

DIVERSITE CHIMIQUE ET CARACTERISATION DE L'IMPACT DU STRESS HYDRIQUE CHEZ LES LAVANDES

YOLANDE DESPINASSE

Thèse dirigée par Pr. Sylvie Baudino

Co-encadrée par Florence Nicolé

Soutenance le 23 octobre 2015



M. Philippe POTIN, Directeur de recherche CNRS, Université Pierre-et-Marie –Curie, Paris	Rapporteur
M. Stéphane HERBETTE, Maître de conférence (HDR), Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme Catherine FERNANDEZ, Professeur, Université d'Avignon	Examinatrice
Mme Anne-Violette LAVOIR, Maître de conférence, Université de Nice	Examinatrice
M. Cédric YVIN, Ingénieur d'étude, iteipmai, Avignon	Examineur
Mme. Florence NICOLE, Maître de conférence, Université Jean-Monnet, Saint Etienne	Co-encadrante de thèse
Mme Sylvie BAUDINO, Professeur, Université Jean-Monnet, Saint Etienne	Directrice de thèse

À Florence N
À Julien
À Marie-Claire
À Nathalie
À pépé mémé

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION	9
I. LES TERPENES VOLATILS	9
I.1 <i>Voies de biosynthèse des terpènes volatils</i>	10
I.1.1 Formation des unités isoprènes réactives : IPP et DMAPP	10
I.1.2 Formation des précurseurs : les prényl diphosphates	11
I.1.3 Formation des terpènes volatils finaux.....	12
I.2 <i>Structures de fabrication et de stockage des terpènes volatils</i>	14
I.3 <i>Variations de la production des terpènes volatils</i>	15
I.3.1 Variation spatiale de la production et du stockage de terpènes volatils au sein d'une plante.....	15
I.3.2 Variation temporelle de la production de terpènes volatils au sein d'une plante.....	16
I.3.3 Variation de la production de terpènes volatils au sein d'une espèce, notion de chémotype	16
I.4 <i>Rôles écologiques des terpènes volatils</i>	17
I.4.1 Défense directe	18
I.4.2 Défense indirecte.....	18
I.4.3 Communication.....	19
I.4.4 Tolérance aux stress abiotiques	19
I.5 <i>Terpènes volatils et amélioration des plantes</i>	20
I.6 <i>Terpènes volatils et pollution atmosphérique</i>	20
II. LES LAVANDES.....	22
II.1 <i>Description et distribution</i>	22
II.1.1 Le genre <i>Lavandula</i>	22
II.1.2 La section <i>Lavandula</i>	22
II.2 <i>Les lavandes, des plantes aromatiques et médicinales</i>	25
II.2.1 Huile essentielle : production et composition	25
II.2.2 Voies de biosynthèse des mono- et sesquiterpènes chez les lavandes.....	28
II.2.3 Culture des lavandes et utilisation par l'homme.....	33
II.3 <i>Les facteurs qui menacent les lavandes</i>	38
II.3.1 La maladie du dépérissement dans les cultures	38
II.3.2 La fermeture du milieu dans les populations sauvages	42
II.3.3 Le changement climatique.....	42
III. LE STRESS HYDRIQUE	44
III.1 <i>Importance et fonctions de l'eau chez les végétaux</i>	44
III.2 <i>Déficit hydrique et régulation de l'eau dans la plante</i>	45
III.2.1 Fermeture des stomates.....	46
III.2.2 Production d'osmoprotectants	46
III.2.3 Régulation du transport de l'eau intracellulaire par les aquaporines	47
III.2.4 Modification de la composition de la paroi cellulaire	47
III.2.5 Modifications morphologiques	48
III.3 <i>Stress hydrique et photosynthèse</i>	48
III.3.1 Bref rappel du fonctionnement de la photosynthèse	48
III.3.2 Impact du stress hydrique sur la photosynthèse.....	50

III.3.3	Mécanismes de contrôle du stress hydrique au niveau de la photosynthèse	52
<i>III.4</i>	<i>Le stress hydrique et le stress oxydant</i>	58
III.4.1	Production et contrôle des ROS cellulaires	58
III.4.2	Relations entre le stress hydrique et le stress oxydant	61
<i>III.5</i>	<i>Stress abiotiques et terpènes volatils</i>	62
III.5.1	Impact du stress hydrique sur le contenu et l'émission de terpènes volatils	62
III.5.2	Rôles possibles des terpènes volatils face aux stress abiotiques.....	66
OBJECTIFS DE LA THESE		68
CHAPITRE 1 : ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE ET GENETIQUE DE LA LAVANDE FINE SUR SON AIRE DE REPARTITION.....		70
I.	EVALUATION DE LA DIVERSITE CHIMIQUE DE LA LAVANDE FINE SUR L'ENSEMBLE DE SON AIRE DE REPARTITION	71
II.	EVALUATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE LA LAVANDE FINE	86
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DE L'IMPACT DU STRESS HYDRIQUE SUR LES LAVANDES.....		88
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE LA BORNYL DIPHOSPHATE SYNTHASE CHEZ LA LAVANDE FINE : UNE MONOTERPENE SYNTHASE IMPLIQUEE DANS LA QUALITE DE L'HUILE ESSENTIELLE		118
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		140
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		144
ANNEXES		166

REMERCIEMENTS

Il est dur de commencer ces remerciements tant le nombre de personnes concernées est grand. Je vais quand même essayer d'être la plus exhaustive possible.

Tout d'abord merci aux membres du jury d'avoir gentiment accepté d'évaluer mon travail. Merci donc à Philippe Potin, Stéphane Herbette, Catherine Fernandez et Cédric Yvin. Je remercie aussi Elena Ormeño, Anne Bousquet-Mélou, Anne Pelegrino et Annick Dubois pour leur participation à mon comité de thèse et les discussions très enrichissantes que nous avons eues.

Je tiens à remercier Sylvie Baudino d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse, de m'avoir fait confiance durant ces quatre années, de m'avoir épaulé et encouragé.

Un grand et énorme merci à Florence N pour avoir été une co-encadrante parfaite ! Merci pour ces discussions scientifiques et personnelles qui m'ont fait avancer autant professionnellement que personnellement. Merci de m'avoir transmis une partie de tes connaissances en statistique car c'était un défi en soit! Merci de m'avoir fait confiance, merci pour ton exigence, merci pour ta présence, merci pour tes conseils et ton soutien. Pour résumer je pense que plus qu'une relation professionnelle de qualité, j'ai gagné une amie.

Un énorme merci à Fred. Tu m'as beaucoup aidé et appris pendant ces années. J'ai été contente de travailler avec toi. La manière que tu as de t'intéresser aux personnes qui t'entoure m'a toujours touché. Tu connais les noms de pratiquement tous tes étudiants et tu t'intéresses vraiment à eux. Répondant toujours présent pour une blague ou un coup de main, c'est toujours mieux quand tu es là !

Un énorme merci à toi aussi Sandrine pour ta gentillesse et ton aide. J'ai aussi été très contente de travailler avec toi. Je me souviendrai de ces longs trajets jusqu'à Marseille où on a bien discuté. En te parlant tout devient plus simple ! Merci pour tes encouragements et merci d'avoir répondu présent à chaque fois que j'en avais besoin.

Merci à Jean-Louis et à Jean-Claude avec qui j'ai moins travaillé mais qui ont chacun participé à rendre ces quatre années agréables. Jean-Louis avec son humour et son aide en biologie moléculaire et Jean-Claude avec ces discussions scientifiques, culturelles et ces encouragements. Merci à vous.

Passage obligé Nico, euh pardon Neeko !! Que dire à part que travailler avec toi a été un vrai bonheur. En plus d'être compétent et enthousiaste tu es extrêmement drôle et je ne compte plus les fois où j'ai pleuré de rire avec toi ! Je me souviens même d'une fois où je conduisais et je ne sais pas comment j'ai fait pour ne pas abîmer la voiture (de la fac en plus)!! Un seul regret, la Calabre!!! Elle nous attend toujours!!

Et maintenant passons à la fée du laboratoire, Auré. La première fois que je suis rentrée dans le laboratoire j'ai été impressionnée de voir à quel point tout était bien rangé, des étiquettes sur les placards, des classeurs avec la liste des produits et leur localisation, des fiches d'utilisation de

matériel...et tout ça mis à jour régulièrement !!! Toujours de bonne humeur, toujours positive, toujours prête à aider et toujours prête à faire tes petits yeux de chat ! Les supers moments que j'ai partagés avec toi sont innombrables autant au labo, au fitness, durant les missions lavande que pendant les EVJF et les mariages! Pour résumer tu es une amie qui m'est très chère et ça va vraiment me manquer de plus te voir tous les jours. Mais heureusement on aura nos séances de théâtre réglementaires (vive Shakespeare !!).

A toi petite Flo G!!! Tout d'abord merci de m'avoir aidé dans mon travail. Merci de ta gentillesse, merci pour tes encouragements et merci pour nos discussions. Tu es une belle personne, il faut juste que tu apprennes à le voir. Et promis, on investira les iléades et on ira voir des spectacles ensemble car sinon tu vas me manquer!

« Yolande, voilà Emilie et Cécile qui sont ATER au BVpam cette année ». ATER ?? Qu'est-ce que ça veut dire? En plus du nom, j'ai surtout appris que c'était des personnes auxquelles j'allais beaucoup m'attacher et qui ne resteraient malheureusement qu'une année. Cécile, j'ai beaucoup aimé partager mon bureau avec toi. J'ai découvert une personne drôle, gentille, compétente qui m'a aidée et soutenue pendant ma première année de thèse. Tu es quelqu'un que j'estime beaucoup et que je regrette de voir si peu. Emilie, toi tu as eu la bonne idée de rester deux ans! Tu es devenue une amie. Nos pauses café, nos discussions et ton soutien ont été d'une grande importance. Tu m'as appris à prendre des décisions et à avancer sans regarder en arrière. Ta force de caractère et ta détermination m'ont beaucoup inspirées. Et tu m'as même montré, chose incroyable pour moi, comment donner le bain à un bébé ! Je me souviens encore d'avoir senti ta puce bouger dans ton ventre et de sa petite bouille à la maternité!! J'ai été très contente de partager ces moments privilégiés avec toi et j'espère connaître tes autres petits bouts!!!

Catherine, ATER BVpam et aussi dans mon bureau. Quelle rencontre!!! Que de discussions scientifiques, personnelles, culturelles, intellectuelles.....Tu m'as vraiment beaucoup apporté. J'ai adoré nos sorties théâtre ou musique. Encore maintenant quand j'entends les informations je me demande ce que tu en penserais et combien de temps nous pourrions en discuter, une heure, deux, voire quatre!!! En plus d'être d'une gentillesse et d'une serviabilité sans faille, tu mets les gens en valeur et en confiance. J'espère vraiment que la recherche ne passera pas à côté de quelqu'un comme toi.

Et maintenant petit clin d'œil à mes compatriotes doctorants BVpam!! Bernard et Pulu. Bernard merci d'avoir fait le transporteur pour moi et merci de ton soutien. N'oublie pas que je te dois toujours une bière! Pulu, thank you for your happiness, for your delicious cakes and for our english conversations!!

A tous les stagiaires qui ont travaillé avec moi je voudrai adresser un énorme merci. Dans l'ordre Zhenni, Thomas, Sophie (ou plutôt Fofi), Adrien, Arthur et Julianne. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous, votre contribution à ce travail est beaucoup plus grande que vous pouvez le penser. Un clin d'œil spécial pour Sophie et Adrien, nos matinées dans « la boîte chaude » resteront mémorables. C'est quand qu'on retravaille ensemble ??

Je voudrai aussi adresser un énorme remerciement à tout le staff de préparation des TP de biologie, Odile, Pascal, Marie, Anne-Laure et Wanda. Merci pour votre travail efficace et professionnel et merci pour votre sympathie.

Un merci tout spécial pour les personnes qui ont participé à l'obtention et aux soins des lavandes sans quoi rien dans ce travail n'aurait été possible. Alors merci à Bernard Pasquier et Sarah Martineau du Conservatoire National des Plantes à Parfum, Aromatiques et Industrielles pour nous avoir fourni leurs connaissances et leur plantes. Un grand merci à Bertrand Ferraton, Bernard et Pascal et à leurs élèves du Lycée horticole de Montravelle d'avoir accepté de prendre soin des lavandes. Merci aussi à Joël Ruiz, dirigeant d'Abiessence, de nous avoir permis d'échantillonner dans ces champs.

Merci à tous ceux qui ont participé à mon travail de près ou de loin. Merci à Cyrille Conord de m'avoir aidé à y voir plus clair en statistique. Merci à Claude Raveyre pour son aide et sa parfaite gestion de l'azote liquide. Merci à tout le personnel administratif de la fac et en particulier à Corine, Pascal, Hubert et Sylvie pour leur aide et leur gentillesse.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mes amis et ma famille. Je vous remercie d'avoir supporté mes « Je ne peux pas, j'ai du travail » et mes explications confuses sur ma thèse. Vous m'avez permis de garder la tête froide et les idées claires. Vous savez à quel point vous m'êtes précieux, alors maintenant je vais prendre plus de temps pour prendre soin de vous. Mention spéciale pour Mickaël qui a passé une soirée entière à me faire une macro Excel! Merci à tous ceux du club de basket de Saint Martin la Plaine qui ne sont rien de moins qu'une deuxième famille, alors vive le SMOB!!!

