s'associent préférentiellement à des monoTPSs connues et principalement la limonène synthase de *L. angustifolia*, la linalol synthase de *L. latifolia*, la  $\beta$ -myrcène synthase et la fenchol synthase d'*Ocimum basilicum*. Les séquences correspondant à nos GEAS s'associent quant à elles préférentiellement à des sesquiTPSs connues, la valencène synthase de *Perilla frutescens* et la germacrène A synthase de *Pogostemone cablin*. Donc, nos gènes FENS et PINS sont potentiellement des monoTPSs et nos gènes GEAS sont potentiellement des sesquiTPSs. L'absence de relation obligatoire entre la séquence protéique d'une TPS et les produits qu'elle forme ne nous permet cependant pas de prédire les produits formés par nos TPS sur la seule base de similarités de séquences.

Les caractéristiques de nos 9 TPS de lavande *Stoechas* sont résumées dans le Tableau 18. Un diagramme montrant l'alignement, et les homologies entre les séquences protéiques prédites, est présenté Figure 48. Les données caractéristiques de nos TPSs putatives sont similaires aux monoTPSs et sesquiTPSs végétales déjà caractérisées. Tous nos gènes de monoTPSs putatifs (groupes *FENS* et *PINS*) clonés ont un cadre de lecture ouvert de 1785 à 1803 pb. Les protéines correspondantes sont constituées de 594 à 600 résidus d'acides aminés (aa), soit des masses moléculaires (PM) prédites de 69.38 à 70.22 kDa et des points isoélectriques (pI) entre 5.39 et 5.67. Les gènes de sesquiTPSs putatifs du groupe GEAS

sont plus petits en longueur : de 1629 à 1644 pb et de 542 à 547 résidus aa, soit des PMs prédites de 63.75 à 64.10 kDa et des pIs entre 4.99 et 5.02. Dans les cas des groupes FENS et PINS, leurs polypeptides prédits sont caractérisés par une forte teneur en Leu (12.17 - 12.46 %), tandis que, les TPSs du groupe GEAS se caractérisent par un contenu élevé en Glu (10.68 - 11.33 %). Toutes les TPSs putatives sont dépourvues de résidus Cys et Tyr.

**Tableau 18 : Caractéristiques des séquences des gènes clonés de TPSs putatives de *L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis***

Gène de TPS	ORF (pb)	Taille (aa)	PM (kDa)	pI	Acide amine haut (%)	Peptide d'adressage plastidial (aa)	RRx8W	GVYxEP	Activité putative
<i>LpFENS</i>	1785	594	69.38	5.61	L, 12.46	Oui (50)	Oui	Non	mono
<i>LsFENS</i>	1785	594	69.45	5.67	L, 12.46	Oui (50)	Oui	Non	mono
<i>LvFENS</i>	1785	594	69.39	5.61	L, 12.46	Oui (50)	Oui	Non	mono
<i>LpPINS</i>	1803	600	69.99	5.39	L, 12.17	Oui (31)	Oui	Non	mono
<i>LsPINS</i>	1803	600	70.22	5.49	L, 12.17	Oui (31)	Oui	Non	mono
<i>LvPINS</i>	1803	600	70.21	5.44	L, 12.17	Oui (31)	Oui	Non	mono
<i>LpGEAS</i>	1644	547	64.10	4.99	E, 11.33	Non	Non	Oui	sesqui
<i>LsGEAS</i>	1629	542	63.75	5.02	E, 10.70	Non	Non	Oui	sesqui
<i>LvGEAS</i>	1632	543	63.82	5.02	E, 10.68	Non	Non	Oui	sesqui

\* Les données d'analyse ont été calculées en utilisant ClustalW (Bioedit), sauf pour les pI et les longueurs des peptides signaux qui ont été prédits par les algorithmes des sites Web [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/) et <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, respectivement. Les abréviations utilisées dans ce tableau sont : ORF, cadre ouvert de lecture ; pb, paires de bases ; aa, acide aminé ; PM, poids moléculaire ; pI, point isoélectrique.

Les alignements de séquences protéiques de toutes les TPSs putatives des groupes FENS et PINS avec celles d'autres TPSs végétales, notamment de Lamiacées, mettent en évidence la présence d'un éventuel peptide d'adressage plastidial précédant le motif RRx8W. Un algorithme de prédiction des peptides d'adressage (ChloroP), disponible sur le site internet : <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, a été utilisé pour prédire l'existence d'un tel peptide. Cet algorithme a respectivement mis en évidence dans les protéines des groupes FENS et PINS une séquence de 50 aa et de 31 aa d'adressage aux plastes. Cependant, les protéines du groupe GEAS sont prédites sans peptide d'adressage mais avaient un motif GVYxEP caractéristique des sesquiTPSs des Angiospermes (Cai *et al.*, 2002). Ces données d'analyse de séquences confirment l'affectation initiale des TPSs des groupes FENS et PINS en monoTPSs putatives et les TPSs du groupe GEAS en sesquiTPS putatives.



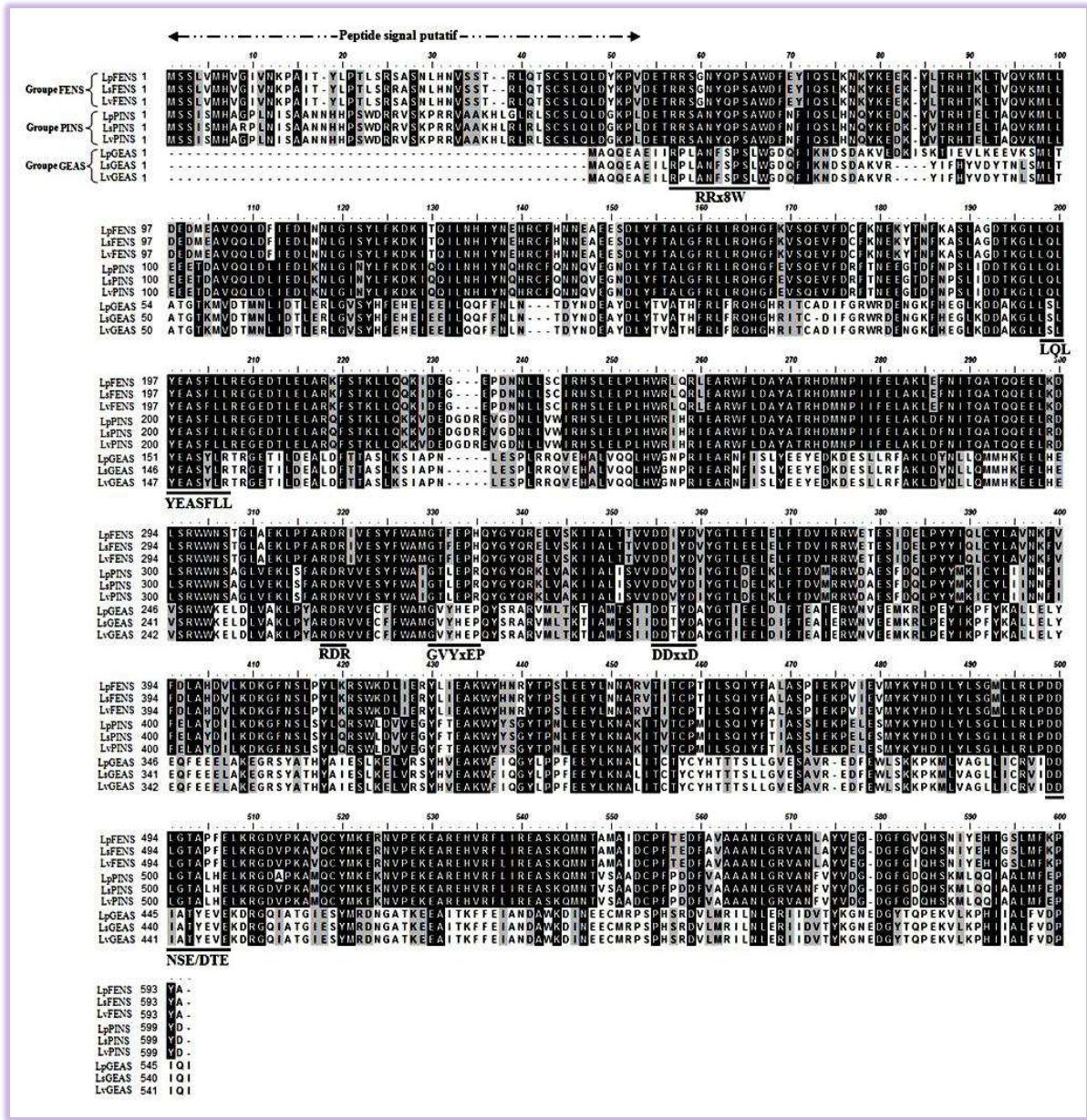


Figure 48 : Alignement des séquences d'acides aminés prédites des clones d'ADNc des TPSs putatives des groupes FENS, PINS et GEAS de *L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis*

Les séquences protéiques ont été alignées en utilisant le programme ClustalW (Bioedit). Les acides aminés identiques et similaires sont indiqués par les boîtes noires et grises, respectivement. Le peptide signal d'adressage plastidial est indiqué par une flèche. Les motifs conservés caractéristiques des TPSs sont soulignés.

Les scores d'identité entre les TPSs putatives de *L. stoechas* *Sensu Lato* sont donnés dans le Tableau 19. Quelles soient nucléotidiques ou protéiques, une très forte homologie a été observée au sein des TPSs de chaque groupe (96.7 - 99.8 %, au niveau aa). Les ORF des ADNc de TPSs de chaque groupe (FENS, PINS et GEAS) des trois lavandes ont présenté exactement les mêmes séquences nucléotidiques, sauf pour un nucléotide polymorphe dans *LsFENS* et *LvFENS* de *L. stoechas* et *L. viridis*, respectivement, à la position 75 et 1726. A cette position, la substitution de la thymine (T) par l'adénine (A) pour *LsFENS* et la guanine (G) par l'adénine (A) pour *LvFENS* a modifié les acides aminés encodés à la position 25 de la Ser à l'Arg et de la Val à l'Ile, respectivement. De même, *LsPINS* et *LpPINS* ont présenté un polymorphisme simple et double aux positions 25 et 118 et 1535, respectivement. A ces positions, la substitution de G par A pour *LsPINS* et A par G et T par C pour *LpPINS* ont modifié les acides aminés encodés à la position 9 de la Gly à l'Arg et à la position 41 de l'Arg à la Gly et à la position 512 de la Val à l'Aln, respectivement. De manière assez différente, les ADNc, *LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS* ont présenté un polymorphisme plus important et plus complexe car il incluait aussi des insertions/délétions. Ceci a engendré un polymorphisme important sur les séquences protéiques correspondantes. Ce polymorphisme est moins accentué entre *LsGEAS* et *LvGEAS*. Par contre, l'homologie baisse quand elle est faite entre les groupes de TPSs (27.6 - 73.8 % au niveau aa), quoi qu'elle reste encore élevée entre les TPSs des groupes FENS et PINS (73.3 - 73.8 % au niveau aa). Cependant, elle est très faible entre les TPSs de ces deux groupes et les TPSs du groupe GEAS (27.6 - 30.1 % au niveau aa, Tableau 19). En règle générale, les identités au niveau nucléotidique (43.4 - 99.9 %) sont plus élevées que celles au niveau acide aminé (27.6 - 99.8%).

**Tableau 19 : Scores d'identité de gènes clonés de TPSs putatives de *L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis***

Gène de TPS	Identité* (%)								
	<i>LpFENS</i>	<i>LsFENS</i>	<i>LvFENS</i>	<i>LpPINS</i>	<i>LsPINS</i>	<i>LvPINS</i>	<i>LpGEAS</i>	<i>LsGEAS</i>	<i>LvGEAS</i>
<i>LpFENS</i>	-	99.9	99.9	80.1	80.1	80.1	44.3	43.9	44.0
<i>LsFENS</i>	<b>99.8</b>	-	99.8	80.1	80.1	80.2	44.3	43.9	44.0
<i>LvFENS</i>	<b>99.8</b>	<b>99.6</b>	-	80.0	80.0	80.1	44.3	43.9	44.1
<i>LpPINS</i>	<b>73.3</b>	<b>73.5</b>	<b>73.3</b>	-	99.8	99.8	43.9	43.4	43.6
<i>LsPINS</i>	<b>73.5</b>	<b>73.6</b>	<b>73.5</b>	<b>99.5</b>	-	99.9	43.9	43.5	43.7
<i>LvPINS</i>	<b>73.6</b>	<b>73.8</b>	<b>73.6</b>	<b>99.6</b>	<b>99.8</b>	-	43.9	43.5	43.7
<i>LpGEAS</i>	<b>29.1</b>	<b>27.6</b>	<b>27.6</b>	<b>30.1</b>	<b>28.6</b>	<b>28.6</b>	-	97.8	97.9
<i>LsGEAS</i>	<b>28.8</b>	<b>28.8</b>	<b>28.0</b>	<b>29.7</b>	<b>29.7</b>	<b>28.7</b>	<b>96.7</b>	-	99.6
<i>LvGEAS</i>	<b>28.8</b>	<b>28.8</b>	<b>28.8</b>	<b>29.6</b>	<b>29.7</b>	<b>29.7</b>	<b>96.8</b>	<b>99.8</b>	-

\* Les valeurs de pourcentages d'identité par paire entre les séquences nucléotidiques (en italique) et les séquences prédites d'acides aminés (en gras) des gènes clonés de TPSs.

Tous les produits des gènes de TPSs putatives que nous avons clonés présentent toutes les caractéristiques structurales des TPSs. Elles possèdent les motifs spécifiques de TPSs tels que les motifs riches en aspartates "DDxxD" et "NSE/DTE" et d'autres comme le motif "RDR" et le motif "LQLYEASFLL" (Figure 48).

### III.4.2.3. Expression hétérologue et purification des TPSs recombinantes

Parmi les objectifs de cette étude figurait l'expression fonctionnelle des gènes de TPSs putatives de *L. stoechas Sensu Lato*. Afin d'atteindre cet objectif, et parce que les fonctions spécifiques d'enzymes de TPSs ne peuvent pas être prédites sur la base de ressemblances de séquence, nous avons décidé d'analyser les activités enzymatiques des polypeptides purs initialement produits de manière recombinante dans *E. coli*. Dans cette phase, la bactérie compétente chimiquement *E. coli*, souche Rosetta (DE3) pLysS a été utilisée. La souche Rosetta est une souche dérivée de la souche BL21 pour en améliorer l'expression des protéines eucaryotes qui contiennent des codons rarement utilisés dans *E. coli*. La souche Rosetta fournit des quantités additionnelles des ARNt des codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC et GGA grâce à un plasmide pRARE. En l'alimentant avec des codons rares, la souche Rosetta assure la traduction universelle, ce qui est surtout utile dans les cas où la traduction, autrement, serait limitée par l'usage des codons ordinaire d'*E. coli*. De plus, le dérivé pLysS de cette souche possède le plasmide pLysS qui code le lysozyme T7 et répresseur *lac* permettant de réguler les niveaux d'expression.

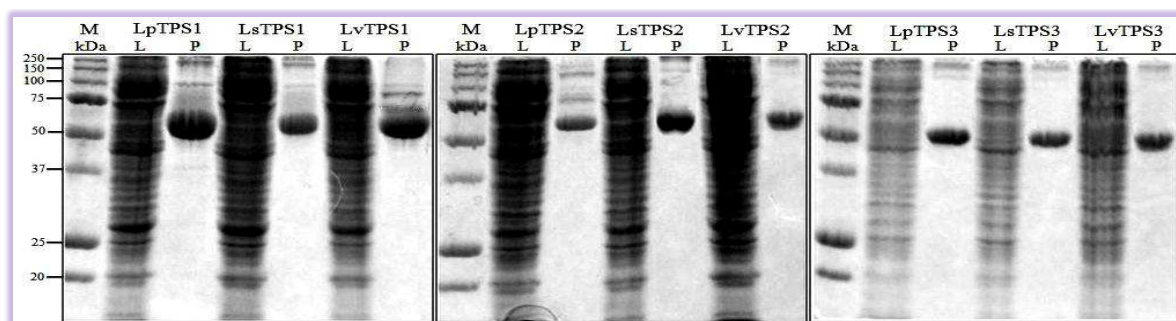
Dans de très nombreux cas, la production d'une protéine de fusion entre la protéine d'intérêt et une protéine 'porteuse' a conduit à une amélioration importante de la proportion de protéine d'intérêt sous forme soluble et ayant le bon repliement. Nous disposions d'une famille de vecteurs (pHxxWA, Gateway-based vectors) permettant de cloner et d'exprimer des gènes en fusion ayant en plus une étiquette poly-histidine (6His) en C-terminal ou en N-terminal. Pour analyser l'effet du type de protéine 'porteuse' sur l'expression et l'activité de nos TPSs putatives, nous avons testé 4 types de vecteurs d'expression, pHGGWA, pHMGWA, pHNGWA et pHXGWA (Figure 31) comportant 4 types de protéines de fusion, GST, MBP, NusA et TRX, respectivement, et un vecteur d'expression pHGWA sans protéine de fusion. Ces essais ont été réalisés exclusivement sur les TPSs putatives de *L. pedunculata*. Des différences significatives ont été observées au niveau de la solubilité des protéines recombinantes (concentration de la protéine purifiée) ou au niveau de l'activité enzymatique de ces protéines. A l'issue de ces tests

préliminaires, le vecteur pHXGWA a été retenu pour les monoTPSs putatives et le vecteur et pHGGWA pour les sesquiTPS putatives.

Dans le but de produire des polypeptides qui imitent au mieux les protéines natives, nous avons exprimé des polypeptides dépourvus de peptide signal quand celui-ci était prédit. Les séquences tronquées ont été obtenues par amplification PCR avec des couples d'amorces spécifique (TPS1exF/TPS1exR, TPS2exF/TPS2exR et TPS3exF/TPS3exR, Tableau 9). Ces peptides signaux sont en effet supprimés du corps de la protéine lors de l'entrée dans le chloroplaste et leur présence inhibe l'activité enzymatique. Si les sites de clivage peuvent varier, ils sont en général reconnaissables par une diminution de la fréquence des résidus sérine et une augmentation correspondante de la fréquence de tyrosine et des résidus acides, l'acide aspartique et l'acide glutamique (Keegstra & Olsen, 1989 ; Gavel & von Heijne, 1990 ; von Heijne & Nishikawa, 1991). Dans la plupart des eucaryotes supérieures, des arginines se trouvent aux positions -2 et -6 à -10 par rapport au site de clivage. Sur la base de toutes ces caractéristiques et aussi en se référant à l'étude de Landmann *et al.* (2007) sur les monoTPSs de *L. angustifolia*, le site potentiel de coupure des clones *LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS* est DYKPV<sup>50</sup>↓D<sup>51</sup>ETRRx8W et pour les clones *LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS* est DGKPL<sup>53</sup>↓D<sup>54</sup>ETRRx8W. Les produits d'amplification, censés être sans la séquence codant le peptide de transit putatif, des groupes FENS et PINS (*LpFENSpm*, *LpPINSpm*, *LsFENSpm*, *LsPINSpm*, *LvFENSpm* et *LvPINSpm*) ont été clonés dans le vecteur d'expression pHXGWA et les ADNc en pleine longueur du groupe GEAS (*LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS*) ont été clonés dans le vecteur d'expression pHGGWA donnant après expression des protéines fusionnées en N-terminus avec les protéines TRX et GST, respectivement. Il est à noter que lors des clonages de ces ADNc dans les vecteurs d'expression, seule l'étiquette poly-His en N-terminale a été maintenue, ainsi qu'un oligopeptide présentant le site de clivage à la thrombine entre les deux protéines à fusionner (permet la libération de la protéine d'intérêt pendant la purification). Pour s'assurer que les constructions soient correctes, tous les clones ont été séquencés. Après clonage, les 9 constructions d'expression ont été nommées : pHXGWA/*LpFENSpm*, pHXGWA/*LpPINSpm*, pHGGWA/*LpGEAS*, pHXGWA/*LsFENSpm*, pHXGWA/*LsPINSpm*, pHGGWA/*LsGEAS*, pHXGWA/*LvFENSpm*, pHXGWA/*LvPINSpm* et pHGGWA/*LvGEAS*. L'expression de tous ces vecteurs d'expression est régulée et dirigée par la polymérase ARN-T7. Ils contiennent un promoteur *lac* inductible par l'IPTG permettant un haut niveau d'expression.

Nous avons ensuite établi des conditions expérimentales permettant de surexprimer les protéines de TPSs putatives à des niveaux élevés. Un protocole très efficace de purification des TPSs a été réalisé en prenant avantage des propriétés de chélation du métal nickel à l'étiquette poly-histidines. En réalisant une culture liquide (TB) de 200 ml à 37 °C, suivie d'une induction par 0.2 mM d'IPTG quand la  $DO_{600nm}$  était comprise entre 0.2 et 0.8, les protéines recombinantes sont obtenues en quantités relativement importante sous forme soluble après une incubation pendant une nuit à 16 °C. Il existe ensuite des systèmes de chromatographie par gel d'affinité au nickel ( $Ni^{2+}$ ) qui permettent de retenir des protéines possédant une extrémité riche en résidus histidines, ce qui était le cas de nos TPSs putatives recombinantes. Les surnageants ont donc été soumis à une chromatographie d'affinité sur gel de nickel. Les protéines ont ensuite été éluées grâce au clivage protéolytique par la thrombine des protéines de fusion immobilisées. La purification des protéines a été possible par cette méthode à partir d'extraits bruts de bactéries. Il y avait vraisemblablement une quantité suffisante de protéines solubles natives dans les extraits pour permettre une purification efficace et les quantités des TPSs purifiées étaient de 2 à 18 µg de protéine par opération de purification (200 ml culture liquide initiale).

La solubilité et la pureté des protéines recombinantes de TPSs putatives ont été jugées, par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 49). Ces critères ont été jugés suffisants pour effectuer les tests d'activité enzymatique. L'analyse par SDS-PAGE des fractions purifiées a indiqué la présence des protéines comme fortement exprimées et solubles mais pas exactement avec les tailles attendues. On trouve une taille de 65 kDa au lieu de 69 kDa pour les FINS, 66 kDa au lieu de 70 kDa pour les PINS et 59 kDa au lieu de 64 kDa pour les GEAS. On observe toutefois sur gel d'électrophorèse la présence de contaminants résiduels de hauts poids moléculaires (Figure 49).



**Figure 49 : Analyse par SDS-PAGE des TPSs recombinantes putatives de lavandes exprimées dans *E. coli*, souche Rosetta et purifiées par chromatographie d'affinité au  $Ni^{2+}$**

Piste M, marqueurs de poids moléculaires de 20 à 250 kDa. Piste L, lysat brut de cellules recombinantes induites de Rosetta pour chaque TPS putative. Piste P, protéines recombinantes purifiées par chromatographie d'affinité au  $Ni^{2+}$  à partir des cellules de Rosetta recombinantes induites. Les bandes de protéines ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

#### III.4.2.4. Caractérisation fonctionnelle de nouvelles TPSs de lavandes

Toutes les enzymes recombinantes de TPSs (2 -18 µg) ont été testées immédiatement après purification avec les trois substrats habituels des TPSs séparément, le GPP, le FPP ou le GGPP dans un tampon normalisé pour l'activité des TPSs (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 % glycérol, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA, 50 µM GPP, FPP ou GGPP, Landmann *et al.*, 2007). En l'absence d'évaluation cinétique pour nos TPSs putatives, la concentration en substrats GPP, FPP ou GGPP utilisée pour ces analyses a été fixée à 50 µM, une concentration proche des constantes de Michaelis (K<sub>m</sub>) mesurées expérimentalement sur des TPSs connues (Cane, 1990 ; Landmann *et al.*, 2007). *LsPINS* et *LvPINS* ayant les mêmes séquences nucléotidiques en dehors de la zone codant pour le peptide signal, seuls les résultats obtenus avec l'ADNc de la forme pseudomature de *LvPINS* sont présentés. L'activité enzymatique des TPSs putatives a été mesurée par GC/MS. L'identification des produits volatils des réactions enzymatique a été réalisée sur la base de leurs indices de rétention et spectres de masse en comparaison avec des standards et/ou de l'HE de patchouli comme illustré dans le Tableau 20. Les aires des pics ont été estimées à partir des chromatogrammes GC/MS (courant total en ions vs. temps de rétention). Ainsi la Figure 50 présente les chromatogrammes types obtenus à l'issue des réactions enzymatiques (courants d'ions totaux des produits terpéniques synthétisés *in vitro* par toutes les enzymes recombinantes). Les spectres de masse des terpènes principaux sont également indiqués.

Les enzymes recombinantes purifiées des monoTPSs putatives pseudomatures et des sesquiTPSs putatives en pleine longueur de *L. stoechas Sensu Lato* se sont toutes avérées catalytiquement actives. Les enzymes du groupe FENS et PINS ne l'étaient que quand le GPP était le substrat et celles du groupe GEAS ne l'étaient que quand le FPP était utilisé comme substrat. Toutes nos enzymes de TPSs putatives étaient incapables d'utiliser le GGPP comme substrat.

Afin de valider nos résultats, des contrôles négatifs ont été réalisés. Ils incluaient des tests réalisés sur protéines purifiées à partir de bactéries sans vecteur d'expression et/ou sur des enzymes recombinantes bouillies dans les mêmes conditions de culture, de purification et de dosage d'activité enzymatique. Il est à noter qu'il est impossible de transformer des bactéries avec des vecteurs d'expression vides car cette condition est létale (critère de sélection).

**Tableau 20 : Identification et caractéristiques des produits volatils synthésés *in vitro* par les TPSs putatives recombinantes de *L. stoechas sensu lato***

Pic <sup>a</sup>	Composé	TR <sub>HP-5MS</sub>	IR <sub>HP-5MS</sub>	IR <sub>DB5</sub> <sup>b</sup>	Validation <sup>c</sup>
1	$\alpha$ -Pinène	5.84	932	932	Std
2	$\beta$ -Myrcène	7.37	987	988	Std
3	$\alpha$ -Phéllandrène	7.97	1007	1002	Std
4	Limonène	8.73	1027	1024	Std
5	$\alpha$ -Terpinolène	10.79	1084	1086	Std
6	$\alpha$ -Fenchol	12.15	1118	1114	Std
7	$\beta$ -Elemène	23.48	1387	1389	HEPt
8	Germacrène A	28.24	1503	1508	HEPt

<sup>a</sup> Les numéros de pic ont été attribués selon leur ordre d'éluion en GC/MS (HP-5MS). <sup>b</sup> IR pris de la librairie d'Adams (Adams, 2007). <sup>c</sup> Des standards authentiques ont été utilisés pour la validation de l'identification en GC/MS (indiqués par Std), tandis que, la validation sur la base de l'HE de patchouli en tant que standard est indiquée par HEPt. TR, temps de rétention ; IR, indice de rétention.

#### III.4.2.4.1. Identification des clones d'ADNc *LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS* en tant que $\alpha$ -fenchol synthases

Les produits des réactions réalisées avec les enzymes *LpFENSpm*, *LsFENSpm* et *LvFENSpm* étaient qualitativement et quantitativement semblables. Les faibles différences de séquences entre ces enzymes n'ont donc pas eu d'influence sur leur activité. Le Tableau 21 liste les terpènes produits *in vitro* avec leurs pourcentages respectifs d'abondance. Il s'agit du :  $\alpha$ -fenchol **6** (71.97 - 72.76 %), limonène **4** (13.62 - 14.08 %),  $\alpha$ -pinène **1** (8.59 - 9.28 %),  $\alpha$ -terpinolène **5** (2.27 - 2.54 %),  $\alpha$ -phéllandrène **3** (1.23 - 1.42 %) et  $\beta$ -myrcène **2** (1.16 - 1.42 %) (Figure 50A, Tableau 21). Ces produits enzymatiques n'ont pas été détectés dans nos réactions témoin réalisées sur des fractions solubles purifiées d'*E. coli* sans vecteur d'expression et sur des fractions solubles purifiées bouillies des TPSs. Ainsi l' $\alpha$ -fenchol était le principal produit des enzymes *LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS*. Nous les avons donc nommées  $\alpha$ -fenchol synthases. Ces enzymes recombinantes,  $\alpha$ -fenchol synthases, sont incapables *in vitro* de catalyser la transformation du FPP et du GGPP. Les séquences des ADNc de *LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS* ont été déposées à GenBank sous les numéros respectifs d'accèsion JX501511, JX501514 et JX501517.

Les COVs des feuilles de *L. pedunculata* sont majoritairement des monoterpènes avec le fenchone, produit d'oxydation de l' $\alpha$ -fenchol, comme composé caractéristique majeure en parallèle avec des quantités minimales d' $\alpha$ -fenchol (Tableau 16). Le fenchone est également un des COVs des feuilles de *L. stoechas* bien qu'il n'y soit présent qu'en quantité mineure. L' $\alpha$ -fenchol y est cependant absent. Etonnamment, dans les COVs de feuilles de *L. viridis*, nous n'avons pas détecté d' $\alpha$ -fenchol et fenchone. Les autres monoterpènes produits par les trois  $\alpha$ -fenchol synthases de *L. stoechas Sensu Lato* sont

également présents dans les profils monoterpéniques de nos trois espèces de lavande sauf pour l' $\alpha$ -terpinolène **5** qui n'est présent que dans la fraction monoterpénique de *L. pedunculata*.

### III.4.2.4.2. Identification des clones d'ADNc *LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS* en tant que $\alpha$ -pinène synthases

L'analyse des produits des enzymes recombinantes *LpPINS*<sub>spm</sub> et *LvPINS*<sub>spm</sub> par GC/MS a révélé la présence de l' $\alpha$ -pinène **1** comme produit principal (90.57 - 93.20 %) ainsi que d'autres monoterpènes cycliques, le limonène **3** (4.9 - 6.8 %), l' $\alpha$ -phéllandrène **2** (1.63 - 1.71 %) et l' $\alpha$ -terpinolène **4** (1.08 - 1.64 %) avec le GPP en tant que substrat (Figure 50B, Tableau 21). Ces produits n'ont pas été détectés lorsque les réactions enzymatiques étaient réalisées avec les fractions solubles purifiées d'*E. coli* ne contenant pas de vecteur d'expression ou avec des fractions solubles purifiées des TPSs puis chauffées. Comme l' $\alpha$ -pinène était la principale substance des enzymes *LpPINS* et *LvPINS* d'une part et la séquence protéique de *LsPINS* est, hors peptide signal, identique à celles de *LvPINS*, nous les avons toutes désignées  $\alpha$ -pinène synthases. Ces enzymes recombinantes,  $\alpha$ -pinène synthases, sont incapables *in vitro* de catalyser la transformation du FPP et du GGPP. Les séquences des ADNc de *LpPINS*, *LvPINS* et *LsPINS* ont été déposées à GenBank sous les numéros respectifs d'accèsion JX501512, JX501518 et JX501515.

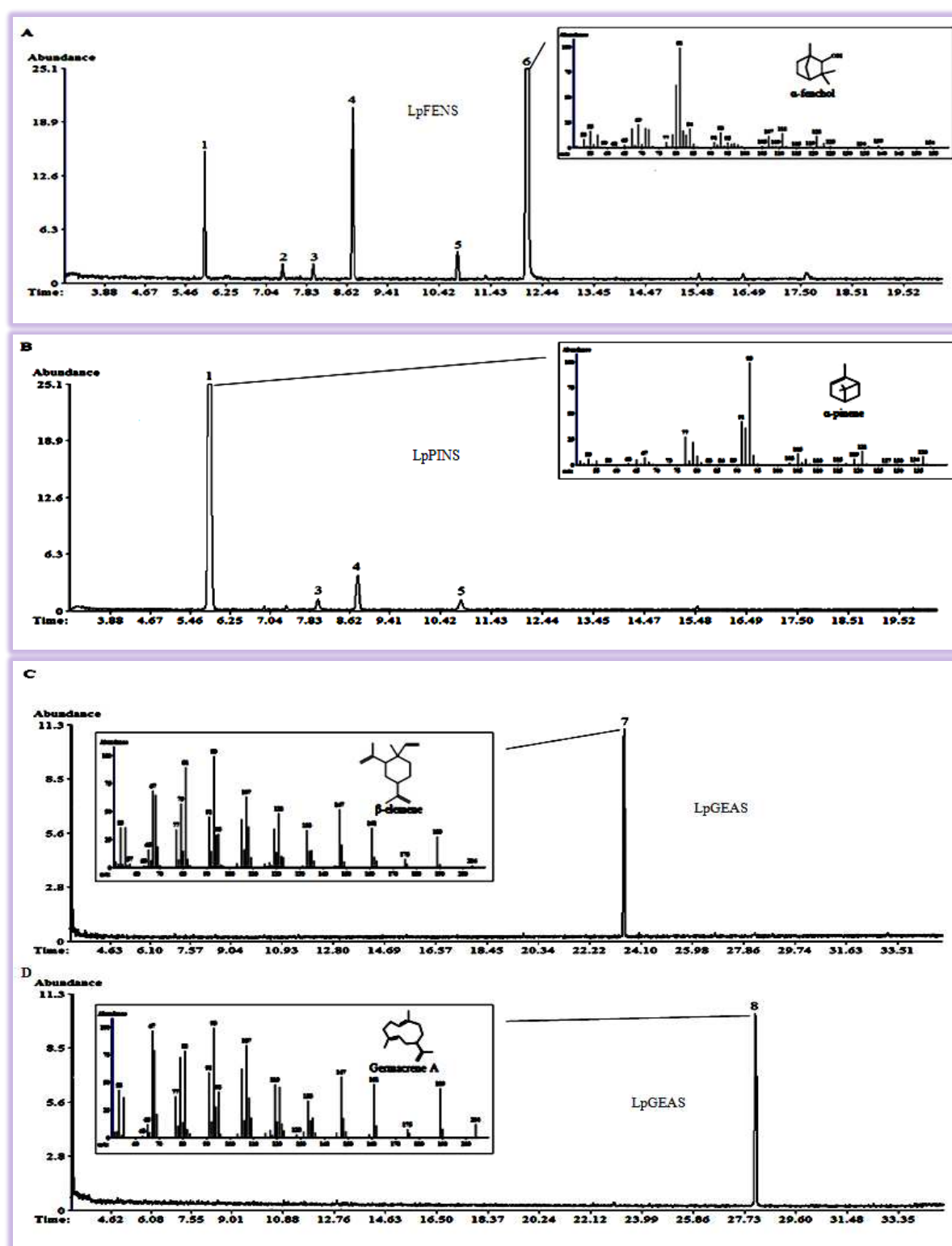
Les produits formés par les enzymes du groupe des PINS sont similaires à ceux produits par les enzymes du groupe des FENS sauf pour la plus grande abondance d' $\alpha$ -pinène et l'absence d' $\alpha$ -fenchol et  $\beta$ -myrcène.

**Tableau 21 : Produits formés *in vitro* par les TPSs de *L. stoechas Sensu Lato***

Composant <sup>a</sup>	Composition <sup>b</sup> (%)							
	<i>Lp</i> FENS	<i>Ls</i> FENS	<i>Lv</i> FENS	<i>Lp</i> PINS	<i>Lv</i> PINS	<i>Lp</i> GEAS	<i>Ls</i> GEAS	<i>Lv</i> GEAS
$\alpha$ -Pinène	8.70	8.59	9.28	<b>93.20</b>	<b>90.57</b>	00	00	00
$\beta$ -Myrcène	1.42	1.27	1.16	00	00	00	00	00
$\alpha$ -Phéllandrène	1.42	1.31	1.23	1.63	1.71	00	00	00
Limonène	14.08	13.62	13.82	4.09	6.08	00	00	00
$\alpha$ -Terpinolène	2.27	2.45	2.54	1.08	1.64	00	00	00
$\alpha$ -Fenchol	<b>72.12</b>	<b>72.76</b>	<b>71.97</b>	00	00	00	00	00
$\beta$ -Elemène	00	00	00	00	00	100	100	100
Germacrene A	00	00	00	00	00	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Annotation fonctionnelle <sup>c</sup>	$\alpha$ -Fenchol synthase			$\alpha$ -Pinène synthase		Germacrene A synthase		

<sup>a</sup> Le  $\beta$ -élémente est détecté ici comme produit de réarrangement thermique du germacrène A en injection à chaud à 250 °C et le germacrène A est détecté en injection à froid à 150 °C. <sup>b</sup> Les données de composition (pourcentage d'abondance) ont été calculées sur la base des aires des pics issus de l'analyse GC/MS sur colonne capillaire HP-5MS. <sup>c</sup> L'annotation fonctionnelle est fondée sur le principal produit terpénique (en gras) d'enzyme recombinante exprimée dans *E. coli*.





**Figure 50 :** Analyses par GC/MS des produits terpéniques formés *in vitro* par les enzymes recombinantes de TPSs des lavandes *Stoechas* avec le GPP ou le FPP en tant que substrats

A. Chromatogrammes montrant les courants d'ions totaux des produits enzymatiques des enzymes purifiées LpFENSpm. Des profils similaires ont été obtenus avec LsFENSpm et LvFENSpm.

B. Chromatogrammes montrant les courants d'ions totaux des produits enzymatiques des enzymes purifiées LpPINSpm. Des profils similaires ont été obtenus avec LvPINSpm, LsPINS s'étant avérée inactive...

C. Chromatogrammes montrant les courants d'ions totaux des produits enzymatiques des enzymes purifiées LpGEAS injectée à chaud (250 °C). Des profils similaires ont été obtenus avec LsGEAS et LvGEAS..

D. Chromatogrammes montrant les courants d'ions totaux des produits enzymatiques des enzymes purifiées LpGEAS injectée à froid (150 °C). Des profils similaires ont été obtenus avec LsGEAS et LvGEAS

### III.4.2.4.3. Identification des clones d'ADNc *LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS* en tant que germacrène A synthases

Les analyses GC/MS des produits enzymatiques des enzymes *LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS* avec le FPP comme substrat ont révélé la présence d'un produit unique, le  $\beta$ -élémane (Tableau 21, Figure 50C). Il est cependant connu que les hautes températures, comme la température du port d'injection à 250°C de la GC lors de l'analyse, induisent des réarrangement de nombreuses molécules telles que le germacrène A qui se transforme thermiquement en  $\beta$ -élémane (Takeda, 1974 ; de Kraker *et al.*, 1998). Une injection à froid (150°C) dans la GC des mêmes extraits a révélé la présence d'une seule substance, le germacrène A (Tableau 21, Figure 50D). Les identités du germacrène A et du  $\beta$ -élémane ont été confirmées par GC/MS en analysant l'HE de patchouli (*Pogostemon cablin*) en injection chaude et froide, les molécules germacrène A et  $\beta$ -élémane n'étant pas disponibles commercialement sous forme pure. L'HE de *P. cablin* referme le germacrène A en quantités importantes et détectables par GC/MS (Deguerry *et al.*, 2006). Les spectres de masse et les indices de rétention du germacrène A et du  $\beta$ -élémane sont identiques à ceux des mêmes composés contenus dans l'HE de patchouli, ainsi qu'à ceux des bibliothèques électroniques WILEY et NIST et aux données publiées par Adams (2007). Les enzymes *LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS* sont donc des germacrène A synthases. Le germacrène A, n'a pas été produit lors de réactions enzymatiques effectuées avec les fractions solubles purifiées d'*E. coli* sans vecteur d'expression et avec des fractions solubles purifiées des TPSs chauffées. Ces enzymes recombinantes, germacrène A synthases, sont incapables *in vitro* de catalyser la transformation du GPP et du GGPP. Les séquences des ADNc ont été déposées à GenBank sous les numéros respectifs d'accèsion JX501513, JX501516 et JX501519.

Le  $\beta$ -élémane a été détecté dans les extraits de composés organiques volatils de nos 3 espèces de lavandes quand les injections étaient réalisées à chaud (250°C) mais était indétectable quand les injections étaient réalisées à froid (150°C). Inversement, le germacrène A n'était détectable que dans les extraits injectés à froid. Le  $\beta$ -élémane n'était cependant présent qu'en faibles quantités ( $0.66 \pm 0.07 - 2.80 \mu\text{g eq. eugénol/g PS} \pm 0.02$ , Tableau 16).

En résumé, toutes nos enzymes possèdent une activité terpène synthase permettant de synthétiser des terpènes présents chez les trois lavandes *Stoechas*. Ces résultats nous permettent de dire que deux types d'enzymes, les  $\alpha$ -fenchol synthases (*LpFENS*, *LsFENS*

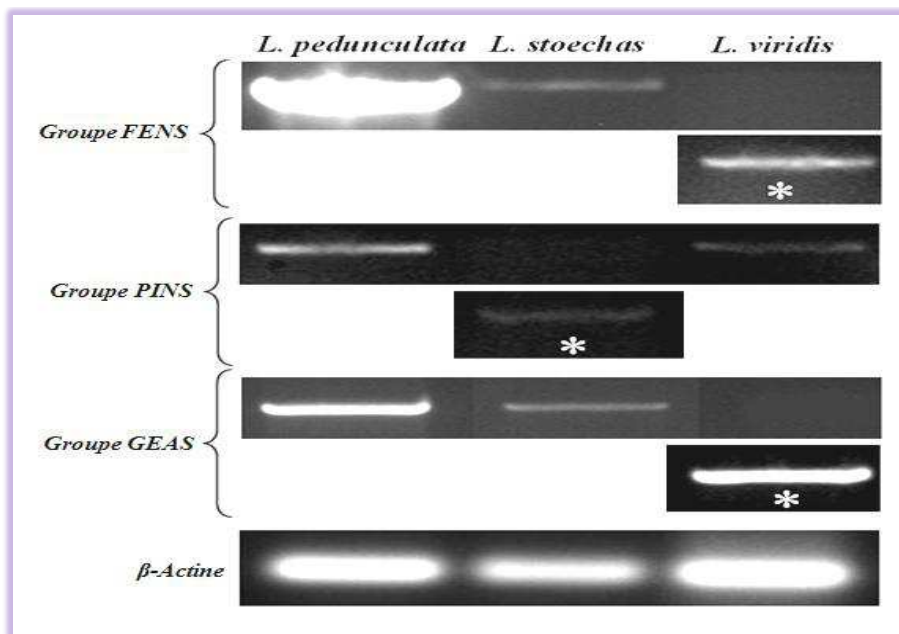
et *LvFENS*) et les  $\alpha$ -pinène synthase (*LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS*) sont des TPSs à multi-produits alors que les germacrène A synthase (*LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS*) sont des TPSs à un produit unique. Les produits formés par ces TPSs sont présents dans les 3 espèces de lavandes analysées mais pas systématiquement et, des fois, à des taux très variables.

#### III.4.2.5. Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes de TPSs de *L. stoechas Ssensu Lato*

Comme les différences de chémotype entre les 3 espèces de lavandes ne pouvaient être expliquées par des différences d'activité des 3 TPSs que nous avons découvertes, nous avons comparé, dans les feuilles des trois lavandes *Stoechas*, l'expression des trois types de gènes clonés dans cette étude ( $\alpha$ -fenchol synthase,  $\alpha$ -pinène synthase et geramcrene A synthase) par la méthode de RT-PCR semi-quantitative. Cette technique consiste à amplifier de façon simultanée (co-amplification) l'ADNc d'un gène d'intérêt et celui d'un gène contrôle à l'aide de deux couples d'amorces distincts. Le gène de  $\beta$ -actine, dont la protéine est exprimée de manière constitutive dans la cellule, a été choisi comme standard interne pour normaliser les différents échantillons d'ADNc utilisés. Des conditions expérimentales d'amplification et d'hybridation compatibles ont été définies pour les trois types de gènes. Les amorces ActF et ActR (Tableau 9) amplifient un fragment de 220 pb du gène de  $\beta$ -actine à une température de fusion élevée (66 °C et 68 °C, respectivement) et donc assez spécifiques. Les amorces spécifiques aux gènes de TPSs (*FENSsemiF/FENSsemiR*, *PINSsemiF/PINSsemiR* et *GEASsemiF/GEASsemiR*, Tableau 9) ont été choisies à l'intérieur des ORF des gènes de TPS. Elles présentent des températures de fusion de 59 °C à 72 °C permettant une amplification la plus spécifique possible de chaque gène tout en permettant une co-amplification spécifique du gène de  $\beta$ -actine. Les résultats de cette analyse sont représentés dans la Figure 51.

Le premier aperçu sur les résultats de cette analyse semi-quantitative montre que les transcrits de tous les gènes de TPS clonés sont exprimés dans les feuilles de toutes les lavandes mais à des intensités très différentes. Le gène de l' $\alpha$ -fenchol synthase est exprimé très fortement dans les feuilles de *L. pedunculata*. Il l'est faiblement dans les feuilles de *L. stoechas* et très faiblement dans les feuilles de *L. viridis* en corrélation avec la teneur très élevée du fenchone dans cette première lavande ( $624.56 \pm 64.50 \mu\text{g eq. eugénol/g PS}$ , Tableau 16), la faible présence de cette molécule chez *L. stoechas* ( $23.4 \mu\text{g eq. eugénol/g}$

PS) et sa non-détection dans les feuilles de *L. viridis*. Le fenchone est la forme oxydée de l' $\alpha$ -fenchol qui était présent en faible quantité dans les feuilles de *L. pedunculata* et indétectable dans les feuilles des deux autres lavandes. L' $\alpha$ -fenchol est donc vraisemblablement très fortement oxydé en fenchone dans ces espèces de lavandes et le niveau de transcription du gène FENS est à mettre en corrélation avec le taux du couple l' $\alpha$ -fenchol/fenchone chez les trois lavandes. Les transcrits de FENS ont tout de même été détectés sur gel à partir de 40 cycles de PCR chez *L. viridis* (Figure 51). D'une façon similaire, les cinq autres produits synthétisés par l' $\alpha$ -fenchol synthase présentent des teneurs au moins 6 fois plus élevées dans les feuilles de *L. pedunculata* par rapport à celles observées chez les autres lavandes en corrélation avec l'expression du gène correspondant sauf pour l' $\alpha$ -pinène dont la teneur chez *L. pedunculata* n'est que 1.4 fois supérieure à celle chez *L. viridis* et 2.6 fois supérieure à celle chez *L. stoechas*. L' $\alpha$ -pinène est aussi la seule molécule dont les proportions relatives aux autres substances produites par l' $\alpha$ -fenchol synthase diffèrent entre celles observées lors des tests de dosage enzymatique et celles des extraits de COVs des 3 lavandes. Cette substance est en effet la plus abondante des 5 co-produits des FENS hors  $\alpha$ -fenchol dans les feuilles des trois lavandes alors qu'elle est la troisième molécule la plus produite par l' $\alpha$ -fenchol synthase après l' $\alpha$ -fenchol et le limonène.



**Figure 51 : Analyse des niveaux relatifs des transcrits des gènes de TPSs par RT-PCR dans les feuilles des trois lavandes**

Les ARN totaux ont été isolés à partir des feuilles et utilisés comme matrice pour l'analyse par RT-PCR. L'actine a servi comme un contrôle endogène (gène de ménage). Les PCR ont été réalisées avec 25 cycles d'amplification pour l'actine et pour tous les gènes de TPSs, sauf pour ceux mentionnés par un astérisque (*LvFENS*, *LsPINS* et *LvGEAS*) qui ont été amplifiés avec 40 cycles.

Le gène d' $\alpha$ -pinène synthase est surtout exprimé dans les feuilles de *L. pedunculata* et *L. viridis* mais est exprimé à un niveau très inférieur (détectable à 40 cycles) chez *L. stoechas* (Figure 51). L'expression de ce gène chez *L. pedunculata* et *L. viridis* explique l'accumulation presque similaire de l' $\alpha$ -pinène chez ces espèces malgré une expression très différente de l' $\alpha$ -fenchol synthase. Il explique aussi la plus forte présence de l' $\alpha$ -pinène chez ces lavandes par rapport au limonène bien que le rapport de production de ces deux molécules par l' $\alpha$ -fenchol synthase soit inverse. La très faible expression de ce gène chez *L. stoechas* et notre incapacité à mettre en évidence une activité enzymatique de LsPINS sont par contre surprenants. *L. stoechas* accumule en effet des quantités plus faible mais tout à fait significative d' $\alpha$ -pinène (16.9  $\mu$ g eq. eugénol/g PS). Cette espèce accumule aussi, contrairement aux deux autres, une forte quantité d'acétate de myrtényle (59.51  $\mu$ g eq. eugénol/g PS) qui est un dérivé biosynthétique de l' $\alpha$ -pinène. Il est donc possible qu'un autre gène de TPS encore inconnu soit responsable d'une synthèse additionnelle d' $\alpha$ -pinène au moins chez cette espèce.

Les ARNm des gènes de germacrène A synthase sont quant à eux présents en plus forte quantité dans les feuilles de *L. pedunculata* que dans celles de *L. stoechas*. Leur abondance était faible, et uniquement détectée après 40 cycles de PCR, chez *L. viridis* (Figure 51). Ces niveaux respectifs d'expression sont cependant très différents des niveaux d'accumulation du germacrène A dans les feuilles de ces trois espèces.

#### III.4.2.6. Analyse phylogénétique

Afin de clarifier les relations phylogénétiques entre les gènes de TPS de lavandes *Stoechas* clonés ici et ceux déjà clonés et caractérisés fonctionnellement chez les Angiospermes, nous avons construit un arbre de relations phylogénétiques. Cet arbre a été construit grâce aux séquences protéiques des TPSs du genre *Lavandula*, des TPSs ayant les mêmes activités catalytiques et un ou plusieurs TPSs représentatives de chacune des sous-familles des TPSs (TPSa - TPSH). Les séquences protéiques des TPSs ont été alignées en utilisant le programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) du logiciel BioEdit. L'arbre des relations phylogénétiques a été construit en utilisant la méthode de neighbor-joining (MEGA 4) et est présenté dans la Figure 52.

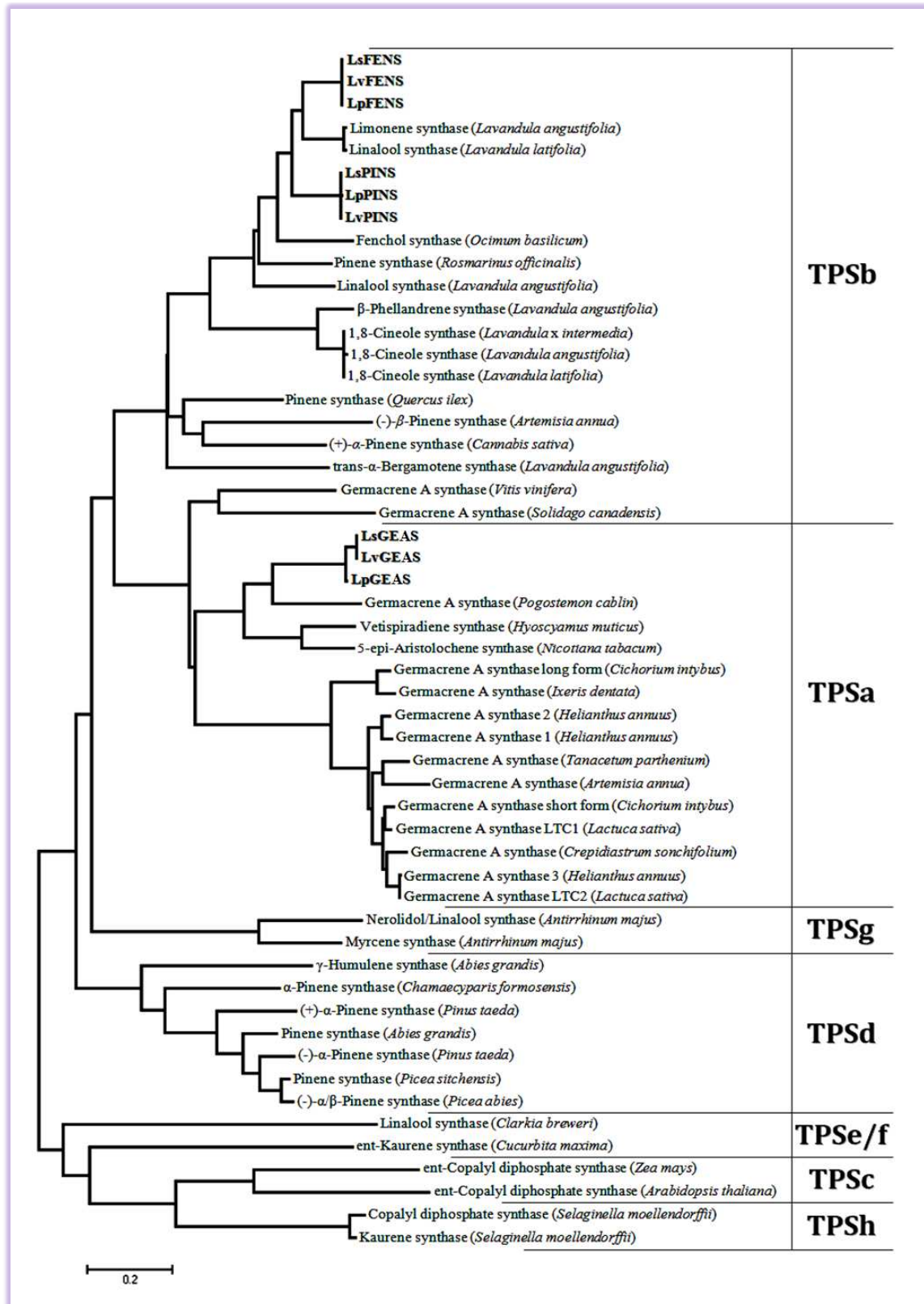


Figure 52 : Relations phylogénétiques des TPSs des lavandes *Stoechas* avec d'autres TPSs connus

**Figure 52 : (suite)**

Les séquences protéiques des TPSs de lavandes ainsi que d'autres mono-, sesqui- et diTPSs choisis d'Angiospermes et de Gymnospermes ont été alignées (Bioedit) et utilisées pour reconstituer l'arbre phylogénétique (Mega 4, Tamura *et al.*, 1997) des TPSs végétales. L'arbre phylogénétique est généré selon la méthode du Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987). Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode de correction de Poisson (Zuckerkanndl & Pauling, (1965). La barre d'échelle indique une divergence de séquence de 20%. Les TPSs de lavandes *Stoechas* clonées et caractérisées dans cette étude sont mises en évidence en gras.

Numéros d'accèsion Genbank : *H. annuus* Germacrene A synthase 1 et Germacrene A synthase 2, EU439590 et EU443249 (Gopfert *et al.*, 2009); *H. annuus* Germacrene A synthase 3, GU176380 (Gopfert *et al.*, 2010); *P. cablin* Germacrene A synthase, AY508728 (Deguerry *et al.*, 2006); *A. majus* Nerolidol/Linalool synthase, EF433761 (Nagegowda *et al.*, 2008); *A. majus* Myrcene synthase, AY195609 (Dudareva *et al.*, 2003); *A. grandis*  $\gamma$ -Humulene synthase, U92267 (Steele *et al.*, 1998); *C. formosensis*  $\alpha$ -Pinene synthase, EU099434 (Chu *et al.*, 2009); *A. grandis* Pinene synthase, U87909 (Bohlmann *et al.*, 1997); *P. taeda* (+)- $\alpha$ -Pinene synthase et (-)- $\alpha$ -Pinene synthase, AF543530 et AF543527 (Phillips *et al.*, 2003); *P. sitchensis* Pinene synthase, AY237645 (McKay *et al.*, 2003); *P. abies* (-)- $\alpha/\beta$ -Pinene synthase, AY473622 (Martin *et al.*, 2004); *C. breweri* Linalool synthase, U58314 (Dudareva *et al.*, 1996); *C. maxima ent*-Kaurene synthase, U43904 (Yamaguchi *et al.*, 1996); *A. thaliana ent*-Copalyl diphosphate synthase, NM116512 (Mayer *et al.*, 1999); *Z. mays ent*-Copalyl diphosphate synthase, AY562491 (Harris *et al.*, 2005); *L. latifolia* Linalool synthase, DQ421801 (Tan *et al.*, 2006, soumission direct au genBank); *L. angustifolia* Limonene synthase, Linalool synthase et *trans*- $\alpha$ -Bergamotene synthase, DQ263740, DQ263741 et DQ263742 (Landmann *et al.*, 2007); *O. basilicum* Fenchol synthase, AY693648 (Iijima *et al.*, 2004); *Q. ilex* Pinene synthase, AM283099 (Andres-Montaner *et al.*, 2006, soumission direct au genBank); *A. annua* (-)- $\beta$ -Pinene synthase, AF276072 (Lu *et al.*, 2002); *C. sativa* (+)- $\alpha$ -Pinene synthase, DQ839405 (Guennewich *et al.*, 2006, soumission direct au genBank); *T. parthenium* Germacrene A synthase, JF819848 (Majdi *et al.*, 2011); *V. vinifera* Germacrene A synthase, HQ326230 (Martin *et al.*, 2010); *I. dentata* Germacrene A synthase, AY082672 (Kim *et al.*, 2005); *C. sonchifolium* Germacrene A synthase, DQ186657 (Ren & You, 2005, soumission direct au genBank); *S. canadensis* Germacrene A synthase, AJ304452 (Prosser *et al.*, 2002); *A. annua* Germacrene A synthase, DQ447636 (Berteau *et al.*, 2006); *C. intybus* Germacrene A synthase short form et Germacrene A synthase long form, AF498000 et AF497999 (Bouwmeester *et al.*, 2002); *L. sativa* Germacrene A synthase LTC1 et Germacrene A synthase LTC2, AF489964 (Bennett *et al.*, 2002); *H. muticus* Vetispiradiene synthase, U20187 (Back & Chappell, 1995); *N. tabacum* 5-*epi*-Aristolochene synthase, L04680 (Facchini & Chappell, 1992); *R. officinalis* Pinene synthase, EF495245 (Tan *et al.*, 2007, soumission direct au genBank); *S. moellendorffii* Copalyl diphosphate synthase et kaurene synthase, XM\_002967320 et XM\_002960304 (Grigoriev *et al.*, 2010, soumission direct au genBank); *L. angustifolia*  $\beta$ -Phellandrene synthase, HQ404305 (Demissie *et al.*, 2011); *Lx intermedia* 1,8-Cineole synthase, JN701459, *L. angustifolia* 1,8-Cineole synthase, JN701461 et *L. latifolia* 1,8-Cineole synthase, JN701460 (Demissie *et al.*, 2012).

Les huit sous-familles des TPSs végétales (TPSa - TPSH), déjà définies sur la base des liens génétiques (Bohlmann *et al.*, 1998a ; Trapp & Croteau, 2001b ; Aubourg *et al.*, 2002 ; Dudareva *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2011), sont clairement séparées et nos nouvelles TPSs de lavandes s'intègrent dans ces sous-familles. Comme illustré dans la Figure 52, les l' $\alpha$ -fenchol synthases et l' $\alpha$ -pinène synthases des lavandes *Stoechas* s'intègrent parmi les TPSs de la sous-famille TPSb et les germacrène A synthases des lavandes *Stoechas* s'intègrent dans la sous-famille TPSa. Les deux groupes de monoTPSs des lavandes *Stoechas* sont groupés dans deux sous-clusters distincts de la sous-famille TPSb. Ainsi, les  $\alpha$ -fenchol synthases de *L. stoechas* *Sensu Lato* présentent les plus fortes ressemblances avec la limonène synthase de *L. angustifolia* (Landmann *et al.*, 2007) et la linalol synthase de *L. latifolia* (GenBank), en dépit des différences fonctionnelles entre ces enzymes. L'ensemble de ces TPSs est sœur des pinènes synthases des lavandes *Stoechas*.

Les germacrène A synthases des lavandes *Stoechas* sont groupées dans la sous-famille TPSa qui est constituée majoritairement de sesquiTPSs. Cette sous-famille regroupe notamment toutes les germacrène A synthases connues à ce jour bien que provenant de familles botaniques très différentes comme des Astéracées, des Vitacées et des Lamiacées.

Les germacrène A synthases que nous avons découvertes sont les premiers membres connus de TPSs de lavande de la sous-famille TPSa. Leur plus grande affinité de séquences au sein de la sous-famille TPSa s'effectue avec la germacrène A synthase de *P. cablin* qui est la seule autre TPS de la famille des Lamiacées. Les autres TPS les plus proches sont la 5-epi-aristolochène synthase (TEAS) et la vetispiradiène synthase (VHS) du tabac et d'*Hyoscyamus muticus* respectivement. Il est à noter que ces deux dernières enzymes produisent du germacrène A comme intermédiaire catalytique.

### III.4.3. Discussion

Le peu d'information génomique disponible (absence de génome séquencé et absence de banque d'EST) et TPS connues sur le genre *Lavandula* ne permet pas le clonage direct des ADNc codants les TPSs. Donc, nous avons débuté notre travail par des amplifications PCR des TPSs sur l'ADNg en utilisant l'approche des amorces dégénérées. Cette approche est souvent utilisée pour le clonage de gènes présentant des zones conservées sur leurs séquences, ce qui est le cas des TPSs. Les séquences protéiques de TPSs publiées depuis une variété de plantes possèdent plusieurs régions hautement conservées. Ceci offre la possibilité d'isoler de nombreux nouveaux gènes de TPSs d'autres plantes par PCR avec des amorces dégénérées. A cet effet, un arbre phylogénétique (Figure 44) a été généré suite à l'alignement de 62 séquences protéiques de TPSs de Lamiacées. Le fait d'établir un arbre à partir de TPSs d'une même famille botanique entraîne nécessairement un biais car il ne permet de ne voir que les zones conservées des enzymes déjà connues dans cette famille. Il nous empêche de désigner des amorces sur des enzymes encore inconnues dans cette famille. Heureusement pour nous, la famille des Lamiacées a été déjà très étudiée pour son métabolisme des terpènes. L'arbre construit dans notre étude a permis de définir six clusters de TPSs : quatre clusters (1, 2, 4 et 6) regroupant des monoTPSs, et deux clusters (3 et 5) regroupant des sesquiTPSs. Le cluster 5 renfermant des sesquiTPSs se détache distinctement du reste de l'arbre. Il pourrait s'agir de gènes qui ont divergé très tôt au cours de l'évolution. Ceci avait déjà été mis en évidence dans l'arbre généré par Bohlmann *et al.* (1998a) qui montre qu'au sein des Angiospermes, les monoTPSs sont clairement distinctes des sesquiTPSs. A contrario, le cluster 3 qui renferme également des sesquiTPSs, se situe au milieu des clusters de monoTPSs. Il regroupe deux sesquiTPSs, la  $\alpha$ -zingibèrene synthase d'*Ocimum basilicum* (Iijima *et al.*, 2004b) et la *trans*-bergamotène synthase de *L. angustifolia* (LaBERS, Landmann *et al.*, 2007). Cette dernière fait partie des trois TPSs caractérisées par Landmann *et al.* (2007) chez *L. angustifolia*. Cette étude montre que



*LaBERS* est plus étroitement apparentée aux monoTPSs qu'aux sesquiTPSs. Il est probable que ces deux enzymes, ici regroupées dans le cluster 3, dérivent de monoTPSs par la perte d'un peptide signal pour le ciblage chloroplastique et par l'élargissement de la poche catalytique de fixation du substrat pour inclure le FPP présent dans le cytosol et non le chloroplast. Cette idée est soutenue par le fait que la protéine *LaBERS* accepte le GPP avec une plus grande affinité. Les fortes homologues de ces enzymes avec les monoTPSs peuvent expliquer les raisons pour lesquelles Landmann *et al.* (2007) ont pu amplifier des gènes de sesquiTPSs et de monoTPSs avec deux couples d'amorces dégénérées possédant la même amorce antisens. Les séquences de sesquiTPSs du cluster 5 sont, quant-à-elles, trop divergentes pour être amplifiées avec le même couple d'amorces.

Au cours de cette phase de notre étude, des amorces dégénérées ont été définies sur chaque cluster pour amplifier des gènes de TPSs sur ADN<sub>g</sub> de *L. pedunculata*. Les séquences amplifiées ont été 'BLASTées' contre la base de données GenBank ce qui permet d'établir que cinq d'entre elles sont des séquences partielles différentes, *LpMTPS1g-383*, *LpMTPS2g-768*, *LpMTPS3g-768*, *LpMTPS4g-792* et *LpMTPS5g-795*, homologues à des monoTPSs du cluster 1, 2 et 6 et trois séquences partielles différentes, *LpSTPS1g-894*, *LpSTPS2g-896* et *LpSTPS3g-909*, homologues à des sesquiTPSs du cluster 5. Enfin, en couplant des amorces spécifiques désignées sur les huit séquences partielles non introniques avec la RACE-PCR, trois gènes, *LpFENS*, *LpPINS* et *LpGEAS*, en pleine longueur codants pour des TPSs ont été amplifiés sur ADN<sub>c</sub> de *L. pedunculata*. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'ADN<sub>c</sub> reflète uniquement les gènes en expression. Ainsi, seules les TPSs exprimées ont été amplifiées. Les différents niveaux d'expression des gènes de TPSs peuvent également influencer sur le rendement de la réaction PCR dans le sens où il est plus probable d'amplifier un gène très exprimé en admettant que l'hybridation des amorces dégénérées sur les gènes de TPSs soit équiprobable.

Ainsi, par le couplage des amorces spécifiques désignées sur les trois séquences pleine longueur de TPSs de *L. pedunculata* avec la marche génomique, nous avons réussi à isoler, cloner et séquencer trois ADN<sub>c</sub> de TPSs orthologues des feuilles de *L. stoechas* (*LsFENS*, *LsPINS* et *LsGEAS*) et des feuilles de *L. viridis* (*LvFENS*, *LvPINS* et *LvGEAS*). Aucun autre gène orthologue additionnel n'a été trouvé dans aucune espèce. La comparaison des différentes séquences avec leurs orthologues a révélé des pourcentages d'identité très élevés (~ 99 %, Tableau 19). La présence des mêmes gènes dans *L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis* avec une très haute identité (Figure 48), confirme que ces plantes sont étroitement

liées génétiquement comme indiqué par leur lien botanique étroit (même section botanique, section *Stoechas* et dénomination originelle de ces trois espèces au sein d'une même espèce). Nos trois gènes n'ont pas subi d'évènement de duplication au sein du complexe d'espèces *Stoechas* en accord avec les ploïdies similaires entre les espèces. Les quelques mutations ponctuelles et insertions/délétions qui différencient les formes orthologues de ces trois gènes n'ont pas modifié les profils des produits des enzymes.

Comme illustré sur la Figure 48, toutes les TPSs de lavande *Stoechas* clonées manifestent les motifs caractéristiques des TPSs. Il s'agit notamment du motif N-terminal RRx8W caractéristique de la plupart des monoTPSs membres des sous-familles TPSb et TPSd (Bohlmann *et al.*, 1998a ; Aubourg *et al.*, 2002). Ce motif est présent dans nos  $\alpha$ -fenchol synthases et  $\alpha$ -pinène synthases en tant que RRS(G/A)NYQPSAW et moins conservé en tant que RPLANFSPSLW dans nos germacrène A synthases du fait du remplacement du deuxième Arg par un Pro. Le motif RRx8W a été signalé comme essentiel à l'activité des monoTPSs pour la production des monoterpènes cycliques en participant dans l'étape initiale de la migration du diphosphate (Savage *et al.*, 1994). Ainsi, le deuxième résidu arginine dans ce motif a été proposé comme étant impliqué dans l'isomérisation du GPP en un intermédiaire cyclisable, tel que le cation de linalyle (Williams *et al.*, 1998 ; Dudareva *et al.*, 2003). Les motifs riches en aspartate, "DDxxD" et "NSE/DTE", abréviation du consensus (L,V)(V,L,A)(N,D)D(L,I,V)x(S,T)x3E, sont également présents dans nos TPSs en tant que DD(I,V,T)YD et DD(L,I)(G,A)T(A,Y)(P,L,E)(F,H,V)E, respectivement (Figure 48). Cependant, le motif DDxxD est hautement conservé chez la quasi-totalité des TPSs végétales et microbiennes alors que le motif NSE/DTE semble être moins conservés (Tarshis *et al.*, 1994, 1996 ; Lesburg *et al.*, 1997 ; Starks *et al.*, 1997 ; Cane & Kang, 2000 ; Christianson, 2006). Peters *et al.* (2003) ont révélé que les réactions de cyclisation se produisent dans des sites actifs séparés. Un site actif est localisé dans une région centrale contenant le motif DDxxD responsable de la liaison du métal divalent pour les réactions de protonation tandis que l'autre site est localisé dans la région C-terminale contenant le motif NSE/DTE responsable des réactions d'ionisations. En outre, toutes nos TPSs putatives sont caractérisées par la présence du motif RxR hautement conservé (Bohlmann *et al.*, 1998a). Ce motif, sous forme de RDR dans nos TPSs, est situé environ 34 aa en amont du motif DDxxD. D'après Stark *et al.* (1997), ce motif aide à orienter l'anion diphosphate loin du

carbocation réactif après l'ionisation du substrat pour empêcher l'attaque nucléophile sur les intermédiaires carbocationiques. Ainsi, spécifiquement nos germacrène A synthases sont caractérisées par la présence d'un motif conservé "GVYxEP" dans les sesquiTPSs des Angiospermes en tant que GVYHEP (Cai *et al.*, 2002). En plus, une autre région conservée est aussi apparente dans nos TPSs, il s'agit du motif LQLYEASFLL qui joue un rôle dans la catalyse (McGeady & Croteau 1995 ; Wise *et al.*, 1998).

La comparaison de Bohlmann *et al.* (1997, 1998a) a montré que des TPSs avec une haute identité en acides aminés (70 - 90 %) peuvent être responsables de la catalyse de réactions différentes, tandis que d'autres TPSs avec seulement 30 % d'identité peuvent catalyser la même cyclisation. Cette faible corrélation entre la structure et la fonction des TPSs rend impossible la classification d'une nouvelle TPS putative avant qu'elle n'ait été analysée biochimiquement. Il a été rapporté que le peptide signal d'adressage chloroplastique est enlevé à l'entrée des TPSs dans les chloroplastes à cause de son action inhibitrice (Robinson & Ellis, 1984 ; Hawlitschek *et al.*, 1988 ; Arretz *et al.*, 1991). Ainsi, les monoTPSs tronquées en amont des deux Arg du motif RRx8W montrent une activité maximale (Williams *et al.*, 1998). La détermination du site potentiel de clivage des peptides signaux légèrement en amont du motif RRx8W, pour l'enlèvement des 50 premiers aa pour les monoTPSs du groupe FENS et des 53 premiers acides aminés pour les monoTPSs du groupe PINS (Figure 48), a été fondée, en parallèle, sur la consultation minutieuse des études publiées sur les TPSs (Fischbach *et al.* 2001, Dudareva *et al.* 2003, Chen *et al.*, 2004, Martin *et al.*, 2004 ; Landmann *et al.*, 2007) et en utilisant l'algorithme ChloroP du site web <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>. Le motif RRx8W est jugé pour définir le site de clivage approximative du peptide d'adressage plastidial dans les enzymes monoTPSa (Williams *et al.*, 1998). L'absence de résidus N-terminaux en amont à ce motif dans l'une des quelconques des structures cristallisées reportées des monoTPSs, non seulement donne à penser qu'ils sont superflus à l'activité enzymatique, mais peut-être plus important encore, qu'ils sont susceptibles de former une structure secondaire ou tout autre structure ordonnée. En plus, le peptide signal doit être exclu pendant le clonage pour améliorer la solubilité de la protéine recombinante. Le peptide de transit dirige les protéines exprimées de manière hétérologue dans *E. coli* vers la cavité périplasmique où les protéines sont agrégées sous forme de corps d'inclusion insolubles (Hannig & Makrides, 1998). Son exclusion, par conséquent, améliore le dépôt des protéines recombinantes dans le cytoplasme bactérien sous une forme soluble (Williams *et al.*,

1998). De ce fait, les peptides signaux d'adressage chloroplastique de toutes les monoTPSs des groupes FENS et PINS ont été éliminés par l'amplification d'un cadre de lecture ouvert tronqué commençant par les trois acides aminés (DET) en amont du motif conservé RRx8W (Figure 48). Cette amplification-délétion nous a permis d'obtenir les formes tronquées pseudomatures (pm) marquées par l'étiquette poly-His de toutes nos monoTPSs (*LpFENSpm*, *LsFENSpm*, *LvFENSpm*, *LpPINSpm*, *LsPINSpm* et *LvPINSpm*). L'utilisation de la souche Rosetta (DE3) pLysS de *E. coli* pour l'expression hétérologue et la chromatographie d'affinité au Ni<sup>2+</sup> nous ont permis de purifier les protéines natives de toutes nos TPSs en quantités notables et solubles allant de 2 à 18 µg.