Les dernières personnes que je voudrai citer sont Julien et Marie-Claire. Julien, l'amour de ma vie, tu as été d'un soutien et d'une aide sans faille autant moralement que pour mes manip' ou la rédaction. Pour cela je ne te remercierai jamais assez. Marie-Claire, ma grande sœur doctorante, merci d'être là, ou plutôt merci d'avoir toujours été là même quand il a fallu manipuler avec moi.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAT	Alcool acétyl transférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BDPS	Bornyl diphosphate synthase
CASDAR	Compte d'affectation spécial pour le développement agricole et rural
CNPMAI	Conservatoire national des plantes à parfum, aromatiques et industrielles Centre interprofessionnel d'expérimentation en plantes à parfum aromatiques et
CRIEPPAM	médicinales
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
FPP	Farnésyl diphosphate
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GGPP	Géranyl géranyl diphosphate
GPP	Géranyl diphosphate
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
INRA	Institut national de recherches agronomiques
IPP	Isopentényl diphosphate
Iteipmai	Institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, médicinales et aromatiques
LEA	Late Embryogenesis Abundant
MDA	Monodehydroascorbate
MEP	Méthyl-érythritol-phosphate
MIP	Major Intrinsic Proteins
MVA	Mévalonate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PS I et II	Photosystèmes I et II
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
Rubisco	Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase
TPS	Terpènes synthases

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié des voies de biosynthèse des terpènes.....	10
Figure 2 : Formules chimiques des précurseurs des voies des terpènes (DMAPP (1) et IPP (2)) et des prényl diphosphates (GPP (3), FPP (4) et GGPP (5)).....	11
Figure 3 : Exemples de mono- et sesquiterpènes linéaires, mono- ou polycycliques illustrant la diversité des terpènes volatils	13
Figure 4 : Mécanismes de réaction des monoterpène synthases conduisant à la formation de monoterpènes linéaires.....	13
Figure 5 : Exemples de structures spécialisées dans la production de terpènes volatils	15
Figure 6 : Vue d'ensemble des différents rôles écologiques des terpènes volatils	17
Figure 7 : Classification et répartition géographique des différentes sections du genre <i>Lavandula</i>	24
Figure 8 : Photo, morphologie générale et aire de répartition de la lavande fine, de la lavande aspic et du lavandin	25
Figure 9 : Photos de microscopie optique d'une coupe calice de lavande fine colorée au réactif Nadi (a et b) et schéma d'un trichome glandulaire pelté (c)	26
Figure 10 : Photos de microscopie optique de trichome glandulaire de lavande fine avant (a) et après distillation (b).....	27
Figure 11 : Voies de biosynthèse des mono- et sesquiterpènes chez les lavandes	32
Figure 12 : Photos d'archives liées à l'utilisation et la récolte des lavandes	34
Figure 13 : Répartition des zones de production de lavande fine et de lavandin en France	35
Figure 14 : Les six itinéraires touristiques proposés par "Les routes de la lavande".....	38
Figure 15 : Cycle de vie de <i>Hyalesthes obsoletus</i> et transmission de la maladie du dépérissement sur la lavande	39
Figure 16 : Photos des différents essais réalisés pour lutter contre la maladie du dépérissement	41
Figure 17 : Cartes de l'évolution du climat méditerranéen entre 1970 (a) et 2009 (b)	43
Figure 18 : Carte mondiale du rapport entre consommation et disponibilité en eau.	44
Figure 19 : Vue d'ensemble des rôles de l'eau chez les végétaux	45
Figure 20 : Fonctionnement de la fixation de l'énergie lumineuse	49
Figure 21 : Le cycle de Calvin	50
Figure 22 : Fonctionnement de la photosynthèse en condition hydrique normale (a) et en déficit hydrique (b).....	51
Figure 23 : Vue d'ensemble des différentes voies de dissipation de l'énergie lumineuse capturée par les photosystèmes I et II	52
Figure 24 : La voie de Melher	53
Figure 25 : Schéma de la photorespiration	54
Figure 26 : Schéma-bilan de la comparaison du fonctionnement de la photosynthèse en conditions normales (a) et en conditions de stress hydrique (b)	57
Figure 27 : Schéma des principaux ROS et de leurs dommages moléculaires	59
Figure 28 : Principales enzymes responsables de la détoxification des ROS.....	60
Figure 29 : Principales molécules antioxydantes	60

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Composés majoritaires de l'huile essentielle d'inflorescence et de feuille chez la lavande fine, la lavande aspic et le lavandin</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 2: Récapitulatif des différents gènes identifiés chez la lavande fine, la lavande aspic et le lavandin, et impliqués dans la synthèse des terpènes volatils</i>	<i>32</i>
<i>Tableau 3 : Production mondiale d'huile essentielle de lavande fine de 2005 à 2012</i>	<i>37</i>
<i>Tableau 4 : Tableau récapitulatif des trois programmes de recherche sur la maladie du dépérissement financés par le ministère de l'agriculture</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents paramètres calculés grâce aux mesures de fluorescence chlorophyllienne.....</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 6 : Revue bibliographique de l'impact du stress hydrique sur la production de terpènes volatils.....</i>	<i>65</i>

INTRODUCTION

I. LES TERPÈNES VOLATILS

Les terpènes volatils font partie de la grande famille des terpènes qui sont des molécules composées d'unités isoprène à cinq carbones (C_5H_8 , **Figure 3**). Le nombre d'unités isoprène peut aller de 1 à 8 (Rodríguez-Concepción et al. 2004; Aharoni et al. 2005) et c'est sur ce critère que sont définies les différentes classes de terpènes. Les hémiterpènes sont composés d'une unité isoprène (C5), les monoterpènes de deux (C10), les sesquiterpènes de trois (C15), les diterpènes de quatre (C20), les triterpènes de six (C30) et les tétraterpènes de huit (C40) (**Figure 1**). En plus d'être très divers chimiquement, ils possèdent des rôles variés allant de la participation à la composition des membranes (stéroïdes, C30) à la photoprotection (caroténoïdes, C40) en passant par la régulation de la croissance en tant que phytohormones (gibbérellines, C20) (Oldfield and Lin 2012). Les terpènes avec un nombre de carbones inférieur ou égal à 20 – les hémiterpènes, les monoterpènes, les sesquiterpènes et certains diterpènes - possèdent une bonne volatilité dans l'air et vont donc être classés dans les terpènes volatils (Dudareva et al. 2004) (**Figure 1**). Ce ne sont pas les seuls composés organiques volatils que l'on retrouve dans la nature puisque s'y ajoutent des phénylpropanoïdes, des benzénoïdes et des dérivés d'acides gras et d'acides aminés (Dudareva et al. 2006). Les composés organiques volatils sont synthétisés par différents groupes d'organismes mais les plus grands producteurs sont les végétaux où ils interviennent dans les relations plante-insecte, plante-plante et dans les stress biotiques et abiotiques (Dudareva et al. 2004; Fantaye et al. 2014). Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur les terpènes volatils.

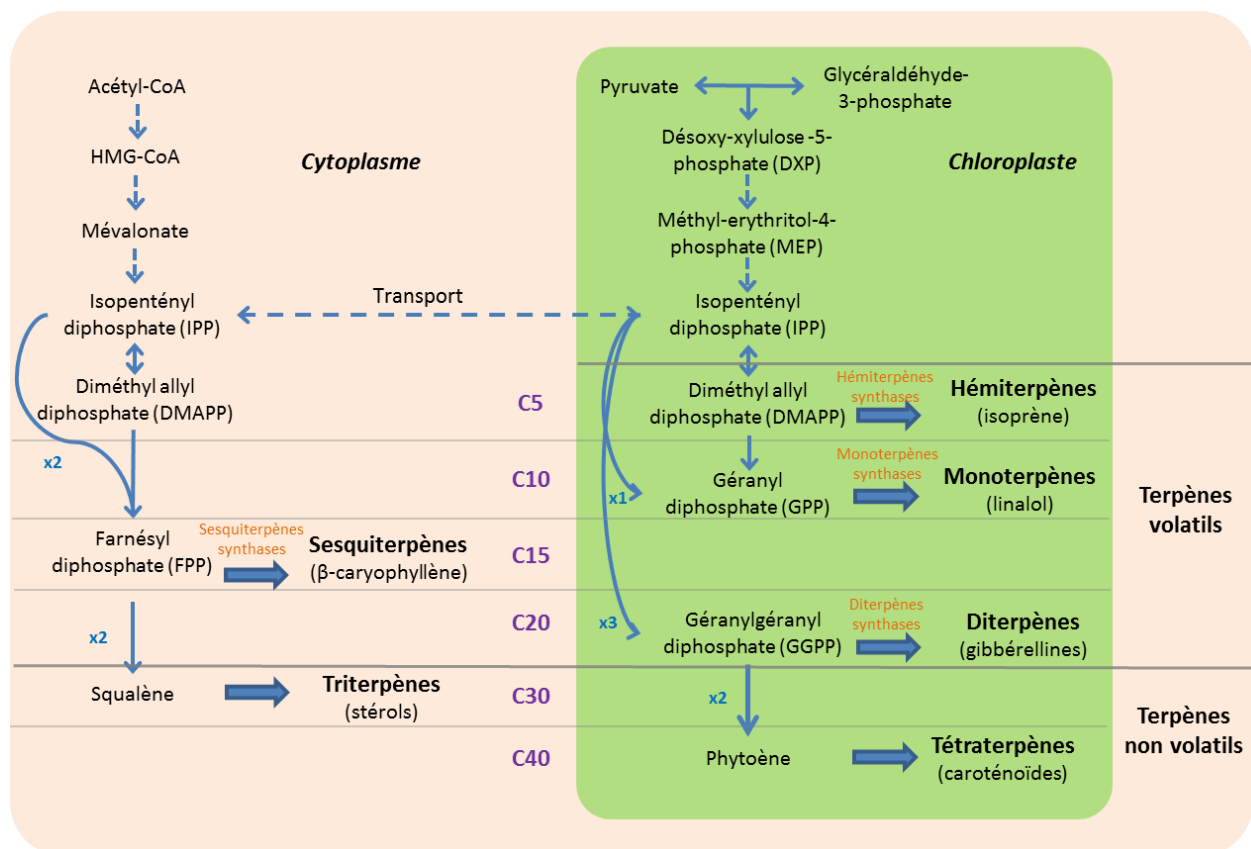


Figure 1 : Schéma simplifié des voies de biosynthèse des terpènes

Les flèches pleines indiquent le passage direct entre deux molécules, les flèches avec des pointillés représentent plusieurs étapes de synthèse et la double flèche en pointillés le transport de l'IPP entre le cytoplasme et le chloroplaste. D'après (Dudareva et al. 2004; Owen and Peñuelas 2005)

I.1 Voies de biosynthèse des terpènes volatils

La biosynthèse des terpènes volatils peut être décomposée en trois étapes successives : 1) formation des unités isoprènes réactives : IPP (Isopentényl diphosphate) et DMAPP (diméthylallyl diphosphate); 2) formation des précurseurs : les prényl diphosphates; 3) formation des terpènes.

I.1.1 Formation des unités isoprènes réactives : IPP et DMAPP

Les unités à cinq carbones à l'origine de toutes les molécules de terpènes sont l'IPP (Figure 2) et son isomère allylique le DMAPP (Figure 2). Pendant longtemps, on a pensé que ces deux unités étaient produites dans le cytosol par la voie du mévalonate (MVA). Ce n'est qu'à la fin des années 1990 qu'une deuxième voie, plastidiale, a été découverte : la voie du méthyl-érythritol-phosphate (MEP) (Lichtenthaler et al. 1997).

La voie du mévalonate se situe dans le cytosol et commence avec l'acétyl-CoA qui donne de l'IPP en passant par l'HMG-CoA (hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A) et le mévalonate grâce à plusieurs

réactions enzymatiques (McGarvey and Croteau 1995) (**Figure 1**). La voie plastidiale, quant à elle, commence par le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le pyruvate qui donnent, par des réactions enzymatiques successives, de l'IPP (McCaskill and Croteau 1999). Ces deux voies conduisent à des classes de terpènes différentes. En effet, la voie cytosolique produit principalement des sesquiterpènes et des triterpènes (Rodríguez-Concepción et al. 2004; Cheng et al. 2007). La voie plastidiale donne des hémiterpènes, des monoterpènes et des diterpènes. Même si ces deux voies peuvent fonctionner indépendamment, il existe des échanges d'IPP qui ont été mis en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des deux voies chez *Arabidopsis thaliana* et chez le tabac (Laule et al. 2003; Hemmerlin et al. 2003). Ainsi, il a été montré que lorsqu'une voie est inhibée, l'autre prend le relais pour maintenir la production d'IPP. Une autre étude a montré que la production de monoterpènes (plastidiale) et de sesquiterpènes (cytosolique) était uniquement assurée grâce au pool d'IPP de la voie plastidiale dans les cellules épidermiques de fleur de mufler (Dudareva et al. 2005).