D'après l'analyse SDS-PAGE (Figure 49) de nos TPSs recombinantes, les poids moléculaires des protéines recombinantes des groupes FENS, PINS et GEAS ont été estimés, respectivement, à ~ 65, ~ 66 et ~ 59 kDa. Ces valeurs de PM sont inférieures à celle prédites à partir de la traduction théorique des ADNc (Tableau 18). Ces incohérences entre les prévisions des PMs et les estimations des PMs basées sur l'analyse SDS-PAGE sont couramment observés (Fischer *et al.*, 2004), et pourraient résulter de repliement ou d'association particulières avec le détergent SDS (Deguerry *et al.*, 2006). Comme plusieurs études ont prouvé que les TPSs peuvent fonctionner avec plusieurs types d'ions métalliques divalents, habituellement le Mg ou le Mn (Poulter & Rilling 1981 ; Croteau, 1987 ; Cane, 1990), nous avons réalisé des essais enzymatiques avec l'assistance du Mg et du Mn conjointement selon les conditions optimisées par Landmann *et al.* (2007).

Les essais enzymatiques couplés à la GC/MS nous ont permis d'identifier sans ambiguïté les activités catalytiques *in vitro* des TPSs de lavandes clonées lors de cette étude. Ainsi l' $\alpha$ -fenchol était le principal produit des TPSs du groupe FENS et nous les avons désignées  $\alpha$ -fenchol synthases (*LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS*). De la même façon, nous avons identifié les TPSs du groupe PINS en tant qu' $\alpha$ -pinène synthases (*LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS*) ainsi que les TPSs du groupe GEAS en tant que germacrène A synthases (*LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS*).

La fraction volatile de *L. pedunculata* est très riche en fenchone (Tableau 16). Vu que le fenchone est la forme oxydatée d' $\alpha$ -fenchol et que *LpFENS* est très fortement exprimée dans cette espèce, il est probable que l'expression forte de *LpFENS* soit responsable du chémotype fenchone de *L. pedunculata*. Croteau *et al.* (1980) ont démontré qu'une fenchol déshydrogénase, isolée en tant qu'enzyme soluble à partir des feuilles de *Foeniculum vulgare*, catalyse la déshydrogénation pyridine nucléotide-dépendante d' $\alpha$ -fenchol en

fenchone. Le fenchone joue un rôle écologique important sur la reproduction de *L. pedunculata* car il agit comme signal d'attraction des insectes pollinisateurs (Duke, 1992). Par contre, l' $\alpha$ -fenchol est totalement absent des fractions volatiles des autres lavandes *Stoechas*, et le fenchone est non-délectable parmi les terpènes volatils de *L. viridis* en parallèle avec la faible expression de la fenchol synthase chez ces deux espèces. Les deux autres TPSs que nous avons découvertes (PINS et GEAS) ne sont pas capables de produire l' $\alpha$ -fenchol pour compenser le manque d'activité de FENS (Figure 50).

La capacité de TPSs (y compris nos TPSs) de produire des produits multiples peut résulter de l'évolution incomplète des sites actifs de la protéine ancestrale pour atteindre la précision de son activité catalytique (Christianson, 2006). De façon inattendue, les enzymes à produits multiples que nous avons découvertes, les  $\alpha$ -fenchol synthases et les  $\alpha$ -pinène synthases, ne catalysent pas la biosynthèse des constituants tels que le  $\beta$ -pinène et le  $\beta$ -phéllandrène, qui sont des isomères (anomères) structurellement semblable à l' $\alpha$ -pinène et l' $\alpha$ -phéllandrène, respectivement, qui eux sont produits par nos enzymes. Phillips *et al.* (2003) et Chu *et al.* (2009) ont cloné des  $\alpha$ -pinène synthases de *Pinus taeda* et de *Chamaecyparis formosensis*, respectivement, responsables de la synthèse *in vitro* exclusivement d' $\alpha$ -pinène sans son isomère  $\beta$ -pinène. Néanmoins, le  $\beta$ -pinène et le  $\beta$ -phéllandrène sont naturellement présents dans les feuilles des trois lavandes *Stoechas*. Cela, nous laisse suggérer la présence chez les trois lavandes d'une autre pinène synthase ou phéllandrène synthase ou même d'autres monoTPSs responsables de la production du  $\beta$ -pinène et/ou du  $\beta$ -phéllandrène comme produits principaux ou secondaires. Par exemple, la  $\beta$ -phéllandrène synthases du sapin grandissime produit *in vitro* le  $\beta$ -phéllandrène (52 %), le  $\beta$ -pinène (34 %), l' $\alpha$ -pinène (8.5 %) et le 4S-limonène (6 %) (Bohlmann *et al.* 1999). Il est cependant à noter que toutes les monoTPSs du genre *Lavandula* qui ont été décrites à ce jour produisent *in vitro* de faibles niveaux d' $\alpha$ -phéllandrène (Demissie *et al.*, 2011 ; Landmann *et al.*, 2007). D'autre part, comme *L. stoechas* présente un chémotype camphre et *L. viridis* présente un chémotype 1,8-cinéol et que ces deux terpène sont présents dans les trois lavandes sources en grandes quantité, il est très probable que deux autres TPSs, une bornyl diphosphate synthase et une 1,8-cinéol synthase encore inconnues soient actives dans ces lavandes. La découverte de ces synthase putatives serait un élément important pour mieux comprendre la production de terpènes volatils dans ces lavandes. Très récemment, Demissie *et al.* (2012) ont cloné une première 1,8-cinéol synthase depuis les

fleurs des trois lavandes *L. x intermedia*, *L. angustifolia* et *L. latifolia*. Cette découverte nous aidera peut être à découvrir son homologue dans les lavandes *Stoechas*.

L'activité enzymatique *in vitro* des GEAS des lavandes *Stoechas* a révélé qu'elles ne produisent qu'un seul terpène, le germacrène A. Il est ainsi surprenant de remarquer que cette substance n'est présente qu'en faible quantité dans les lavandes *Stoechas*. Tout aussi surprenant est le manque de corrélation entre le niveau d'expression de cette enzyme et le taux de germacrène A dans les 3 espèces de cette étude. Plusieurs autres TPSs recombinantes sont connues pour synthétiser *in vitro* des terpènes qui ne sont pas produits dans la plante d'origine. C'est par exemple le cas de la bergamotène synthase de *L. angustifolia* qui synthétise un jeu de sesquiterpènes (dont majoritairement le bergamotène) qui n'ont jamais été détectés chez la plante hôte (Landmann *et al.*, 2007). Ceci peut avoir plusieurs causes. Premièrement, les composés volatils produits sont peut être émis très rapidement dans l'atmosphère et ne se sont donc peut être jamais accumulés en assez grande quantité pour pouvoir être détecté lors d'une extraction avec un solvant organique. Autre possibilité, les conditions de réaction enzymatique *in vitro* (tels que les cofacteurs métalliques utilisés) sont peut être trop différentes des conditions *in vivo* et modifient le mécanisme de catalyse pour générer un autre lot de produits. Le ratio entre les concentrations en  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  ont ainsi été démontrés comme étant un facteur contrôlant les produits formés (Croteau & Karp, 1979 ; Landmann *et al.*, 2007). Finalement, il est possible que le germacrène A soit bien produit dans les lavandes *Stoechas* mais soit très rapidement transformé en une autre substance et reste ainsi à des taux très bas *in vivo*. Cette dernière hypothèse est intéressante car il est connu que le germacrène A joue un rôle d'intermédiaire réactionnel dans la biosynthèse des lactones sesquiterpéniques au goût amer, des substances trop polaires pour être extraites par les solvants organiques classiquement utilisés pour extraire les terpènes des Lamiacées (de Kraker *et al.*, 1998, 2001 ; Bennete *et al.*, 2002 ; Majdi *et al.*, 2011). Même si la découverte d'une germacrène A synthase dans les lavandes *Stoechas* a été surprenante, elle est intéressante et nous pousse à étudier de plus près le rôle de ce composé chez ces plantes.

Les propriétés enzymatiques d'une  $\alpha$ -fenchol synthase ont été initialement déterminées à partir d'extraits protéiques bruts des feuilles de *Foeniculum vulgare* (Croteau *et al.*, 1980). L' $\alpha$ -fenchol synthase que nous décrivons est la deuxième TPS clonée et caractérisée fonctionnellement qui catalyse la formation de l' $\alpha$ -fenchol comme substance principale. Une seule autre  $\alpha$ -fenchol synthase a été décrite à ce jour, et ce dans une autre Lamiacée,

*Ocimum basilicum* (Iijima *et al.*, 2004b). Ce travail, qui présente des résultats assez similaires à ceux de notre étude, a montré que l' $\alpha$ -fenchol synthase *O. basilicum* synthétise *in vitro* de l' $\alpha$ -fenchol comme produit principal mais aussi de l' $\alpha$ -pinène, du limonène et un monoterpène non-identifié. Par contre, les séquences protéiques de nos  $\alpha$ -fenchol synthases ne sont similaires à cette  $\alpha$ -fenchol synthase d'*O. basilicum* qu'à 67 %. Les séquences protéiques de nos synthases sont plus proches (78 % d'identité) de celles de la limonène synthase et la linalol synthase clonées chez *L. angustifolia* (Landmann *et al.*, 2007) et de *L. latifolia* (GenBank), respectivement. Ces données signifient une fois de plus que la similarité des séquences toute seule ne fournit pas une indication certaine sur les propriétés catalytiques d'une TPS. Elle est par contre souvent une image miroir des liens phylogénétiques entre les plantes (Bohlmann *et al.*, 1998a).

L' $\alpha$ -pinène synthase des lavandres *Stoechas* découverte dans cette étude constitue la deuxième TPS de ce type à être clonée et caractérisée dans la famille des Lamiacées après celle de *Rosmarinus officinalis* (GenBank). Auparavant, d'autres  $\alpha$ -pinène synthases avaient été clonées et caractérisées depuis quatre Gymnospermes et trois Angiospermes (Bohlmann *et al.*, 1997 ; Trapp & Croteau, 2001a ; Lu *et al.*, 2002 ; McKay *et al.*, 2003 ; Phillips *et al.*, 2003 ; Martin *et al.* 2004 ; Chu *et al.*, 2009). La plupart de ces synthases produisent *in vitro* un mélange d' $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -pinène. Cependant, des  $\alpha$ -pinène synthases clonées des conifères produisent *in vitro* l' $\alpha$ -pinène en tant que produit principal sans le  $\beta$ -pinène (Phillips *et al.*, 2003 ; Chu *et al.*, 2009). En outre, une pinène synthase extraite directement des feuilles de *Salvia officinalis* est responsable de la synthèse *in vitro* de trois terpènes, (+)- $\alpha$ -pinène, (+)-limonène et (+)-camphène (Gambliel & Croteau, 1984). Les pinène synthases citées précédemment ont une similarité de séquence faible (25 - 42 %) avec nos  $\alpha$ -pinène synthases. Cependant, ces dernières, présentent une similarité de séquence beaucoup plus élevée avec la limonène synthase (74 %) et la linalol synthase (60 %) de *L. angustifolia* (Landmann *et al.*, 2007).

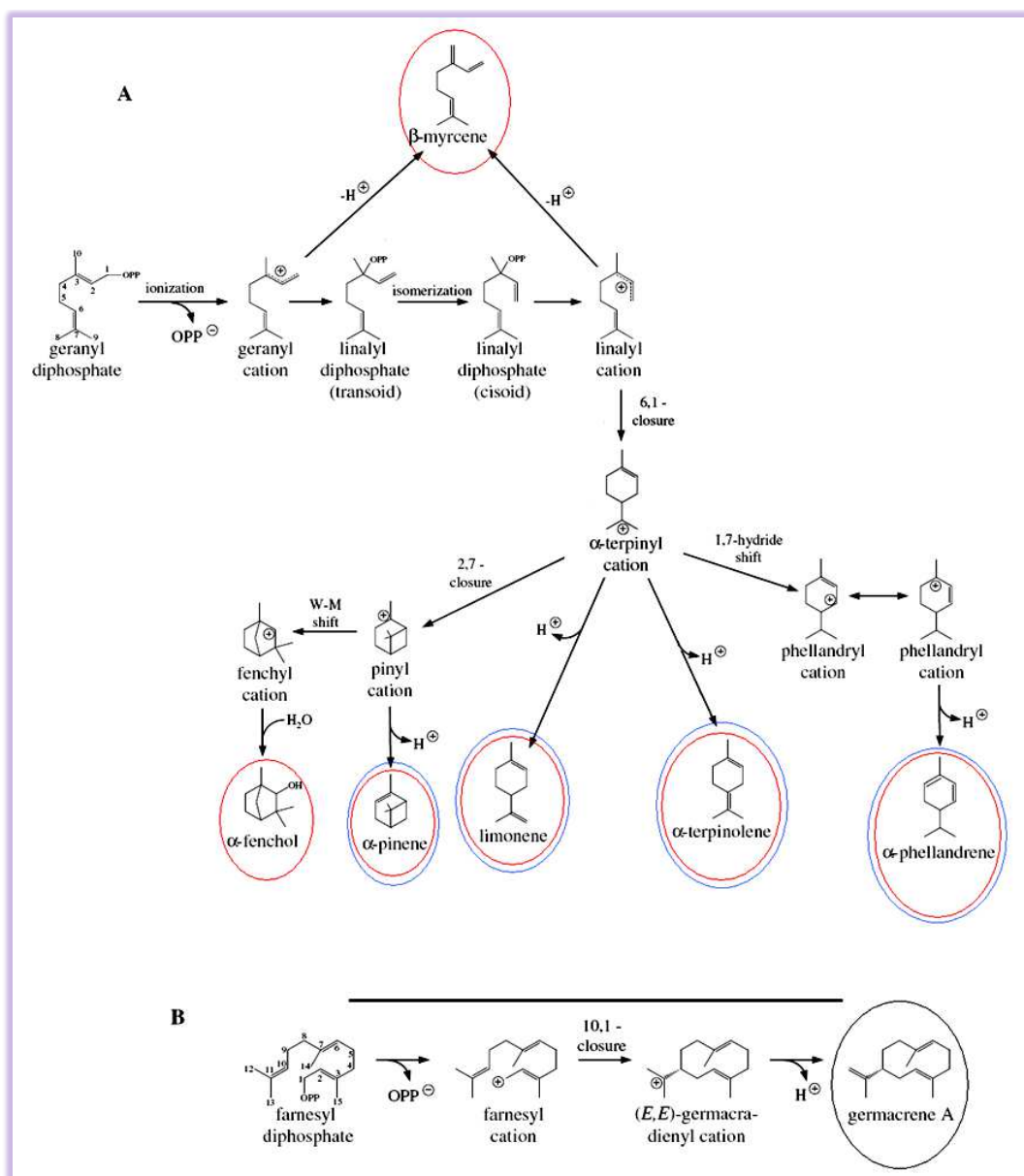
A ce jour, environ quatorze germacrène A synthases ont été isolées, clonées et caractérisées exclusivement depuis des Angiospermes : Astéracées, Vitacées et Lamiacées. Le premier rapport était celui sur la chicorée (*Cichorium intybus*) où deux germacrène A synthases ont été isolées, les deux catalysant exclusivement la formation du (+)-germacrène A (Bouwmeester *et al.*, 2002). Les germacrène A synthases des lavandes de cette étude, sont les deuxièmes signalées et clonées à partir des Lamiacées. La première était de *Pogostemon cablin* (Deguerry *et al.*, 2006). Ces germacrène A synthases comme

pour la plupart des autres germacrène A synthases catalysent *in vitro* la formation de germacrène A comme sesquiterpène unique (Bennette *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2005 ; Berteau *et al.*, 2006 ; Degurru *et al.*, 2006 ; Göpfert *et al.*, 2009, 2010 ; Majdi *et al.*, 2011). Exceptionnellement, deux germacrène A synthases de *Vitis vinifera* et *Solidago canadensis* produisent le germacrène A comme sesquiterpène majeur en parallèle avec d'autres sesquiterpènes secondaires (Prosser *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2010). D'autres TPSs, comme la 5-épi-aristolochène synthase (TEAS) (Back *et al.*, 1994 ; Starks *et al.*, 1997) et la vetispiradiène synthase (HVS) (Back & Chappell, 1995) sont capables de convertir le FPP en 5-épi-aristolochène et en vetispiradiène, respectivement, via la production du germacrène A comme intermédiaire catalytique lié à l'enzyme. En outre, d'autres TPSs synthétisent le germacrène A comme sesquiterpène secondaire. Citons à titre d'exemple, la germacrène C synthase de *Lycopersicon esculentum* (Colby *et al.*, 1998), la germacrène D synthase et la patchoulol synthase de *P. cablin* (Deguerry *et al.*, 2006), la  $\delta$ -selinène synthase d'*Abies grandis* (Steel *et al.*, 1998) et la  $\beta$ -cubebène synthase de *Magnolia grandiflora* (Lee & Chappell, 2008). Les protéines LpGEAS, LsGEAS et LvGEAS ont des identités de séquence faibles (36 - 46 %) avec les germacrène A synthase végétales citées précédemment sauf avec la germacrène A synthase de patchouli (*P. cablin*) et la TEAS du tabac avec qui elles ont des similarités de 64 % et 59 %, respectivement. D'autre part, contrairement à toutes les germacrène A synthases déjà connues, celles des lavandes *Stoechas* et de *P. cablin* sont plus courtes (-12 aa).

Les monoterpènes végétaux sont synthétisés dans les plastes après le transfert des monoTPSs du cytosol par leurs peptides de transit. Comme est montré dans la Figure 53A, les voies de la biosynthèse des monoterpènes débute par l'association de l'IPP et du DMAPP, générés depuis la voie du MEP, ce qui génère le GPP. Cette réaction enzymatique est réalisée par la GPP synthase. Les réactions catalysées par les TPSs sont initiées par l'assistance électrophile au clivage C-O des phosphoesters de diphosphate (Croteau, 1987 ; Cane, 1990). Le GPP, substrat des monoTPSs, est converti en cation de géranyle puis en cation de linalyle par l'intermédiaire très réactif, le LPP. La formation des monoterpènes acycliques pourrait se découler soit via l'intermédiaire cation de géranyle ou via le cation de linalyle. Les voies de biosynthèses de tous les monoterpènes cycliques passent par le cation d' $\alpha$ -terpinyle issu de la conversion du cation de linalyle (Bohlmann *et al.*, 1997). Le cation d' $\alpha$ -terpinyle est considéré comme l'intermédiaire unique central



dans la synthèse des monoterpènes cycliques. Depuis cet intermédiaire central, les voies de synthèse divergent, conduisant à la formation de monoterpènes hydrocarbonés et/ou monoterpènes hydroxylés. En effet, les carbocations peuvent subir une gamme d'isomérisation, de cyclisation, et de réarrangement avant que ces réactions ne soient achevées par des déprotonations ou par des captures d'eau conduisant au monoterpène final. De ce fait, les  $\alpha$ -fenchol synthases de lavandes *Stoechas* catalysent *in vitro* des réactions nécessitant la formation de plusieurs intermédiaires carbocationiques. Au cours de ces réactions, le GPP est converti en un seul monoterpène acyclique ( $\beta$ -myrcène) et cinq monoterpènes cycliques ( $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -phélladrène, limonène,  $\alpha$ -terpinolène et  $\alpha$ -fenchol) tandis que, les  $\alpha$ -pinène synthases catalysent *in vitro* la conversion du GPP en quatre monoterpènes cycliques ( $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -phéllandrène, limonène et  $\alpha$ -terpinolène). Le limonène et l' $\alpha$ -terpinolène dérivent directement de cation  $\alpha$ -terpinyl, alors que l' $\alpha$ -fenchol, l' $\alpha$ -pinène et l' $\alpha$ -phéllandrène sont indirectement formés via les cations fenchyle, pinyle et phéllandryle, respectivement (Figure 53A). Cependant, la synthèse du  $\beta$ -myrcène peut dériver soit du cation géranyle soit du cation de linalyle.



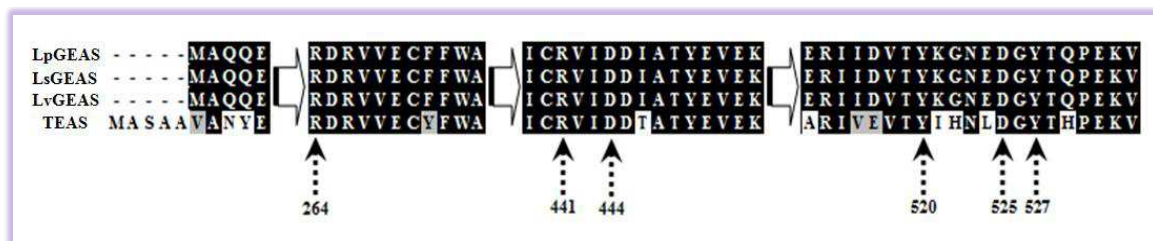
**Figure 53 : Proposition de fonctionnement des TPSs de lavandes *Stoechas* découvertes dans cette étude**

Ce schéma est adapté d'après Degenhardt *et al.* (2009). Les produits des TPSs de lavandes *Stoechas* découvertes dans cette étude sont placés dans des cercles de couleur différente selon les synthèses considérées : rouge pour FENS, bleu pour PINS et noire pour GEAS. A, monoterpènes formés par FENS et PINS. B, sesquiterpène formé par GEAS. OPP désigne le groupement diphosphate.

La biosynthèse des sesquiterpènes commence par la perte du pyrophosphate du FPP sous l'action enzymatique des sesquiTPSs. Dans ce processus, les germacrène A synthésés de lavandes *Stoechas* sont capables de former le germacrène A en catalysant la conversion du FPP en cation *E,E*-germacradienyle par une cyclisation entre le C1 et le C10 (Figure 53B). Ce carbocation est converti en germacrène A par déprotonation. Le germacrène A sert de substrat à la synthèse de nombreux métabolites secondaires. L'oxydation du

germacrène A, chez la chicorée, la laitue, la camomille et probablement aussi chez d'autres espèces végétales, conduit aux lactones sesquiterpéniques des classes germacranolides, eudesmanolides et guaianolides (de Kraker *et al.*, 1998, 2001 ; Bennette *et al.*, 2002 ; Majdi *et al.*, 2011). Ces métabolites secondaires végétaux (lactones sesquiterpéniques) sont principalement produits par les Astéracées ainsi que chez d'autres familles, y compris les Lamiacées (Ammon, 2004). En outre, le germacrène A est sensible aux conditions légèrement acides, où des cyclisations chimiques spontanées sont induites pour produire le selina-4,11-diène, l' $\alpha$ -selinène et le  $\beta$ -selinène (de Kraker *et al.*, 1998). Ces deux dernières substances sont présentes dans les profils terpéniques des trois lavandes *Stoechas* à l'exception de l'absence de l' $\alpha$ -selinène chez *L. pedunculata*. L' $\alpha$ -selinène et le  $\beta$ -selinène avaient déjà été détectés dans les profils d'HEs de *L. stoechas* et *L. viridis* (Nogueira & Romano, 2002 ; Angioni *et al.*, 2006 ; Benabdelkader *et al.*, 2011). Donc, très probablement, le germacrène A représente la source d' $\alpha$ -selinène et  $\beta$ -selinène. La TEAS est une TPS de tabac capable de convertir le FPP en germacrène A qui reste attaché à l'enzyme. Les séquences protéiques des germacrène A synthases des lavandes *Stoechas* ont une identité relativement élevée avec la TEAS (59 %). Comme la structure cristalline de la TEAS a été établie, il est utile de comparer les séquences des germacrène A synthases de lavandes *Stoechas* avec celle de la TEAS. Comme indiqué dans la Figure 54, plusieurs acides aminés dans la séquence de la TEAS ont été proposés pour être impliqués dans la formation de l'intermédiaire germacrène A ainsi que sa cyclisation supplémentaire. Par exemple, dans la séquence protéique de la TEAS les résidus R264 et R441 sont impliqués en partie dans la liaison du Mg et dans l'ionisation du diphosphate en parallèle avec le résidu D525 engagé dans l'élimination du proton en C13 du cation germacradienyle (Starks *et al.*, 1997). Les résidus Y520, D444 et D525 ont été montrés pour être les responsables de la cyclisation supplémentaire du germacrène A en 5-*epi*-aristolochène par la TEAS (Starks *et al.*, 1997 ; Rising *et al.*, 2000). En outre, Prosser *et al.* (2002) ont suggéré que le remplacement de la tyrosine (position 527 en TEAS) par la leucine dans la germacrène A synthase de la verge d'or déstabilise le cation germacradienyle conduisant à mettre fin à la réaction en stade germacrène A. L'ensemble de ces résidus actifs sont présents dans les germacrène A synthases des lavandes *Stoechas* (Figure 54), sauf que le germacrène A est formé en tant que produit enzymatique final. Cette comparaison n'a pas pu révéler une différence évidente qui pourrait expliquer la cessation de la réaction en germacrène A. Probablement d'autres différences entre la TEAS et les germacrène A synthases de

lavandes peuvent affecter le mécanisme réactionnel. Des données supplémentaires proviendront de la mutagenèse dirigée des germacrène A synthases de lavandes *Stoechas*.



**Figure 54 : Résidus d'acides aminés impliqués dans la formation de l'intermédiaire germacrène A et sa cyclisation additionnelle par la TEAS**

Les flèches désignent la position des résidus d'acides aminés impliqués dans la formation de l'intermédiaire germacrène A et de son cyclisation additionnelle par la TEAS

Les variations observées lors de l'analyse RT-PCR semi-quantitative (Figure 51) de l'expression des gènes de TPS de lavandes *Stoechas* sont corrélées en partie avec la teneur en constituants produits par ces TPSs dans les fractions volatiles de feuilles de ces lavandes. Chez les trois lavandes *Stoechas* le gène d' $\alpha$ -fenchol synthase est en relation directe et partielle avec la variation chémotypique. Ce gène présente des variations d'expression très élevées entre les trois lavandes. Le niveau d'expression très élevé du gène de l' $\alpha$ -fenchol synthase (*LpFENS*) chez les feuilles de *L. pedunculata* (Figure 51) indique la grande capacité à produire une grande quantité d' $\alpha$ -fenchol, apparemment très rapidement oxydé en fenchone car *L. pedunculata* possédait un niveau très élevé en fenchone (chémo type fenchone). Par contre, le niveau très bas de l'expression de ce gène (*LsFENS*) remarqué dans les feuilles de *L. stoechas* (Figure 51) corrèle avec les petites quantités de fenchol/fenchone chez cette espèce à chémo type camphre. D'autre part, lors de cette analyse RT-PCR, l'impossibilité de détecter les ARNm d' $\alpha$ -fenchol synthase (*LvFENS*) dans les feuilles de *L. viridis* à 25 cycles indique que la quantité de transcrits de ce gène est très faible (Figure 51). Cependant, les transcrits de l' $\alpha$ -fenchol synthase sont détectés à très bas niveau à 40 cycles de PCR dans les feuilles de *L. viridis* en contradiction avec le profil en composés volatils qui montrent une absence totale d' $\alpha$ -fenchol et fenchone. De ce fait, on peut conclure que le gène d' $\alpha$ -fenchol synthase est régulé différemment au niveau transcriptionnel au sein du complexe d'espèces *L. stoechas Sensu Lato*, expliquant ainsi les présences et absences de chémo type fenchone au sein des différentes espèces le constituant.

Enfin, compte tenu des résultats de l'analyse semi-quantitative et de l'affinité taxonomique entre ces trois lavandes (section *Stoechas*), nous pouvons suggérer que les activités des trois TPSs clonées ici sont, en partie, régulées au niveau transcriptionnel. Cette suggestion est en accord avec d'autres études sur les TPSs végétales. Ces études ont prouvé dans divers modèles expérimentaux que l'activité des TPSs est régulée au niveau transcriptionnel. Par exemple, Lane *et al.*, (2010) ont établi une relation directe entre le niveau des transcrits de la *LaLINS* et la quantité de linalol dans l'HE de fleurs de *L. angustifolia*. Boeckelmann (2008) a signalé une augmentation concertée de l'accumulation des transcrits de la *LaLINS* et du linalol (produit de la *LaLINS*) dans les plantes *L. angustifolia* et *L. x intermedia* pendant la floraison. De bonnes corrélations ont été mesurées entre la composition des HEs et les concentrations, relatives et absolues, des transcrits des TPSs chez différentes lignées d'*Origanum vulgare* (Crocoll *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont été également signalés dans d'autres espèces (Turner *et al.*, 1999, 2000b ; Gershenzon *et al.*, 2000 ; McConkey *et al.*, 2000 ; Sharon-Asa *et al.*, 2003 ; Dudareva *et al.*, 2005 ; Tholl, 2006 ; Nagegowda *et al.*, 2008 ; Nagegowda, 2010). Peters & Croteau (2004) suggèrent que le fonctionnement du métabolisme secondaire des plantes est le plus souvent régulé au niveau de la transcription.

**CHAPITRE IV**  
**CONCLUSION**  
**ET PERSPECTIVES**

Mon travail de thèse s'est inscrit dans le cadre des travaux de recherche menés par deux laboratoires, le laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et valorisation de la biomasse (ENS, Alger) et le laboratoire de biotechnologies végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales (UJM, Saint Etienne). Le premier laboratoire dirige ces efforts vers l'évaluation des activités biologiques des produits naturels, tandis que le deuxième laboratoire focalise ces axes de recherche sur les voies de biosynthèse des terpènes. L'objectif de mon travail a été d'étudier la bioactivité et la biodiversité chimique des huiles essentielles de lavandes du complexe d'espèces *L. stoechas Sensu Lato*.

Lors de cette étude, nous avons, dans un premier temps, procédé à l'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles (HEs) des parties aériennes fleuries de onze populations de *L. stoechas* en croissance naturelle en Algérie. Nous avons tout d'abord augmenté la connaissance sur la nature chimique, et la variabilité, des composés volatils constituant les HEs de *L. stoechas*. Ensuite, nous avons évalué le potentiel antioxydant et antimicrobien de ces HEs.

L'analyse chimique des composés volatils des parties aériennes fleuries de ces plantes a été effectuée par GC/FID et GC/MS. Pour ces échantillons, nous avons constaté une variabilité chimique importante des constituants de l'HE, notamment par la présence, à la fois des HEs dominées par le fenchone (10 populations), mais également d'une HE riche en camphre (une population) contenant en deuxième lieu le fenchone. Ces HEs sont caractérisées aussi par la présence importante de 1,8-cinéol et viridiflorol en parallèle avec une grande biodiversité (au total 121 composés identifiés) et variation qualitative et quantitative de tous les constituants dans les différents échantillons. Ainsi, 54 composés volatils rapportés ici n'avaient jamais été signalés auparavant dans les HEs de *L. stoechas* à travers le monde. Les HEs que nous avons extraites à partir des populations sauvages de *L. stoechas* font preuve d'une grande diversité dans la composition qui affecte des constituants majeurs et mineurs. Les connaissances acquises sur leur composition élargissent d'avantage les connaissances actuelles sur la gamme de diversité des composés organiques volatils dans cette espèce avec la première détection de plusieurs constituants mineurs. Avec sa grande biodiversité chimique, nous confirmons que *L. stoechas* est une très bonne source de matériel végétal pour une large gamme de molécules bioactives. Néanmoins, notre étude confirme également que les variations dans le contenu de composants majeurs de l'HE de *L. stoechas* ne sont pas limités aux (et peut ne pas correspondre) événements évolutifs connus tels que les radiations ou la sous-spéciation, car

l'origine du rayonnement, de la diversification et l'emplacement actuel de la biodiversité des sous-espèces ont été clairement assignés en Espagne (Upson & Andrews, 2004). Des grandes différences de composition peuvent être observées sur une échelle géographique fine de sorte qu'un échantillonnage dense de plantes individuelles sur une petite partie de l'aire de répartition de cette espèce, comme l'Algérie, contient déjà une part de la diversité chimique de l'espèce entière et peut être utilisée pour alimenter des programmes de développement variétaux.

L'activité antioxydante des HEs des 11 populations de *L. stoechas* a été évaluée et comparée en utilisant les méthodes suivantes : la méthode de DPPH et la méthode du  $\beta$ -carotène/acide linoléique. On a remarqué que les 11 HEs ont montré des différences significatives d'activité antioxydante en relation étroite avec la variation de leur composition chimique. Généralement, ces HEs ont présenté une activité antioxydante. Elle était cependant faible par comparaison aux antioxydants de référence (BHT et  $\alpha$ -tocophérol). Les données de cette activité antioxydante, rapportée pour la première fois dans cette étude, suggèrent que cette activité de différentes HEs de *L. stoechas*, en dépit de son potentiel relativement faible, peut être intéressante du fait de la diversité des substances actives. Toutes ces substances étaient présentes en quantités très faibles (le plus souvent inférieures à 0.3 % de la teneur totale de l'huile), si bien que nos huiles les plus actives étaient celles qui contenaient le plus grand nombre de molécules bioactives. Parce que notre échantillonnage a été fait sur une petite zone géographique, cette analyse souligne à nouveau l'extraordinaire biodiversité de *L. stoechas* en termes de matériel source de substances bioactives. Elle suggère également que les HEs accumulées dans les populations sauvages contiendront un ensemble plus large de molécules antioxydantes par rapport à celles produites à partir d'un seul clone cultivé.

L'activité antimicrobienne (CMI) des 11 HEs de *L. stoechas* a été évaluée *in vitro* envers onze microorganismes pathogènes (bactéries Gram plus, bactéries Gram négatives, champignons filamenteux et levures reconnues pour leur impact clinique, sanitaire et économique). En parallèle avec l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne des 11 HEs de populations algériennes a été très variable à travers les populations en relation avec la variation en composition chimique. Généralement, toutes les 11 HEs étaient efficaces envers tous les microorganismes notamment les HEs extraites de *L. stoechas* de la région de Boumerdes (LS3) et de la région de Bouira-Guerrouma (LS6). Les différents travaux, réalisés au cours de cette évaluation, ont permis de mettre en avant les propriétés



antibactériennes et antifongiques de ces HEs en lien avec leurs constituants contre plusieurs bactéries et champignons pathogènes. L'activité antimicrobienne appréciable de l'HE de *L. stoechas* algérienne, rapportée ici pour la première fois, a validé l'utilisation traditionnelle de l'HE de cette espèce en tant que drogue antiseptique en Algérie et dans certaines régions méditerranéennes. Néanmoins, certaines populations se sont avérées être de meilleures sources de matériaux bioactifs (populations LS3 et LS6) envers un large panel de microorganismes et peuvent donc avoir un plus grand potentiel applicatif dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et de protection des cultures. Toutes ces informations témoignent du potentiel que présentent les HEs pour la recherche de molécules antimicrobiennes innovantes dans leur mode d'action.

Nous nous sommes intéressés dans un deuxième temps aux composés organiques volatils (COVs) des feuilles de trois lavandes *Stoechas*, *L. pedunculata*, *L. stoechas* et *L. viridis*, qui sont très voisines d'un point de vue botanique au sein du genre *Lavandula*. Elles font partie de la même section botanique (section *Stoechas*) et ont été considérées jusque récemment comme des sous-espèces de la même espèce, *L. stoechas*. Une analyse par GC/MS d'extraits hexane des COVs de feuilles de pieds individuels a permis d'identifier 124 composés, parmi lesquels nous trouvons une majorité de molécules monoterpéniques oxygénés. Nous avons mis en évidence une variation de la teneur des principaux COVs entre les trois lavandes étudiées en accord avec les variations chémotypiques connues au niveau interspécifique dans chacune de ces espèces. Les trois pieds que nous avons sélectionnés correspondent à un chémotype fenchone (*L. pedunculata*), un chémotype camphre (*L. stoechas*) et un chémotype 1,8-cinéol (*L. viridis*). Les différences de COVs entre les 3 pieds des 3 espèces que nous avons sélectionnés étaient surtout importantes au niveau des sesquiterpènes qui constituent la deuxième classe de composants après les monoterpènes.

Au cours des cinq dernières décennies, un vaste ensemble de littérature a été généré au sujet des voies de biosynthèse des terpènes et, notamment, des terpènes synthases (TPS), une famille d'enzymes qui est responsable de la diversification de leur squelette carboné. Ceci est le résultat de la recherche de nombreux groupes à travers le monde, travaillant sur les rôles et la distribution des composés terpéniques dans la nature, leur importance dans les cultures agronomiquement importantes et leur utilisation dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Il y a aussi eu beaucoup de recherches sur la relation structure-fonction des TPSs. Nous disposons ainsi d'une meilleure compréhension

de la façon dont ces enzymes ont évolué, de comment elles peuvent être manipulées à des fins commerciales pour la médecine et les secteurs de production agronomique. Toutefois, il reste encore beaucoup à apprendre sur l'évolution de la famille des TPSs, les subtilités du fonctionnement des TPS et les mécanismes par lesquels la production des terpènes par ces enzymes est contrôlée. Dans ce contexte, mon travail de thèse a contribué à élargir les connaissances actuelles sur les voies de biosynthèse des terpènes chez les Lamiacées en caractérisant dans un premier temps trois nouvelles enzymes à activité terpène synthase, impliquées dans les voies de biosynthèse des terpènes chez les lavandes *Stoechas*. Dans cette étude, nous avons réussi à cloner, séquencer et caractériser fonctionnellement trois nouvelles TPSs depuis les feuilles de *L. Pedunculata* ainsi que leurs orthologues chez *L. stoechas* et *L. viridis*. L'utilisation d'amorces dégénérées nous a permis d'isoler trois ADNc de TPSs distincts de *L. pedunculata* (*LpFENS*, *LpFENS* et *LpGEAS*). Nous avons ensuite isolé leurs homologues respectifs avec des amorces spécifiques chez *L. stoechas* (*LsFENS*, *LsPINS* et *LsGEAS*) et chez *L. viridis* (*LvFENS*, *LvPINS* et *LvGEAS*). Ces gènes étaient présents en copies uniques dans ces trois espèces. Tous les éléments structuraux tels que les motifs caractéristiques des TPSs (e.g. RRx8W, DDxxD, NTE/NSE) sont présents et suggèrent que ces ADNc encodent potentiellement des TPSs fonctionnelles. Ainsi, l'expression hétérologue de ces TPSs dans *E. coli* (Rosetta (DE3) pLysS) nous a permis de confirmer l'analyse des séquences. Les gènes des groupes FENS (*LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS*) et PINS (*LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS*) encodent des monoTPSs actives qui catalysent *in vitro* la formation de plusieurs monoterpènes cycliques et/ou acycliques avec la dominance respective d' $\alpha$ -fenchol et d' $\alpha$ -pinène. Ceux du groupe GEAS (*LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS*) encodent des TPSs actives qui catalysent la formation d'un sesquiterpène cyclique unique, le germacrène A. Ainsi, l'analyse des produits enzymatiques par GC/MS des TPSs que nous avons découvertes a conduit à leur identification fonctionnelle en tant qu' $\alpha$ -fenchol synthases (*LpFENS*, *LsFENS* et *LvFENS*),  $\alpha$ -pinène synthases (*LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS*) et germacrène A synthases (*LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS*). Tous les trois types de TPSs sont exprimés différemment dans les feuilles de chacun des pieds de lavande *Stoechas* que nous avons analysés précédemment en corrélation avec la teneur de leurs composés associés dans la source végétale. Cela nous a permis de conclure que les activités de ces TPSs sont principalement régulées au stade transcriptionnel. Une analyse phylogénétique de nos TPSs de lavandes *Stoechas* en présence d'un panel représentatif de TPSs déjà caractérisées dans d'autres

espèces végétales, les place dans deux clusters distincts correspondant dans deux sous-familles distinctes. *LpFENS*, *LsFENS*, *LvFENS*, *LpPINS*, *LsPINS* et *LvPINS* se classent dans la sous-famille TPSb et *LpGEAS*, *LsGEAS* et *LvGEAS* sont dans la sous-famille TPSa. Les séquences connues les plus proches de nos protéines FENS et PINS étaient des TPSs d'autres genres de lavandes bien que celles-ci aient des activités enzymatiques différentes (limonène synthase et linalol synthases de *L. latifolia* et *L. angustifolia*). La caractérisation fonctionnelle de nos trois nouvelles activités TPSs chez les lavandes fournit des ressources nouvelles pour les recherches sur le métabolisme des terpènes spécialement chez les espèces *Lavandula* et, plus généralement, chez les plantes supérieures. Nous rapportons en effet ici pour la première fois trois séquences de TPSs jamais publiées pour le genre *Lavandula*. Il s'agit aussi de la seconde description d'une activité  $\alpha$ -fenchol synthase chez les plantes et germacrène A synthase chez les Lamiacées.

Des études complémentaires pourront être envisagées dans plusieurs domaines.

- ✚ Les terpènes, en tant qu'un large groupe de produits naturels, constituent une riche source de molécules naturelles pour la découverte de nouveaux médicaments et composés bioactifs d'intérêt. Cela a été illustré par un sesquiterpène antipaludique, l'artémisinine et par un diterpène anticancéreux, le taxol. Tous deux sont issus de plantes et sont utilisés en médecine traditionnelle. Dans ce contexte, l'effet antimicrobien des HEs de *L. stoechas* devra également être exploré sur un spectre plus large de microorganisme en utilisant plusieurs méthodes d'évaluation. Il est indispensable d'évaluer la toxicité de cette HE sur l'homme pour éviter tout problème d'effet secondaire. Il serait, en ce sens, utile d'envisager de préciser la nature du (ou des) composé(s) responsable(s) de cette activité par un fractionnement mené en parallèle de tests biologiques (bioguidage). Après ces nombreux tests, cette HE à activité antimicrobienne pourra servir de base au développement de nouveaux antibiotiques afin de contribuer à élargir l'arsenal thérapeutique dont nous disposons pour lutter contre le problème récurrent de la résistance microbienne aux antibiotiques.
- ✚ Les trois enzymes de TPS décrites ici, pour chaque lavande, avec leur activité *in vitro* ne semblent pas suffisantes pour expliquer l'accumulation de tous les terpènes dans les feuilles de ces lavandes. La présence de grandes quantités de camphre et de

1,8-cinéol en parallèle avec d'autres mono- et sesquiterpènes dans les feuilles des lavandes *Stoechas*, implique certainement le fonctionnement d'autres TPSs. Parmi ces TPSs, citons en particulier la 1,8-cinéol synthase et la bornyl diphosphate synthase. Des études complémentaires sont nécessaires comme complément d'enquête dans la production des terpènes volatils et ainsi que dans la variation chémotypique dans les lavandes *Stoechas* en parallèle avec l' $\alpha$ -fenchol synthase identifiée dans le présent travail. Cela sera facilité lorsque les informations de séquences des génomes ou des banques d'EST de ces espèces de lavandes seront disponibles. Le séquençage du génome entier conduira à la découverte d'autres gènes clés dans la biosynthèse des terpènes. La compréhension de l'expression des gènes du genre *Lavandula* de la biosynthèse de l'HE en relation avec le métabolisme de l'HE pourrait générer des informations essentielles concernant la régulation de la biosynthèse des HEs chez les plantes supérieures.

- ✚ Les analyses GC/MS de l'activité *in vitro* des neuf TPSs de lavandes *Stoechas* ont montré qu'il s'agissait de trois types d'activité,  $\alpha$ -fenchol synthase,  $\alpha$ -pinène synthase et germacrène A synthase. Cependant, la fonction *in vivo* de ces TPSs n'a pas été démontrée. L'analyse de COVs produits par des plantes déficientes dans l'expression de ces gènes permettrait de répondre à cette question. Des protocoles de transformation génétique de ces espèces ne sont cependant pas disponibles.
- ✚ L'absence de relation directe entre l'expression des gènes de germacrène A synthase et de l'accumulation du germacrène A dans les feuilles des lavandes *Stoechas* appelle à la poursuite des recherches pour lever cette ambiguïté. Des recherches complémentaires pourraient avoir pour but de tester l'utilisation du germacrène A dans le métabolisme terpénique de ces plantes.
- ✚ Des expériences de mutagenèse dirigée sur les gènes des groupes FENS et PINS permettraient de mieux comprendre comment ces enzymes sont capables de réaliser des structures bicycliques de type  $\alpha$ -fenchol et  $\alpha$ -pinène. Les séquences des polypeptides correspondant sont en effet proches entre elles mais aussi proches de celles de TPSs d'autres genres de lavande synthétisant des produits monocycliques (limonène) ou linéaires (linalol). L'usage des nombreuses structures cristallographiques de TPSs disponibles et la haute conservation des structures secondaires et tertiaires dans cette famille d'enzymes devrait faciliter le choix des acides aminés à cibler dans une telle étude.

# BIBLIOGRAPHIE

## -A-

- Abbott, E., Hall, D. et al. (2010). Laser microdissection of conifer stem tissues: isolation and analysis of high quality RNA, terpene synthase enzyme activity and terpenoid metabolites from resin ducts and cambial zone tissue of white spruce (*Picea glauca*). *BMC Plant Biol.* **10**, 106-122.
- Aburjai, T., Hudiab, M. et al. (2005). Chemical composition of the essential oil from different aerial parts of lavender (*Lavandula coronopifolia* Poier) (Lamiaceae) grown in Jordan. *J. Essent. Oil Res.* **17**, 49-51.
- Adam, K. P. and Zapp, J. (1998). Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry* **48**, 953-959.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Adamson, G. E., Lazarus, S. A. et al. (1999). HPLC method for the quantification of procyanidins in Cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 4184-4188.
- Adzet, T., Granger, R. et al. (1977). Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus* : sa signification taxonomique. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**, 269-272.
- AFNOR. (1996). *Huiles essentielles, recueil de normes françaises*. AFNOR, Paris La Défense, France.
- Afsharypuor, S. and Jahromy, M. M. (2003). Constituents of the essential oil from *Tanacetum lingulatum* (Boiss.) Bornm. *J. Essent. Oil Res.* **15**, 74-76.
- Agranoff, B. W., Eggerer, H. et al. (1960). Biosynthesis of terpenes. *J. Biol. Chem.* **235**, 326-332.
- Agricultural Research Service. (2000). Dr Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. <http://www.ars-grin.gov/duke/>.
- Aharoni, A., Giri, A. P. et al. (2004). Gain and Loss of Fruit Flavor Compounds Produced by Wild and Cultivated Strawberry Species. *Plant Cell.* **16**, 3110-3131.
- Aharoni, A., Giri, A. P. et al. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell.* **15**, 2866-2884.
- Ait-Ali, T., Swain, S. M. et al. (1997). The *LS* locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme *ent*-kaurene synthase A. *Plant J.* **11**, 443-454.
- Akers, C. P., Weybrew, J. A. et al. (1978). Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Am. J. Bot.* **65**, 282-292.
- Alchanati, I., Patel, J. A. A. et al. (1998). The enzymatic cyclization of nerolidyl diphosphate by delta cadinene synthase from cotton stele tissue infected with *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry* **47**, 961-967.
- Aliagiannis, N., Kalpotzakis, E. et al. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agr. Food Chem.* **40**, 4168-4170.
- Alma, M. H., Nitz, S. et al. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.), *J. Agr. Food Chem.* **52**, 3911-3914.
- Alonso, W. R. and Croteau, R. (1993). Prenyltransferases and cyclases. *Methods Plant Biochem.* **9**, 239-260.
- Altschul, S. F., Madden, T. L. et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**(17), 3389-3402.

- Alvaez-Castellanos, P. P. and Pascual-Viilalobos, M. J. (2003). Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum caronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Ind. Crops Prod.* **17**, 77-81.
- Amaral-Franco, J. (1984). *Nova flora de Portugal*, (Continente e Acores). Vol II. Lisboa: Sociedade Astoria Ltd.; p. 505. [Translation of flora Europaeae II and IV. Tutin, T.G., Heywood, V.W., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. and Webb, D.A. editors. Cambridge: Univ. Press.].
- Amelunxen, F. (1965). Elektromikroskopische Untersuchungen an den Drüsenhäutchen von *Mentha piperita* L. *Planta Med.* **13**, 457-473.
- Amelunxen, F., Wahlig, T. et al. (1969). Über den Nachweis des ätherischen Öls in isolierten Drüsenhaaren und Drüsenhäutchen von *Mentha piperita* L. *Z Pflanzenphysiol.* **61**, 68-72.
- Ammon, H. P. T. (2004). *Hunnius-Pharmazeutisches Wörterbuch*. De Gruyter, Berlin, 2004.
- An, M., Haig, T. et al. (2001). On-site field sampling and analysis of fragrance from living Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **917**, 245-250.
- Angioni, A., Barra, A. et al. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agr. Food Chem.* **54**(12), 4364-4370.
- Arabaci, O. and Bayram, E. (2005). Populations of *Lavandula stoechas* L. evaluation of chemical composition, essential oil and morphological traits in wild in the Mediterranean environment. *Asian J. Chem.* **18**(1), 371-380.
- Arretz, M., Schneider, H. et al. (1991). Processing of mitochondrial precursor proteins. *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 403-412.
- Arigoni, D., Eisenreich, W. et al. (1999). Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **96**, 1309-1314.
- Arimura, G., Huber, D. P. W. et al. (2004a). Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, *PtdTPS1*. *Plant J.* **37**, 603-616.
- Arimura, G., Ozawa, R. et al. (2004b). Herbivore induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **135**, 1976-1983.
- Assad, Y. O. H., Torto, B. et al. (1997). Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Phytochemistry* **44**, 833-841.
- Ascensao, L. and Pais, M. S. (1998). The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, ultrastructure and secretion. *Ann. Bot.* **81**, 263-271.
- Ascensao, L., Marques, N. et al. (1997). Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *Int. J. Plant. Sci.* **158**, 249-258.
- Ashby, M. and Edwards, P. (1990). Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164.
- Asimgil, A. (1997). *Sifali Bitkiler*. İstanbul: Timas Yayınları. pp. 147-148.

-Aubourg, S., Lecharny, A. et al. (2002). Genomic analysis of the terpenoid synthase (*AtTPS*) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genomics*. **267**, 730-745.

### -B-

- Back, K. and Chappell, J. (1995). Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to related terpene cyclases. *J. Biol. Chem.* **270**, 7375-7381.
- Back, K., Yin, S. et al. (1994). Expression of a plant sesquiterpene cyclase gene in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**(2), 527-532.
- Baldovini, N., Muselli, A. et al. (1998). Chemical variability of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* from Corsica. *Riv. Ital. EPPOS*, 773-780.
- Baldovini, N., Lavoine-Hanneguelle, S. et al. (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry* **66**, 1651-1655.
- Bartley, G. E. and Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*. **7**, 1027-1038.
- Bauer, K., Garbe, D. et al. (1990). *Common Fragrance and Flavor Materials*, VCH Publishers, New York.
- Baytop, T. (1999). *Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present)*. No. 3255 (2nd ed., pp. 244-245). Istanbul: Publications of the Istanbul University.
- Becerra, J. X. (2007). The impact of herbivore-plant coevolution on plant community structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7483-7488.
- Bednarek, P. and Osbourn, A. (2009). Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* **324**, 746-748.
- Bellakhdar, J., Berrada, M. et al. (1985). Etude chimique comparative des huiles essentielles de dix populations de *Lavandula multifida* L. *Al Biruniya* **1**, 95-106.
- Benabdelkader, T., Zitouni, A. et al. (2011). Essential Oils from Wild Populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Composition, Chemical Variability, and *in vitro* Biological Properties. *Chem. Biodivers.* **8**(5), 937-953.
- Ben Arafa A., Combes S. et al. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 149-154.
- Benjilali, B., Sarris, J. et al. (1982). *Sci. Aliments* **2**, 515.
- Bennett, M. H., Mansfield, J. W. et al. (2002). Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Phytochemistry* **60**, 255-261.
- Bensen, R. J., Johal, G. S. et al. (1995). Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell*. **7**, 75-84.
- Bernard-Dagan, C. (1988a). *Biosynthesis of lower terpenoids: genetic and physiological controls in woody plants*. In Hanover, J.W., Keathly, D.E., Wilson, C.M. and Kuny, G. (eds.), *Genetic manipulation of woody plants*, New York, (USA): Plenum. - ISBN 03-064-28156. pp. 329-351
- Bernard-Degan, C. (1988b). *Seasonal variations in energy sources and biosynthesis of terpenes in maritime pine*. In W. J. Mattson, J. Levieux and C. Bernard-Degan. (eds.), *Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects*. Springer, New York. pp. 93-116.
- Berteau, C. M., Voster, A. et al. (2006). Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: Cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library. *Arch. Biochem. Biophys.* **448**, 3-12.



- Bicchi, C. and Pisciotta, A. (1990). Use of two-dimensional gas chromatography in the direct enantiomer separation of chiral essential oil components. *J. Chromatogr. A* **508**, 341-348.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J. et al. (1993). *The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis* **14**, 1023-1031.
- Bochar, D. A., Friesen, J. A. et al. (1999). *Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA*. In Cane, D. (eds.), *Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Vol. 2. New York: Pergamon Press, pp, 15-44.
- Boeckelmann, A. (2008). *Monoterpene production and regulation in lavenders (Lavandula angustifolia and Lavandula x intermedia)*. Okanaga, University of British Columbia. Master of Science.
- Boelens, M. H. (1995). Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* Oils. *Perfum. Flavor*. **20**, 23-51.
- Boelens, M. H. and van Gemert, L. J. (1993). Volatile character-impact sulfur compounds and their sensory properties. *Perfum. Flavor*. **18**, 29-39.
- Bohlmann, J. and Croteau, R. (1999). *Diversity and variability of terpenoid defenses in conifers: molecular genetics, biochemistry and evolution of the terpene synthase gene family in grand fir (Abies grandis)*. In Chadwick, D.J. and Goode, J.A. (eds.), *Insect Plant Interactions and Induced Plant Defense*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp 132-146.
- Bohlmann, J. and Keeling, C. I. (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant J*. **54**, 656-669.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. et al. (1998a). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4126-4133.
- Bohlmann, J., Steele, C. L. et al. (1997). Monoterpene synthases from Grand fir (*Abies grandis*) - cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S,5S)-pinene synthase. *J. Biol. Chem.* **272**, 21784-21792.
- Bohlmann, J., Crock, J. et al. (1998b). Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6756-6761.
- Bohlmann, J., Phillips, M. et al. (1999). cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the Tpsd gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 232-243.
- Bohm, H., Boeing, H. et al. (1998). Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z. Ernährungswissenschaft* **37**(2), 147-63.
- Bosabalidis, A., and Tsekos, I. (1982a). Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. *Protoplasma* **112**, 55-62.
- Bosabalidis, A., and Tsekos, I. (1982b). Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. II. Development of the essential oil accumulating central space of the gland and process of active secretion. *Protoplasma* **112**, 63-70.
- Boucard, G. R. and Serth, R. W. (1991). A Continuous Steam Stripping Process for the Distillation of Essential Oils. *Perfum. Flavor*. **16**, 1-8.
- Bourett, T. M., Howard, R. J. et al. (1994). Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *Int. J. Plant. Sci.* **155**, 623-632.

- Bousmaha, L., Atik Bekkara, F. et al. (2005). Advanced in the chemical composition of *Lavandula dentata* L. essential oil from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* **17**, 292-295.
- Bousmaha, L., Boti, J. B. et al. (2006). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *Flavour Fragr. J.* **21**, 368-372.
- Bouvier, F., Rahier, A. et al. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant Isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* **44**, 357-429.
- Bouwmeester, H. J., Kodde, J. et al. (2002). Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiol.* **129**(1), 134-144.
- Bouwmeester, H. J. (2006). Engineering the essence of plants. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1359-1361.
- Bouzouita, N., Kachouri, F. et al. (2005). Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia. *J. Essent. Oil Res.* **17**, 584-586.
- Bowers, W. S. (1991). *Insect hormones and antihormones in plants*. In Rosenthal, G.A. and Berenbaum, M.R. (eds.), *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, San Diego, Calif, pp. 431-456.
- Bowers, W. S., Tomihisha, O. et al. (1976). Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. *Science* **193**, 542-547.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. et al. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Brocks, J. J., Logan, G. A. et al. (1999). Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* **285**, 1033-1036.
- Brown, J. T., Hegarty, P. K. et al. (1987). The toxicity of monoterpenes to plant cell cultures. *Plant Sci.* **48**, 195-201.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 2<sup>ème</sup> édition. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 915 p.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (2<sup>ème</sup> édition). Technique et documentation-Lavoisier, Paris. 915p.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L. et al. (1991). Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z. Naturforsch. C.* **46**, 1067-1072.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 223-253.
- Busso, D., Delagoutte-Busso, B. et al. (2005). Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **343**, 313-321.

### -C-

- Cai, Y, Jia, J. W. et al. (2002). A cDNA clone for  $\beta$ -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* **61**, 523-529.
- Caillet, S. and Lacroix, M. (2007). Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- Caissard, J. C., Meekijironenroj, A. et al. (2004). Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *Am. J. Bot.* **91**, 1190-1199.

- Camara, B. and Brangeon, J. (1981). Carotenoid metabolism during chloroplast to chromoplast transformation in *Capsicum annum* fruit. *Planta* **151**, 359-364.
- Cane, D. E. (1990). Enzymatic formation of sesquiterpenes. *Chem. Rev.* **90**, 1089-1103.
- Cane, D. E. (1999). *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Elsevier, Amsterdam, Netherland. pp 155-200.
- Cane, D. E. and Iyengar, R. (1979). Enzymatic conversion of farnesyl to nerolidyl pyrophosphate-role of the pyrophosphate moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 3385-3388.
- Cane, D. E. and Yang, G. H. (1994). Trichodiene synthase-stereochemical studies of the cryptic allylic diphosphate isomerase activity using an anomalous substrate. *J. Org. Chem.* **59**, 5794-5798.
- Cane, D. E. and Tandon, M. (1995). Epicubenol synthase and the stereochemistry of the enzymatic cyclization of farnesyl and nerolidyl diphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5602-5603.
- Cane, D. E. and Kang, I. (2000). Aristolochene synthase: purification, molecular cloning, highlevel expression in *Escherichia coli*, and characterization of the *Aspergillus terreus* cyclase. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 354-364.
- Cane, D. E., Swanson, S. et al. (1981). Trichodiene biosynthesis and the enzymatic cyclization of farnesyl pyrophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2136-2138.
- Cane, D. E., Xue, Q. et al. (1996a). Trichodiene synthase. Probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **35**, 12369-12376.
- Cane, D. E., Xue, Q. et al. (1996b). Enzymatic formation of isochamigrene, a novel sesquiterpene, by alteration of the aspartate-rich region of trichodiene synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8499-8500.
- Cantino, P. D., Harley, R. M. et al. (1992). *Genera of Labiatae: Status and Classification*. In R.M. Harley and T. Reynolds (eds). *Advances in Labiate Science*. 511-522. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Carde, J. P. (1979). Le fonctionnement des cellules sécrétrices des canaux chez le Pin maritime : données de la microscopie électronique. *104<sup>e</sup> Congr. Natl. Soc. Savantes*, Bordeaux, Sciences, Fasc. II., p 275-286.
- Carde, J. P. (1987). Electron microscopy of plant cell membrane - In Packer L. and Douce R. *Methods in enzymology*, Vol. 148, New York, Academic Press, p 599-622.
- Carson, C. F., Mee, B. J. et al. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Ch.* **46**(6), 1914-1920.
- Carson, C. F., Hammer, K.A. et al. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 50-62.
- Caruthers, J. M., Kang, I. et al. (2000). Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *J. Biol. Chem.* **275**, 25533-25539.
- Casabianca, H. and Graff, J. B. (1994). Separation of linalyl acetate enantiomers: Application to the authentication of bergamot food products. *J. High Resol. Chrom.* **17**, 184-186.
- Cassera, M. B., Gozzo, F. C. et al. (2004). The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **279**, 51749-51759.
- Cavaleiro, C., Rezzi, S. et al. (2001). Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**, 1175-1183.

- Cavalli, J. F., Fernandez, X. et al. (2003). Comparison of static-headspace, HS-SPME, HSSE and direct thermal desorption techniques on chemical composition of french olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7709-7716.
- Cavanagh, H. M. A., and Wilkinson, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytother. Res.* **16**, 301-308.
- Chappell, J. (1995a). The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* **107**, 1-6.
- Chappell, J., (1995b). Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 521-547.
- Chappell, J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Cur. Opin. Plant Biol.* **5**, 151-157.
- Chaytor, D. A. (1937). A taxonomic study of the genus *Lavandula*. *J. Linn. Soc. Lond. Bot.* **51**, 153-204. In Lis-balchin, M. (2002). *Lavender, the genus Lavadula*. London & New York: Taylor and Francis.
- Chen, A., Kroon, P. A. et al. (1994). Isoprenyl diphosphate synthases: protein sequence comparisons, a phylogenetic tree, and predictions of secondary structure. *Protein Sci.* **3**, 600-607.
- Chen, F., Tholl, D. et al. (2003). Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell.* **15**, 481-494.
- Chen, F., Ro, D. K. et al. (2004). Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiol.* **135**, 1956-1966.
- Chen, F., Tholl, D. et al. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* **66**, 212-229.
- Chen, X. Y., Chen, Y., et al. (1995). Cloning, expression, and characterization of (+)-delta-cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 255-266.
- Cheng, A. X., Lou, Y. G. et al. (2007). Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *J. Integr. Plant Biol.* **49**, 179-186.
- Cheniclet, C. (1984). *Organisation ultrastructurale des cellules terpénogènes et composition des secrétats terpéniques volatils : existe-t-il une relation fonctionnelle ?* Thèse Doct. Sci. Univ. Bordeaux II.
- Cheniclet, C. and Carde, J. P. (1985). Presence of leucoplasts in secretory cells and of monoterpenes in the essential oil : a correlative study. *Isr. J. Bot.* **34**, 219-238.
- Cheniclet, C., Bernard-Dagan, C., et al. (1988). *Terpene biosynthesis under pathological conditions*. In Mattson, W.J., Levieux, J. and Bernard-Dagan, C. *Mechanisms of woody plant defenses against insects*, New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, p117-130.
- Chograni, H., Messaoud, C. et al. (2008). Genetic diversity and population structure in Tunisian *Lavandula stoechas* L. and *Lavandula multifida* L. (Lamiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **36**, 349-359.
- Christianson, D. W. (2006). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* **106**, 3412-3442.
- Christianson, D. W. (2007). Roots of biosynthetic diversity. *Science* **316**, 60-61.
- Christianson, D. W. (2008). Unearthing the roots of the terpenome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 141-150.
- Cimanga, K., Kambu, K. et al. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 213-220.

- Chu, F. H., Kuo, P. M. et al. (2009). Cloning and characterization of  $\alpha$ -pinene synthase from *Chamaecyparis formosensis* Matsum. *Holzforschung* **63**, 69-74.
- Colby, S. M., Alonso, W. R. et al. (1993). 4S- Limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*): cDNA isolation, characterization and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *J. Biol. Chem.* **268**, 23016-23024.
- Colby, S. M., Crock, J. et al. (1998). Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2216-2221.
- Cong, Y., Abulizi, P. et al. (2008). Chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* from Xinjiang, China. *Chem. Nat. Comd.* **44**(6), 810.
- Connolly, J. D. and Hill, R. A. (1991). *Dictionnaire of terpenoids*. London, Chapman and Hall.
- Copolovici, L. O., Filella, I. et al. (2005). The capacity for thermal protection of photosynthetic electron transport varies for different monoterpenes in *Quercus ilex*. *Plant Physiol.* **139**, 485-496.
- Cornish, K. (1993). The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferases in *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **218**, 267-271.
- Coste, H. and Flahault, C. (1998). *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes*. Librairie scientifique et technique Albert Blanchard, Paris, Tome III, 807p.
- Couderc-Le-Vaillant, M., Segur-Fantino, N. et al. (1990). Etude phytodermatologique de *Lavandula angustifolia* Mill. *Revue Cytol. Biol. Veget. Bot.* **13**, 75-88.
- Crock, J., Wildung, M. R. et al. (1997). Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- $\beta$ -farnesene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 12833-12838.
- Crocoll, C., Asbach, J. et al. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **73**, 587-603
- Croteau, R. (1987). Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.* **87**, 929-954.
- Croteau, R. and Karp, F. (1977). Demonstration of a cyclic pyrophosphate intermediate in the enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to borneol. *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 77-86.
- Croteau, R. and Karp, F. (1979). Biosynthesis of monoterpenes - hydrolysis of bornyl pyrophosphate, an essential step in camphor biosynthesis, and hydrolysis of geranyl pyrophosphate, the acyclic precursor of camphor, by enzymes from sage (*Salvia officinalis*). *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 523-532.
- Croteau, R., Hooper, C. L. et al. (1978). Biosynthesis of monoterpenes. Partial purification and characterization of a bicyclic monoterpene dehydrogenase from sage (*Salvia officinalis*). *Arch. Biochem. Biophys.* **188**, 182-193.
- Croteau, R., Felton, N. M. et al. (1980). Biosynthesis of monoterpenes: Conversion of the acyclic precursors geranyl pyrophosphate and neryl pyrophosphate to the rearranged monoterpenes fenchol and fenchone by a soluble enzyme preparation from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Arch. Biochem. Biophys.* **200**, 524-533.
- Croteau, R., Gurkewitz, S. et al. (1987). Biochemistry of oleoresinosis. Monoterpene and diterpene biosynthesis in lodgepole Pine samplings infected with *Ceratocystis clavigera* or treated with carbohydrate elicitors. *Plant Physiol.* **85**, 1123-1128.

- Croteau, R., Kutcahn, T. M. et al. (2000). *Natural products*. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Grissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1318.
- Crowell, A. L., Williams, D. C. et al. (2002). Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 112-121.
- Cseke, L., Dudareva, N. et al. (1998). Structure and evolution of linalool synthase. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1491-1498.
- Cuendet, M., Hostettmann, K. et al. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagvaea blumei*. *Helv. Chim. Acta* **80**, 1144-1152.
- Curado, M. A., Oliveira, C. B. A., et al. (2006). Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* **67**, 2363-2369.

### -D-

- Dadalioglu, I., and Evrendilek, G. A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *J. Agr. Food Chem.* **52**(26), 8255-8260.
- Delaquis, P.J., Stanich, K. et al. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oil. *Int. J. Food Microbiol.* **74**(1-2), 101-109.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R. et al. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agr.* **77**, 140-146.
- Davis, E. M. and Croteau, R. (2000). *Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes*. In *Topics in Current Chemistry: Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, **209**. Edited by Leeper, F.J., Vederas, J.C. Springer-Verlag, 53-95.
- Davis, P. H. and Hedge, I. C. (1971). Floristic links between NW Africa and SW Asia. *Ann. Natur. Museu. Wien* **75**, 43-57.
- Dawson, F. A. (1994). The Amazing Terpenes. *Naval Stores Rev.* March/April, 6-12.
- Debra, A., Pearson, H. H. S. et al. (2001). Inhibition of in vitro low density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. *Method. Enzymol.* **335**, 2001. 350-60.
- Degenhardt, J., Köllner, T. G. et al. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**, 1621-1637.
- Deguerry, F., Pastore, L. et al. (2006). The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* **454**, 123-136.
- de Kraker, J. W., Franssen, M. C. R. et al. (1998). (+)-Germacrene A biosynthesis. The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in Chicory. *Plant Physiol.*, **117**, 1381-1392.
- de Kraker, J. M., Franssen, M. C. R. et al. (2001). Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. demonstration of a cytochrome P450 (1)-germacrene A hydroxylase and NADP1-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiol.* **125**, 1930-1940.
- Delfine, S., Csiky, O. et al. (2000). Fumigation with exogenous monoterpenes of a nonisoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*) : monoterpene acquisition, translocation,

- and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytol.* **146**, 27-36.
- Demissie, Z. A., Sarker, L. S. et al. (2011). Cloning and functional characterization of  $\beta$ -phellandrene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Planta* **233**, 685-696
- Demissie, Z. A., Cella, M. A. et al. (2012). Cloning, functional characterization and genomic organization of 1,8-cineole synthases from *Lavandula*. *Plant Mol. Biol.* **79**, 393-411.
- de Moraes, C. M., Mescher, M. C. et al. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature* **410**, 577-580.
- Dewick, P. M. (1999). The biosynthesis of C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 97-130.
- Denyer, S. P. and Hugo, W. B. (1991). *Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, p 171-187.
- Dob, T., Dahmane, D. et al. (2006a). Essential oil composition of *Lavandula stoechas* from Algeria. *Pharm. Biol.* **44**(1), 60-64.
- Douce, R. and Joyard, J. (1981). Does the plastid envelope derive from the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem. Sci.* **6**, 237-239.
- Douce, R. and Joyard, J. (1984). *The regulatory role of the plastid envelope during development*. In Baker, N.R., and Barber, J. *Chloroplast biogenesis*, Elsevier Science Publishers, p 71-132.
- Doyle, J. A. (1998). Phylogeny of vascular plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **29**, 567-599.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**, 11-15
- Dudareva, N. and Pichersky, E. (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiol.* **122**, 627-633.
- Dudareva, N., Cseke, L. et al. (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell.* **8**, 1137-1148.
- Dudareva, N., Martin, D. et al. (2003). (*E*)- $\beta$ -Ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell.* **15**, 1227-1241.
- Dudareva, N., Pichersky, E. et al. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* **135**, 1893-1902.
- Dudareva, N., Andersson, S. et al. (2005). The non mevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 933-938.
- Dudareva, N., Negre, F. et al. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Cr. Rev. Plant Sci.* **25**, 417-440.
- Dueber, M. T., Adolf, W. et al. (1978). Biosynthesis of the diterpene phytoalexin casbene: partial purification and characterization of casbene synthetase from *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* **62**, 598-603.
- Duke, J. A. (1992). *Handbook of biologically active phytochemicals and their activities*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Duncan, J. D. and West, C. A. (1981). Properties of kaurene synthetase from *Marah macrocarpus* endosperm: evidence for the participation of separate but interacting enzymes. *Plant Physiol.* **68**, 1128-1134.
- Dungey, H. S., Potts, B. M. et al. (2000). Plant genetics affects arthropod community richness and composition: evidence from a synthetic eucalypt hybrid population. *Evolution* **54**, 1938-1946

**-E-**

- Economou L., Venskutonis R. et al. (1991). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs. *J. Sci. Food Agr.* **77**, 140-146.
- Eisenreich, W., Rohdich, F. et al. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **6**, 78-84.
- Eisenreich, W., Schwarz, M. et al. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Biol.* **5**, 221-233.
- El-Garf, I., Grayer, R. J. et al. (1999). Hypolaetin 8-O-glucuronide and related flavonoids from *Lavandula coronopifolia* and *L. pubescens*. *Biochem. Syst. Ecology* **27**, 843-846.
- El-Gazzar, A. and I. A. Watson. (1970). Taxonomic study of Labiatae and related genera. *New Phytol.* **69**, 451-486.
- El-Hilaly, J., Hmammouchi, M. et al. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J. Ethnopharmacol.* **86**, 149-158.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. et al. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* **8**, 978-984.
- Ens, E., Bremner, J. et al. (2009). Identification of volatile compounds released by roots of an invasive plant, bitou bush (*Chrysanthemoides monilifera* spp. *rotundata*), and their inhibition of native seedling growth. *Biol. Invasions* **11**, 275-287.
- Eoh, H., Brown, A.C. et al. (2007). Characterisation of the *Mycobacterium tuberculosis* 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase: potential for drug development. *J. Bacteriol.* **189**, 8922-8927.
- Epstein, W. W. and Poulter, C. D. (1973). A survey of some irregular monoterpenes and their biogenetic analogies to presqualene alcohol. *Phytochemistry* **12**, 737-747.
- Eulgem, T., Rushton, P. J. et al. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**, 199-206.
- Eveleigh, T. (1996). *Lavender*. Lorenz books: Sydney.