I.1.2 Formation des précurseurs : les prényl diphosphates

Une fois les unités isopréniques réactives formées, des prényltransférases prennent le relais pour former le squelette carboné des terpènes grâce à une condensation tête-bêche entre l'IPP et le DMAPP (Oldfield and Lin 2012). Les produits issus de l'action des prényltransférases sont des prényl diphosphates (**Figure 2**). On peut citer le GPP (géranyl diphosphate) provenant de la condensation d'un IPP et d'un DMAPP par une GPP synthase. La FPP synthase (farnésyl diphosphate synthase) ajoute successivement deux molécules d'IPP à une molécule de DMAPP pour former le précurseur des sesquiterpènes (C15) et des triterpènes (C30). La géranyl géranyl diphosphate synthase quant à elle ajoute trois molécules d'IPP à une molécule de DMAPP pour former le géranyl géranyl diphosphate (GGPP) qui est le précurseur des diterpènes (C20) et des tétraterpènes (C40) (Cheng et al. 2007). Ainsi, dans le cas des triterpènes et des tétraterpènes, c'est l'ajout de deux molécules de FPP (C15) et de GGPP (C20) qui conduit aux deux précurseurs des triterpènes et des tétraterpènes que sont le squalène (C30) et le phytoène (C40) (McGarvey and Croteau 1995; Barkovich and Liao 2001; Owen and Peñuelas 2005).

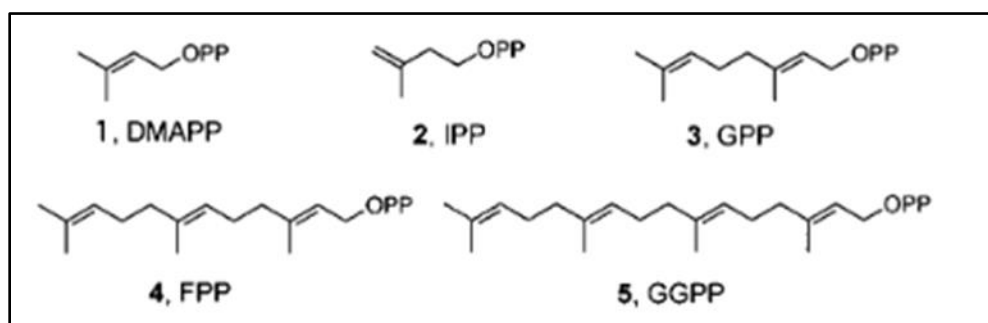


Figure 2 : Formules chimiques des précurseurs des voies des terpènes (DMAPP (1) et IPP (2)) et des prényl diphosphates (GPP (3), FPP (4) et GGPP (5)).

Extraite de (Oldfield and Lin 2012)

I.1.3 Formation des terpènes volatils finaux

I.1.3.1 *Origine de la diversité des terpènes volatils*

Les prényl diphosphates servent de précurseurs à des enzymes que l'on nomme les terpène synthases (Cheng et al. 2007). Elles peuvent produire des terpènes acycliques, mono- ou polycycliques apportant un premier niveau de diversité (**Figure 3**). L'autre principale caractéristique de ces enzymes est qu'elles sont souvent capables de donner plusieurs produits à partir d'un même précurseur. Chez *Arabidopsis thaliana*, deux sesquiterpènes sont responsables de la formation d'un mélange de 20 sesquiterpènes (Tholl et al. 2005). Toujours chez *Arabidopsis thaliana*, une myrcène/ocimène synthase a été caractérisée comme produisant 56 % de myrcène, 20 % de *E*- β -ocimène et 5 % d'autres monoterpènes cycliques (Bohlmann et al. 2000). Cette multitude de produits est expliquée en partie par le mécanisme de formation des terpènes. La plupart des terpène synthases ont besoin d'un ion divalent comme cofacteur. Il permet l'ionisation du substrat et la formation d'un carbocation qui subit différents réarrangements avant que la réaction ne se termine par la perte d'un proton ou l'addition d'un groupement nucléophile (Degenhardt et al. 2009). La **Figure 4** illustre les différents intermédiaires menant à la formation de monoterpènes linéaires. Lors du fonctionnement d'une monoterpène synthase, ces différents intermédiaires sont plus ou moins bien stabilisés et peuvent mener à l'arrêt de la synthèse plus tôt ou plus tard dans la cascade de ces intermédiaires, expliquant la production de différents composés. On compte aujourd'hui près de 40 000 terpènes volatils identifiés (Kampranis et al. 2007). Le deuxième facteur impliqué dans la diversité des terpènes volatils est l'intervention d'autres réactions biochimiques comme des déshydrogénations, des acétylations ou bien encore des méthylations (Dudareva et al. 2004; Dudareva et al. 2006). L'acétate de linalyle, composé majeur chez la lavande, est par exemple produit par acétylation du linalol par une acétyl-transférase encore non identifiée à ce jour (Woronuk et al. 2011).

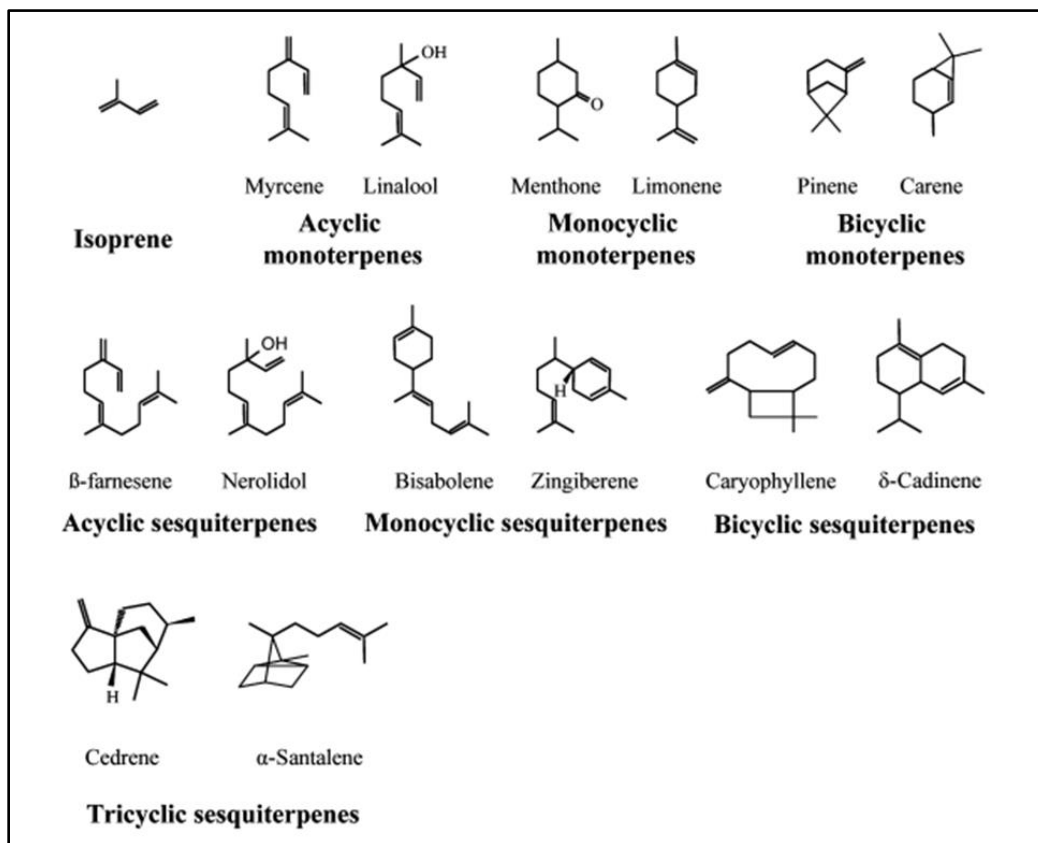


Figure 3 : Exemples de mono- et sesquiterpènes linéaires, mono- ou polycycliques illustrant la diversité des terpènes volatils

13

Chez les terpènes volatils on trouve des structures chimiques différentes avec des cyclisations ou des molécules linéaires. Modifiée de (Dudareva et al. 2006)

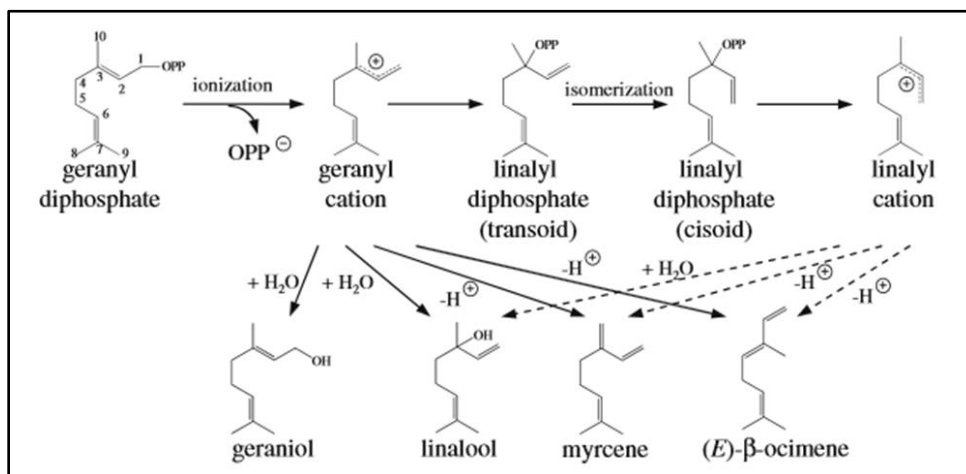


Figure 4 : Mécanismes de réaction des monoterpène synthèses conduisant à la formation de monoterpènes linéaires

Extrait de (Degenhardt et al. 2009)

1.1.3.2 La famille des terpène synthases

Les terpène synthases sont regroupées en sept familles notées de TPSa à TPSg chez les angiospermes et les gymnospermes (Degenhardt et al. 2009). Dans ces sept familles, on trouve les monoterpène synthases, les sesquiterpène synthases et les diterpène synthases. Cette séparation en sept familles est basée sur les similarités de séquences, de modes de fonctionnement et d'architectures des gènes (Dudareva et al. 2006). D'un point de vue fonctionnel, on distingue deux classes de terpène synthases : les terpène synthases de classe I et les terpène synthases de classe II (Chen et al. 2011). Les terpène synthases de classe I regroupent la majorité des terpène synthases et fonctionnent par ionisation et formation d'un carbocation comme vu précédemment grâce à un domaine de type kaurène synthase. Cette activité par ionisation dépendante d'un ion divalent se traduit par la présence, en N-terminal, d'un domaine possédant les motifs DDXXD et NSE/DTE. Les terpène synthases de classe I regroupent des monoterpène synthases, des sesquiterpène synthases et des diterpène synthases. Ce n'est pas le cas des terpène synthases de classe II qui regroupent uniquement des diterpène synthases. Elles présentent un domaine de type copalyl diphosphate synthase qui permet la protonation du précurseur et non l'ionisation. On trouve notamment dans la séquence un motif DXDD caractéristique de la fonction de protonation.

Cette division en deux classes est probablement due à l'origine des terpène synthases. En effet, toutes les terpène synthases proviendraient de la duplication d'un gène ancestral codant pour une enzyme bifonctionnelle présentant les deux fonctionnalités d'ionisation et de protonation (Cao et al. 2010; Chen et al. 2011). Ces gènes auraient ensuite évolué par perte d'une des deux fonctions. Cette hypothèse est soutenue par le fait que certaines diterpène synthases de gymnospermes, comme l'abiétadiène synthase du sapin géant, possèdent les domaines caractéristiques des deux classes leur permettant d'avoir les deux activités (Peters et al. 2000).

1.2 Structures de fabrication et de stockage des terpènes volatils

Certains terpènes volatils ne sont pas produits dans des cellules spécialisées (Caissard et al. 2004). Pour les autres cependant, il existe une grande diversité de structures constituées de cellules spécialisées dans la synthèse et le stockage de ces composés. Certaines structures spécialisées peuvent produire et émettre les composés directement, comme c'est le cas des cellules épidermiques coniques du pétale de rose (Bergougnoux et al. 2007) (**Figure 5a**). D'autres produisent et stockent les terpènes volatils dans des cavités diverses. C'est le cas chez les Solanacées et les Lamiacées qui présentent des trichomes glandulaires. Ces structures externes sont composées de cellules de pied et de cellules sécrétrices qui stockent les terpènes volatils sous leur cuticule. La menthe poivrée présente deux type de trichomes glandulaires, les trichomes glandulaires capités composés de deux cellules sécrétrices et les trichomes glandulaires peltés composés de huit cellules sécrétrices (Gershenzon et al. 1992) (**Figure 5b**). Les citrons possèdent des cavités sécrétrices internes situées dans l'épicarpe du fruit (Liang et al. 2006) (**Figure 5c**). On peut aussi citer les laticifères qui produisent et stockent le latex de manière intracellulaire (Pickard 2008) (**Figure 5d**) ou les canaux résinifères présents chez certains conifères (Fahn 1988; Zulak and Bohlmann 2010) (**Figure 5e**).