**-F-**

- Facchini, P. J. and Chappell, J. (1992). Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 11088-11092.
- Facchini, P. J. and DeLuca, V. (2008). Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J.* **54**, 763-784.
- Fahn, A. (1979). *Secretory tissues in plants*. New York: Academic Press.
- Fakhari, A. R., Salehi, P. et al. (2005). Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Chromatogr. A.* **1098**, 14-18.
- Fäldt, J., Arimura, G. et al. (2003). Functional identification of AtTPS03 as (E)-beta-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 745-751.
- Fall, R. and K. Monson, R. (1992). Isoprene Emission Rate and Intercellular Isoprene Concentration as Influenced by Stomatal Distribution and Conductance. *Plant Physiol.* **100**, 987-992.
- Felicetti, B. and Cane, D. E. (2004). Aristolochene synthase: mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7212-7221.
- Fernandez-Perez, V., Jimenez-Carmona, M. M. et al. (2000). An approach to the static-dynamic subcritical water extraction of laurel essential oil: comparison with conventional techniques. *Analyst.* **125**, 481-485.



- Ferrerres, F., Barberan, F. A. T. et al. (1986). Flavonoids from *Lavandula dentata*. *Fitoterapia*, **57**, 199-200.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. et al. (1995). Composition of the essential oil of *Lavandula pinnata* L. fil. var. *pinnata* grown on madeira. *Flavour Fragr. J.* **10**, 93-96.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. et al. (1997). *Physiological aspects of essential oil production*. In Franz, C. H., Máthé, Á. and Buchbauer, G. *Essential oils: basic and applied research*. Proceedings of the 27<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils, (pp. 95-107). Carol Stream, IL.: Allured Publishing Corp.
- Fischbach, R. J. (2001). Monoterpene synthasen in Blättern der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und der Steineiche (*Quercus ilex* L.). PhD Thesis. Schriftenreihe Fraunhofer Institut Atmosphärische Umweltforschung.
- Fischbach, R. J., Zimmer, W. et al. (2001). Isolation and functional analysis of a cDNA encoding a myrcene synthase from holm oak (*Quercus ilex* L.). *Eur. J. Biochem.* **268**, 5633-5638.
- Fischer, N. H., Williamson G. B. et al. (1994). In search of allelopathy in the florida scrub-the role of terpenoids. *J. Chem. Ecol.* **20**, 1355-1380.
- Fischer, H., Polikarpov, I. et al. (2004). Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci.* **13**(10), 2825-2828.
- Flores, G., Blanch, G. P. et al. (2005). Enantiomeric composition studies in *Lavandula* species using supercritical fluids. *J. Sep. Sci.* **28**, 2333-2338.
- Formáček, V. and Kubezcka, K. H. (1982). *Essential Oil Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy*, John Wiley and Sons, Chichester.
- Fraga, B. M. (2007). Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1350-1381.
- Franchomme, P. et Pénoël, D. (1990). *L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.

### -G-

- Gambliel H. and Croteau, R. (1984). Pinene cyclases I and II. Two enzymes from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze stereospecific cyclizations of geranyl pyrophosphate to monoterpene olefins of opposite configuration. *J. Biol. Chem.* **259**(2), 740-748.
- Gámez, M. J., Jimenez, J. et al. (1987). Hypoglycemic activity in various species of the genus *Lavandula*. I : *Lavandula stoechas* L. and *Lavandula multifida* L. *Pharmazie*. **42**, 706-707.
- Gámez, M. J., Jimenez, J. et al. (1990). Study of the essential oil of *Lavandula dentata* L. *Pharmazie*. **45**, 69-70.
- Gamisans, J. and Jeanmonod, D. (1993). *Catalogue des plantes vasculaires de la Corse*. Edit., Jeanmonod D., Burdet H.M., Genève.
- Garcia-Vallejo, M. I. (1992). *Aceites esenciales de las Lavandulas ibéricas: ensayo de la quimiotaxonomía*. Departamento de biología vegetal I. Madrid, Universidad Complutense de Madrid. PhD: 498p.
- Garcia-Vallejo, M. I., Garcia-Vallejo, M. C. et al. (1994). Necrodane (1, 2, 2, 3, 4-pentamethylcyclopentane) derivatives in *Lavandula luisieri*, new compounds to the plant Kingdom. *Phytochemistry* **36**, 43-45.
- Garneau, F. X. (2002). *Le matériel végétal et les huiles essentielles*. LASEVE-UQAC, Chicoutimi, Québec.

- Gavel, Y. and von Heijne, G. (1990). A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett.* **260**, 455-458.
- Gersbach, P. V. (2002). The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). *Ann. Bot.* **89**, 255-260.
- Gershenzon, J. and Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 408-414.
- Gershenzon, J. and Kreis, W. (1999). *Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins*. In Wink, M. (eds.), *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Annual Plant Reviews*, Vol. 2. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, pp 222-229.
- Gershenzon, J. and Croteau, R. B. (1993). *Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes*. In Lipid metabolism in plants, TS, eds, CRC Press, Boca Raton, pp 340-388.
- Gershenzon, J., McCaskill, D. et al. (1992). Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Anal. Biochem.* **200**, 130-138.
- Gershenzon, J., McConkey, M. E. et al. (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol.* **122**, 205-213.
- Ghalem, B. and Mohamed, B. (2008). Antibacterial activity of leaf oils of *Eucalyptus globules* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Afr. J. Pharmacol.* **2**, 211-215.
- Ghelardini, C., Galeotti, N. et al. (1999). Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Med.* **65**, 700-703.
- Gingins de La Sarraz, F. C. J. (1826). *Histoire Naturelle des Lavandes*. In Lis-balchin, M. (2002). *Lavender, the genus Lavandula*. London & New York: Taylor and Francis.
- Giordani, R., Regli P. et al. (2004). Antimicrobial effet of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res.* **18**, 990-995.
- Giray, E. S., Kırıcı, S. et al. (2008). Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta* **74**, 930-935.
- Gniazdowska, A. and Bogatek, R. (2005). Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiolo. Plant.* **27**, 395-407.
- González-Coloma, A. Martín-Benito, D. et al. (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochem. Syst. Ecol.* **34**, 609-616.
- Goodwin, T. W. (1977). *The prenyl-lipids of the membranes of higher plants*. In Tevini, M. and Lichtenthaler, H.K. (eds.), *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*, Springer- Verlag, Berlin and New York. p. 29-47.
- Göpfert, J. C., MacNevin, G. et al. (2009). Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitates glandular trichomes. *BMC Plant Biol.* **9**, 86-104
- Göpfert, J. C., Bülow, A. K. et al. (2010). Identification and functional characterization of a new sunflower germacrene A synthase (HaGAS3). *Nat. Prod. Commun.* **5**(5), 709-715.
- Gören, A. C., Topçu, G. et al. (2002). The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Z. Naturforsch.* **57c**, 797-800.
- Goto, T., Takahashi, N. et al. (2010). Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism. *PPAR Res.* **2010**, 1-9.

- Granger, R., Passet J. et al. (1975), Sur les essences dites de " Marjolaine " *Riv. Ital. Essenza Profumi Plante Officinal. Aromi. Saponi. Cosmetici. Aerosol.* **57**, 199-208.
- Granger, R. et Passet, J. (1973). *Thymus vulgaris* spontané de France : races chimiques et chémotaxonomie. *Phytochemistry* **12**, 1683-1691.
- Granger, R., Passet, J. et al. (1973). Plantes médicinales à essences et chimiotaxonomie. In: *XVIIIème Journée de l'Aromatique*, Lourmarin.
- Grauvel, C. and Petersen, J. (2007). Isoprenoid biosynthesis authenticates the classification of the green alga *Mesostigma viride* as an ancient streptophyte. *Gene* **396**, 125-133.
- Grayer, R. J., Kite, G. C. et al. (1996). Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* **43**, 1033-1039.
- Grice, H. C. (1986). Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food. Chem. Toxicol.* **24**, 1127-1130.
- Grieve, M. (1971). *A Modern Herbal*, Vol. II (New York: Dover Publications, Inc; ISBN 0-486-22799-5)
- Guessennd, N., Kacou-N'douba, A. et al. (2008). Prévalence et profil de résistance des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargie (BLSE) à Abidjan Côte d'Ivoire de 2005 à 2006. *J. Sci. Pharm. Biol.* **9**(1), 63-70.
- Guitton, Y., (2010). Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula* : aspects évolutifs et physiologiques. Thèse doctorat, Université de Saint Etienne, France. P253.
- Gülçin, İ., Oktay, M. et al. (2003a). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.* **83**, 371-382.
- Gülçin, İ., Büyükkokuroğlu, M. E. et al. (2003b). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *J. Ethnopharmacol.* **86**, 51-58.
- Gülçin, İ., Şat, I. G. et al. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem.* **87**, 393-400.
- Günnewich, N., Page, J. E. et al. (2007). Functional expression and characterization of trichome-specific (-)-limonene synthase and (+)- $\alpha$ -pinene synthase from *Cannabis sativa*. *Nat. Prod. Commun.* **2**, 223-232.
- Guenther, E. (1948). The essential oils, Vol. 1 : History-Origin in plants production-Analysis. Litton Educational Publishing, INC. 427 p.
- Guillemain, J., Rousseau, A. et al. (1989). Neurodepressive effects of the essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Ann. Pharm. Fra.* **47**, 337-343.
- Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat. Université de Corse. 148p.
- Guo, Z. and Wagner, G. J. (1995). Biosynthesis of cembratrienols in cell-free extracts from trichomes of *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci.* **110**, 1-10.
- Guyot-Declerck, C., Renson, S., Bouseta, A. and Collin, S. (2002). Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia*, and *Lavandula angustifolia* x *latifolia* honeys. *Food Chemistry.* **79**, 453-459.
- Grujic-Jovanovic, S., Skaltsa, H. D. et al. (2004). Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia, *Flavour Fragr. J.* **19**, 139-144.

**-H-**

- Hajhashemi, V, Ghannadi A. et al. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* **89**, 67-71.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Hallahan, D. L. (2000). *Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiate plants*, Vol 31. Academic Press, San Diego, pp 77-120.
- Hamouda, T. and Baker, J. R. (2000). Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *J. Applied Microbiol.* **89**, 397-403.
- Hanamanthagouda, M. S., Kakkalamei, S. B. et al. (2010). Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chem.* **118**, 836-839.
- Hannig, G., and Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **16**(2), 54-60.
- Harborne, J. B. (1991). *Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids*. In *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, Harborne, J.B. and Tomas-Barberan, F.A. eds (Oxford.: Clarendon Press.), pp 396-426.
- Harris, L. J., Saparno, A. et al. (2005). The maize An2 gene is induced by *Fusarium* attack and encodes an ent-copalyl diphosphate synthase. *Plant Mol. Biol.* **59**(6), 881-894.
- Harley, P., Fridd-Stroud, V. et al. (1998). Emission of 2-methyl-3-buten-2-ol by pines: A potentially large natural source of reactive carbon to the atmosphere. *J. Geophys. Res-Atmos.* **103**, 25479-25486.
- Hassiotis, C. N. (2010). Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**, 493-501.
- Hawltitschek, G., Schneider, H. et al. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* **53**(5), 795-806.
- Hawthorne, S. B., Riekkola, M. et al. (1993). Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *J. Chromatogr. A.* **634**, 297-308.
- Hayashi, K., Kawaide, H. et al. (2006). Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS. Lett.* **580**, 6175-6181.
- Hedges, L. M. and Wilkins, C. L. (1991). Component analysis of eucalyptus oil by gas chromatography-fourier transform-infrared spectrometry-mass spectrometry. *J Chromatogr. Sci.* **29**, 345-350.
- Heiling, S., Schuman, M. C. et al. (2010). Jasmonate and pphsystemin regulate key malonylation steps in the biosynthesis of 17-hydroxygeranyl linalool diterpene glycosides, an abundant and effective direct defense against herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell.* **22**, 273-292.
- Heinrich, G., Schultze, W. et al. (1983) The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*. *Physiol. Vég.* **21**, 257-268.
- Helsper, J. P. F. G., Davies, J. A. et al. (1998). Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrid* L. cv. Honesty. *Planta* **207**, 88-95.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J. F. et al. (2003a). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 26666-26676.

- Hemmerlin, A., Rivera, S. B. et al. (2003b). Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 32132-32140.
- Herrera, J. (1997). The role of colored accessory bracts in the reproductive biology of *lavandula stoechas*. *Ecology* **78**, 494-504.
- Herrera, C. M. and Bazaga, P. (2008). Adding a third dimension to the edge of a species' range: altitude and genetic structuring in mountainous landscapes. *Heredity* **100**, 275-285.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. et al. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices. *J. Agr. Food Chem.* **41**, 1242-1246.
- Hoelscher, D. J., Williams, D. C. et al. (2003). A cDNA clone for 3-carene synthase from *Salvia stenophylla*. *Phytochemistry* **62**, 1081-1086.
- Hoagland, D. R., and Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circular.* **347**, 1-32.
- Hohmann, J., Zupkó, I. et al. (1999). Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation, *Planta Med.* **65**, 576-578.
- Horwitz, J. P., Chuna, J. et al. (1964). Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- $\beta$ -D-glycopyranosides, *J. Med. Chem.* **7**, 574.
- Hosoi, M., Ito, M. et al. (2004). CDNA isolation and functional expression of myrcene synthase from *Perilla frutescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1979-1985.
- Huang, K. X., Huang, Q. L. et al. (1998). Overproduction, in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a Key enzyme in the taxol biosynthetic pathway. *Protein Expr. Purif.* **13**, 90-96.
- Huber, D. P. W., Ralph, S. et al. (2004). Genomic hardwiring and phenotypic plasticity of terpenoid-based defenses in conifers. *J. Chem. Ecol.* **30**, 2399-2418.
- Hyatt, D. C. and Croteau, R. (2005). Mutational analysis of a monoterpene synthase reaction: altered catalysis through directed mutagenesis of (-)-pinene synthase from *Abies grandis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **439**(2), 222-233.
- Hyatt, D. C., Youn, B. et al. (2007). Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 5360-5365.

### -I-

- Iason, G. R., Lennon, J. J. et al. (2005). Does chemical composition of individual scots pine trees determine the biodiversity of their associated ground vegetation. *Ecol. Lett.* **8**, 364-369
- Iijima, Y., Gang, D. R. et al. (2004). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiol.* **134**, 370-379.
- Imelouane, B., Elbachiri, A. et al. (2009). Physico-chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of eastern Moroccan *Lavandula dentata*. *Int. J. Agr. Biol.* **11**, 113-118.
- International Trade Centre, UNCTAD/GATT. (1993). Repport, Market Research File on Selected Essential Oils. 169 p.
- Ito, M. and Honda, G. (2007). Geraniol synthases from *Perilla* and their taxonomical significance. *Phytochemistry* **68**, 446-453.

**-J-**

- Jakobsen, H. B., Friis, P. et al. (1994). Emission of volatiles from flowers and leaves of *Brassica-Napus* in-Situ. *Phytochemistry* **37**, 695-699.
- Jasinski, M., Stukkens, Y. et al. (2001). A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* **13**, 1095-1107.
- Javidnia, K., Miri, R. et al. (2005). Composition of the essential oil of *Salvia macrosiphon* Boiss. from Iran, *Flavour Fragr. J.* **20**, 542-543.
- Jennewein, S. and Croteau, R. (2001). Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biot.* **57**, 13-19.
- Jia, J. W., Crock, J. et al. (1999). (3R)-linalool synthase from *Artemisia annua* L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 143-149.
- Joulain, D. and König, W. A. (1998). The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, EB-Verlag, Hamburg.
- Juan, C., Emerson, B. C. et al. (2000). Colonization and diversification: towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Trends Ecol. Evol.* **15**, 104-109.

**-K-**

- Kalemba, D. and Kunicka A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**, 813-829.
- Kampranis, S. C., Ioannidis, D. et al. (2007). Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: Structural insights into the evolution of terpene synthase function. *Plant Cell* **19**, 1994-2005.
- Karioti, A., Hadjipavlou-Litina, D. et al. (2004). Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiya aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 8094-8098.
- Karousou, R., Vokou, D. et al. (1998). Variation of *Salvia fruticosa* essential oils on the island of Crete (Greece). *Bot. Acta* **111**, 250-254.
- Keegstra, K., Olsen, L. J. (1989). Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 471-501.
- Keeling, C. I. and Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* **170**, 657-675.
- Keeling, C. I., Dullat, H. K. et al. (2010). Identification and functional characterization of monofunctional entcopalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in white spruce reveal different patterns for diterpene synthase evolution for primary and secondary metabolism in gymnosperms. *Plant Physiol.* **152**, 1197-1208.
- Kessler, A. and Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Ann. Rev. Plant Biol.* **53**, 299 – 328.
- Kim, N. S. and Lee, D. S. (2002). Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **982**, 31-47.
- Kim, M. Y., Chang, Y.G. et al. (2005). cDNA Isolation and characterization of (+)-germacrene A synthase from *Ixeris dentata* form. *albiflora* Hara. *J. Plant Biol.* **48**(2), 178-186.
- Kinsella, J. E., Frankel, E. et al. (1993). Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. *Food Tech.* **47**, 85-89.

- Knobloch, K. Paulis, A. et al. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Ess. Oil Res.* **1**, 118-119.
- Knudsen, J. T. and Gershenzon, J. (2006). *The chemical diversity of floral scent*, In Dudareva, N. and Pichersky, E. (eds.), *Biology of floral scent*, Boca Raton :Taylor and Francis. pp. 27-52.
- Koepp, A. E., Hezari, M. et al. (1995). Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to tax-4(5),11(12)-diene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *J. Biol. Chem.* **270**, 8686-8690.
- Kokkalou, E. (1988). The constituents of the essential oil from *Lavandula stoechas* growing wild in Greece. *Planta Medica.* **54**(1), 58-59.
- Kokkini, S. and Vokou, D. (1989). *Mentha spicata* (Lamiaceae) chemotypes growing wild in Greece. *Econ. Bot.* **43**, 192-202.
- Köllner, T. G., Schnee, C. et al. (2004). The variability of sesquiterpenes cultivars is controlled by allelic emitted from two *Zea mays* variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell* **16**, 1115-1131.
- Kolossova, N., Gorenstein, N. et al. (2001). Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *Plant Cell* **13**, 2333-2347.
- Kordali, S., Cakir, A. et al. (2007). Inhibitory effects of monoterpenes on seed germination and seedling growth. *Z. Naturforsch. C.* **62c**(3-4), 207-214.
- Kourikn, R. (1998). *The Lavender garden*. Chronicle Books, San Francisco. 120p.
- Kovacevic, M. and Kac, M. (2001). Solid-phase microextraction of hop volatiles— Potential use for determination and verification of hop varieties. *J. Chromatogr. A.* **918**, 159-167.
- Kovatcheva, E. G., Koleva, I. I. et al. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell cultures. *Food Chem.* **72**, 295-300.
- Koyama, T. and Ogura, K. (1999). *Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyltransferases*. In: Cane D.E. ed. *Comprehensive Natural Product Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Vol. 2. Pergamon Press, Oxford. pp. 69–96.
- Kulusic, T., Radonic, A. et al. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* **85**, 633-640.

### -L-

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-685.
- Lai, L. S., Chou, S. T. et al. (2001). Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 963-968.
- Lalel, H. J. D., Singh, Z. et al. (2003). Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity, postharvest. *Biol. Technol.* **29**, 205-218.
- Landmann, C., Fink, B. et al. (2007). Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Arch. Biochem. Biophys.* **465**(2), 417-429.
- Lane, A., Boeckleemann, A. et al. (2010). A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*. *Planta* **231**, 835-845.
- Lange, B. M., Rujan, T. et al. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13172-13177.

- Laule, O., Fürholz, A. et al. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 6866-6871,
- Lavoine-Hanneguelle, S. and Casabianca, H. (2004). New compounds from the essential oil and absolute of *Lavandula luisieri* L. *J. Essent. Oil Res.* **16**, 445-448.
- Lawrence, B. M. (1976). Progress in essential oils. *Flavour Fragr. J.* **1**, 11-13.
- Lawrence, B. M. (1980). The existence of infraspecific differences in specific genera in the Labiatae family. In: *Annales techniques, VIIe Congrès International des Huiles Essentielles*, Cannes-Grasse. pp. 118-131,
- Lawrence, B. M., (1992). *Chemical components of Labiatae oils and their exploitation*. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), *Advances in Labiate Science*. Royal Botanic Gardens, Kew, 399-436.
- Lee, S. and Chappell, J. (2008). Biochemical and genomic characterization of terpene synthases in *Magnolia grandiflora*. *Plant Physiol.* **147**, 1017-1033.
- Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S. et al. (2006). *In vitro* bioactivities of essential oils used for acne control. *Int. J. Aromather.* **16**, 43-49.
- Lesburg, C. A., Zhai, G. et al. (1997). Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* **277**, 1820-1824.
- Lewinsohn, E., Gijzen, M. et al. (1991). Defense mechanisms of conifers. Relationship of monoterpene cyclase activity to anatomical specialization and oleoresin monoterpene content. *Plant Physiol.* **96**, 38-43.
- Lewinsohn, E., Schalechet, F. et al. (2001). Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol.* **127**, 1256-1265.
- Lichtenthaler, H. K. (1998). The plants 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Fat Sc. Technol.* **100**, 128-138.
- Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47-65.
- Lichtenthaler, H. K. (2007). Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynth. Res.* **92**, 163-179.
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. et al. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plantarum* **101**, 643-652.
- Lin, X., Hezari, M. et al. (1996). Mechanism of taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in pacific yew. *Biochem.* **35**, 2968-2977.
- Lis-balchin, M. (2002). *Lavender, the genus Lavadula*. London & New York: Taylor and Francis, 268p.
- Lis-Balchin, M. and Hart, S. (1999). Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytother. Res.* **13**, 540-542.
- Lis-Balshin, M. and Roth, G. (2000). Composition of the essential oils of *Pelargonium odoratissimum*, *P. exstipulatum* and *P. x fragras* (Geraniaceae) and their bioactivity. *Flavour Fragr. J.* **15**, 391-394.
- Little, D. B., Croteau, R. B. (2002). Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **402**, 120-135.



- Lopes, N. P., Kato, M. J. et al. (1997). Orcadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves, *Phytochemistry* **46**, 689-693.
- Loreto, F. and Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* **127**, 1781-1787.
- Lu, S., Xu, R. et al. (2002). Cloning and functional characterization of a  $\beta$ -pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiol.* **130**, 477-486.
- Ludley, K. E., Robinson, C. H. et al. (2009). Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forests is revealed by novel experimental system. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 117-124
- Lundmark, J. D. (1780). *De Lavandula*. Dissertatio Academica. Uppsala. In Lis-balchin, M. (2002). *Lavender, the genus Lavandula*. London & New York: Taylor and Francis.

### -M-

- Mahmoudi, Y. (1982). *La thérapeutique par les plantes communes en Algérie*. Blida, Algérie: Palais de livre. pp. 55-58.
- Majdi, M., Liu, Q. et al. (2011). Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry* **72**, 1739-1750.
- Manohar, V., Ingram, C. et al. (2001). Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* **b228**, 111-117.
- Marculescu, A., Sand, D. et al. (2001). Possibilities of influencing the biosynthesis and accumulation of the active principles in *Chrysanthemum balsamita* L. species. *Rom. Biotech. Lett.* **7**, 577-584.
- Marpeau, A., Walter, J. et al. (1989). Effects of wounds on the terpene content of twigs of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) II. Changes in the volatile terpene hydrocarbon composition. *Trees (Berlin)* **4**, 220-226.
- Martin, D., Tholl, D. et al. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.* **129**, 1003-1018.
- Martin, D. M., Gershenzon, J. et al. (2003). Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiol.* **132**, 1586-1599.
- Martin, D., Fäldt, J. et al. (2004). Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol.* **135**, 1908-1927.
- Martin, D. M., Aubourg, S. et al. (2010) Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biol.* **10**, 226-248.
- Masse, G., Belt, S. T. et al. (2004). Isoprenoid biosynthesis in the diatoms *Rhizosolenia setigera* (Brightwell) and *Haslea ostrearia* (Simonsen). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4413-4418.
- Mattiacci, L., Hütter, E. et al. (2000). Plantodour mediates parasitoid host handling and oviposition in an endophytic tritrophic system. *Chemoecology* **10**, 185-192.
- Mau, C. J. D. and West, C. A. (1994). Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 8497-8501.

- Mayer, K., Schuller, C. et al. (1999). Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**(6763), 769-777.
- Mayrhofer, S., Teuber, M. et al. (2005). Diurnal and seasonal variation of isoprene biosynthesis-related genes in grey poplar Leaves. *Plant Physiol.* **139**, 474-484.
- McCaskill, D. G., Gershenzon, J. et al. (1992). Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta* **187**, 445-454.
- McConkey, M. E., Gershenzon, J. et al. (2000). Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiol.* **122**(1), 215-224.
- McGarvey, D. J. and Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* **7**, 1015-1026.
- McGeady, P. and Croteau, R. (1995). Isolation and characterization of an active-site peptide from a monoterpene cyclase labeled with a mechanism-based inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**(1), 149-155.
- McKay, S. A. B., Hunter, W. L. et al. (2003). Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development and gene expression of (-)-pinene synthase in sitka spruce. *Plant Physiol.* **133**, 368-378.
- Mercier, C. and Chabardes, P. (1994). Organometallic chemistry in industrial vitamin A and vitamin E synthesis. *Pure App. Chem.* **66**, 1509-1518.
- Meulenkamp, J. E. and Sissingh W. (2003). Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African-Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeogr. Palaeocl.* **196**, 209-228.
- Millar, J., Midland, S. et al. (2005). (2,3,4,4- Tetramethylcyclopentyl) methyl acetate, a sex pheromone from the obscure mealybug: first example of a new structural class of monoterpenes. *J. Chem. Ecol.* **31**, 2999-3005.
- Milner, C. P., Trengove, R. D. et al. (1997). *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the essential oils of Eucalyptus: A comparison with other methods*. In: Linskens, H.F. and Jackson, J.F. (1991) (Eds.), *Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Analysis of Plant Fragrance.* **19**, 159-173. Springer, Berlin, Germany. 141-158.
- Miller, B., Oschinski, C. et al. (2001). First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli*. *Planta* **213**, 483-487.
- Miller, B., Madilao, L. L. et al. (2005). Insect-induced conifer defense: White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcript in sitka spruce. *Plant Physiol.* **137**, 369-382.
- Moon, T., Cavanagh, H. M. A. et al. (2007). Antifungal activity of Australian grown *Lavandula* ssp. essential oils against *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Leptosphaeria maculans* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Essent. Oil Res.* **19**, 171-175.
- Morhy, L., Gomes, J. et al. (1970). *Ocimum nudicaule* Benth., A new source of methylchavicol. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* **42**, 147-158.
- Morrone, D., Chambers, J. et al. (2009). Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Lett.* **583**, 475-480.
- Mundina, M., Vila, R. et al. (2001). Composition and chemical polymorphism of the essential oils from *Piper lanceaefolium*. *Biochem. Syst. Ecol.* **29**, 739-748.
- Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I. et al. (2006). Upregulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol.* **142**, 890-900.

- Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I. et al. (2007). Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochem. Syst. Ecol.* **35**, 479-488.
- Murray J. A. H. Bradley, H. et al. (1933). *The Oxford English Dictionary*. Vol.6, Clarendon Press, Oxford. p.111. In : Upson, T. and Andrews, S. (2004). *The genus Lavandula*. Portland and Oregon, USA: Timber Press.
- Murray, M. J. and Lincoln, D. E. (1970). The genetic basis of acyclic oil constituents in *Mentha citrata* Ehrh. *Genetics* **65**, 457-471.

### -N-

- Nadkarni, K. M. (1982). *Indian Materia Medica*, third ed. Popular Prakashan, Bombay, p. 730.
- Nagegowda, D. A. (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett.* **584**(14), 2965-2973.
- Nagegowda, D. A., Gutensohn, M. et al. (2008). Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. *Plant J.* **55**(2), 224-239.
- Newman, J. D. and Chappell, J. (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 95-106.
- Niinemets, U. and Reichstein, M. (2002). A model analysis of the effects of nonspecific monoterpenoid storage in leaf tissues on emission kinetics and composition in Mediterranean sclerophyllous *Quercus* species. *Global Biogeochem. Cy.* **16**, 1110-1126.
- Nogueira, J. M. F. and Romano, A. (2002). Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Phytochem. Anal.* **13**, 4-7.
- Nogueira, P. C. L., Bittrich, V. et al. (2001). The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). *Phytochemistry* **56**, 443-452.

### -O-

- Ogura, K., and Koyama, T. (1998). Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276.
- Okada, K. and Hase, T. (2005). Cyanobacterial non-mevalonate pathway: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase interacts with ferredoxin from *Thermosynechococcus elongatus*. *J. Biol. Chem.* **276**, 5483-5490.
- Okuda, T., Yoshida, T. et al. (1989). Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med.* **55**(117), 122.
- O'Reilly-Wapstra, J., Freeman, J. et al. (2011). Quantitative trait loci for foliar terpenes in a global eucalypt species. *Tree Gene. Genom.* **7**(3), 485-498.
- Owen, S. M. and Penuelas, J. (2005). Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends Plant Sci.* **10**, 420-426.
- Ozawa, R., Arimura, G. et al. (2000). Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant Cell Physiol.* **41**, 391-398.

### -P-

- Paduch, R., Kandefers-Szerszeń, M. et al. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **55**, 315-327.

- Pala-Paul, J., Brophy, J. J. et al. (2004). Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia. *Biochem. Syst. Ecol.* **32**, 55-62.
- Paré, P. W. and Tumlinson, J. H. (1997a). De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiol.* **114**, 1161-1167.
- Paré, P. W. and Tumlinson, J. H. (1997b). Induced synthesis of plant volatiles. *Nature* **385**, 30-31.
- Paris, H. and Moyses, R. R. (1976). *Précis de matière médicale*, 2<sup>ème</sup> ed (tome1), Masson Cie., Paris.
- Paschold, A., Halitschke, R. et al. (2006). Using 'mute' plants to translate volatile signals. *Plant J.* **45**, 275-291.
- Paton, A. J., Springate, D. et al. (2004). Phylogeny and evolution of basil and allies (*Ocimeae*, *Labiatae*) based on three plastid DNA regions. *Mol. Phylogenet. Evol.* **31**, 277-299.
- Pattnaik, S, Subramanyam, V. R. et al. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* **89**, 39-46.
- Pellmyr, O. (1986). Three pollination morphs in *Cimicifuga simplex*; incipient speciation due to inferiority in competition. *Oecologia* **68**, 304-307.
- Penuelas, J. and Llusia, J. (2002). Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. *New Phytol.* **155**, 227-237.
- Penuelas, J. and Munne-Bosch, S. (2005). Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends Plant Sci.* **10**, 166-169.
- Peters, R. J. and Croteau, R. B. (2004). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. In G Kishore, ed, *Handbook of Plant Biotechnology: Applications of Plant Biotechnology in Agriculture, the Pharmaceutical Industry, and Other Industries*, Vol 2. John Wiley & Sons, London, pp 609-628.
- Peters, R. J., Carter, O. A. et al. (2003). Bifunctional abietadiene synthase: mutual structural dependence of the active sites for protonation-initiated and ionization-initiated cyclizations. *Biochemistry* **42**, 2700-2707.
- Peyton L. (1983). Lavandes et lavandins dans le monde. *Parfum Cosmét. Arôm.* **54**, 55-60.
- Phillips, M. A. and Croteau, R. B. (1999). Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.* **4**, 184-190.
- Phillips, M. A., Wildung, M. R. et al. (2003). CDNA isolation, functional expression, and characterization of (+)-alpha-pinene synthase and (-)-alpha-pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): stereocontrol in pinene biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **411**, 267-276.
- Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**(3), 237-243.
- Pichersky, E., Raguso, R. A. et al. (1994). Floral Scent Production in *Clarkia* (*Onagraceae*) (I. Localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity). *Plant Physiol.* **106**, 1533-1540.
- Pickett, J. A. (1991). *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. In Harborne, J.B. and Tomas-Barberan, F.A. (eds.), *Proc. Phytochemistry Soc. Europe* Clarendon Press, Oxford; pp. 297-313.
- Pino, J. A., Mesa, J. et al. (2005). Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2213-2223.
- Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 500-508.

- Poulter, C. D. and Rilling, H. C. (1978). The prenyl transfer reaction. Enzymatic and mechanistic studies of the 1'-4 coupling reaction in the terpene biosynthetic pathway. *Acc. Chem. Res.* **11**, 307-313.
- Poulter, C. D. and Rilling, H. C. (1981). *Prenyl transferases and isomerase*. In Porter, J.W. and Spurgeon, S.L. (eds.), *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. Vol. 1. John Wiley and Sons, New York, NY. pp.162-209.
- Prisic, S., Xu, M. M. et al. (2004). Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiol.* **136**, 4228-4236.
- Prosser, I., Phillips, A. L. et al. (2002). (+)-(10R)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. *Phytochemistry* **60**, 691-702.
- Prosser, I., Altug, I. J. et al. (2004). Enantiospecific (+)- and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 136-144.
- Prosser, I. M., Adams, R. J. et al. (2006). Cloning and functional characterisation of a cis-muroladiene synthase from black peppermint (*Mentha x piperita*) and direct evidence for a chemotype unable to synthesise farnesene. *Phytochemistry* **67**, 1564-1571.
- Pryor, W. A. (1991). The antioxidant nutrient and disease prevention—What do we know and what do we need to find out? *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 391–393.
- Putievsky, E., Ravid, U. et al. (1986). The influence of season and harvest frequency on the essential oil and the herbal yield from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions. *J. Nat. Prod.* **49**, 326-329.

### -Q-

- Quezel, P. and Santa, S. (1963). *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales* (Vol II). Paris: Centre National de la Recherche Scientifique.
- Qureshi, N., and Porter J. W. (1981). *Conversion of acetyl-Coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate*. In: Porter J.W., Spurgeon S.L. editor. *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. vol. 1 : New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 47–94

### -R-

- Railton, I. D., Fellows, B. et al. (1984). *ent*-Kaurene synthesis in chloroplasts from higher plants. *Phytochemistry* **23**, 1261-1267.
- Rajaonarivony, J. I. M., Gershenzon, J. et al. (1992). Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*). *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 49-57.
- Ramos-Valdivia, A. C., van der Heijden, R. et al. (1997). Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Nat. Prod. Rep.* **14**, 591-603.
- Rasmann, S., Köllner, T. G. et al. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **434**, 732-737.
- Ravid, U., Putievsky, E. et al. (1996). Stereochemical analysis of borneol in essential oils using permethylated  $\beta$ -cyclodextrin as a chiral stationary phase. *Flavour Fragr. J.* **11**, 191-195.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M. K. et al. (2006). Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacids<sup>®plus</sup>, on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon* **48**, 1075-1082.
- Reichling, J., Weseler, A. et al. (2002). Bioactive essential oils used in phytomedicine as anti-infective agents: Australian tea tree oil and manuka oil. *Act. Pythoter.* **1**, 26-32.