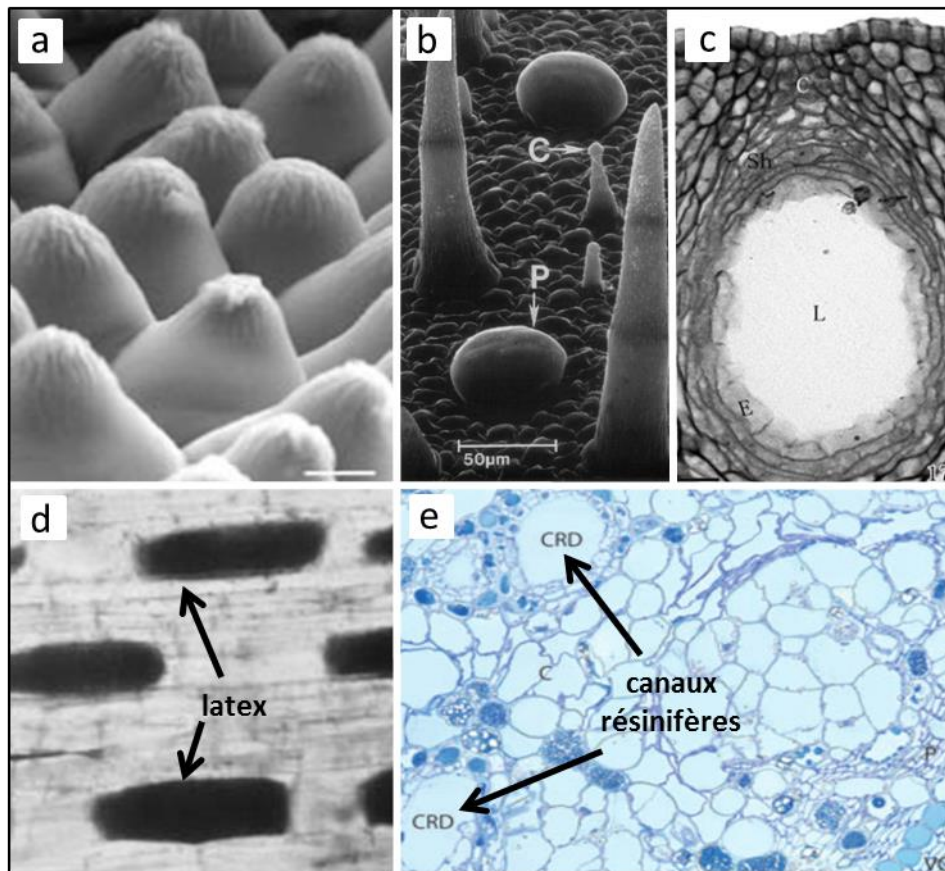


Figure 5 : Exemples de structures spécialisées dans la production de terpènes volatils

(a) Cellules épidermiques coniques de pétale de rose (Bergougnoux et al. 2007). (b) Trichomes glandulaires capités (C) et peltés (P) sur l'épiderme de feuille de menthe poivrée (*Lamiaceae*) (Gershenzon et al. 1992). (c) Cavité sécrétrice d'épicarpe de citron ;(L) lumen ; (E) cellules épithéliales ; (C) capsule ; (Sh) cellules de la gaine (Liang et al. 2006). (d) Laticifères de pétale de « moonflower » (Pickard 2008). (e) Canaux résinifères de feuille d'épicéa ; (CRD) constitutive resin duct (Zulak and Bohlmann 2010)

I.3 Variations de la production des terpènes volatils

I.3.1 Variation spatiale de la production et du stockage de terpènes volatils au sein d'une plante

Comme évoqué précédemment, il existe des structures spécialisées dans la production et le stockage des terpènes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces structures spécialisées peuvent présenter une répartition hétérogène sur la plante, responsable d'une production différentielle de terpènes selon les organes. Chez les angiospermes, l'un des organes produisant la plus grande diversité et la plus grande quantité de terpènes est la fleur (Raguso 2008). Au sein même de la fleur, une spatialisation de la production peut être observée. En effet, chez la lavande, c'est le calice qui est le plus grand producteur de terpènes grâce à sa forte densité en trichomes glandulaires (Guitton et al. 2010a; Guitton et al. 2010b). Chez le muflier, les terpènes sont produits dans les lobes haut et bas de la corolle (Dudareva et al. 2000). Les feuilles peuvent elles aussi être le lieu majoritaire de production des terpènes comme c'est

le cas chez la menthe poivrée (Gershenzon et al. 2000). Chez les conifères, on retrouve principalement les terpènes dans la résine produite dans les canaux résinifères (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.e**) résents dans les aiguilles et l'écorce (Phillips and Croteau 1999; Zulak and Bohlmann 2010).

I.3.2 Variation temporelle de la production de terpènes volatils au sein d'une plante

En plus de leur hétérogénéité spatiale au sein de la plante et des organes, les terpènes volatils peuvent présenter des variations temporelles de leur production. La lumière est un facteur clé de régulation. Ainsi, chez *Artemisia annua* la production de β -pinène est plus forte de jour que de nuit (Lu et al. 2002). Cette variation de la production de terpènes volatils en fonction du rythme circadien a aussi été mise en évidence chez le muflier (Kolossova et al. 2001), le peuplier (Mayrhofer et al. 2005) et chez l'épicéa (Martin et al. 2003). La production de terpènes volatils peut aussi varier quantitativement et qualitativement en fonction de la maturité de l'organe producteur. Chez la lavande, l'accumulation de composés organiques volatils change en fonction du stade de développement de la fleur (Guitton et al. 2010a). Trois groupes de composés ont été définis en fonction de leur accumulation différentielle durant les stades bouton floral, pleine floraison et fructification. Ainsi, un bouton floral contient de grandes quantités de δ -3-carène, limonène, β -myrcène, bornyl acétate, bornéol, 1,8-cinéole et trans- β -ocimène alors qu'une fleur en pleine floraison sera riche en trans- β -farnésène, β -caryophyllène, germacrène D, acétate de lavandulyle et acétate de linalyle. Ces variations temporelles sont le signe de rôles spécifiques de ces différents bouquets floraux dans la protection et l'attraction des pollinisateurs. D'autres études menées sur des échelles de temps longues ont étudié le lien entre la production de terpènes volatils et les saisons (Llusià and Peñuelas 2000; Sabillon and Cremades 2001; Llusià et al. 2006; Fares et al. 2012). Même si la plupart du temps il existe un lien fort entre la saison et la production de terpènes volatils, il n'y a pas de patron généralisable car ces relations dépendent des espèces et de leurs environnements.

I.3.3 Variation de la production de terpènes volatils au sein d'une espèce, notion de chémotype

Au sein d'une même espèce on peut définir la notion de chémotype qui correspond à l'existence de profils chimiques différents accompagnés ou non de différences phénotypiques (Loreto et al. 2009). Chez le thym (*Thymus vulgaris*) par exemple six chémotypes ont été identifiés en fonction de leur composé majoritaire (carvacrol, thymol, linalol, thujanol-4, α -terpineol et geraniol) (Granger and Passet 1973). De plus ces six chémotypes possèdent une ségrégation spatiale particulière, conséquence de la différence de sensibilité au gel hivernal. Les chémotypes phénoliques (carvacrol et thymol) sont sensibles au gel alors que les chémotypes non phénoliques (linalool, thujanol-4, α -terpineol et geraniol) ne le sont pas et sont donc principalement présents dans des endroits plus froid que les chémotypes phénoliques (Vernet et al. 1986). De nombreuses études soulignent l'existence de chémotypes au sein d'une même espèce comme chez *Valeriana jatamansi* (Sundaresan et al. 2012), *Ocimum gratissimum* (Vieira et al. 2001) ou encore *Salvia fructicosa* (Skoula et al. 1999). Il a aussi été trouvé que les chémotypes pouvaient être reliés à la provenance géographique des plantes (Skoula et al. 1996; Zaouali and Boussaid 2008) et/ou à la génétique (Naydenov et al. 2005; Zaouali and Boussaid 2008). C'est le cas pour les 6 chémotypes de

thym (Vernet et al. 1986) et *Lavandula latifolia* (Muñoz-Bertomeu et al. 2007a). Chez cette dernière le chémotype à linalol est associé au climat supra-Méditerranéen (hiver froid et été tempéré) alors que le climat thermo-Méditerranéen (hiver frais et pluvieux et été chaud et sec) favorise le chémotype à 1,8-cinéole (Muñoz-Bertomeu et al. 2007a). Cette corrélation n'est pas toujours retrouvée comme par exemple chez *Lavandula multifida* où les trois chémotypes identifiés parmi 12 populations, ne montraient pas de liens clairs avec leur provenance géographique.

I.4 Rôles écologiques des terpènes volatils

Même s'ils ont longtemps été classés dans le métabolisme secondaire à cause de leur absence chez certaines plantes et du manque de connaissance de leur rôle, les terpènes volatils possèdent de multiples rôles écologiques. Certains auteurs préfèrent donc parler de métabolisme spécialisé (Pichersky and Lewinsohn 2011) car les terpènes volatils et plus généralement les composés organiques volatils dont ils font partie participent à l'adaptation des plantes à leur milieu et leur sont donc essentiels. On peut classer le rôle des terpènes en 4 catégories (*Figure 6*) que nous allons détailler : 1) Défense directe ; 2) Défense indirecte ; 3) Communication et 4) Tolérances aux stress abiotiques.

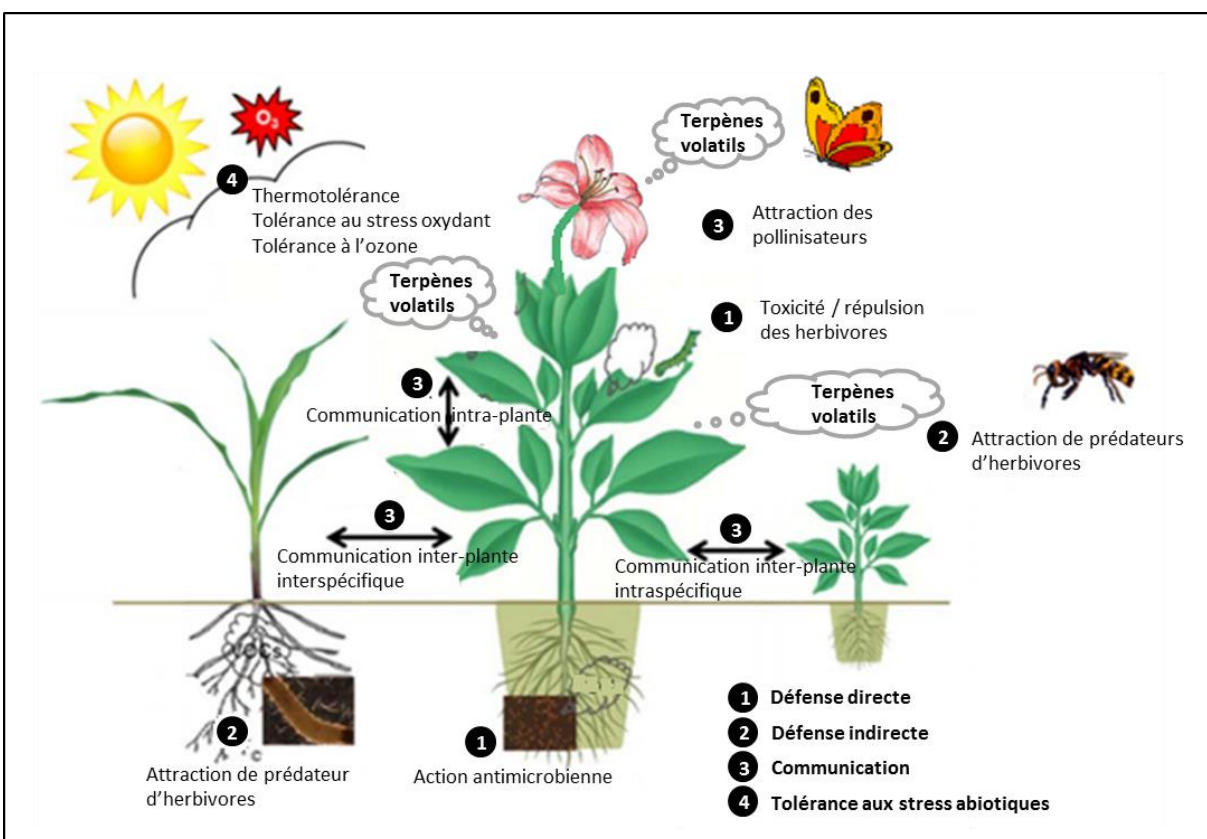


Figure 6 : Vue d'ensemble des différents rôles écologiques des terpènes volatils

Modifié d'après (Fantaye et al. 2014)

I.4.1 Défense directe

Les terpènes possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes qui leurs permettent d'être impliqués dans la défense directe face aux stress biotiques. En effet, de nombreuses études *in vitro* montrent leurs capacités à limiter les infections par des champignons ou des bactéries. (Knobloch et al. 1989; Dalleau et al. 2008; Maietti et al. 2013). C'est le cas pour l'huile essentielle de lavande fine qui possède même une activité antibactérienne sur certaines souches de staphylocoque et d'entérocoque résistantes aux antibiotiques à une concentration de moins de 1 % (Nelson 1997). Chez les conifères, les canaux résinifères contiennent de l'oléorésine composée de mono-, sesqui- et diterpènes qui sont impliqués dans la réponse défensive suite à l'attaque de coléoptères. Le rôle de cette résine est complexe puisque certains monoterpènes sont toxiques pour l'insecte (limonène et δ -3-carène) tandis que d'autres ont un effet répulsif. Enfin, une fois les monoterpènes et certains sesquiterpènes évaporés, le reste de la résine se rigidifie en piégeant parfois les insectes mais surtout en recouvrant la plaie pour éviter l'attaque par des champignons (Phillips and Croteau 1999; Trapp and Croteau 2001). Un autre aspect de l'action directe des terpènes volatils est leur utilisation dans les processus d'allélopathie qui peuvent, par exemple, inhiber la croissance de la plante réceptrice (Ormeño et al. 2007a; Kegge and Pierik 2010).

I.4.2 Défense indirecte

Les terpènes volatils sont impliqués dans la défense indirecte des plantes mettant en jeu des interactions tritrophiques. Lorsque la plante est attaquée par des herbivores, elle émet des composés organiques volatils qui attirent les prédateurs de ces herbivores. C'est ce que certains auteurs nomment « l'appel à l'aide » (Dicke and Baldwin 2010; Kaplan 2012). Ainsi chez le maïs, l'attaque de larves *Diabrotica virgifera virgifera* (coléoptère) induit l'émission de β -caryophyllène par les racines. Ce composé attire des nématodes prédatrices des larves ce qui favorise la protection du maïs (Rasmann et al. 2005). La variation de composition des terpènes émis par une plante suite à l'attaque d'herbivores peut aussi être utilisée par les insectes de diverses manières. La moutarde noire, par exemple, peut être infectée par deux types d'herbivores : *Delia radicum* qui attaque ses racines et *Pieris brassicae* qui attaque ses feuilles. Lorsque la moutarde noire est attaquée par *Delia radicum*, cela affecte le comportement d'oviposition de *Cotesia glomerata*, un parasite de l'herbivore foliaire *Pieris brassicae*. Le parasite de l'herbivore foliaire choisit de préférence des insectes présents sur des plantes non infectées par *Delia radicum* pour pondre ses œufs (Soler et al. 2007). Les profils chimiques des plantes infectées par l'herbivore racinaire *Delia radicum* et des plantes contrôles montrent une augmentation de composés volatils sulfurés concomitante avec une diminution de β -farnésène, sesquiterpène connu comme attractant d'herbivore ou d'insecte carnivore. Cela illustre bien la complexité des échanges qui peuvent impliquer beaucoup d'organismes. De plus, il a été montré que la diffusion des molécules volatiles peut être influencée par les conditions environnementales (Dicke and Baldwin 2010). Dans un contexte de changement climatique et d'augmentation de l'ozone atmosphérique, une étude récente a montré que l'augmentation d'ozone diminuait la distance d'action des composés organiques volatils émis par le haricot suite à l'attaque d'herbivores (Blande et al. 2010).

I.4.3 Communication

Les molécules volatiles peuvent être considérées comme des signaux chimiques véhiculant un message entre un émetteur et un récepteur. Tel un langage, les terpènes volatils vont donc constituer un moyen de communication qui s'inscrit dans différents contextes écologiques. Un des processus bien connu est l'attraction des pollinisateurs par les composés émis par les fleurs (Pichersky and Gershenzon 2002; Hossaert-McKey et al. 2010). Le linalol, par exemple, attire une large gamme de pollinisateurs (Raguso and Pichersky 1999). Chez l'arum, l'accumulation de terpènes volatils dans les vésicules des cellules coniques de l'inflorescence coïncident avec le moment où le pistil devient réceptif. Une fois la réceptivité du pistil passée, les vésicules ne sont plus présentes dans l'inflorescence, signe que les terpènes volatils accumulés ont été émis pour attirer les pollinisateurs durant la réceptivité du pistil (Leguet et al. 2014). Les terpènes volatils sont aussi des effecteurs de la communication inter-plantes (intra- et interspécifique) et intra-plante (Baldwin et al. 2006; Ormeño et al. 2007a; Heil and Bueno 2007). Chez *Nicotiana attenuata* l'émission de terpènes influence les profils d'expression géniques des plantes voisines de la même espèce (Paschold et al. 2006). Le rôle exact de ces modifications n'a pas pu être mis en évidence.

I.4.4 Tolérance aux stress abiotiques

Les conditions environnementales comme la température, la lumière, le déficit hydrique ou encore l'ozone peuvent influencer la production des terpènes volatils (Bertin and Staudt 1996; Loreto and Schnitzler 2010; Peñuelas and Staudt 2010). Chez le maïs, les émissions de composés organiques volatils suite à l'attaque par un herbivore sont modifiées par la température, la lumière, l'humidité du sol, l'humidité de l'air et le degré de fertilisation (Gouinguéné and Turlings 2002). Les auteurs ont mis en évidence une très forte action de la lumière puisqu'aucune émission n'est détectée sans lumière. De plus, la quantité totale d'émission de composés organiques volatils est inversement proportionnelle à l'augmentation de l'humidité du sol. Pourtant, tous les composés du bouquet ne réagissent pas de la même façon. Les quantités de linalol (monoterpène), β -caryophyllène (sesquiterpène) et (*E*)- α -bergamotène (sesquiterpène) augmentent avec l'humidité tandis que le géranyl acétate (monoterpène) et (*E*)- β -farnésène (sesquiterpène) sont peu abondants quand l'humidité du sol est forte. Devant le grand nombre d'études montrant les effets des stress abiotiques sur la production et l'émission de terpènes volatils (Sharkey and Loreto 1993; Bertin and Staudt 1996; Loreto et al. 1996; Ormeño et al. 2008; Lavoit et al. 2009), leur rôle dans la tolérance au stress a été proposé. Les terpènes volatils seraient impliqués dans la thermotolérance (Singsaas et al. 1997; Loreto et al. 1998; Delfine et al. 2000; Velikova et al. 2011), la tolérance à l'ozone (Loreto et al. 2001; Velikova et al. 2005; Calfapietra et al. 2008) et la tolérance au stress oxydant (Affek and Yakir 2002; Velikova et al. 2004). Je consacre un paragraphe spécifique dans l'introduction, intitulé *Stress abiotiques et terpènes volatils* (III.5), dans lequel je développe les relations entre les terpènes volatils et la tolérance aux stress abiotiques.

1.5 Terpènes volatils et amélioration des plantes

De par leurs rôles écologiques, les terpènes peuvent constituer des cibles intéressantes dans les stratégies d'amélioration des plantes. Dans le cas de la menthe, des recherches ont montré que la surexpression de la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réducto-isomérase, enzyme responsable de la formation du méthylérythritol-4-phosphate dans la voie plastidiale (**Figure 1**), conduisait à une augmentation d'au moins 50 % du rendement en huile essentielle (Mahmoud and Croteau 2001; Lange et al. 2011). Chez le tabac, la suppression de l'expression d'un gène codant pour une P450 hydroxylase a induit l'accumulation du substrat de cette enzyme : le cembratriène-ol (diterpène), ce qui s'est traduit par une diminution de l'infection par des pucerons (Wang et al. 2001). Même si la plupart des études semblent montrer que la régulation des terpènes est principalement transcriptionnelle (Dudareva et al. 1996; McConkey et al. 2000; Guitton et al. 2010a; Jullien et al. 2014), la manipulation de l'expression des terpènes volatils peut se révéler plus compliquée. Ainsi, la surexpression du gène codant pour la linalol synthase chez le pétunia a conduit à la production de linalol glucosylé non volatil et non à du linalol volatil comme attendu à cause de l'action endogène d'une glucosyltransférase (Lücker et al. 2001). Une étude récente sur la surexpression d'une isoprényl diphosphate synthase chez l'épicéa a aussi montré des résultats inattendus (Nagel et al. 2014) : même si cette surexpression a augmenté la production de géranyl diphosphate (GPP) et de géranyl géranyl diphosphate (GGPP), il n'y a pas eu d'augmentation de monoterpènes ou de diterpènes ni même de caroténoïdes ou de chlorophylles. La surexpression a conduit à l'augmentation des acides gras estérifiés avec du géranylgéranyl. Cela montre bien la complexité de la régulation des terpènes volatils *in vivo* et le besoin de recherches complémentaires.

1.6 Terpènes volatils et pollution atmosphérique

Les principaux composés volatils émis dans l'atmosphère sont l'isoprène (44 %) et les monoterpènes (11 %) (Guenther et al. 1995). Leur présence peut influencer la chimie atmosphérique. Ils sont en effet capables de réagir avec des molécules oxydantes telles que les oxydes d'azote et l'ozone. Lorsque la concentration en oxyde d'azote est faible, les terpènes volatils réagissent avec l'ozone et en diminue la quantité. Par contre, lorsque la concentration des oxydes d'azote est grande, les oxydes d'azote réagissent avec les terpènes volatils et produisent du NO₂ (Chameides et al. 1988; Taraborrelli et al. 2009). Le NO₂ ainsi produit, en plus d'être toxique pour l'homme, participe à la formation des pluies acides et de l'ozone troposphérique impliqué dans le phénomène d'effet de serre. Ces réactions sont favorisées par de fortes radiations d'UV et de fortes températures. Beaucoup d'études ont donc été menées pour essayer de comprendre et de modéliser les émissions de terpènes volatils et leur lien avec la chimie atmosphérique (Grote et al. 2006; Grote et al. 2009; Taraborrelli et al. 2009; Lavoie et al. 2011). Le bassin méditerranéen notamment, est très concerné par ces problématiques pour différentes raisons. Premièrement, car sa flore est constituée de beaucoup d'espèces émettrices de terpènes volatils tel que *Quercus ilex* (qui domine dans les forêts méditerranéennes). Deuxièmement, son climat chaud et ensoleillé favorise aussi bien les émissions de terpènes volatils (Sharkey and Loreto 1993; Niinemets et al. 2004; Loreto et al. 2014) que leurs réactions avec les oxydes d'azote. Et dernièrement, la présence et la concentration des grandes villes dans ces régions engendrent de fortes productions d'oxydes d'azote

(Fares et al. 2009; Fowler et al. 2009). Ces trois conditions réunies favorisent donc le réchauffement climatique. Cependant on ne sait pas encore si ce phénomène va s'auto-amplifier puisque l'impact du réchauffement climatique sur les émissions de terpènes volatils est complexe à définir et reste encore débattu (Fortunati et al. 2008; Yuan et al. 2009; Peñuelas and Staudt 2010).

II. LES LAVANDES

II.1 Description et distribution

II.1.1 Le genre *Lavandula*

Les lavandes appartiennent à la famille des *Lamiaceae* comprenant des plantes dicotylédones herbacées à semi-ligneuses avec 7534 espèces pour 236 genres (world checklist of selected plant families, Kew Royal botanic garden website). Cette famille est caractérisée par la présence d'une fleur zygomorphe à deux lèvres, d'une tige carrée, d'un fruit de type tétrakène et de la production, chez de nombreuses espèces, de composés organiques volatils (Kubitzki and Kadereit 2003). On retrouve d'ailleurs de nombreuses plantes aromatiques et médicinales dans cette famille comme le thym, le romarin, l'origan, la menthe, la mélisse, la sauge, le basilic ou encore la sarriette. Le genre *Lavandula* regroupe 39 espèces réparties en trois sous-genres : *Lavandula*, *Fabricia* et *Sabaudia* et comprenant respectivement les sections suivantes : *Stoechas*, *Lavandula*, *Dentata / Pterostoechas*, *Subnuda*, *Chaetostachys*, *Hasikenses* et *Sabaudia* (Upson et al. 2004; Moja et al. 2015) (Figure 7a). La Figure 7b présente les inflorescences caractéristiques des huit sections. L'aire de répartition du genre *Lavandula* est très large puisqu'elle comprend la France, l'Espagne, le Portugal, l'Italie, toute la partie nord de l'Afrique, la Turquie et l'Inde (Lis-Balchin 2002) (Figure 7c). Le sous-genre *Lavandula* est confiné à la partie nord de cette aire de répartition sur le pourtour méditerranéen jusqu'à la Jordanie (Guitton 2010) (Figure 7c).