- Reverchon, E. and Senatore, F. (1994). Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* **42**, 154-158.
- Richard, H. (1992). *Epices et Aromates*. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- Richard, H. et Multon, J. L. (1992). *Les arômes alimentaires*. Technologie et Documentation Lavoisier Paris. 439 p.
- Rising, K. A., Starks, C. M. et al. (2000). Demonstration of germacrene A as an intermediate in 5-epi-aristolochene synthase catalysis. *Am. Chem. Soc.* **122**, 1861-1866.
- Ristorcelli, D., Tomi, F. et al. (1998).  $^{13}\text{C}$ -NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas*. *Flavour Fragr. J.* **13**(3), 154-158.
- Rivera, S. B., Swedlund, B. D. et al. (2001). Chrysanthemyl diphosphate synthase: Isolation of the gene and characterization of the recombinant non-head-to-tail monoterpene synthase from *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 4373-4378.
- Robinson, C. and Ellis, R. J. (1984). Transport of proteins into chloroplasts. partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of important precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.* **142**, 337-342.
- Rodriguez-Concepcion, M. (2004). The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr. Pharm. Design.* **10**, 2391-2400.
- 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 Physiol.* **130**: 1079-1089.
- Roeder, S., Hartmann, A. M. et al. (2007). Regulation of simultaneous synthesis of floral scent terpenoids by the 1,8-cineole synthase of *Nicotiana suaveolens*. *Plant Mol. Biol.* **65**, 107-124.
- Rohdich, F., Kis, K. et al. (2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 535-540.
- Rohdich, F., Hecht, S. et al. (2002). Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1158-1163,
- Rohmer, M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565-574.
- Rohmer, M., Knani, M. et al. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524,
- Röse, U. S. R., Manukian, A. et al. (1996). Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves. *Plant Physiol.* **111**, 487-495.
- Rozeira, A. (1949). A Secciao *Stoechas* Gingins do genero *Lavandula* L. *Brotéria Série de Ciências Naturais* 18, 1-82. In Lis-balchin, M. (2002). *Lavender, the genus Lavadula*. London & New York: Taylor and Francis.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. pp 365-386.
- Ruberto, G. and Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* **69**, 167-174.
- Ryley, C. (1998). Roman gardens and their plants. Sussex Archaeological Society, Lewes England. 56 pp.

-Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. et al. (2001). Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 13543-13548.

### -S-

- Sacchettini, J. C. and Poulter, C. D. (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science* **277**, 1788-1789.
- Sáez, F. and Stahl-Biskup, E. (2002). *Essential oil polymorphism in the genus Thymus*. In Stahl-Biskup, E. and Sáez, F. (eds.), *Thyme: the genus Thymus*, Taylor and Francis, London pp. 135-143.
- Said, H. M. (1996). *Medicinal Herbs*, Vol. 1., Bait al-Hikmah, Madinat al-Hikmah: Pakistan.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Salido, S., Valenzuela, L. R. et al. (2004a). Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochem. Syst. Ecol.* **32**, 265-277.
- Salido, S. Altarejos, J. et al. (2004b). Chemical composition and seasonal variations of Spike Lavander oil from southern Spain. *J. Essent. Oil Res.* **16**, 206-210.
- Sallaud, C., Rontein, D. et al. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from *Z,Z*-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell*. **21**, 301-317.
- Sambrook, J., Fritschi, E. F. et al. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanz, J., Soria, A. C. et al. (2004). Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1024**, 139-146.
- Sapir-Mir, M., Mett, A. et al. (2008). Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol.* **148**, 1219-1228.
- Saroglou, V., Dorizas, N. et al. (2006). Analysis of the essential oil composition of eight *Anthemis* species from Greece. *J. Chromatogr. A* **1104**, 313-322.
- Savage, T., Hatch, M. et al. (1994). Monoterpene synthases of *Pinus contorta* and related conifers. A new class of terpenoid cyclase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4012-4020.
- Schiller, G. and Grunwald, C. (1987). Resin monoterpenes in range-wide provenance trials of *Pinus halepensis* Mill. in Israel. *Silvae Genet.* **36**, 109-114.
- Schillmiller, A. L., Schauvinhold, I. et al. (2009). Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 10865-10870.
- Schmid, C. and Ziegler, H. (1992). Permeation characteristics of isolated cuticles of *Citrus Aurantium* L for monoterpenes. *Trees-Struct. Funct.* **6**, 172-177.
- Schnee, C., Kollner, T. G. et al. (2002). The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)- $\beta$ -farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiol.* **130**, 2049-2060.
- Schnepf, E. (1974). *Gland cells*. In Robards, A.W. (eds.), *Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure*. McGraw-Hill, New York, NY, pp 331-357.
- Schnepf, E. (1968). Zur Feinstruktur der Schleimszernierenden Drüsenhaare auf der Ochrea von Rumex und Rheum. *Planta* **79**, 22-34.
- Schuler, M. (1996). The Role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol.* **112**, 1411-1419.

- Schulz, H., Özkan, G. et al. (2005). Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **39**, 249-256.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. et al. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* **54**, 712-732.
- Seemann, M., Zhai, G. Z. et al. (2002). Pentalenene synthase. Analysis of active site residues by sitedirected mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7681-7689.
- Segur-Fantino, N., Bahuaud, G. et al. (1988). Etude de la variabilité génétique au sein d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* P. Pill.). *Parf. Cosm. Arôm.* **80**, 116-120.
- Sevinate-Pinto, I. and Antunes, T. (1991). Glandular trichomes of *Teucrium scorodonia* L. ultrastructure and secretion. *Flora* **185**, 207-213.
- Seybold, S. J., Bohlmann, J. et al. (2000). Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective and synthesis. *Can Entomol.* **132**, 697-753.
- Sharkey, T. D., Chen, X. et al. (2001). Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiol.* **125**, 2001-2006.
- Sharkey, T. D., Yeh, S. et al. (2005). Evolution of the isoprene biosynthetic pathway in kudzu. *Plant Physiol.* **137**, 700-712.
- Sharkey, T. D., Wiberley, A. E. et al. (2008). Isoprene emission from plants: Why and how. *Ann. Bot.* **101**, 5-18.
- Sharon-Asa, L., Shalit, M. et al. (2003). *Citrus* fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *Plant J.* **36**(5), 664-674.
- Shen, B., Zheng, Z. et al. (2000). A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14807-14812.
- Sherwin, E. R. (1990). *Antioxidants*, In: *Food Additives*, (eds. Branen, A.L., Davidson, P.M. and Salminen, S.). Marcel Dekker, New York, pp. 139-193.
- Shimada, T., Endo, T. et al. (2005). Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8 cineole synthases in Citrus unshiu Marc. *Plant Sci.* **168**, 987-995.
- Shishova, E. Y., di Costanzo, L. et al. (2007). X-ray crystal structure of aristolochene synthase from *Aspergillus terreus* and evolution of templates for the cyclization of farnesyl diphosphate. *Biochemistry* **46**, 1941-1951.
- Simonpoli, P. (1993). In *Arburi, Arbigliule, Savoirs populaires sur les plantes de corse*. Parc Naturel Regional de la Corse, Ajaccio, Corsica.
- Singh, H. P., Batish, D. R. et al. (2006).  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Ann. Bot.* **98**, 1261-1269.
- Skoula, M., Abidi, C. et al. (1996). Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 255-260.
- Sökmen, A., Gulluce, M. et al. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Contr.* **15**, 627-634.
- Sonboli, A., Salehi, P. et al. (2004). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta crispa* Willd. from Iran. *Z. Naturforsch C.* **59**, 653-656.
- Song, M. J. and Kim, N. M. (2003). Antimicrobial action of *p*-hydroxyphenyl acrylate. *Int. Biodeter. Biodegr.* **52**, 107-113.
- Spurgeon, S. L. and Porter, J. W. (1981). *Biosynthesis of isoprenoid compounds*. (eds.), John Wiley and Sons, New York, Vol. 1. 558p.



- Stahl-Biskup, E. (2002). *Essential oil chemistry of the genus Thymus - a global view*. Stahl- Biskup, E. and Sáez, F. (eds.), *Thyme: the genus Thymus*, Taylor and Francis, London pp. 75-124.
- Starks, C. M., Back, K. et al. (1997). Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science* **277**, 1815-1820.
- Steele, C. L., Crock, J. et al. (1998). Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 2078-2089.
- Stevens, K. (1984). *Biological activity and chemistry of sesquiterpene lactones*. In Nes, W.D., Fuller, G. and Tsai L. (eds.), *Isopentenoids in plants*, Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 65-80.
- Stoessel, A., Stothers, J. B. et al. (1976). Sesquiterpenoid stress compounds of the solanaceae. *Phytochemistry* **15**, 855-872.
- Stofer Vogel, B., Wildung, M. R. et al. (1996). Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*) cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 23262-23268.
- Suarez-Cervera, M. and Seoane-Camba, J. A. (1986). Taxonomía numérica de algunas especies de *Lavandula* L., basada en caracteres morfológicos, cariológicos y palinológicos. *Anales. Jard. Bot. Madrid.* **42**, 395-409.
- Sudriá, C., Piñol, M. T. et al. (1999). Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell Tiss. Org.* **58**(3), 177-184.
- Summons, R. E., Jahnke, L. L. et al. (1999). 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**, 554-557.
- Sun, T. P. and Kamiya, Y. (1994). The *Arabidopsis* *GAL* locus encodes the cyclase entkaurene synthetase a of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518.

## -T-

- Tabanca, N., Kırimer, N. et al. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 4300-4303.
- Takahashi, S. and Koyama, T. (2006). Structure and function of cisprenyl chain elongating enzymes. *Chem. Rev.* **6**, 194-205.
- Takeda, K. (1974). Stereospecific cope rearrangement of the germacrene-type sesquiterpenes. *Tetrahedron* **30**, 1525-1534.
- Tamura K, Dudley J. et al. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596-1599.
- Tarayre, M., Thompson, J. D. et al. (1995). Intraspecific variation in the inhibitory effects of *Thymus vulgaris* (Labiatae) monoterpenes on seed-germination. *Oecologia* **101**, 110-118.
- Tarshis, L. C., Yan, M. et al. (1994). Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 10871-10877.
- Tarshis, L. C., Proteau, P. J. et al. (1996). Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15018-15023.
- Teissedre, T. L., Frankel, E. N. et al. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wine. *J. Sci. Food Agr.* **70**, 55-61.

- Tellez, M. R., Khanb, I. A. et al. (2004). Steam distillation–solid-phase microextraction for the detection of *Ephedrasinica* in herbal preparations. *J. Chromatogr. A* **1025**, 51-56.
- Terry, G. M., Stokes, N. J. et al. (1995). Exposure to isoprene promotes flowering in plants. *J. Exp. Bot.* **46**, 1629-1631.
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 297-304.
- Tholl, D., Chen, F. et al. (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J.* **42**, 757-771.
- Thompson, J. D. (2002). *Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphism in thyme*. In: *Thyme: the Genus Thymus* (eds. Stahl-Biskup E & Saez F), pp. 44-74. Taylor & Francis, London.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. et al. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**(22), 4673-4680.
- Tomas-Barberan, F. A., Grayer-Barkmeijer, R. J. et al. (1988). Distribution of 6-hydroxy, 6-methoxy-and 8-hydroxyflavone glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and related families. *Phytochemistry* **27**: 2631-2645.
- Tomei, P. E., Cioni, P. L. et al. (1995). Evaluation of the chemical composition of the essential oils of some Lamiaceae from Serrania de Ronda (Andalucia, Spain). *J. Essent. Oil Res.* **7**, 279-282.
- Torras-Claveria, L., Jauregui, O. et al. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) Waste. *J. Agr. Food Chem.* **55**(21), 8436-8443.
- Trapp, S. C. and Croteau, R. (2001a). Defensive resin biosynthesis in conifers. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **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. J., Tumlinson, J. H. et al. (1990). Exploitation of herbivore induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**, 1251-1253.
- Turner, G. W. and Croteau, R. (2004). Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunolocalization of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiol.* **136**, 4215-4227.
- Turner, G., Gershenzon, J. et al. (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.
- Turner, G. W., Gershenzon, J. et al. (2000a). Development of peltate glandular trichomes of Peppermint. *Plant Physiol.* **124**, 665-679.
- Turner, G. W., Gershenzon, J. et al. (2000b). Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol.* **124**, 655-664.
- Tutin, T. G., Heywood, V. H. et al. (1972). *Flora Europaea*. Volume 3: *Diapensiaceae to Myoporaceae*. Cambridge university Press : 370p.

**-U-**

- Ullmann, A., Jacob, F. et al. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **24**, 339-43.
- Ultee A, Bennik, M. H. et al. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1561-1568.
- Ulubelen, A., Topcu, G. et al. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* **36**, 971-974.
- Unsicker, S. B., Kunert, G. et al. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 479-485.
- Upton, T. M. (1997). *Systematics of the genus Lavandula* L. (Lamiaceae), University of Reading: 446.
- Upton T. (2002). *The taxonomy of the genus Lavandula* L. In Lis-balchin, M. *Lavender, the genus Lavadula*. London & New York: Taylor and Francis, pp 2-34.
- Upton, T. (2009). *The Monograph, an overview: new classification and future prospects*. First international Lavender conference, Cambridge university botanic garden and Clare college.
- Upton, T. and Andrews, S. (2004). *The genus Lavandula*. Portland and Oregon, USA: Timber Press. p 442.
- Upton, T. M., Grayer, R. J. et al. (2000). Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem. Syst. Ecol.* **28**, 991-1007.
- Usmanghani, K., Saeed, A. et al. (1997). *Indusynic Medicine. Traditional Medicine of Herbal, Animal and Mineral Origin in Pakistan*, University of Karachi, (1997). University of Karachi Press, p 273.

**-V-**

- Valentini, G., Arnold, N. et al. (1993). Etude chimique comparative des huiles essentielles de quatre populations de *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* spontanées de Chypre. *Plantes Méd. Phytothér.* **26**, 289-299.
- van den Dool, H., and Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, **11**, 463-471.
- van der Fits, L. and Memelink, J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**, 295-297.
- Vasconcelos Silva, M. G., Craveiro, A. A. et al. (1999). Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*. *Fitoterapia* **70**, 32-34.
- Vekiari, S. A, Protopapadakis, E. F. et al. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *J. Agr. Food Chem.* **5**(1), 147-153.
- Venskutonis, P. R., Dapkevicius, A. et al. (1997). Composition of the essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from Lithuania. *J. Essent. Oil Res.* **9**, 107-110.
- Viljoen, A., Vuuren, S. V. et al. (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae) - the antimicrobial and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *J. Ethnopharmacol.* **88**, 137-143.

- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A. et al. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease. *J. Agr. Food Chem.* **43**, 2800-2802.
- Vogel, B. S., Wildung, M. R. et al. (1996). Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*) cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 23262-23268.
- Vokou, D., Kokkini, S. et al. (1993). Geographic variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential Oils. *Biochem. Syst. Ecol.* **21**, 287-295.
- von Heijne, G. and Nishikawa, K. (1991). Chloroplast transit peptides the perfect random coil? *FEBS Lett.* **278**, 1-3.
- Vujisic L., Vuckovic I. et al. (2006). Comparative examination of the essential oils of *Anthemis ruthenica* and *A. arvensis* wild-growing in Serbia, *Flavour Fragr. J.* **21**, 458-461.

### -W-

- Wagner, G. J. (1991). Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.* **96**, 675-679.
- Waller, G. R., Frost, G. M. ET AL. (1968). Biosynthesis of monoterpenoids by *Santolina chamaecyparissus* L. *Phytochemistry* **7**, 213-220.
- Weber F. J. and de Bont J. A. M. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimi. Biophys. Acta* **12**, 225-245.
- Weiss, E. A. (1997). *Essential Oil Crops*, CAB International, Wallingford, UK.
- West, C. A. (1981). *Biosynthesis of diterpenes*. In Porter, J. W. and Spurgeon, S. L. (eds.), *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. Vol. 1. Wiley, New York. pp. 375.
- Whatley, J. M., McLean, B. et al. (1991). Continuity of chloroplast and endoplasmic reticulum membranes in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* **117**, 209-217.
- Whittington, D. A., Wise, M. L. et al. (2002). Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 15375-15380.
- Wichi, H. P. (1988). Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food. Chem. Toxicol.* **26**, 717-723.
- Wildung, M. R. and Croteau, R. (1996). A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 9201-9204.
- Williams, D. C., McGarvey, D. J. et al. (1998). Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* **37**, 12213-12220.
- Williams, D. C., Wildung, M. R. et al. (2000). Heterologous expression and characterization of a "pseudomature" form of taxadiene synthase involved in paclitaxel (Taxol) biosynthesis and evaluation of a potential intermediate and inhibitors of the multistep diterpene cyclization reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 137-146.
- Wise, M. L. and Croteau, R. (1999). *Monoterpene biosynthesis*. In Cane, D.E. (eds.), *Comprehensive Natural Product Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*, Vol. 2, Elsevier Science, Oxford, UK. pp 97-153.

- Wise, M. L., Savage, T. J. et al. (1998). Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) – cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 14891-14899.
- Withers, S. T. and Keasling, J. D. (2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl. Microbiol. Biot.* **73**, 980-990.
- Wooding, F. B. P. and Northcote, D. H. (1965). The fine structure of the mature resin canal cells of *Pinus pinea*. *J. Ultra. Res.* **3**, 233-244.
- Wu, S., Schalk, M. et al. (2006). Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1441-1447.

### -X-

- Xaver, H. and Andary, C. (1988). Polyphenols of *Lavandula stoechas* L. *Bull. Liais. Group Polyphé.* **133**, 624-626.
- Xu, Y. H., Wang, J. W. et al. (2004). Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A. *Plant Physiol.* **135**, 507-515.

### -Y-

- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Ann. Rev. Plant Biol.* **59**, 225-251.
- Yamaguchi, S., Saito, T. et al. (1996). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). *Plant J.* **10**, 203-213.
- Yamaura, T., Tanaka, S. et al. (1989). Light dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. *Phytochemistry* **28**, 741-744.
- Yang, D. S., Son, K. C. et al. (2009). Volatile organic compounds emanating from indoor ornamental plants. *Hortscience* **44**, 396-400.
- Yang, T., Li, J. et al. (2005). A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry* **66**, 285-293.
- Yassaa, N. and Williams, J. (2005). Analysis of enantiomeric and non-enantiomeric monoterpenes in plant emissions using portable dynamic air sampling/solid-phase microextraction (PDAS-SPME) and chiral gas chromatography/mass spectrometry. *Atmos. Environ.* **39**, 4875-4884.
- Ye, X., Al-Babili, S. et al. (2000). Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**(5451), 303-305.
- Yin, S., Mei, L. et al. (1997). Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression (characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter). *Plant Physiol.* **115**, 437-451.
- Yuba, A., Yazaki, K. et al. (1996). CDNA cloning, characterization, and functional expression of 4S-(-)-limonene synthase from *Perilla frutescens*. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 280-287.

### -Z-

- Zhang, Y. and Wang, L. (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol.* **5**, 1-12.

- Zhao, C., Zeng, Y. et al. (2009). Comparative analysis of essential oils from eight herbal medicines with pungent flavor and cool nature by GC-MS and chemometric resolution methods. *J. Sep. Sci.* **32**, 660-670.
- Zinkel, D. F., and Russell, J. (1989). *Naval Stores: Production, Chemistry, Utilization*. Pulp Chemicals Association, New York. p 1060.
- Zrira, S. and Benjilali, B. (2003). The constituents of the oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *atlantica* Br.-Bl. and *L. stoechas* ssp. *stoechas* from Morocco. *J. Essent. Oil Res.* **15**, 68-69.
- Zuckermandl, E. and Pauling, L. (1965). *Evolutionary divergence and convergence in proteins*, pp. 97-166 in *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York.
- Zulak, K. G., Dullat, H. K. et al. (2010). Immunofluorescence localization of levopimaradiene/abietadiene synthase in methyl jasmonate treated stems of sitka spruce (*Picea sitchensis*) shows activation of diterpenoid biosynthesis in cortical and developing traumatic resin ducts. *Phytochemistry* **71**, 1695-1699.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J. et al. (2009). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav. *Chem. Biodivers.* **6**, 1283-1292.
- Zuzarte, M., Dinis, A. M. et al. (2010). Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Ind. Crop. Prod.* **32**, 580-587.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J. et al. (2011). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *J. Med. Microbiol.* **60**, 612-618.

# ANNEXE

**Annexe I : Article huiles essentielles de populations algériennes de *L. stoechas* publié dans *Chemistry & Biodiversity***

**Annexe II : Poster huiles essentielles de populations algériennes de *L. stoechas* présenté lors du 12<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et plantes médicinales, Grasse mars 2010**

**Annexe III : Poster terpene synthases de *L. pedunculata* présenté lors du 13<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et plantes médicinales, Grasse avril 2011**



Annexe I : Article huiles essentielles de populations algériennes de *L. stoechas* publié dans  
*Chemistry & Biodiversity*

CHEMISTRY &amp; BIODIVERSITY – Vol. 8 (2011)

937

**Essential Oils from Wild Populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.:  
Composition, Chemical Variability, and *in vitro* Biological Properties**

by Tarek Benabdelkader<sup>a) b)</sup>, Abdelghani Zitouni<sup>c)</sup>, Yann Guitton<sup>b)</sup>, Frédéric Jullien<sup>b)</sup>,  
Dany Maitre<sup>d)</sup>, Hervé Casabianca<sup>d)</sup>, Laurent Legendre<sup>e) b)</sup>, and Abdelkrim Kameli<sup>e)</sup>

<sup>a)</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara, 35000 Boumerdes,  
Algeria

<sup>b)</sup> Université de Lyon, F-42023 Saint Etienne; Université de Saint Etienne, Jean Monnet,  
F-42023 Saint Etienne; Laboratoire de Biotechnologie Végétale Appliquée aux Plantes Aromatiques et  
Médicinales, Faculté des Sciences et Techniques, EA 3061, F-42023 Saint Etienne

(phone: +33-477481524; fax: +33-477481584; e-mail: laurent.legendre@univ-st-etienne.fr)

<sup>c)</sup> Laboratoire de Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse, Ecole Normale Supérieure,  
16050 Kouba, Alger, Algeria

<sup>d)</sup> Service Agroalimentaire, CNRS Service Central d'Analyse, F-69360 Solaize, Lyon

<sup>e)</sup> Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, Ecole Normale Supérieure, 16050 Kouba, Alger, Algeria

In an effort to develop local productions of aromatic and medicinal plants, a comprehensive assessment of the composition and biological activities of the essential oils (EOs) extracted from the aerial flowering parts of wild growing *Lavandula stoechas* L. collected from eleven different locations in northern Algeria was performed. The oils were characterized by GC-FID and GC/MS analyses, and 121 compounds were identified, accounting for 69.88–91.2% of the total oil compositions. The eleven oils greatly differed in their compositions, since only 66 compounds were common to all oils. Major EO components were fenchone (**2**; 11.27–37.48%), camphor (**3**, 1.94–21.8%), 1,8-cineole (**1**; 0.16–8.71%), and viridiflorol (**10**; 2.89–7.38%). The assessed *in vitro* biological properties demonstrated that the DPPH-based radical-scavenging activities and the inhibition of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid-based lipid oxidation differed by an eight-fold factor between the most and the least active oils and were linked to different sets of molecules in the different EOs. The eleven EOs exhibited good antimicrobial activities against most of the 16 tested strains of bacteria, filamentous fungi, and yeasts, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 0.16 to 11.90 mg/ml.

**1. Introduction.** – The genus *Lavandula* L. includes 39 species, numerous hybrids, and nearly 400 registered cultivars [1]. Its natural distribution area stretches from the Canary Islands, Cape Verde Islands, and Madeira, across the Mediterranean basin, the Arabian Peninsula, and all the way to tropical North Africa, and, with a disjunction, to India [2]. This genus is represented in the *Algerian Flora* by six species, *i.e.*, *L. stoechas* L., *L. multifida* L., *L. coronopifolia* POIR., *L. pubescens* DEC., *L. dentata* L., and the more recently added *L. antineae* MAIRE [1–3].

In Algeria, *L. stoechas* L. (syn. *Stoechas officinarium* MOENCH) is known as 'Helhal' and is widely distributed across all the northern fringes of the country. It has been reported that this plant is widespread throughout the Mediterranean basin, where it can be a common component of low-growing shrub vegetations on acidic soils (heath) [1]. The large distribution of *L. stoechas* in many countries bordering the Mediterranean

Sea is fairly unique within the genus *Lavandula*. The reported medicinal properties of this species are also very diverse, since *L. stoechas* has traditionally been used as expectorant, carminative, stimulant, wound healing adjuvant [4][5], antispasmodic, sedative, diuretic, therapy for rheumatic diseases [6], analgesic, and antiseptic [7]. Most of these properties are due to the essential oil (EO) fraction of the plant. In the Algerian folk medicine, the aerial parts of *L. stoechas*, especially the inflorescences, are used as an antiseptic and stimulant agent [8], and in the Algerian cuisine, they are also used as culinary herb to prepare the most popular couscous.

The composition of *L. stoechas* EO has been studied from wild and cultivated plants collected in several Mediterranean countries. About 60 chemical constituents have been described. These mostly include mono- and sesquiterpenes. The most commonly reported chemotype is a fenchone/camphor chemotype, though a fenchone/1,8-cineole and a pulegone chemotype have also been reported [4–6][9–20]. Additional compounds have been detected in non-EO extracts of *L. stoechas*. These include flavonoids [1], longipinene derivatives [21], and triterpenoids [22].

Several recent studies have revealed that *L. stoechas* EO and other extracts have antimicrobial [4][6][17][19][23], insecticidal [24], and antioxidant [7] properties. Nevertheless, most of those studies only assayed single EO samples, so that the chemical basis for the biological properties of *L. stoechas* EO could not be assessed. The antioxidant properties were also very scantily characterized.

As part of our ongoing efforts to characterize and valorize the Algerian aromatic and medicinal plants, we conducted an exhaustive investigation of the chemical composition and variability of EOs obtained from the flowering aerial parts of *L. stoechas* harvested in eleven localities in Algeria (Fig. 1 and Table 1). We also conducted the first characterization of the DPPH radical-scavenging and  $\beta$ -carotene/linoleic acid-bleaching properties of *L. stoechas* EO and tried to correlate these activities with the abundance of specific compounds in the EO. Antimicrobial properties of the EOs were also assessed.

**2. Results and Discussion.** – 2.1. *Extraction Yields.* Conventional hydrodistillation of the aerial flowering parts of the eleven wild populations of *L. stoechas* from northern Algeria yielded light to dark yellow EOs with yields ranging from 0.34 to 1.63% (w/w, on the dry weight basis; Table 1). Even for the four populations harvested at the same locality, i.e., LS4, LS5, LS6, and LS7 (Fig. 1), the EO yields exhibited large variability, spreading from 0.52 to 1.63%. This may be a typical feature of wild *L. stoechas*, since wild Spanish populations of *L. stoechas* also exhibited similarly high variations of EO yields [10]. Similar conclusions were also drawn for wild populations from Crete [12] and Corsica [13]. These differences in EO yields may be the result of either uncontrolled biotic and abiotic elicitations or of inherent genetic differences, as already described for other EO producing plant species [25][26].

2.2. *Essential Oil Composition and Variability.* The EOs of eleven *L. stoechas* populations originating from different locations of northern Algeria (Fig. 1 and Table 1) were subjected to detailed GC-FID and GC/MS analyses, to improve the current knowledge about the *L. stoechas* EO composition and its possible variability. The identified constituents are listed in Table 2, according to their elution order on a HP-1 capillary column. Their retention indices (RIs) on HP-1 and INNOWAX-1



Fig. 1. Geographical origins of the eleven Algerian populations of *L. stoechas* used in this study. For the significance of the population codes, see Table 1.

Table 1. Collection Sites, Main Ecological Features, and Essential Oil (EO) Yields of the Eleven Algerian *L. stoechas* Populations that Served as a Source of EOs in this Study

Population code	Locality	Collection site	Bioclimatic zone <sup>a)</sup>	Rainfall [mm/year]	Geographical location			EO Yield [%, w/w]
					Latitude N	Longitude E	Elevation [m]	
LS1	Skikada	Aïn-Chéraïa	MH	905	36°51'21"	6°43'12"	478	0.71
LS2	Jijel	Iragheune	MH	1200	36°49'22"	5°45'45"	66	0.79
LS3	Boumerdes	Boumerdes	MH	900	36°45'49"	3°28'59"	88	1.16
LS4	Bouira	Lakhdaria	CH	660	36°34'12"	3°34'11"	128	0.52
LS5	Bouira	Ain Bessam	CH	660	36°17'53"	3°39'38"	685	1.63
LS6	Bouira	Guerrouma	CH	660	36°23'44"	3°26'23"	481	1.14
LS7	Bouira	Taguedit	CSA	400	36°09'01"	3°41'21"	200	0.60
LS8	Blida	Hammam Melouane	MH	600	36°28'16"	2°49'46"	346	1.36
LS9	Médéa	Benchicao	CH	615	36°11'53"	2°50'55"	1122	0.34
LS10	Ain Defla	Ain Defla	MSA	470	36°09'14"	2°03'59"	383	0.36
LS11	Chlef	Chlef	MSH	420	36°09'54"	1°19'25"	162	0.52

<sup>a)</sup> Bioclimatic zones: MH, Mediterranean humid; CH, continental humid; CSA, continental semi-arid; MSA, Mediterranean semi-arid; MSH, Mediterranean sub-humid.

Table 2. Chemical Composition of the Essential Oils from the Flowering Aerial Parts of Eleven Algerian Wild Populations of *L. stoechas*

Component <sup>a)</sup>	<i>R<sub>I<sub>HP</sub></sub></i> <sup>b)</sup>	<i>R<sub>I<sub>MSO</sub></sub></i> <sup>c)</sup>	Composition (%)										Identification <sup>d)</sup>				
			<i>LS1</i> <sup>e)</sup>	<i>LS2</i>	<i>LS3</i>	<i>LS4</i>	<i>LS5</i>	<i>LS6</i>	<i>LS7</i>	<i>LS8</i>	<i>LS9</i>	<i>LS10</i>		<i>LS11</i>			
Benzaldehyde <sup>f)</sup>	929	1546	- <sup>g)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS
$\alpha$ -Pinene	932	1037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS, CoGC
$\alpha$ -Fenchene	943	1077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS
Camphene <sup>i)</sup>	945	1088	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS
Verbenene <sup>i)</sup>	948	1147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS, CoGC
Hexanoic acid <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	949	1860	0.37	-	0.11	0.29	-	-	-	-	-	-	0.3	0.19	0.13	-	GC, MS
Oct-1-en-3-ol <sup>i)</sup>	959	1463	0.07	-	-	0.07	-	-	-	-	-	-	0.02	0.14	0.07	-	GC, MS
$\beta$ -Pinene	972	1129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	GC, MS, CoGC
2,3-Dihydro-1,8-cineole <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	979	1211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	-	0.11	-	GC, MS
Lavander lactone <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	998	1700	0.21	0.1	0.13	0.06	0.08	0.26	0.26	0.17	-	-	0.06	0.16	0.12	-	GC, MS
$\alpha$ -Phellandrene	999	1185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-	-	-	GC, MS
Benzyl alcohol <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	1004	1881	0.19	-	0.09	0.07	-	-	-	0.15	0.04	0.24	0.04	0.24	0.11	0.05	GC, MS
$\delta$ -3-Carene	1007	1173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-	-	GC, MS, CoGC
<i>o</i> -Cymene <sup>i)</sup>	1010	1287	-	0.05	0.2	0.12	0.03	-	-	0.11	0.06	-	0.11	0.06	0.19	0.22	GC, MS
$\alpha$ -Terpinene	1011	1202	-	0.07	0.2	0.12	0.11	-	-	0.09	0.03	-	0.09	0.03	0.12	0.02	GC, MS, CoGC
<i>p</i> -Cymene	1013	1295	-	0.08	tr	tr	0.1	-	-	0.44	0.22	-	-	-	-	-	GC, MS, CoGC
Limonene <sup>i)</sup>	1023	1219	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS, CoGC
<b>1,8-Cineol (1)</b>	1023	1229	<b>0.16</b>	<b>8.71</b>	<b>8.49</b>	<b>4.28</b>	<b>4.19</b>	<b>2.21</b>	<b>2.21</b>	<b>1.3</b>	<b>7.51</b>	<b>2.63</b>	<b>5.69</b>	<b>7.85</b>	<b>7.85</b>	<b>7.85</b>	GC, MS, CoGC
<i>o</i> -Cresol <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	1034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	0.07	0.05	-	-	-	MS
<i>p</i> -Cresol <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	1046	2062	0.08	tr	tr	0.05	-	-	-	0.05	0.07	0.09	-	-	-	-	GC, MS
$\gamma$ -Terpinene	1050	1269	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.03	0.03	tr	tr	tr	tr	MS
<i>trans</i> -Thujan-4-ol <sup>i)</sup>	1054	1482	0.05	-	-	-	0.11	0.12	0.12	0.07	0.11	tr	tr	tr	0.06	0.11	GC, MS
<i>cis</i> -Linalool oxide (furanoid) <sup>i)</sup>	1058	1463	0.26	0.41	0.21	0.5	0.25	1.15	1.15	0.37	0.39	0.45	0.45	0.45	0.38	0.38	GC, MS
Camphenilone <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	1060	1486	0.12	0.06	tr	0.05	tr	tr	tr	0.11	0.02	0.04	0.05	0.07	0.07	0.07	GC, MS
<b>Fenchone (2)</b>	1068	1427	<b>11.27</b>	<b>37.48</b>	<b>24.11</b>	<b>24.14</b>	<b>36.76</b>	<b>16.35</b>	<b>16.35</b>	<b>14.56</b>	<b>34.48</b>	<b>26.52</b>	<b>29.92</b>	<b>32.42</b>	<b>32.42</b>	<b>32.42</b>	GC, MS, CoGC
<i>p</i> - $\alpha$ -Dimethylstyrene <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	1073	1463	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-	-	-	GC, MS
<i>trans</i> -Linalool oxide (furanoid) <sup>i)</sup>	1073	1491	0.34	0.4	0.22	0.39	0.29	1.01	1.01	0.29	0.33	0.38	0.35	0.35	0.35	0.35	GC, MS
Terpinolene	1080	1308	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.01	tr	tr	tr	tr	tr	MS
Nonanal <sup>f)</sup> <sup>i)</sup>	1082	1414	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	MS
Linalool	1084	1561	0.36	0.48	0.15	0.5	0.23	1.06	1.06	0.45	0.15	0.46	0.37	0.53	0.53	0.53	GC, MS, CoGC
<i>cis</i> -Thujan-4-ol <sup>i)</sup>	1084	1569	0.06	-	-	-	0.1	-	-	-	0.11	0.07	0.1	0.1	0.1	0.1	GC, MS

Table 2 (cont.)