22

II.1.2 La section *Lavandula*

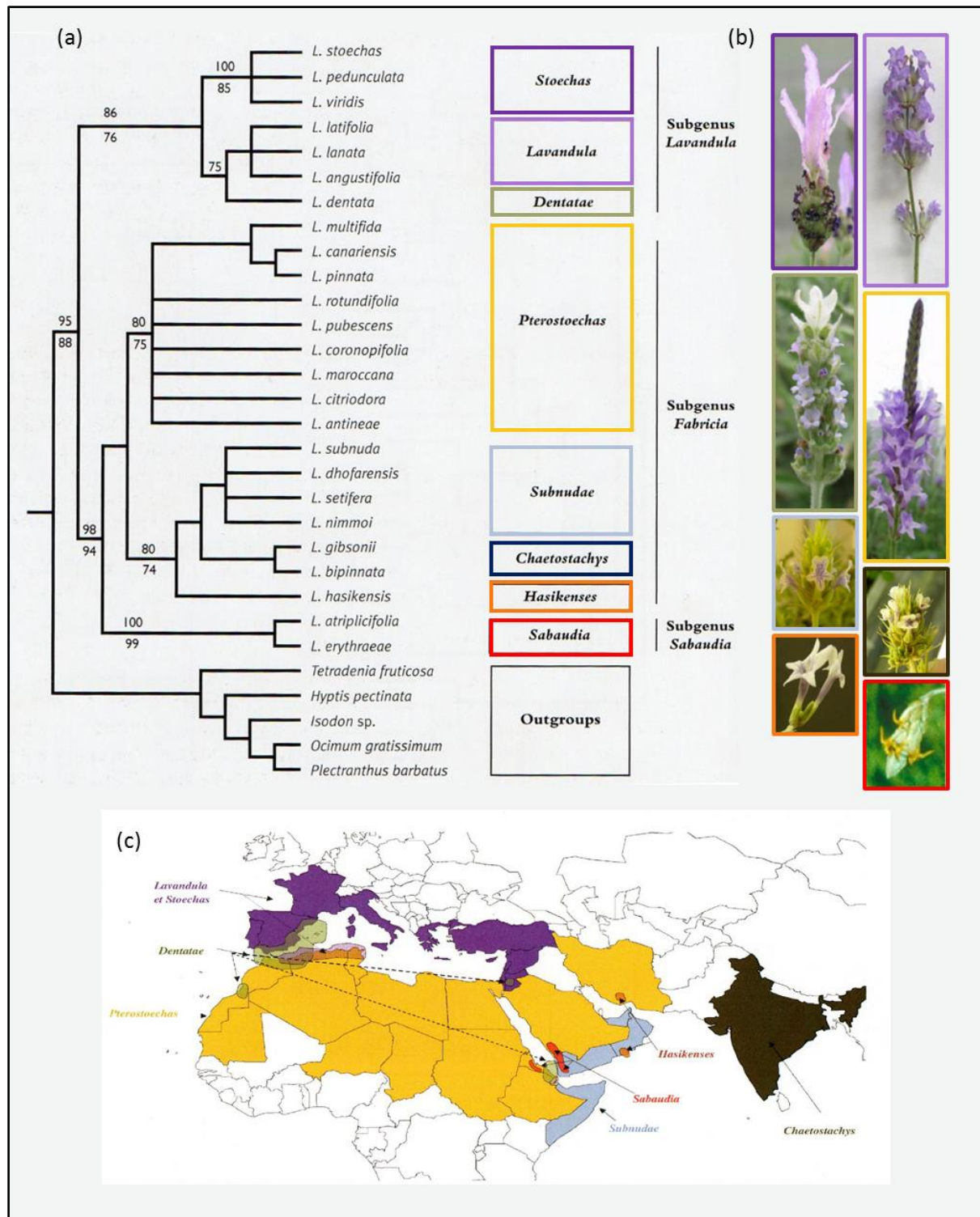
La section *Lavandula* regroupe des petites plantes ligneuses qui possèdent des feuilles linéaires à lancéolées. Le nombre de chromosomes des plantes de cette section varie de $2n = 36$ à $2n = 75$ (Lis-Balchin 2002; Upson et al. 2004). Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux espèces de la section *Lavandula* : la lavande aspic (*L. latifolia* Medik.) et la lavande fine (*L. angustifolia* Miller) (Figure 7a) qui sont présentes en France. Malgré des caractéristiques assez différentes, les deux espèces montrent des aires de distributions chevauchantes et sont capables de s'hybrider naturellement pour donner le lavandin (*L. x intermedia*) (Lis-Balchin 2002).

La lavande fine est probablement la lavande la plus connue en France pour son parfum et les propriétés médicinales de son huile essentielle. C'est une plante de 40 à 80 cm de haut possédant des inflorescences à multiples fleurs généralement de couleur violettes (Figure 7b). Elle se développe dans des milieux ouverts, souvent arides, et sur des sols calcaires. Elle existe sous la forme de deux sous-espèces, *L. angustifolia* sous-espèce *angustifolia* et *L. angustifolia* sous-espèce *pyrenaica* (Upson et al. 2004). Ces deux sous-espèces diffèrent par leurs aires de répartition. En effet la sous-espèce *angustifolia* est retrouvée principalement en France dans les Alpes-de-Haute-Provence, la Drôme, l'Ardèche et le sud du Massif Central (Figure 8). Quelques populations sont situées dans les Alpes italiennes et une unique population isolée a été trouvée en Calabre, au sud de l'Italie (Bernard Pasquier, CNPMAI : Conservatoire National des plantes à parfum, aromatiques et industrielles ; comm. personnelle). La sous-espèce

pyrenaica est exclusivement localisée dans les Pyrénées Française et Espagnole (**Figure 8**). Les différences morphologiques majeures entre les deux sous-espèces sont un calice érigé et moins poilu chez *L. angustifolia* sous-espèce *pyrenaica* ainsi qu'une bractée recouvrant totalement la base de la cyme alors que chez *L. angustifolia* sous-espèce *angustifolia*, le recouvrement n'est que partiel.

La lavande aspic, *L. latifolia*, est aussi présente en France mais son aire de répartition est plus au Sud que la lavande fine, englobant le Sud de la France et la partie Est de l'Espagne (**Figure 8**). De plus, la lavande aspic préfère des altitudes plus basses, entre 100 et 800 m d'altitude, alors que la lavande fine est retrouvée entre 500 et 1800 m d'altitude. La différence morphologique majeure entre la lavande fine et la lavande aspic est la présence de deux inflorescences secondaires chez la lavande aspic, avec une disposition typique en fourche et une tige centrale portant l'inflorescence principale plus longue (**Figure 8**).

Dans les zones où les deux espèces cohabitent, des hybridations se produisent et génèrent des hybrides stériles : dans les Alpes, *L. x intermedia* aussi appelé lavandin ; dans les Pyrénées, *L. x aurigerana* Mailho dont nous reparlerons pas plus ici (Lis-Balchin 2002; Upson et al. 2004). Morphologiquement, le lavandin est plus haut (de 1 m à 1 m 50), plus large, et possède des inflorescences plus massives et plus longues (plus de 20 cm) (Upson et al. 2004) (**Figure 8**). Il présente la triple inflorescence en fourche caractéristique de la lavande aspic bien que ce ne soit pas un critère absolument ubiquitaire. Dans le milieu naturel, de par la stérilité des lavandins, les zones de recouvrement réduites des deux espèces parentes et les faibles fréquences des phénomènes d'hybridation, les lavandins sont souvent en très faibles effectifs. Dans les écrits, le lavandin a souvent été confondu avec l'un ou l'autre de ses parents du fait de sa grande variabilité phénotypique. Dans l'herbier de Philip Miller, auteur du nom officiel de la lavande fine, *L. angustifolia* Miller en 1768, il s'est avéré que son exemplaire de lavande fine est très probablement un lavandin (Upson et al. 2004). Le lavandin et la lavande fine sont largement cultivés en France pour leurs huiles essentielles pour l'industrie du parfum et des arômes.



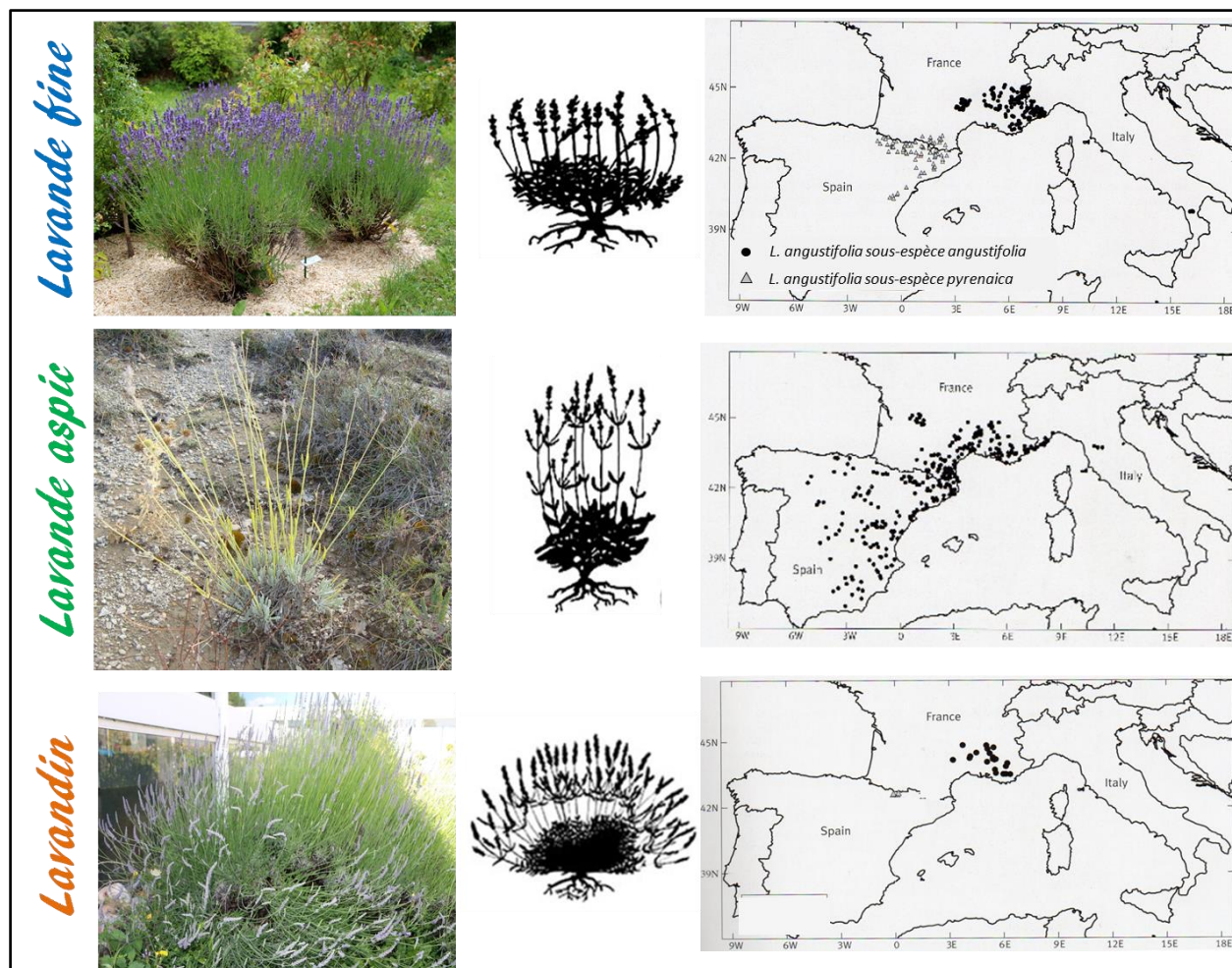


Figure 8 : Photo, morphologie générale et aire de répartition de la lavande fine, de la lavande aspic et du lavandin

Les cartes de répartition ont été modifiées d'après (Upson et al. 2004). Les morphologies générales des plantes proviennent de (Duru and Naviner 1998).

II.2 Les lavandes, des plantes aromatiques et médicinales

II.2.1 Huile essentielle : production et composition

Les lavandes, comme beaucoup de *Lamiaceae* produisent des grandes quantités de terpènes volatils, principalement des mono- et des sesquiterpènes (Upson et al. 2004; Guitton et al. 2010a), stockés dans des structures spécialisées : les trichomes glandulaires (Perrin and Colson 1986) (**Figure 9**). Ces structures sont composées de quelques cellules épidermiques basales surmontées de cellules sécrétrices généralement au nombre de 2 pour les trichomes glandulaires capités et de 8 pour les trichomes glandulaires peltés (Iriti et al. 2006) (**Figure 9** et **Figure 10a**). Les terpènes volatils produits par ces cellules sont stockés sous leur cuticule (en violet sur la **Figure 9b**) ; c'est pour cette raison qu'il faut frotter les feuilles ou les calices de lavande pour casser les glandes et mieux sentir leur parfum. La densité de trichomes glandulaires est beaucoup plus forte sur le calice de la fleur (Guitton et al. 2010a;

Jullien et al. 2014) même si les trichomes glandulaires sont aussi présents sur les feuilles. Les autres trichomes que l'on trouve chez les lavandes en abondance sont les trichomes tecteurs. Ce sont des poils ramifiés qui ne produisent pas de terpènes.

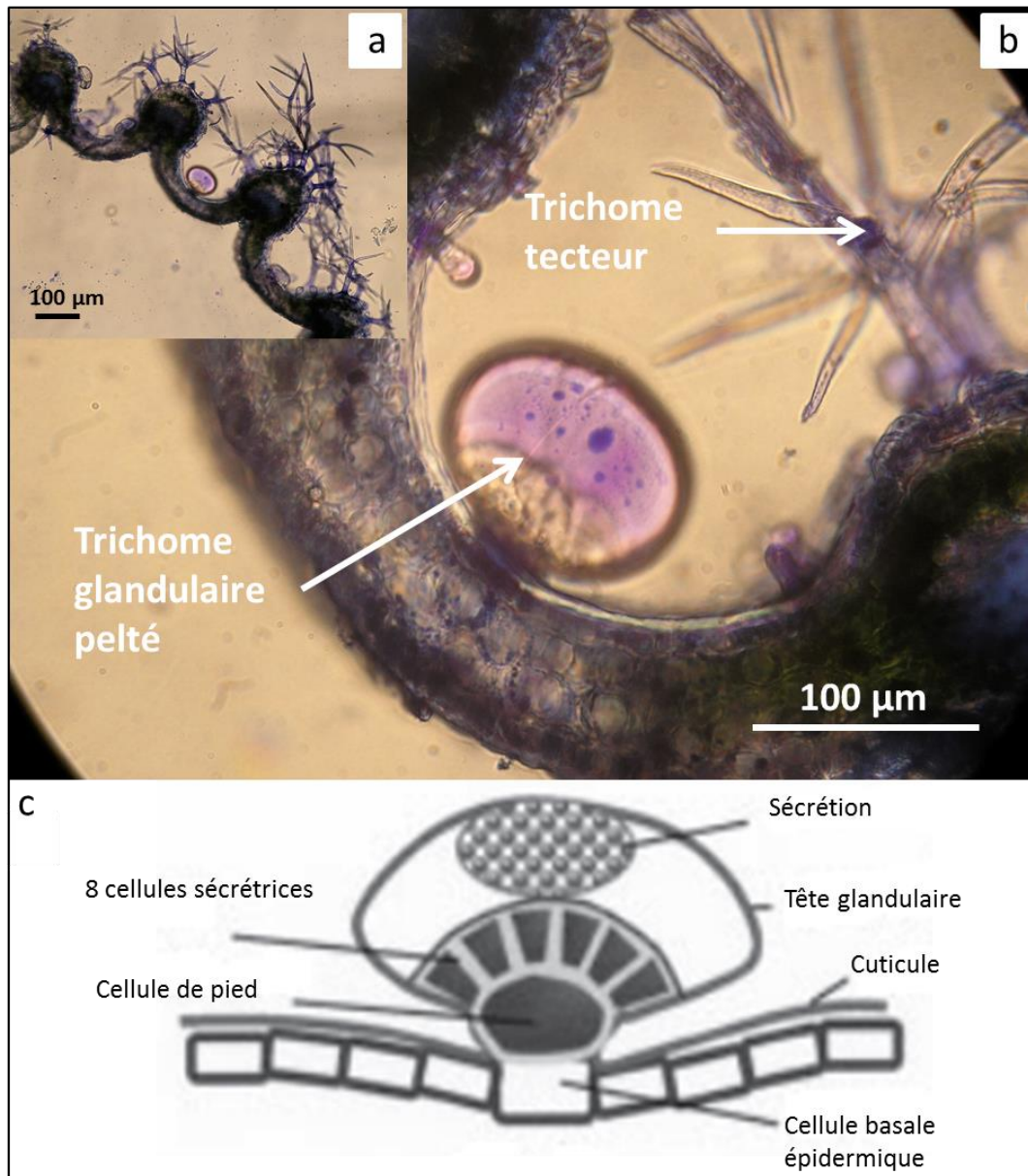


Figure 9 : Photos de microscopie optique d'une coupe calice de lavande fine colorée au réactif Nadi (a et b) et schéma d'un trichome glandulaire pelté (c)

(a) Vue d'ensemble de la section de calice. (b) Agrandissement d'un trichome glandulaire et d'un trichome tecteur. La coloration violette est associée à la présence de terpènes sous la cuticule du trichome glandulaire pelté. Modifié d'après (Guillon et al. 2010b). (c) Modifié d'après (Iriti et al. 2006).

L'huile essentielle est extraite des inflorescences de lavandes. Récoltées début juillet, les inflorescences sont mises à sécher pendant 24 à 48 heures pour permettre l'évaporation de l'eau en excès dans les plantes (Duru and Naviner 1998). L'huile essentielle est ensuite extraite par hydrodistillation des inflorescences dans des alambics. La vapeur d'eau déchire la cuticule des trichomes glandulaires et entraîne les composés volatils (Iriti et al. 2006) (**Figure 10**). Après refroidissement de cette vapeur d'eau, l'huile essentielle, hydrophobe, compose une phase bien distincte de l'eau florale. D'autres processus comme l'extraction par solvant (hexane principalement) existent et permettent l'obtention de la concrète, pâte faite de cires et de composés organiques volatils. Pour retirer les cires, la concrète est mélangée à de l'alcool puis filtrée, on obtient alors l'essence absolue. Cette essence absolue est d'une très grande qualité et est réservée aux produits de luxe (Duru and Naviner 1998).

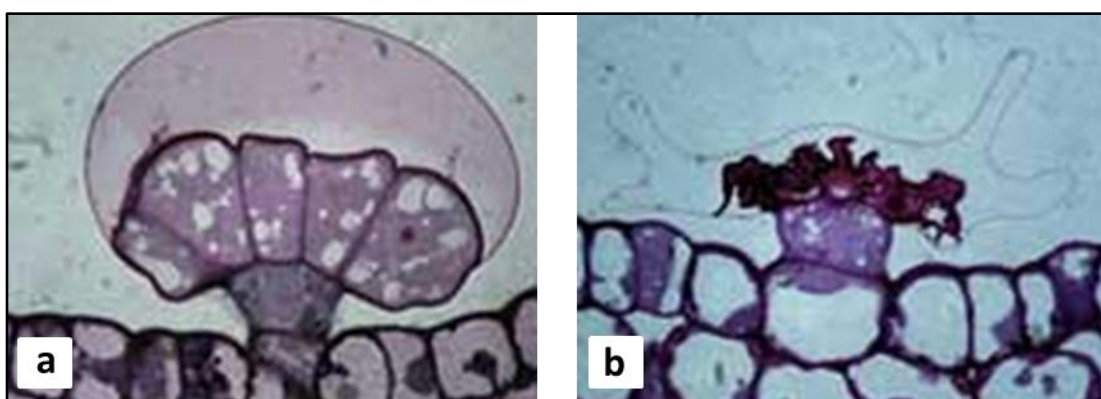


Figure 10 : Photos de microscopie optique de trichome glandulaire de lavande fine avant (a) et après distillation (b).

Le diamètre de la glande est de 80 μm . Photos de Monique Colson et André Perrin, LBVpam, Université de Saint Etienne

La composition de l'huile essentielle dépend de l'espèce et de la phénologie de la fleur (Guitton et al. 2010a; Guitton et al. 2010b). Elle est composée de monoterpènes pour environ 70 % et de sesquiterpènes pour environ 30 % (Lis-Balchin 2002). L'huile essentielle de lavande fine contient principalement deux monoterpènes, le linalol et l'acétate de linalyle (An et al. 2001; Shellie et al. 2002; Hassiotis et al. 2014). Chez la lavande aspic, les composés majoritaires sont le linalol, le 1,8-cinéole et le camphre (Muñoz-Bertomeu et al. 2007a; Herraiz-Peñalver et al. 2013). Le lavandin possède une composition terpénique où l'on retrouve des composés des deux parents, acétate de linalyle, 1,8-cinéole et camphre (**Tableau 1**) (Baydar and Kineci 2009; Varona et al. 2010; Maietti et al. 2013). Les valeurs du **Tableau 1** sont données à titre indicatif car les huiles essentielles peuvent différer en fonction des variétés, de la méthode d'extraction ou encore du moment de l'extraction. Les feuilles produisent aussi de l'huile essentielle mais en quantité environ 10 fois inférieure à celle des inflorescences (Guitton 2010; Jullien et al. 2014). Les principaux composés sont le 1,8-cinéole, le camphre et le bornéol (**Tableau 1**) (Muñoz-Bertomeu et al. 2007a; Guitton 2010). Même si les compositions foliaires sont variables, le lavandin possède là encore une composition intermédiaire entre ces deux parents avec entre 8 et 22 % de bornéol alors que la lavande fine en possède entre 15 et 53 % et la lavande aspic entre 1 et 3 %.

	<i>Lavande fine</i>	<i>Lavande aspic</i>	<i>Lavandin</i>
<i>Inflorescences</i>			
Linalol (C10)	20-46 %	30-50 %	20-30 %
Acétate de linalyle (C10)	25-55 %	<1 %	25-35 %
Bornéol (C10)	0-3 %	1-3 %	1-3 %
Camphre (C10)	<0,5 %	10-20 %	5-10 %
1,8-cinéole (C10)	2-4 %	30-40 %	10 %
β-Caryophyllène (C15)	3-8 %	<0,5 %	2-6 %
Limonène (C10)	<0,5 %	1-3 %	1-2 %
Lavandulol et acétate (C10)	0,1-10 %	0,2-1,5 %	0,5-0,8 %
α- et β-pinène(C10)	<0,5 %	1-4 %	0,5-1 %
<i>Feuilles</i>			
1,8-cinéole (C10)	43-63 %	45-54 %	39-77 %
Camphre (C10)	Non détecté	30-44 %	35-76 %
Bornéol (C10)	15-53 %	1-3 %	8-22 %

Tableau 1 : Composés majoritaires de l'huile essentielle d'inflorescence et de feuille chez la lavande fine, la lavande aspic et le lavandin

Les valeurs en gras représentent les composés majoritaires de la lavande fine (bleu), la lavande aspic (vert) et le lavandin (orange). C10 : monoterpènes et C15 : sesquiterpènes. Synthèse de différentes études (An et al. 2001; Muñoz-Bertomeu et al. 2007a; Baydar and Kineci 2009; Guitton 2010; Varona et al. 2010; Maietti et al. 2013; Herraiz-Peñalver et al. 2013; Hassiotis et al. 2014).

II.2.2 Voies de biosynthèse des mono- et sesquiterpènes chez les lavandes

II.2.2.1 *Présentation de la voie de biosynthèse des mono- et sesquiterpènes chez les lavandes*

Comme évoqué précédemment, la biosynthèse des terpènes volatils se fait en trois étapes : formation des précurseurs IPP et DMAPP, formation des prényl diphosphates et formation des terpènes finaux. Ces trois étapes impliquent différentes classes d'enzymes dont les prényl transférases et les terpène synthases (**Figure 1**). Les recherches sur les gènes et les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des terpènes volatils chez les lavandes ont permis d'en mettre en évidence 25 (**Figure 11 et Tableau 2**); sept dans la formation de l'IPP et du DMAPP chez la lavande fine ; trois prényl transférases dont une chez la lavande fine et deux chez le lavandin ; douze terpène synthases dont huit chez la lavande fine, deux chez la lavande aspic et deux chez le lavandin et enfin une alcool déshydrogénase et deux monoterpène alcool acétyl transférases chez le lavandin (Landmann et al. 2007; Demissie et al. 2011; Demissie et al. 2012; Sarker et al. 2012; Sarker et al. 2013; Jullien et al. 2014) (**Figure 11 et Tableau 2**). En grande majorité, ces gènes ont été identifiés grâce à l'utilisation de banques de gènes transcrits (ou banque d'EST pour Expressed Sequence Tag). Ainsi, des banques d'EST ont été constituées

chez la lavande fine (Lane et al. 2010; Jullien et al. 2014) et le lavandin (Demissie et al. 2012). Elles ont été réalisées à partir de la plante entière (Jullien et al. 2014), de fleurs ou de feuilles (Lane et al. 2010), soit spécifiquement à partir de trichomes glandulaires isolés de fleur (Demissie et al. 2012).