Components <sup>a)</sup>	$R_{I_{HP-I}}$ <sup>b)</sup>	$R_{I_{NNO}}$ <sup>c)</sup>	Composition (%)										Identification <sup>d)</sup>				
			LS1 <sup>e)</sup>	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11	tr	GC, MS	GC, MS, CoGC	
Hotrienol <sup>f)</sup>	1084	1627	0.12	0.07	tr	-	0.03	tr	0.01	tr	0.1	tr	0.01	tr	0.1	tr	GC, MS
2-Phenylethyl alcohol <sup>f)</sup>	1084	1936	0.12	tr	0.43	0.1	0.09	0.13	0.24	0.04	0.05	0.12	0.24	0.04	0.05	0.12	GC, MS, CoGC
$\alpha$ -Thujone <sup>f)</sup>	1087	1463	0.08	0.16	0.19	0.15	0.14	0.14	0.25	0.08	0.29	0.2	0.14	0.08	0.29	0.2	GC, MS
$\alpha$ -Fenchol	1099	1607	0.42	1.37	0.61	0.75	1.01	0.58	0.93	1.0	1.3	0.79	0.8	1.0	1.3	0.79	GC, MS, CoGC
Chrysanthenone <sup>f)</sup>	1100	1505	0.1	0.13	0.16	0.22	0.06	0.01	0.65	0.13	tr	0.09	0.09	0.13	tr	0.09	GC, MS
<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol <sup>f)</sup>	1104	1649	0.05	0.11	0.06	tr	0.08	-	-	0.08	-	-	-	0.08	-	-	GC, MS
$\alpha$ -Campholenal <sup>f)</sup>	1105	1510	0.16	0.22	0.24	0.17	0.29	0.13	0.27	0.15	0.21	0.23	0.19	0.15	0.21	0.23	GC, MS
<i>cis</i> -Pinar-2-ol <sup>f)</sup>	1107	-	0.05	0.19	0.19	0.11	-	0.16	0.11	0.15	0.15	0.23	0.22	0.15	0.15	0.23	MS
Nopinone <sup>f)</sup>	1108	1616	tr	0.12	0.01	0.07	-	0.05	0.1	0.19	0.1	0.08	0.14	0.19	0.1	0.08	GC, MS
<b>Camphor (3)</b>	1121	1556	<b>9.77</b>	<b>5.81</b>	<b>1.94</b>	<b>17.12</b>	<b>15.50</b>	<b>21.8</b>	<b>11.56</b>	<b>8.69</b>	<b>8.99</b>	<b>13.19</b>	<b>14.52</b>	<b>8.69</b>	<b>8.99</b>	<b>13.19</b>	GC, MS, CoGC
<i>trans</i> -Pinocarveol <sup>f)</sup>	1124	1683	0.42	0.37	1.61	0.24	0.22	0.22	0.94	0.24	0.33	0.37	0.29	0.24	0.33	0.37	GC, MS
<i>cis</i> -Verbenol <sup>f)</sup>	1125	1675	0.45	0.56	0.45	0.3	0.22	0.34	0.36	0.28	0.46	0.54	0.48	0.36	0.28	0.46	GC, MS
Sabina ketone <sup>f)</sup>	1125	1668	0.04	0.07	0.12	tr	0.03	0.01	0.05	0.06	0.06	0.06	0.11	0.06	0.06	0.11	GC, MS
<i>trans</i> - <b>Verbenol<sup>f)</sup></b>	1127	1699	<b>3.0</b>	<b>2.33</b>	<b>0.11</b>	<b>1.0</b>	<b>0.83</b>	<b>0.76</b>	<b>0.7</b>	<b>0.03</b>	<b>1.29</b>	<b>1.33</b>	<b>0.58</b>	<b>0.03</b>	<b>1.29</b>	<b>1.33</b>	GC, MS
$\alpha$ -Phellandren-8-ol <sup>f)</sup>	1130	1727	tr	0.18	tr	0.13	tr	-	-	tr	tr	tr	0.13	tr	tr	0.13	GC, MS
<i>exo</i> -Methylcamphenilol <sup>f)</sup>	1133	1625	0.14	0.09	0.21	0.1	0.18	0.09	0.35	0.1	0.14	0.1	0.1	0.1	0.14	0.1	GC, MS
Pinocarvone <sup>f)</sup>	1139	1604	0.19	0.31	0.14	0.3	0.13	0.13	0.25	0.3	0.17	0.19	0.26	0.3	0.17	0.19	GC, MS
$\beta$ -Phellandren-8-ol <sup>f)</sup>	1145	1735	0.16	0.15	0.02	0.52	0.19	0.15	0.25	0.32	0.18	0.16	tr	0.25	0.32	0.18	GC, MS
$\delta$ -Terpineol <sup>f)</sup>	1146	1699	0.05	0.5	0.64	0.16	0.13	0.76	0.45	0.26	0.34	0.57	0.88	0.45	0.26	0.34	GC, MS, CoGC
<i>cis</i> -Linalool oxide (pyranoid) <sup>f)</sup>	1148	1762	0.51	0.18	tr	0.18	0.1	0.29	0.15	0.17	0.29	0.42	0.16	0.17	0.29	0.42	GC, MS
Borneol	1150	1720	1.13	0.2	0.21	0.71	0.73	0.52	0.95	0.32	0.63	0.87	0.29	0.32	0.63	0.87	GC, MS, CoGC
Lavandulol	1150	1688	0.20	0.11	0.21	0.09	0.08	0.11	0.13	0.11	0.3	0.29	0.18	0.11	0.3	0.29	GC, MS, CoGC
<i>trans</i> -Linalool oxide (pyranoid) <sup>f)</sup>	1152	1783	0.42	0.21	tr	0.18	0.15	0.2	0.28	0.16	0.35	0.37	0.23	0.16	0.35	0.37	GC, MS
<i>p</i> -Methylacetophenone (4) <sup>f)</sup>	1154	1803	0.18	0.16	0.28	0.11	0.11	0.29	0.4	0.18	0.18	0.22	0.18	0.18	0.18	0.22	GC, MS
<i>m</i> -Cymen-8-ol (5) <sup>f)</sup>	1155	1867	<b>0.14</b>	<b>0.23</b>	<b>2.06</b>	<b>2.02</b>	<b>1.7</b>	<b>0.42</b>	<b>0.42</b>	<b>3.21</b>	<b>0.79</b>	<b>0.11</b>	<b>0.81</b>	<b>3.21</b>	<b>0.79</b>	<b>0.11</b>	GC, MS
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1160	1874	<b>2.64</b>	<b>1.32</b>	<b>2.0</b>	<b>1.81</b>	<b>1.60</b>	<b>1.31</b>	<b>1.78</b>	<b>2.77</b>	<b>2.74</b>	<b>1.53</b>	<b>1.83</b>	<b>2.77</b>	<b>2.74</b>	<b>1.53</b>	GC, MS
<b>Terpinen-4-ol</b>	1162	1622	<b>0.32</b>	<b>0.5</b>	<b>1.17</b>	<b>0.31</b>	<b>0.18</b>	<b>0.3</b>	<b>2.14</b>	<b>0.4</b>	<b>0.35</b>	<b>0.35</b>	<b>0.5</b>	<b>0.4</b>	<b>0.35</b>	<b>0.35</b>	GC, MS, CoGC
Myrtenal <sup>f)</sup>	1170	1665	0.43	0.5	0.48	0.36	0.33	0.27	0.43	0.36	0.56	0.49	0.47	0.43	0.36	0.56	GC, MS
$\alpha$ -Terpineol	1172	1715	0.22	0.55	0.62	0.21	0.3	0.41	0.37	0.41	0.53	0.39	0.96	0.37	0.41	0.53	GC, MS, CoGC
Methylchavicol <sup>f)</sup>	1175	1705	-	0.26	0.64	0.16	0.17	-	0.28	0.09	0.05	0.23	0.15	0.28	0.09	0.05	GC, MS
Myrtenol	1179	1821	0.59	0.66	0.56	0.41	0.3	0.47	0.66	0.56	1.13	0.8	0.64	0.66	1.13	0.8	GC, MS

Table 2 (cont.)

Components <sup>a</sup>	$RJ_{HPL}$ <sup>b</sup>	$RJ_{NMR}$ <sup>c</sup>	Composition (%)										Identification <sup>d</sup>	
			LS1 <sup>e</sup>	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10		LS11
Verbenone	1180	1749	2.67	2.18	1.22	1.78	1.43	0.7	1.36	2.07	1.49	1.22	0.9	GC, MS
<i>trans</i> -Piperitol <sup>f</sup> )	1191	1775	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS
<i>trans</i> -Carveol <sup>l</sup> )	1197	1860	0.88	0.81	0.69	0.42	0.59	0.48	0.71	0.4	0.86	0.57	0.54	GC, MS
<i>exo</i> -2-Hydroxycineole <sup>f</sup> )	1198	1881	0.18	tr	0.22	0.09	0.03	0.04	0.35	0.14	0.55	0.49	0.34	GC, MS
$\alpha$ -Fenchyl acetate <sup>l</sup> )	1207	1495	tr	0.37	0.12	0.12	0.15	0.2	0.28	0.36	0.21	0.31	0.25	GC, MS
Cuminaldehyde <sup>l</sup> )	1213	1821	tr	0.06	0.15	0.26	0.13	tr	0.08	0.08	0.23	0.05	0.28	GC, MS
Carvone	1215	1769	0.52	0.74	0.83	0.34	0.52	0.46	0.71	0.58	0.71	0.67	0.79	GC, MS, CoGC
<i>cis</i> -Piperitone oxide <sup>f</sup> )	1222	-	0.74	0.09	0.48	0.29	0.29	0.13	0.58	0.45	0.59	0.31	0.15	GC, MS
2-Phenylethyl acetate <sup>f</sup> )	1225	1839	0.08	-	0.4	tr	tr	-	0.08	0.12	0.29	0.12	0.17	GC, MS, CoGC
<i>trans</i> -2-Hydroxypinocampnone <sup>f</sup> )	1226	-	0.18	-	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	MS
Piperitenone <sup>l</sup> )	1226	1764	0.11	-	-	0.08	0.18	-	0.19	-	-	-	-	GC, MS
<i>trans</i> -Piperitone oxide <sup>f</sup> )	1232	-	0.85	0.26	tr	0.1	0.33	0.3	0.32	0.11	0.3	0.22	0.1	GC, MS
Geraniol <sup>f</sup> )	1233	1866	0.14	0.09	-	0.23	-	-	0.29	0.17	0.21	0.12	0.28	GC, MS, CoGC
Perillaldehyde <sup>f</sup> )	1245	1829	0.18	0.13	0.17	0.13	0.14	0.21	1.31	0.12	0.27	0.26	0.18	GC, MS
Cuminol <sup>f</sup> )	1263	2134	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	0.25	0.18	GC, MS
Thymol <sup>l</sup> )	1267	2213	tr	-	-	0.09	-	-	-	tr	tr	tr	tr	GC, MS, CoGC
$\alpha$ -Necrodiol acetate (6) <sup>l</sup> )	1269	1601	-	-	0.83	-	-	-	1.34	-	-	-	-	GC, MS
Bornyl acetate	1270	1612	2.82	0.47	0.46	2.36	3.03	3.73	4.0	1.61	1.52	3.12	0.92	GC, MS, CoGC
Lavandulyl acetate	1271	1606	0.13	tr	tr	tr	0.05	tr	tr	0.08	0.11	0.11	0.08	GC, MS, CoGC
Undecan-2-one <sup>f</sup> )	1273	1619	-	-	0.61	0.4	tr	-	-	-	-	-	-	GC, MS
Carvacrol <sup>l</sup> )	1276	2240	tr	-	-	0.24	-	-	-	0.02	tr	tr	tr	GC, MS, CoGC
Unknowns (MM150 and MM164)	1276	-	0.46	-	2.03	1.6	2.18	0.58	0.51	2.39	1.32	0.27	1.25	MS
Filifolide A <sup>f</sup> )	1278	-	0.58	0.14	tr	0.12	tr	-	-	0.06	0.17	0.11	tr	MS
Myrtenyl acetate <sup>l</sup> )	1305	1704	1.27	0.61	2.17	1.69	1.62	2.54	1.72	1.01	2.51	1.68	2.14	GC, MS, CoGC
Piperitenone <sup>l</sup> )	1308	1967	0.14	tr	tr	0.08	tr	tr	tr	0.03	0.09	tr	tr	GC, MS
Eugenol <sup>f</sup> )	1327	2196	0.20	0.08	0.13	0.19	-	0.08	0.44	0.04	0.29	0.23	0.08	GC, MS, CoGC
Unknown (MM168)	1351	2157	1.02	-	-	0.21	0.36	0.44	0.29	0.13	0.19	0.21	0.14	MS
Cyclosativene <sup>l</sup> )	1369	1506	0.06	0.11	0.1	0.24	0.07	-	-	0.11	-	0.16	0.07	GC, MS
$\alpha$ -Copaene	1377	1517	tr	tr	tr	0.06	-	-	-	0.06	-	0.08	0.06	GC, MS, CoGC
Sativene <sup>f</sup> )	1391	1569	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-	GC, MS
<i>trans</i> - $\beta$ -Caryophyllene <sup>l</sup> )	1419	1628	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	GC, MS, CoGC

Table 2 (cont.)

Components <sup>a)</sup>	$R_{I_{HP-1}}^b)$	$R_{I_{INNO}}^c)$	Composition (%)										Identification <sup>d)</sup>			
			LS1 <sup>e)</sup>	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10		LS11		
Alloaromadendrene <sup>i)</sup>	1459	1681	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS
$\beta$ -Selinene <sup>f)</sup>	1482	1750	0.21	0.11	-	0.05	-	-	-	-	0.09	0.05	-	0.13	-	GC, MS
Dihydroactinidiolide <sup>f)</sup>	1486	-	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MS
Epicubebol (7) <sup>f)</sup>	1488	1967	0.57	0.52	0.15	0.47	0.17	0.33	0.14	0.26	0.26	0.34	1.0	0.52	0.14	GC, MS
Ledene <sup>f)</sup>	1491	1730	0.16	0.15	-	0.36	-	-	-	0.09	0.09	0.28	0.25	0.14	0.08	GC, MS
$\alpha$ -Muuroleone	1494	1753	0.16	0.25	-	0.19	-	0.13	0.14	0.10	0.10	0.17	0.13	0.08	0.06	GC, MS, CoGC
$\gamma$ -Cadinene	1508	1792	0.05	0.03	0.12	0.06	tr	0.01	0.02	0.04	0.1	0.26	0.06	0.06	0.06	GC, MS
Cubebol (8) <sup>f)</sup>	1509	1914	0.38	0.71	0.44	0.25	0.16	0.29	0.32	0.29	0.38	0.15	0.67	0.67	0.67	GC, MS
Calamenene <sup>f)</sup>	1510	1860	0.15	tr	0.21	0.2	tr	0.12	0.1	0.12	0.08	0.21	0.11	0.11	0.11	GC, MS
$\delta$ -Amorphene (9) <sup>f)</sup>	1511	1730	0.23	0.59	0.18	0.46	tr	0.17	0.22	0.15	0.2	0.59	0.32	0.32	0.32	GC, MS
$\delta$ -Cadinene	1515	1787	0.11	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.04	0.04	0.12	0.06	0.06	0.06	GC, MS
Cadina-1,4-diene <sup>f)</sup>	1525	1816	0.18	tr	-	0.14	-	-	-	0.06	-	0.12	-	-	-	GC, MS
$\alpha$ -Calacorene <sup>f)</sup>	1529	1946	-	tr	-	0.18	-	0.16	-	0.12	0.11	0.2	-	-	-	GC, MS
Myrtenyl valerate <sup>f)</sup>	1542	-	0.69	0.56	0.33	0.26	0.22	0.45	0.24	0.1	0.14	0.41	0.2	0.2	0.2	GC, MS
<i>cis</i> - $\alpha$ -Copaeen-8-ol <sup>f)</sup>	1550	2077	0.54	0.57	0.7	0.28	0.39	1.24	-	0.38	0.3	0.45	1.06	1.06	1.06	GC, MS
Palustrol <sup>f)</sup>	1562	1973	0.27	tr	0.17	0.15	tr	0.21	0.15	0.11	0.11	tr	tr	tr	tr	GC, MS
Spathulenol	1565	2157	0.22	tr	0.23	0.19	tr	0.31	0.27	0.08	0.27	0.16	0.28	0.28	0.28	GC, MS
Caryophyllene oxide	1571	2024	0.81	0.55	0.98	0.31	0.53	2.22	0.6	0.52	0.48	0.65	0.46	0.46	0.46	GC, MS
Globulol	1576	2095	0.82	0.98	0.59	0.2	0.28	0.67	0.52	0.45	0.57	0.73	0.38	0.38	0.38	GC, MS
<b>Viridiflorol (10)<sup>i)</sup></b>	1583	2103	<b>7.38</b>	<b>4.88</b>	<b>6.81</b>	<b>4.34</b>	<b>3.58</b>	<b>7.14</b>	<b>6.44</b>	<b>3.01</b>	<b>3.8</b>	<b>5.07</b>	<b>2.89</b>	<b>2.89</b>	<b>2.89</b>	GC, MS
<b>Ledol<sup>f)</sup></b>	1593	2065	<b>1.01</b>	<b>1.70</b>	<b>1.96</b>	<b>2.09</b>	<b>0.5</b>	<b>1.8</b>	<b>1.96</b>	<b>0.47</b>	<b>1.28</b>	<b>1.24</b>	<b>0.99</b>	<b>0.99</b>	<b>0.99</b>	GC, MS
Unknown	1594	-	3.27	1.23	2.09	0.56	1.57	4.48	4.09	1.36	1.22	1.77	0.86	0.86	0.86	GC, MS
Epicubebol <sup>f)</sup>	1616	2095	0.60	0.64	0.62	0.51	0.27	0.79	0.59	0.37	0.61	0.63	0.4	0.4	0.4	GC, MS
$\alpha$ -Cadinol <sup>f)</sup>	1626	2203	0.43	0.36	0.7	0.55	0.41	0.92	0.51	0.3	0.52	0.5	0.38	0.38	0.38	GC, MS
$\alpha$ -Muurolool <sup>f)</sup>	1630	2233	0.38	0.2	0.25	tr	tr	tr	0.31	0.08	tr	-	-	-	-	GC, MS
Cubebol <sup>f)</sup>	1633	2101	0.22	0.22	0.06	0.1	-	-	0.07	0.06	-	0.09	-	-	-	GC, MS
$\beta$ -Eudesmol <sup>f)</sup>	1636	2268	0.43	0.31	0.35	0.16	-	-	0.11	0.09	-	-	-	-	-	GC, MS
O-Containing sesquiterpene (MM218)	1654	-	1.67	1.66	1.37	1.11	0.51	1.31	1.01	0.7	0.98	1.09	0.56	0.56	0.56	MS
$\alpha$ -Cyperone <sup>f)</sup>	1725	2398	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GC, MS

Table 2 (cont.)

Components <sup>a)</sup>	$RI_{HP-1}$ <sup>b)</sup>	$RI_{INNO}$ <sup>c)</sup>	Composition (%)											Identification <sup>d)</sup>		
			$LS1$ <sup>e)</sup>	$LS2$	$LS3$	$LS4$	$LS5$	$LS6$	$LS7$	$LS8$	$LS9$	$LS10$	$LS11$			
O-Containing sesquiterpene (MM236)	1822	-	2.43	2.15	2.46	2.17	1.15	4.77	2.22	1.48	3.75	2.55	2.78	MS		
O-Containing sesquiterpene (MM236)	1829	-	1.83	1.73	1.98	1.75	0.92	3.83	1.98	1.2	3.05	1.99	2.11	MS		
Monoterpene hydrocarbons			0.0	0.2	0.4	0.24	0.24	0.0	0.64	0.71	0.0	0.31	0.24			
O-Containing monoterpenes			46.19	71.3	55.27	66.27	75.37	61.32	55.73	71.33	62.36	70.87	74.43			
Sesquiterpene hydrocarbons			1.31	1.24	0.61	1.94	0.07	0.59	0.59	1.13	0.98	2.25	0.9			
O-Containing sesquiterpenes			20.38	17.18	19.82	14.63	8.87	25.83	17.2	9.85	16.33	16.44	13.48			
Others			2.0	0.55	2.41	1.78	0.29	0.21	1.24	0.63	1.74	1.33	0.85			
<b>Total identified</b>			<b>69.88</b>	<b>90.47</b>	<b>78.51</b>	<b>84.86</b>	<b>84.84</b>	<b>87.95</b>	<b>75.4</b>	<b>83.65</b>	<b>81.41</b>	<b>91.2</b>	<b>89.9</b>			

<sup>a)</sup> Components listed in the order of elution on the HP-1 capillary column. <sup>b)</sup>  $RI$ : Retention indices on the HP-1 column. <sup>c)</sup>  $RI$ : Retention indices on the INNOWAX-1 column. <sup>d)</sup> Identification: GC, identification based on  $RI$ ; MS, identification based on a comparison of mass spectra with Wiley and Nist libraries and the literature [27][28]; Co-GC, identification based on co-injection with authentic compounds. <sup>e)</sup> For the signification of the population code, see Table 1 and Fig. 1. <sup>f)</sup> Components reported for the first time in *L. stoechas* oils. <sup>g)</sup> -: Not detected. <sup>h)</sup> tr: Trace (< 0.01%). <sup>i)</sup> Components reported for the first time in *L. stoechas* oils from Algeria.



capillary columns, their relative percentages (FID-based quantification), and their methods of identification are also listed in *Table 2*. The analyses resulted in the identification of 121 compounds that represented 69.88–91.2% of the total oil compositions. To the best of our knowledge, 83 of these compounds are being reported here for the first time in Algerian *L. stoechas* oil, and 54 compounds had never been reported in *L. stoechas* oils (*Table 2*). These include *p*-methylacetophenone (**4**), *m*-cymen-8-ol (**5**),  $\alpha$ -necrodiyl acetate (**6**), epicubebol (**7**), cubebol (**8**), and  $\delta$ -amorphene (**9**; *Table 2* and *Fig. 2*). In total, 66 constituents were detected in all populations, while the others could only be seen in one or more populations.

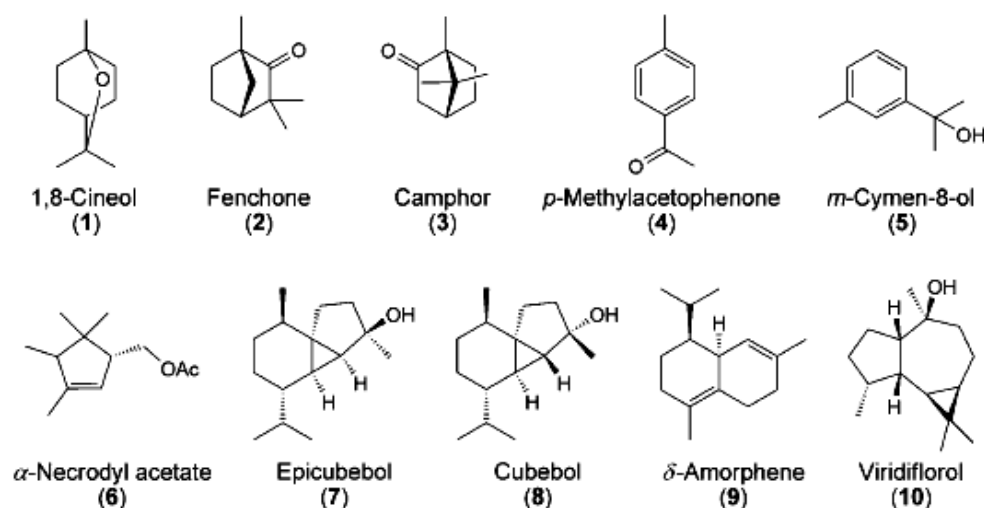


Fig. 2. Structures of the main compounds (1–3 and 10) of the Algerian *L. stoechas* essential oils and some compounds (4–9) detected for the first time in essential oils of *L. stoechas*

The most abundant compound class was constituted of the O-atom containing monoterpenes (46.19–75.37%), with fenchone (**2**; 11.27–37.48%), camphor (**3**; 1.94–21.8%), and 1,8-cineol (**1**; 0.16–8.71) as the most abundant compounds (*Table 2* and *Fig. 2*). The O-atom containing sesquiterpenes composed the second most abundant compound class (8.87–25.83%), with viridiflorol (**10**; 2.89–7.38) as the most abundant representative (*Fig. 2*). The EOs were, however, poor in sesquiterpene hydrocarbons (0.07–2.25%) and monoterpene hydrocarbons (0.0–0.71%).

To characterize the chemical basis of the EO composition variability of wild Algerian *L. stoechas* populations, we conducted a hierarchical clustering analysis (HCA) on an EO composition data matrix restricted to the four major components, *i.e.*, 1–3 and 10, which accounted for 28.58 to 60.03% of the total EO contents. This separated the Algerian *L. stoechas* populations into two main categories (*Fig. 3*). The first one (*Cluster I*) contained the EOs of all populations, except *Population LS6*. These ten EOs had 2 as major component, whereas the EO of *Population LS6* had 3 as principal compound. Linkage cluster analysis of *Cluster I* revealed the existence of a large chemical diversity among the fenchone chemotype populations, with the separation of *Subcluster IA*, including the populations *LS1* and *LS7*, from the other populations of *Cluster I* on the basis of higher contents of **10** (7.38 and 6.44%, *resp.*) and

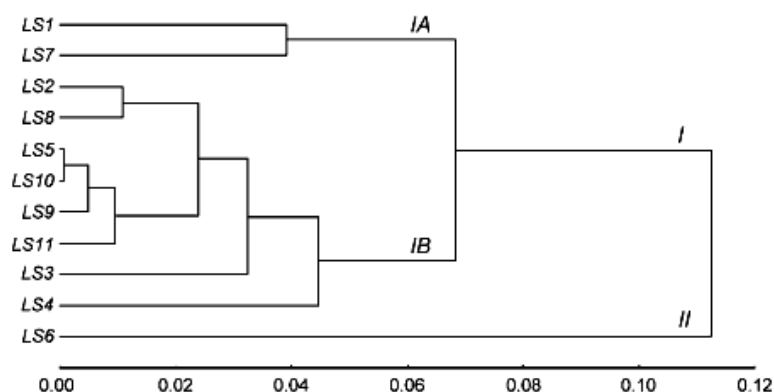


Fig. 3. Hierarchical cluster analysis dendrogram of the eleven Algerian populations of *L. stoechas*, based on a comparison of the contents of the four major essential oil constituents. For the significance of the population codes, see Table 1.

lower contents of **1** (0.16 and 1.30%, resp.). Subsequent subgrouping dichotomically separated the other EOs on the basis of their different proportions of **1**, **3**, and **10**.

The most reported chemotype of *L. stoechas* is a fenchone/camphor chemotype recorded in Morocco [16], Tunisia [19], Spain [10], Italy [6], Crete, Greece [12], Hatay, Turkey [17], Cyprus [11], and Corsica, France [14]. In agreement with the present data, comparative studies of different populations from a restricted geographic area have revealed that the ratio between compounds **2** and **3** may vary greatly and may even be inverted [10–14][16]. In a few of these studies conducted in Spain and Crete, some populations with a fenchone/1,8-cineol chemotype were distinguished, that were growing in the same phytogeographic area as others with a fenchone/camphor chemotype [10][12]. In Turkey, a 1,8-cineol/camphor chemotype was described [18]. In the EOs of the Algerian populations *LS2* and *LS3*, **1** was the second most abundant component behind **2**, and it represented more than 8% of the total oil content in these populations. Nevertheless, statistical analyses of our denser sampling does not support the distinction of a fenchone/camphor from a fenchone/1,8-cineol chemotype in Algeria. It appears from the present data, that populations with high contents of **1** are not restricted to the northern shores of the Mediterranean Sea, but can also be found in northern Africa.

The eleven Algerian *L. stoechas* EOs studied differed greatly from other published *L. stoechas* EOs with respect to less abundant compounds. *p*-Cymene was revealed as a fairly abundant constituent (6.5% of the total oil content) in the EO of another Algerian population [20], in contrast to the EOs of the present study, where it was, at best, detected at trace amounts (Table 2). Inversely, the same study on an Algerian population [20] did not detect any myrtenyl acetate, which was an important constituent of the present oils (0.61–2.54%) and a characteristic component of other *L. stoechas* EOs [10]. The composition of the EOs reported here differed from any other by the presence of higher quantities of **10** (2.89–7.38%) and the absence of linalyl acetate,  $\beta$ -phellandrene, longifolene, and germacrene D.

2.3. *Antioxidant Activity.* EOs with antioxidant activity are of interest because of their lengthened shelf life and as source of natural antioxidants. Despite the wide use of *L. stoechas* EO, its antioxidant potential has never been assessed. Determined by the DPPH-based free radical-scavenging assay, the eleven Algerian *L. stoechas* EOs exhibited significant differences in their radical-scavenging activity (Table 3). The EO of Population LS4 exhibited the highest radical-scavenging activity, followed by the LS2 oil, with  $EC_{50(DPPH)}$  values of  $5.10 \pm 0.32$  and  $10.97 \pm 0.98$  mg/ml, respectively. The LS5 and LS7 oils were the least active with respective  $EC_{50(DPPH)}$  values of  $32.42 \pm 1.46$  and  $26.80 \pm 0.91$  mg/ml. Hence, the  $EC_{50(DPPH)}$  values of the most and least active oils differed by an eight-fold factor. When compared to the reference compounds butylhydroxytoluene (BHT) and  $\alpha$ -tocopherol, all *L. stoechas* oils were found to be less efficient radical scavengers than  $\alpha$ -tocopherol and BHT, which exhibited  $EC_{50(DPPH)}$  values of  $0.02 \pm 0.001$  and  $0.11 \pm 0.01$  mg/ml, respectively (Table 3).

Table 3. DPPH Free Radical-Scavenging and  $\beta$ -Carotene/Linoleic Acid-Bleaching Activities of the Essential Oils of Algerian *L. stoechas* Populations in Comparison with BHT and  $\alpha$ -Tocopherol

Sample	$EC_{50(DPPH)}$ [mg/ml] <sup>a)</sup>	AA [%] <sup>b)</sup>
Essential oils <sup>c)</sup>		
LS1	$24.73 \pm 0.73$	$25.54 \pm 0.36$
LS2	$10.97 \pm 0.98$	$68.79 \pm 0.62$
LS3	$15.50 \pm 0.57$	$16.32 \pm 0.46$
LS4	$5.10 \pm 0.32$	$79.72 \pm 0.45$
LS5	$32.42 \pm 1.46$	$21.60 \pm 1.20$
LS6	$19.38 \pm 0.36$	$26.71 \pm 0.07$
LS7	$26.80 \pm 0.91$	$28.87 \pm 0.52$
LS8	$13.75 \pm 0.72$	$50.85 \pm 1.10$
LS9	$12.26 \pm 0.32$	$42.12 \pm 0.41$
LS10	$16.44 \pm 1.49$	$28.47 \pm 1.12$
LS11	$20.70 \pm 0.99$	$26.46 \pm 0.72$
Positive controls		
BHT	$0.11 \pm 0.01$	$99.86 \pm 0.19$
$\alpha$ -Tocopherol	$0.02 \pm 0.001$	$98.40 \pm 0.38$

<sup>a)</sup>  $EC_{50(DPPH)}$ : Concentration of EO that scavenged 50% of the DPPH radicals. Lower  $EC_{50}$  values indicate higher reactivity with DPPH and, hence, a better H-atom donating activity. Values are means of three parallel determinations of three independent experiments  $\pm$  standard deviations. <sup>b)</sup> AA: Potential of EO to inhibit the oxidation of linoleic acid. Higher AA values indicate greater inhibition of the linoleic acid oxidation. Values are means of three parallel determinations of three independent experiments  $\pm$  standard deviations. <sup>c)</sup> For the signification of the population codes, see Table 1 and Fig. 1.

With a complementary assay, the  $\beta$ -carotene/linoleic acid-bleaching test, the potential of the EOs to inhibit the oxidation of linoleic acid, expressed as AA (antioxidant activity [%]), was determined. This test is known to reveal different antioxidant properties of natural products than the DPPH test and may thus unveil different antioxidant compounds within plant extracts [29]. Among the eleven *L. stoechas* oils, the highest activity was again associated with Population LS4 (AA =  $79.72 \pm 0.45\%$ ), followed by Population LS2 (AA =  $68.79 \pm 0.62\%$ ), as can be seen in

**Table 3.** All oils were, nevertheless, less potent inhibitors of linoleic acid oxidation than the reference compounds BHT and  $\alpha$ -tocopherol (AA =  $99.86 \pm 0.19$  and  $98.40 \pm 0.38\%$ , resp.).

Several compounds that we found to be present in *L. stoechas* EOs are known to possess antioxidant activities. These include eugenol, carvacrol, thymol, terpinolene,  $\alpha$ -terpinene,  $\gamma$ -terpinene [30], and terpinen-4-ol [31]. To determine whether some EO components play an important role in the antioxidant activity of Algerian *L. stoechas* EO, we calculated the *Pearson's* correlation coefficient between the contents of the 93 most abundant EO components and the DPPH- and  $\beta$ -carotene/linoleic acid-based antioxidant activities of the eleven oils. No significant correlation was found between the contents of the four major EO components (1–3 and 10) and these two activities. This agrees with the TLC screening test (data not shown) and with previous reports [30]. Only for three compounds that were present in at least seven EOs, positive correlations with  $r^2 > 0.4$  with the  $\beta$ -carotene/linoleic acid test were obtained, *i.e.*, for pinocarvone ( $r^2 = 0.583$ ,  $p = 0.006$ ),  $\beta$ -phelandren-8-ol ( $r^2 = 0.511$ ,  $p = 0.013$ ), and  $\alpha$ -muurolene ( $r^2 = 0.506$ ,  $p = 0.014$ ), and only for one compound with the DPPH test, *i.e.*, ledene ( $r^2 = 0.445$ ,  $p = 0.025$ ). Unfortunately, their non-availability under a pure form did not allow experimental confirmation of these correlations. Nevertheless, additional compounds may participate in the antioxidant activity of some of the eleven EOs. The very active *LS4* oil was, for example, the only oil to contain thymol and carvacrol, two compounds with known antioxidant activity. These data suggest that the antioxidant activity of different Algerian *L. stoechas* EOs may be due to different constituents. This conclusion is confirmed by a rapid TLC screening test of the components of the eleven oils. The most active EO, that of *Population LS4*, displayed the largest number of clearance spots ( $\geq 6$  spots in total, which included carvacrol that was tested in parallel as a standard), while the least active oils generated less clearance spots (data not shown).

**2.4. Antimicrobial Activity.** Because of the increased resistance of many pathogenic microbes to drugs, additional efforts are required to unveil novel compounds from natural sources, including plants and their EOs. Therefore, *in vitro* bioassays to estimate the susceptibility of sixteen pathogenic and phytopathogenic microorganisms towards the EOs of the eleven Algerian *L. stoechas* populations were conducted (*Table 4*). In agreement with the high variability of their chemical compositions, the eleven EOs were variably effective against the tested microorganisms. The minimum inhibitory concentrations (*MICs*) varied between 0.23 and 11.36 mg/ml against the bacteria, between 0.23 and 8.52 mg/ml against the filamentous fungi, and between 0.16 and 11.9 mg/ml against the yeast species (*Table 4*).

An antimicrobial activity is considered strong, when the *MIC* values range between 0.05 and 0.50 mg/ml, moderate when they are between 0.6 and 1.50 mg/ml, and weak when they are above 1.50 mg/ml [32]. Accordingly, the EO of *Population LS3* can be considered as very active against all tested microbial strains. The EO of *Population LS6* exhibited the same pattern of activity except against *A. flavus*, *F. oxysporum*, and *C. albicans* (b), against which it was moderately active. The *LS5* EO exhibited moderate antimicrobial activity towards all bacteria and filamentous fungal strains with maximum *MICs* of 1.4 mg/ml. It showed, however, only a weak activity against the *C. albicans* strains.

Table 4. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of the Essential Oils of Algerian *L. stoechas* Populations

Microorganism	MIC [mg/ml]										
	LS1 <sup>a</sup> )	LS2	LS3	LS4	LS5	LS6	LS7	LS8	LS9	LS10	LS11
<i>Gram-negative bacteria</i>											
<i>E. coli</i> E13	4.84	3.84	0.23	2.04	1.4	0.32	4.76	11.36	3.78	3.7	1.96
<i>E. coli</i> E195	6.05	>7.68	0.23	>8.16	0.7	0.32	1.19	8.52	3.78	5.18	1.96
<i>E. coli</i> ATCC 25925	1.21	1.28	0.23	0.51	0.7	0.32	1.19	8.52	2.16	1.48	1.96
<i>E. coli</i> K12	4.84	3.84	0.23	2.55	0.7	0.32	1.19	11.36	2.16	2.96	0.49
<i>K. pneumoniae</i> E40	4.84	>7.68	0.23	>8.16	0.7	0.32	1.19	8.52	2.7	0.74	0.49
<i>K. pneumoniae</i> Kp19	4.84	>7.68	0.23	>8.16	0.7	0.32	1.19	11.36	2.7	3.7	1.96
<i>S. enterica</i>	4.84	>7.68	0.23	>8.16	0.7	0.32	1.19	11.36	2.7	3.7	1.96
<i>P. aeruginosa</i>	1.21	>7.68	0.23	>8.16	0.7	0.32	1.19	8.52	2.16	4.44	1.96
<i>A. baumannii</i>	4.84	>7.68	0.23	5.1	0.7	0.32	1.19	8.52	2.16	0.74	0.98
<i>Gram-positive bacteria</i>											
<i>B. subtilis</i>	4.84	3.84	0.23	2.55	0.7	0.32	1.19	11.36	2.16	1.48	0.98
<i>Filamentous fungi</i>											
<i>A. niger</i>	6.05	4.48	0.46	2.55	0.7	0.32	5.95	8.52	2.7	5.18	1.96
<i>A. flavus</i>	6.05	5.12	0.46	2.55	1.4	0.64	5.95	8.52	2.7	5.18	1.96
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	4.84	2.56	0.23	2.04	1.4	0.64	5.95	8.52	2.16	3.7	0.98
<i>M. ramannianus</i>	4.84	2.56	0.23	2.04	1.4	0.32	1.19	11.36	2.16	1.48	0.98
<i>Yeasts</i>											
<i>C. albicans</i> (a)	6.05	4.48	0.46	2.55	3.5	0.16	5.95	8.52	10.80	3.7	1.96
<i>C. albicans</i> (b)	6.05	>6.4	0.46	>8.16	2.8	0.80	11.9	11.36	10.80	5.18	1.96

<sup>a</sup>) For the signification of the population codes, see Table 1 and Fig. 1.

The antimicrobial activities of plant EOs have been reported to be linked to the presence of specific constituents. Several studies have reported that camphor, linalool, 1,8-cineole [33], carvacrol, eugenol, perillaldehyde [34], terpinen-4-ol [35], caryophyllene oxide, spathulenol [36], borneol [37], and myrtenal [6] revealed powerful antimicrobial activities. All of these compounds were present in our oils, some being even major oil constituents. Nevertheless, our data (statistical analysis) did reveal that no significant correlation between the content of a specific EO component and the antimicrobial activity of the EO did exist, against any of the tested microorganisms (data not shown). This may be due to the fact that several of the major compounds share a similar antimicrobial activity. Additionally, synergistic effects may have occurred, as known for compounds 1 and 3 [38].

The present results on the antimicrobial activities of *L. stoechas* EOs agree with those in previous reports, indicating, for example, that the volatile oil of wild Tunisian plants exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* [19]. Similarly, antibacterial activities were reported for EOs of wild *L. stoechas* populations from Turkey [4][17] and Cagliari, Italy [6], and for cultivated plants in Australia [23]. The EOs of *L. pedunculata*, formerly considered as a subspecies of *L. stoechas*, have shown a significant antifungal activity against dermatophyte strains [39].

**3. Conclusions.** – The EOs extracted from eleven wild populations of Algerian *L. stoechas* displayed a large diversity in their composition that affected major and minor constituents. The gained knowledge about their composition further expands the known and already impressive range of diversity of volatile organic compounds in this species, with the first detection of many minor constituents. With its large chemical biodiversity, *L. stoechas* was confirmed to be a very good source of plant material for a large range of bioactive molecules. Nevertheless, the study also confirmed that variations in the contents of major *L. stoechas* EO components were not restricted to (and may not match) known evolutionary events, such as radiation or sub-speciation events, although the origin of radiation, diversification, and current location for subspecies biodiversity has clearly been assigned in Spain [1]. A future gain of knowledge on the molecular events behind the biosynthesis of individual EO components will now open a fascinating area of research to unveil the genetic and environmental events that generate such biodiversity.

The data reported in this study suggest, for the first time, that the antioxidant activity of different *L. stoechas* EOs is moderate and can be due to the presence of different sets of antioxidant compounds. Because our sampling was made on a small geographic area, this analysis again highlights the extraordinary biodiversity of *L. stoechas* in terms of source material for bioactive compounds.

The antimicrobial activity of Algerian *L. stoechas* EO is reported here for the first time. Our analyses validate the traditional use of the EO of this species as an antiseptic drug in Algeria and in some Mediterranean regions. Nevertheless, some populations (*LS3* and *LS6*) proved to be a better source of bioactive material against a wider panel of microorganisms than the others and may therefore have a greater applicative potential in the pharmaceutical, crop protection, and cosmetic industries.

The authors are thankful to Prof. *N. Sabaou*, Laboratory of Microbiology, Ecole Normale Supérieure, Kouba-Alger, Algeria, for his help in the antimicrobial tests. Mr. *A. Piot*, Institut Universitaire de Technologie, Saint Etienne, France, is greatly acknowledged for his support in the GC/MS analyses.

### Experimental Part

**Plant Material.** The aerial parts of *L. stoechas* L. (flowering shoots with leaves and inflorescences) were collected at maximum flowering (March 2007) from wild-growing populations. A total of eleven populations were sampled randomly across Algerian northern parts (*Fig. 1* and *Table 1*). The plant material was harvested at the same period (March 2007) to avoid potential seasonal variations in the EO composition. Botanical authentication of the species was carried out at the herbarium of the Department of Botany, Ecole Nationale d'Agronomie (ENA), Algiers, Algeria, where voucher specimens have been deposited, and according to the *Flora of Algeria* [3]. The harvested material was shade air-dried and finely powdered using a blender before hydrodistillation.

**Isolation of Essential Oils.** The powdered flowering aerial parts were subjected to hydrodistillation for 3 h using a modified *Clevenger*-type apparatus. The EOs were isolated from the distillates by the addition of Et<sub>2</sub>O and dried (anh. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). After filtration, the Et<sub>2</sub>O was completely evaporated under vacuum. The pure oils were weighed and stored at 4° in brown glass vials prior to analysis. The oil yields are compiled in *Table 1*. The oil color ranged from light to dark yellow.

**GC Analysis.** The GC-FID analyses were carried out with an *Agilent 6890* apparatus equipped with two cap. columns of different polarity, a *HP-1* (50 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.52 μm) and an *INNOWAX-1* cap. column (60 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.50 μm). The oven temp. was programmed from 80 to 295° at 2°/min and held isothermal at 295° for 25 min for the *HP-1* column

and from 60 to 245° at 2°/min and held isothermal at 245° for 25 min for the *INNOWAX-1* column. He was used as the carrier gas at a flow rate of 1.5 and 1.3 ml/min for the *HP-1* and *INNOWAX-1* column, resp. Aliquots of 1 µl of the samples diluted in hexane were injected in the split mode (ratio 1:20). The injector and flame ionization detector (FID) temp. was 250°.

**GC/MS Analysis.** The GC/MS analyses of the EOs were carried out with an *Agilent HP* gas chromatograph (model 6850 and 7890) coupled to an *Agilent HP* mass selective detector (model 5975 and 5975C, resp.) in the electron impact mode (EI) equipped with Chem-Station data analysis software for mass spectrum database screening. In total, 0.2 µl aliquots of the samples diluted in hexane were injected using the splitless mode. The same *INNOWAX-1* column as described above and a *HP-1* cap. column (50 m × 0.20 mm i.d., film thickness 0.33 µm) were used. The oven temp. was programmed from 60 to 280° at 3°/min and held isothermal at 280° for 10 min for the *HP-1* column and from 60 to 245° at 3°/min and held isothermal at 245° for 25 min for the *INNOWAX-1* column; injector temp., 250°; carrier gas, He (1.3 ml/min). The EI-MS operating parameters were as follows: electron energy, 70 eV; automatic scanning of the mass range 30–350 amu (30–400 amu for the *INNOWAX-1* column) at 2.4 scans/s; ion source temp., 230°; quadrupole, 150°.

**Compound Identification.** Retention indices (*R<sub>i</sub>*) were calculated for all EO constituents rel. to the *t<sub>R</sub>* of *n*-alkanes that were analyzed under the same chromatographic conditions [40]. The identification of the EO constituents was based on the comparison of the mass spectra with those of the *WILEY275.L* and *NIST05.L* libraries (computer matching), those of a homemade mass spectral library, those of authentic compounds available in our laboratory, and published mass spectra [27]. The identification was confirmed by comparing the *R<sub>i</sub>* with those of authentic compounds and previously published *R<sub>i</sub>*s [27] [28]. Relative percentage amounts of the separated compounds were calculated from the GC-FID peak areas generated by a computerized integrator without the use of correction factors. The reported values are the means obtained from three injections of each oil sample.

**Rapid TLC Screening Test.** As described by *Cuendet et al.* [41], 5 µl aliquots of the EOs diluted 1:10 in hexane, of BHT, and of  $\alpha$ -tocopherol were spotted on silica gel (SiO<sub>2</sub>) sheets and developed in acetone/hexane 1:30 (v/v). The TLC sheets were sprayed with a 0.2% soln. of DPPH (= 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) reagent in EtOH and left in the dark at r.t. for 30 min. The spots for which the color turned from purple to yellow on a violet background were scored as positive radical-scavenging compounds.

**DPPH Radical-Scavenging Method.** This is the most widely used method for evaluating the radical-scavenging activity of plant drugs. The test assesses the capacity of the oil to scavenge the relatively stable DPPH radical. Scavenging of the DPPH free radical causes a change of color from an initially dark violet soln. to a yellow one, due to the formation of DPPH-H (= 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). According to *Brand-Williams et al.* [42], aliquots of 50 µl of solns. of various concentrations of each oil (2–44 mg/ml) and of each standard (0.005–16 mg/ml) were added to 5 ml of an EtOH soln. of freshly prepared DPPH (0.004%), and the mixtures were vortexed and incubated in the dark at r.t. for 30 min. The disappearance of the DPPH radical was read spectrophotometrically at 517 nm against a blank (EtOH soln.) with a *JASCO-V530* spectrophotometer. The percentage of DPPH free radicals scavenged (*I* [%]) was calculated using *Eqn. 1*:

$$I [\%] = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100 \quad (1)$$

where *A<sub>blank</sub>* is the absorbance of the control reaction containing all reagents except the EOs and *A<sub>sample</sub>* is the absorbance of the test reaction containing also the oil. The *EC<sub>50(DPPH)</sub>* value represented the concentration of EO that scavenged 50% of the DPPH radicals and was used as an estimate of the radical-scavenging activity. It was calculated from the plot of *I* [%] against the EO concentrations. All tests were carried out in triplicate and the *EC<sub>50(DPPH)</sub>* values were reported as means ± SD.

**$\beta$ -Carotene/Linoleic Acid-Bleaching Method.** This is one of the complementary methods used to screen for antioxidant compounds. It is based on the principle that the unsaturated fatty acid linoleic acid spontaneously oxidizes when it is exposed to the reactive oxygen species (ROS) present in H<sub>2</sub>O enriched with O<sub>2</sub>. The reaction products then initiate  $\beta$ -carotene oxidation into a colorless form. The extent of discoloration is measured spectrophotometrically and used as an estimate of the antioxidant activity

(AA). As described in by *Dapkevicius et al.* [43], a stock soln. of  $\beta$ -carotene/linoleic acid emulsion mixture was prepared as follows: 0.5 mg of crystalline  $\beta$ -carotene was dissolved in 1 ml of  $\text{CHCl}_3$ , and 1 ml of this soln. was transferred into a round flask containing 25  $\mu\text{l}$  of linoleic acid and 200 mg of *Tween-40*. After the complete removal of  $\text{CHCl}_3$  by evaporation, 100 ml of  $\text{O}_2$  enriched dist.  $\text{H}_2\text{O}$  was added under vigorous shaking. Aliquots (2.5 ml) of the mixture were transferred into a series of test tubes containing 350  $\mu\text{l}$  of EO diluted in EtOH (2 g/l). After vigorous mixing, the test tubes were incubated at  $50^\circ$  for 2 h. A negative control tube was prepared by replacing the EO by EtOH. The absorbance was finally measured at 490 nm against a blank (emulsion without  $\beta$ -carotene). Antioxidant activities (AA [%]) were calculated using Eqn. 2:

$$AA [\%] = (1 - (A_0 - A_t) / (A_{0\text{control}} - A_{t\text{control}})) \times 100 \quad (2)$$

where  $A_0$  and  $A_{0\text{control}}$  were the absorbance at  $t_0$  of the sample and the control, resp., and  $A_t$  and  $A_{t\text{control}}$  were the absorbance at  $t = 2$  h of the sample and the control, resp. All tests were carried out in triplicate and the inhibition percentages (AA [%]) were reported as means  $\pm$  SD.

**Microbial Strains.** A selection of pathogenic and phytopathogenic microorganisms including ten bacteria, four filamentous fungi, and two yeasts were used to evaluate the antimicrobial activity of *L. stoechas* EOs. These included the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (E13), *E. coli* (E195), *E. coli* (ATCC 25925), *E. coli* (K12), *Klebsiella pneumoniae* (E40), *K. pneumoniae* (Kp19), *Salmonella enterica* (E32), *Acinetobacter baumannii* (E16), and *Pseudomonas aeruginosa* (CIP A22), the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), the filamentous fungi *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (Foln 3–5), and *Mucor ramannianus* (NRRL 1829), and the yeasts *Candida albicans* (strains a and b). All pure cultures of the microorganisms were obtained from the collection of the Laboratory of Microbiology, Ecole Normale Supérieure, Kouba-Alger, Algeria, except for the yeast strains that were clinically isolated from human patients at the *Zmirli* hospital, Alger, Algeria.

**Antimicrobial Activity.** The minimum inhibitory concentrations (MICs) for the test microorganisms were determined *in vitro* by using the conventional agar dilution method, as previously described [44]. Serial dilutions of the EOs were made with sterile melted nutrient agar medium enriched with 10 g/l glucose and *Tween-80* (0.5%, v/v) to cover a concentration range of 0.16–24 mg/ml. After vortexing, the resulting nutrient agar solns. were immediately poured into *Petri* dishes. The dishes were allowed to dry at r.t. and were spot-inoculated in two replicates with 2  $\mu\text{l}$  of each target microorganism suspension. Inocula of the microorganisms were prepared from 24 h cultures for bacteria and 72 h cultures for fungi, and the suspensions were adjusted to ca.  $10^6$  CFU/ml. The same test was carried out without EO as a control. The inoculated plates were incubated at  $30^\circ$  for 24 h for bacteria and for 48 h for fungi. The MIC values were the lowest concentrations of each EO that yielded no visible growth of the microorganisms.

**Statistical Analyses.** The cluster analysis (*Euclidean* distance and *1-r Pearson* method) was performed with STATISTICA version 5.1 software (*Stat Soft, Inc.*, Tulsa, OK, USA) on the quant. data (GC-FID analyses) of the four main EO constituents of the eleven EO samples, to evaluate their respective degrees of relatedness. To identify EO compounds potentially associated with biological activities, *Pearson's* correlation coefficients were calculated between the EO contents of the compounds and the biological activities. To facilitate the interpretation of the results for the DPPH radical-scavenging activity, the  $EC_{50(\text{DPPH})}$  values were transformed into  $100 - EC_{50(\text{DPPH})}$ , to have values that would increase with an increasing radical-scavenging power. The significance of the correlation by pairs of components was tested using *Bonferroni's* correction for multiple comparisons. The level of significance was set at  $\alpha = 0.05$ , and a  $p$  value  $< 0.0005$  was accepted as significant.

## REFERENCES

- [1] T. Upson, S. Andrews, 'The Genus *Lavandula*', Timber Press, Portland, Oregon, USA, 2004.
- [2] M. Lis-balchin, 'Lavender, the Genus *Lavandula*', Taylor & Francis, London, New York, 2002.
- [3] P. Quezel, S. Santa, 'Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales', Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1963, Vol. II.
- [4] A. C. Gören, G. Topçu, G. Bilsel, M. Bilsel, Z. Aydoğmuş, J. M. Pezzuto, *Z. Naturforsch., C* **2002**, *57*, 797.



- [5] E. S. Giray, S. Kırıcı, D. A. Kaya, M. Türk, Ö. Sönmez, M. İnan, *Talanta* **2008**, *74*, 930.
- [6] A. Angioni, A. Barra, V. Coroneo, S. Dessi, P. Cabras, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4364.
- [7] İ. Gülçin, I. G. Şat, Ş. Beydemir, M. Elmastaş, Ö. I. Küfrevioğlu, *Food Chem.* **2004**, *87*, 393.
- [8] Y. Mahmoudi, 'La Thérapeutique par les Plantes Communes en Algérie', Palais du Livre, Blida, Algeria, 1982.
- [9] E. Kokkalou, *Planta Med.* **1988**, *54*, 58.
- [10] M. I. García Vallejo, Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Spain, 1992.
- [11] G. Valentini, N. Arnold, B. Bellomaria, *Plant Med. Phytother.* **1993**, *26*, 289.
- [12] M. Skoula, C. Abidi, E. Kokkalou, *Biochem. Syst. Ecol.* **1996**, *24*, 255.
- [13] N. Baldovini, A. Muselli, D. Ristorcelli, F. Tomi, J. Casanova, *Riv. Ital. EPPOS* **1998**, 773.
- [14] D. Ristorcelli, F. Tomi, J. Casanova, *Flavour Fragrance J.* **1998**, *13*, 154.
- [15] N. A. Akgün, M. Akgün, S. Dinçer, A. Akgerman, *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 143.
- [16] S. Zrira, B. Benjlali, *J. Essent. Oil Res.* **2003**, *15*, 68.
- [17] I. Dadalıoğlu, G. A. Evrendilek, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8255.
- [18] O. Arabacı, E. Bayram, *Asian J. Chem.* **2005**, *18*, 371.
- [19] N. Bouzouita, F. Kachouri, M. Hamdi, M. M. Chaabouni, R. Ben Aissa, S. Zgouli, P. Thonart, A. Carlier, M. Marlier, G. C. Lognay, *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 584.
- [20] T. Dob, D. Dahmane, M. Agli, C. Chelghoum, *Pharm. Biol.* **2006**, *44*, 60.
- [21] A. Ulubelen, N. Gören, Y. Olcay, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3966.
- [22] G. Topçu, M. N. Ayril, A. Aydin, A. C. Gören, H. B. Chai, J. M. Pezzuto, *Pharmazie* **2001**, *56*, 892.
- [23] T. Moon, H. M. A. Cavanagh, J. M. Wilkinson, *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 171.
- [24] A. F. Traboulsi, K. Taoubi, S. El-Haj, J. M. Bessiere, S. Rammal, *Pest Manage. Sci.* **2002**, *58*, 491.
- [25] E. Putievsky, U. Ravid, N. Dudai, *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 326.
- [26] A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, L. G. Pedro, J. J. C. Scheffer, in 'Essential Oils: Basic and Applied Research, Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils', Eds. C. H. Franz, Á Máthé, G. Buchbauer, Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois, 1997, p. 95.
- [27] R. P. Adams, 'Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy', Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois, 2007.
- [28] D. Joulain, W. A. König, 'The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons', EB-Verlag, Hamburg, 1998.
- [29] T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, M. Milos, *Food Chem.* **2004**, *85*, 633.
- [30] G. Ruberto, M. T. Baratta, *Food Chem.* **2000**, *69*, 167.
- [31] P. Lertsatitthanakom, S. Taweethaisupapong, C. Aromdee, W. Khunkitti, *Int. J. Aromather.* **2006**, *16*, 43.
- [32] N. Aligiannis, E. Kalpotzakis, S. Mitaku, I. B. Chinou, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4168.
- [33] S. Pattnaik, V. R. Subramanyam, M. Bapaji, C. R. Kole, *Microbios* **1997**, *89*, 39.
- [34] S. Burt, *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223.
- [35] C. F. Carson, B. J. Mee, T. V. Riley, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1914.
- [36] A. Ulubelen, G. Topçu, C. Eriş, U. Sönmez, M. Kartal, S. Kurucu, C. Bozok-Johansson, *Phytochemistry* **1994**, *36*, 971.
- [37] N. Tabanca, N. Kırimer, B. Demirci, F. Demirci, K. H. C. Başer, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4300.
- [38] A. Viljoen, S. van Vuuren, E. Ernst, M. Klepser, B. Demirci, K. H. C. Başer, B.-E. van Wyk, *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *88*, 137.
- [39] M. Zuzarte, M. J. Gonçalves, C. Cavaleiro, A. M. Dinis, J. M. Canhoto, L. R. Salgueiro, *Chem. Biodiversity* **2009**, *6*, 1283.
- [40] H. Van Den Dool, P. D. Kratz, *J. Chromatogr., A* **1963**, *11*, 463.
- [41] M. Cuendet, K. Hostettmann, O. Potterat, W. Dyatmiko, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1144.
- [42] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm.-Wiss. Technol.* **1995**, *28*, 25.
- [43] A. Dapkevicius, R. Venskutonis, T. A. Van Beek, P. H. Linssen, *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 140.
- [44] A. Sökmen, M. Gulluce, H. A. Akpulat, D. Daferera, B. Tepe, M. Polissiou, M. Sökmen, F. Şahin, *Food Control* **2004**, *15*, 627.

Received October 29, 2010

# Annexe II : Poster huiles essentielles de populations algériennes de *L. stoechas* présenté lors du 12<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et plantes médicinales, Grasse mars 2010

**VARIABLETY IN YIELD, CHEMICAL COMPOSITION, ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF ESSENTIAL OILS OF LAVANDULA STOECHAS FROM ALGERIA**

**Tarek Benabdokader<sup>1</sup>, Abdelghani Zitouni<sup>2</sup>, Yann Guillon<sup>3</sup>, Frédéric Julien<sup>4</sup>, Laurent Legendre<sup>5</sup>, Abdelkrim Kameli<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université M'Hamed El Bacha, Boumerdes 34001, Algérie  
<sup>2</sup> Laboratoire de Biotechnologie Industrielle, Université des Sciences et de la Technologie, Université Jean Monnet, 42023, Saint Etienne, France  
<sup>3</sup> Laboratoire de Produits Biocactifs et Innovations de la Biomasse, Ecole Normale Supérieure, Kouba 16050, Alger, Algérie  
<sup>4</sup> Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, Ecole Normale Supérieure, Kouba 16050, Alger, Algérie  
<sup>5</sup> Laboratoire de Biotechnologie Industrielle, Université des Sciences et de la Technologie, Université Jean Monnet, 42023, Saint Etienne, France

**ABSTRACT**

The aerial flowering parts of 11 populations of *Lavandula stoechas* L. growing wild in northern regions of Algeria were hydrodistilled to obtain essential oils with variable yield (0.54 - 1.63%, w/w, dry weight). The oil composition varied qualitatively and quantitatively among oils in which more than 100 compounds were identified representing 77.33-99.53% of the total oil. All oils were characterized by a large amount of oxygenated monoterpenoids (84.09-88.66%), Fenchone (16.61-31.22%) and camphor (3.69-24.42%) were the first major components, in which the samples were grouped into fenchone chemotype (10 populations) and camphor chemotype (LS1 population). Furthermore, LS4 population did demonstrate the highest antioxidant activity (IC<sub>50</sub> = 5.100.32 mg/ml and 3.5 = 79.720.45%). Agar diffusion method showed the strongest antibacterial activity by LS3, LS6 and LS8 populations oils against all bacteria tested (0.0625-23.0 mg/ml). Moreover, the best antifungal effect was elicited by LS3 and LS6 oils against all fungi tested (0.0625-16.0 mg/ml).

**INTRODUCTION**

*Lavandula stoechas* L. was a small woody aromatic shrubs with large distribution throughout the Mediterranean basin (Upton et al., 2004). In Algeria, known as "Hellul" was widely distributed from the Northwest to Northeast, wherever herbal parts especially leaves and flowers are used in folk medicine as an antiseptic and stimulant agent and also used as culinary herb to prepare the most popular "couscous" (Baïa Aïssa, 1991).

Their essential oil contains about 60 compounds, in which the dominance of fenchone chemotype was currently obvious with important contribution of camphor, 1,8-cineol, myristyl acetate, myristyl acetate, bornyl acetate, α-cadinol and p-cymene (Goren et al., 2002; Zaira & Benhalil, 2008; Dadlioglu & Ferendek, 2004; Bouazoua et al., 2005;

**RESULTS**

**1. Extraction yields**  
The conventional hydrodistillation of the aerial flowering parts of *L. stoechas* populations afforded a light yellow, yellow to dark yellow essential oils with a variable yields (0.54-1.63%, w/w). The highest content was recorded in LS5, LS8, LS3 and LS6 populations, which were represented the north center of Algeria. In addition the yields of LS5 and LS8 populations were relatively higher than that previously reported from other Algerian *L. stoechas* (Dés et al., 2006).

**2. Chemical composition and variability**  
More than 100 compounds were detected by GC/MS analysis (77.33-99.53% of the total oils), in which 68 of them being reported for the first time in Algerian *L. stoechas* oils. It can be seen in figures that the oils were very rich in oxygen-containing monoterpenes (54.09-55.46%) represented by fenchone (16.61-31.22%) as first main component in LS3 to LS11 oils and by camphor (3.69-24.42%) as first main component in LS1 oil. Other significant and characteristic constituents of Lavender oils were also present in all one oil: 1,8-cineol (0.55-14.02%), viridiflorol (2.62-5.63%), myristyl acetate (1.23-4.52%) and bornyl acetate (0.46-3.65%).

As shown in figures, there were significant quantitative variations among essential oils in terms of content of main components and significant qualitative variation of others (Data not presented here). Generally, the essential oils composition of Algerian *L. stoechas* seems to be distinctive with high proportion of viridiflorol compared to the Mediterranean populations.

**3. Antioxidant activity**  
It is well known that the content of secondary metabolites like essential oils of plants seems to depend on genetic factors, nature of parts of plant made of extraction, season and location of collection (climate and soil properties).

Using β-carotene/linoleic acid bleaching test (Fig. 1), the highest activity was also found in the LS4 oil (0.447872±0.045%). Generally, in all oils the percent inhibition was lower than those of standard: α-tocopherol (EHT), α-tocopherol (LS4-LS2-LS8-LS9-LS7-LS10-LS6-LS11-LS1-LS3-LS5).

**4. Antimicrobial activity**  
LS3 and LS6 oils showed very strong activity against all tested bacteria (MIC=0.25-0.50mg/ml). The remaining oils showed moderate to weak antibacterial activity. Generally, *E. coli* (ATCC 25925) was the most sensitive among bacteria.

The best antifungal effect was elicited also by LS3 and LS6 oils (MIC=0.16-0.5mg/ml), being *C. albicans* (a) the most susceptible strain, while *C. glabrata* (b) was the most resistant species. The other oils exhibited moderate to weak antifungal effect (MIC=1-19.119mg/ml).

The antimicrobial activities of oils might be associated with the presence of powerful antimicrobial active compounds such as camphor, 1,8-cineol (Fernández et al., 1997), terpineol-4-ol (Carson et al., 2002), viridiflorol (Forster & Wilkner, 1998) and bornyl acetate (Yasuo et al., 2003), which these compounds were found in our oils with high content.

Our results of the antimicrobial activities seem to be in accordance with previous reports indicating that the *L. stoechas* oils possess antimicrobial activities (Goren et al., 2002; Sofici et al., 2003; Dadlioglu et al., 2004; Bouazoua et al., 2005; Angioni et al., 2006; Mossi et al., 2007; Malhotra et al., 2008).

**CONCLUSION**

In this study, myristyl acetate and viridiflorol were detected for the first time in our oils. Between main components in Algerian *L. stoechas* and a significant variation was recorded among populations in respect to essential oil content and its chemical composition, particularly with regard to major components, which we detected the dominance of fenchone chemotype in the study area.

The results of bioassays indicated that these essential oils exhibited reasonable antioxidant activity. However, these oils exerted remarkable antimicrobial effectiveness against microorganisms, especially for LS3, LS6, LS5 and LS11 populations, which offer the possibility of using these oils as new resources for antimicrobial agents.

**REFERENCES**

Angioni, R., P. 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography-mass spectrometry. *Chil. Chem. Soc. Trans.* 52A: 4848-4850.  
 Baïa Aïssa, H. 1993. Les plantes médicinales en Algérie. Alger, Algérie: Centre National de Recherche Scientifique et Technologique, 257-262.  
 Bouazoua, M., et al. 2005. Journal of Essential Oil Research, 17, 589-596.  
 Caron, S., et al. 2002. Journal of Applied Microbiology, 93, 148-156.  
 Dadlioglu, S., et al. 2004. Journal of Applied Microbiology, 97, 791-801.  
 Dadlioglu, S., et al. 2005. Journal of Applied Microbiology, 99, 447-455.  
 Dadlioglu, S., et al. 2006. Journal of Applied Microbiology, 101, 171-178.  
 Dadlioglu, S., et al. 2007. Journal of Applied Microbiology, 103, 148-156.  
 Dadlioglu, S., et al. 2008. Journal of Applied Microbiology, 105, 148-156.  
 Fernández, J., et al. 1997. Journal of Applied Microbiology, 83, 120-128.  
 Forster, J., et al. 1998. Journal of Applied Microbiology, 85, 148-156.  
 Goren, L., et al. 2002. Journal of Applied Microbiology, 93, 148-156.  
 Sofici, A., et al. 2003. Journal of Applied Microbiology, 95, 148-156.  
 Mossi, M., et al. 2007. Journal of Applied Microbiology, 103, 148-156.  
 Malhotra, S., et al. 2008. Journal of Applied Microbiology, 105, 148-156.

**Annexe III :**  
**Poster terpene synthases de *L. pedunculata* présenté lors du 13<sup>ème</sup> Symposium International d’Aromathérapie et plantes médicinales, Grasse avril 2011**

## Lavandula Terpeneoils Biosynthesis

### Cloning, Sequencing and Functional Characterization of three Terpene Synthases from a Leaf cDNA Library of *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica*

Tarek Benabdekader<sup>a,b</sup>, Jean-Louis Magnard<sup>b</sup>, Yann Guittion<sup>c</sup>, Karine Fattarai<sup>b</sup>, Nicolas Boyer<sup>b</sup>, Bernard Pasquier<sup>d</sup>, Frédéric Jullien<sup>b</sup>, Abdelkrim Kameli<sup>e</sup> and Laurent Legendre<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Bordj, Algérie, Algérie, 34000, Algérie  
<sup>b</sup> Laboratoire de Biotechnologie végétale appliquée aux Cistaceae, Aromatiques et Anticanceriques, Faculté des Sciences et Techniques, Université Jean Monnet de Saint Etienne, 42023, Saint Etienne, France  
<sup>c</sup> UMR 5076, CNRS, IFR 118, UJST, 1635, av. de l'Université, 63000 Clermont Ferrand, France  
<sup>d</sup> Chimie des produits naturels, Faculté de Pharmacie, Université de Bordeaux, 33075 Bordeaux, France  
<sup>e</sup> Laboratoire de Biotechnologie végétale, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 34087 Alger, Algérie  
<sup>f</sup> Biologie Moléculaire, UMR 5176, CNRS, USTL, 33075 Bordeaux, France

#### L. Pedunculata Leaf Terpeneoils (Monoterpenes and Sesquiterpenes)

Upson and Andrews (2004) describe the Narrowleaf Spanish lavender or Portuguese lavender (*L. pedunculata* subsp. *lusitanica* syn. *L. serotiflora* *lusitanica*) as a woody aromatic shrub with attractive inflorescence shape and color native from the sandy soils in the coastal areas of southern Portugal and south west Spain.

Spanish lavender, contains a fragrant oil mainly composed of monoterpenes than sesquiterpenes. This oil was produced and stocked in different types of trichome covering the upper and the lower face of leaves. Plants produce an amazing variety of terpenoids as primary constituents of their essential oils especially monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes, a number of which act as pollinators attractors or as protectors against diseases or herbivores or environmental stress.

Terpenoids are known as not only raw materials for flavor and fragrance but also biologically active substances against plants, microorganisms and insects. Terpenoids are the most structurally and stereochemically diverse family of natural products, of which more than 35000 have been identified in all life forms (Christianson, 2004).

Terpene synthases (TPS) are cytosolic or plastidic enzymes involved in the biosynthesis of terpene secreted by several aromatic plants and other forms of life. Although their catalytic properties are well characterized, TPSs apparently catalyze multistep transformation of Co<sub>2</sub>-geranyl diphosphate (GPP), Co<sub>2</sub>-farnesyl diphosphate (FPP) or Co<sub>2</sub>-geranylgeranyl diphosphate (GGPP) to terpene hydrocarbon scaffolds of mono, sesqui and diterpenes, respectively (Davis & Croteau, 2000). In addition to the fact that single TPS can synthesize single or multiple terpenoid products from simple precursors, plants contain multiple TPS genes each with differing function (Huber, 2005).

#### L. Pedunculata Leaf Terpene Synthases (Sequences and Functions)

To isolate TPS genes from leaves of *L. pedunculata*, degenerate primers were made corresponding to the conserved motifs of Lamiales TPSs (NCBI Genbank). Partial sequences of putative TPSs were generated by PCR with several combinations of degenerate primers on genomic DNA. The expression of these partial TPSs was confirmed by PCR with specific primers of partial TPS DNA. The sequences of our TPSs were used for homology searches to known TPS sequences via the NCBI GenBank with several BLAST algorithms (Altschul et al., 1997). For TPS expression level, relative semi-quantitative PCR was carried out using full length primers on leaf cDNA.

Three full length TPSs, **LpPENS**, **LpPINS** and **LpGERAS** were cloned and sequenced by using the 5' and 3' RACE strategies. The nucleotide and the amino acid sequences of our TPSs demonstrated homology with known TPS genes that are responsible for the biosynthesis of terpenoids in plants. **LpPENS** and **LpPINS** demonstrate the signal peptide and the RR<sub>2</sub>W motif essential for monoTPS chloroplast targeting and activity, respectively (Bohlmann et al., 1998). The DXXX motif was also present in all our TPSs like other TPSs. This motif was the divalent metal binding site for the protonation reaction.

For TPS functional characterization, the Gateway technology was used with the expression vector pEXGWA or pHGWA (Busso et al., 2005) to perform the heterologous expression of recombinant TPS clones in *E. coli* Rosetta strain. The TPS proteins were purified by affinity tag His-chromatography. Enzymatic assays were started with MgCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub> and by the addition of GPP, FPP or GGPP as substrates and the terpenoids release was analyzed by GC-MS after silylation. The products of the reactions with **LpPENS** were  $\alpha$ -fenchol, limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -terpinolene and  $\alpha$ -phellandrene. As  $\alpha$ -fenchol was the major product of these enzymes, we designate it as a  $\alpha$ -fenchol synthase. The leaf oil of *L. pedunculata* contains a higher quantity of fenchone (fenchone chemotype), from which the impact of **LpPINS** on this lavender oil composition since fenchone was derived from the  $\alpha$ -fenchol by oxidation. **LpPINS** also contribute to volatiles composition by  $\alpha$ -pinene as the most major product and additional products as **LpPINS** except  $\alpha$ -fenchol. **LpGERAS** accepted FPP and transformed it to a single product germacrene A. Germacrene A was not found between volatiles of *L. pedunculata*, suggesting that the compound plays an intermediate role in the biosynthesis of other sesquiterpenoids such as  $\alpha$ -selinene and  $\beta$ -selinene.

Once the basic skeletons are produced via these pathways, the diversity of volatiles is achieved via additional modification reactions such as acylation, methylation, oxidation/reduction and cyclic ring closure. Plant volatiles are lipophilic molecules with high vapor pressure that serve various ecological roles (Pichersky et al., 2006).

#### L. Pedunculata Leaf Terpene Synthases (Phylogenetic and taxonomic evolution)

To perform phylogenetic and molecular evolutionary analyses, the deduced amino acid of full length sequences of our three TPSs and functionally-known TPS genes were aligned and the phylogenetic tree was drawn by the UPGMA method in MEGA package (Tamura et al., 2007).

Seven subfamilies of the plant terpene synthase family, designated TPSa, TPSb, TPSc, TPSd, TPSe, TPSf and TPSg, were previously defined based on clusters identified in the phylogeny are clearly separated (Bohlmann et al., 1997, 1998b, Aubourg et al., 2005).

Sequence relatedness places **LpPENS** and **LpPINS** into the previously defined TPSb subfamilies and **LpGERAS** into TPSa. **LpPENS** and **LpPINS** were closely related to limonene synthase from *L. angustifolia* (Landmann et al., 2007). Similarity is based more on taxonomic affinities of the plant species from which the gene was isolated rather than the type of products formed (Bohlmann et al., 1998).

**13<sup>ème</sup> Symposium International d'Aromathérapie et Plantes Médicinales**  
 Du samedi 26 mars au dimanche 3 avril 2011