Même si l'on connaît les enzymes responsables de certains composés majoritaires chez les lavandes comme le linalol et le 1,8-cinéole (Landmann et al. 2007; Demissie et al. 2012), beaucoup restent inconnues. Par exemple, l'enzyme responsable de l'acétylation du linalol en acétate de linalyle n'est pas encore caractérisée à ce jour. Cette enzyme appartient très probablement à la famille des alcool acétyl transférases (AAT) (Figure 11). Certaines sont connues par exemple chez la rose (Shalit et al. 2003) et chez *Clarkia breweri* (Dudareva et al. 1998) où elles acétylent le géraniol et le benzylalcool pour donner l'acétate de géranyle et l'acétate de benzyle respectivement. De plus, des extraits cellulaires d'origan, de menthe et de sauge se sont montrés capables de transformer le linalol en acétate de linalyle, soutenant l'hypothèse de la présence d'une AAT dans ces espèces proches des lavandes (Larkov et al. 2008). Récemment deux AAT ont été mises en évidence chez le lavandin, AAT-3 et AAT-4 (Sarker and Mahmoud 2015) (Figure 11 et Tableau 2). Elles fonctionnent à partir de lavandulol et de géraniol pour donner de l'acétate de lavandulyle et de l'acétate de géranyle. Elles présentent toutefois une plus grande affinité pour le lavandulol. Les auteurs en concluent que ces deux enzymes sont responsables de la production d'acétate de lavandulyle *in vivo*. La voie du lavandulol est un exemple de voie de biosynthèse de terpènes irréguliers c'est-à-dire provenant de la fusion de deux DMAPP, et non pas d'un IPP et d'un DMAPP, catalysée par la lavandulyl diphosphate synthase, une prényl transférase (Demissie et al. 2013). Cette enzyme produit du lavandulyl diphosphate qui est ensuite déphosphorylé par une ou plusieurs enzymes inconnues pour donner du lavandulol ; le lavandulol est ensuite transformé en acétate de lavandulyle par AAT-3 et AAT-4 (Figure 11). Une voie très intéressante chez les lavandes est celle du camphre. Le camphre est éliminé chimiquement de l'huile essentielle de lavandin par les industriels pour en améliorer la qualité olfactive. La voie du camphre débute par le bornyl diphosphate mais n'est que partiellement connue chez les lavandes (Figure 11). Ainsi, on connaît uniquement l'enzyme responsable du passage du bornéol au camphre, la bornéol déshydrogénase (Sarker et al. 2012). Chez la sauge, une bornyl diphosphate synthase (BDPS) a été identifiée comme convertissant le GPP en bornyl diphosphate (Wise et al. 1998; Whittington et al. 2002). On peut donc supposer l'existence d'une telle enzyme chez les lavandes (Figure 11). Des transcrits de la banque d'EST de lavande fine ont révélés des homologies de séquences avec la bornyl diphosphate de sauge (Lane et al. 2010). Comme dans le cas du lavandulyl diphosphate, on ne connaît pas la ou les enzymes responsables de la déphosphorylation du bornyl diphosphate pour conduire à la formation du bornéol.

II.2.2.2 Régulation de la voie de biosynthèse des mono- et sesquiterpènes chez les lavandes

Dans la majeure partie des études portant sur la caractérisation des enzymes impliquées dans la production des mono- et sesquiterpènes, il a été trouvé une adéquation entre le taux de transcrits et la quantité de produits associés (Guitton et al. 2010a; Demissie et al. 2011; Demissie et al. 2012; Sarker et al. 2012; Sarker et al. 2013; Jullien et al. 2014). D'autres études sur la surexpression de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des mono- et sesquiterpènes ont aussi montré une adéquation entre le taux de transcription des transgènes et la quantité de produits formés. Ainsi les lignées de lavande aspic

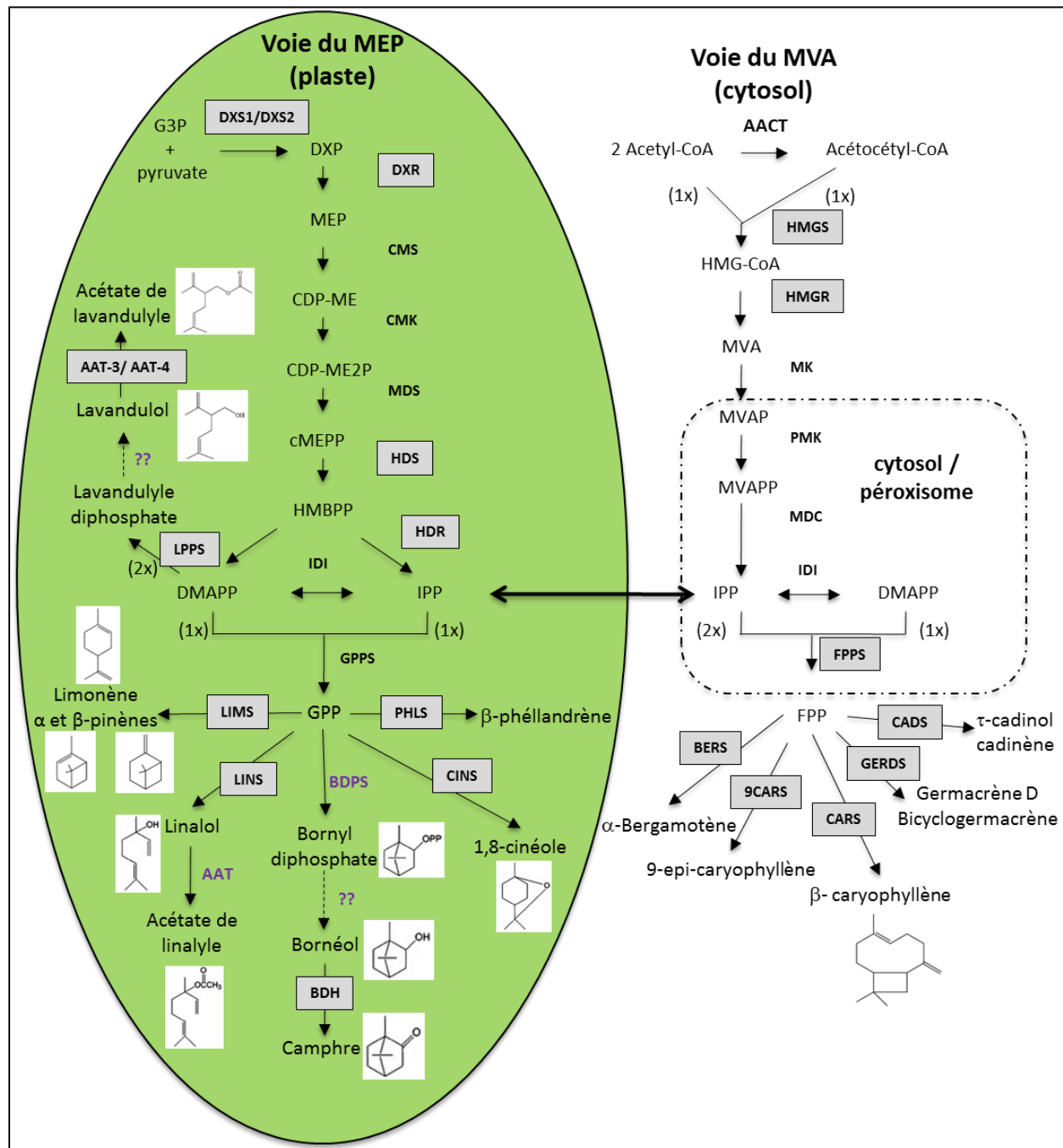
surexprimant le gène de la linalol synthase de *Clarkia breweri* ont montré une augmentation de linalol entre 2 et 20 fois, liée à la présence d'une plus grande quantité de transcrits de ce gène (Mendoza-Poudereux et al. 2014b). Il en a été de même dans les lignées transgéniques de lavande aspic transformées avec le gène de la limonène synthase de *Mentha spicata* (Muñoz-Bertomeu et al. 2008). Tous ces résultats montrent la corrélation entre niveau d'expression du gène et niveau de terpènes formés. Ils laissent penser que la régulation de la production des mono- et des sesquiterpènes passe principalement par une régulation transcriptionnelle même s'il n'est pas exclu que d'autres mécanismes de régulation entrent en jeu comme des modifications post-traductionnelles ou la disponibilité en substrat (Dudareva et al. 2004; Dudareva and Negre 2005).

Un autre élément important pour la régulation de la synthèse des terpènes est la disponibilité des précurseurs que sont l'IPP et le DMAPP par les voies plastidiale et cytosolique (**Figure 1** et **Figure 11**). L'étude de ces deux voies a permis d'identifier les enzymes clés. Ainsi, pour la voie cytosolique du mévalonate, il a été montré que l'HMGR (Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase) était l'enzyme limitante impliquant des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Rodríguez-Concepción 2006). Chez la lavande aspic, la surexpression du domaine catalytique de l'HMGR d'*Arabidopsis thaliana* a entraîné une augmentation de la quantité des constituants de l'huile essentielle par 2,1 dans les fleurs et 1,9 dans les feuilles (Muñoz-Bertomeu et al. 2007b). Concernant la voie plastidiale, plusieurs enzymes ont été pointées pour leur rôle régulateur : la DXS (Désoxyxylulose synthase), la DXR (désoxyxylulose phosphate réductoisomérase) et la HDR (hydroxyméthyl butényl diphosphate réductase). Le rôle exact de chacune dans la régulation de la voie n'est pas totalement élucidé car il existe des résultats contradictoires suivant les espèces (Rodríguez-Concepción 2006). Ainsi, la transformation de la lavande aspic avec le gène de DXR d'*Arabidopsis thaliana* a augmenté la présence de l'enzyme mais n'a pas accru la production de monoterpènes, de chlorophylles ou de caroténoïdes (Mendoza-Poudereux et al. 2014a). Pourtant le même type d'expérimentation a été menée chez la menthe poivrée et a induit l'augmentation de l'huile essentielle de 50 % (Mahmoud and Croteau 2001). Concernant la DXS, la transformation de plantes de lavande aspic avec un gène de DXS d'*Arabidopsis thaliana* a engendré une augmentation d'huile essentielle entre 100 et 350 % selon les lignées (Munoz-Bertomeu et al. 2006). Des résultats similaires ont été obtenus chez des tabacs transformés avec le gène DXS de la vigne avec une augmentation des quantités de monoterpènes entre 50 et 1000 % suivant les lignées et les composés (Battilana et al. 2011). Les études menées sur la lavande aspic laissent penser que, chez la lavande, la DXS serait l'enzyme responsable du contrôle du flux métabolique des terpènes.

		<i>Lavande fine</i>	<i>Lavande aspic</i>	<i>Lavandin</i>
FORMATION DES PRECURSEURS (IPP ET DMAPP)				
Voie cytosolique	HMGS : Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase	JX630154.1 LBVpam (non publié)		
	HMGR : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase	Non référencé LBVpam (non publié)		
Voie plastidiale	DXS1/DXS2 : Désoxyxylulose synthase	JX630149.1/ JX630150.1 LBVpam (non publié)		
	DXR : désoxyxylulose phosphate réductoisomérase	Non référencé LBVpam (non publié)		
	HDS : hydroxyméthylbut-2-ényl diphosphate synthase	JX630152.1 LBVpam (non publié)		
	HDR : hydroxyméthyl-2-butényl 4-diphosphate reductase	Non référencé LBVpam (non publié)		
PRENYL TRANSFERASES				
Condensation régulière	GPSS : Petite sous unité de géranyl diphosphate synthase			JX985359.1 (Demissie et al. 2013)
	FPPS : Farnésyl diphosphate synthase	JX630156.1 LBVpam (non publié)		
Condensation irrégulière	LPSS : Lavandulyl diphosphate synthase			JX985358.1 (Demissie et al. 2013)
TERPENE SYNTHASES				
Monoterpènes synthases	CINS : Cinéole synthase	JN701461.1 (Demissie et al. 2012)	JN701460.1 (Demissie et al. 2012)	JN701459.1 (Demissie et al. 2012)
	LINS : Linalol synthase	DQ263741.1 (Landmann et al. 2007)	DQ421801.1 (non publié)	
	LIMS : Limonène synthase	DQ263740.1 (Landmann et al. 2007)		
	PHILLS : β -phellandrène synthase	HQ404305.1 (Demissie et al. 2011)		
Sesquiterpènes synthases	BERS : Trans- α -bergamotène synthase	DQ263742.1 (Landmann et al. 2007)		
	CADS : Cadinol synthase	JX401282.1 (Jullien et al. 2014)		
	CARS : β -caryophyllène synthase	JX401283.1 (Jullien et al. 2014)		
	GERDS : Germacrène D synthase	JX401284.1 (Jullien et al. 2014)		
	9 CARS : 9-epi-caryophyllène synthase			KF470962.1 (Sarker et al. 2013)
AUTRES				
Alcool déshydrogénase	BDH : Bornéol déshydrogénase			Non référencé (Sarker et al. 2012)
Alcool acétyl transférase	AAT-3 et AAT-4 : alcool acétyl transférases 3 et 4			KM275343 KM275344 (NCBI) (Sarker and Mahmoud 2015)

Tableau 2: Récapitulatif des différents gènes identifiés chez la lavande fine, la lavande aspic et le lavandin, et impliqués dans la synthèse des terpènes volatils

Les numéros d'accèsion sont ceux de GenBank.



32

Figure 11 : Voies de biosynthèse des mono- et sesquiterpènes chez les lavandes

Modifiée d'après (Jullien et al. 2014). Les gènes des enzymes connues en 2015 chez les lavandes sont représentés dans des carrés grisés. Les enzymes écrites en violet sont des enzymes connues chez d'autres plantes. Les formules chimiques des composés majoritaires produits dans les fleurs et dans les feuilles sont représentées. **AACT** : acétoacétyl-coenzyme A thiolase; **AAT** : alcool acétyl transférase ; **AAT-3** et **AAT-4** : alcool acétyl transférase 3 et 4. **BDH** : bornéol déshydrogénase ; **BDPS** :

diphosphate synthase ; **BERS** : α -bergamotène synthase; **CADS** : cadinol synthase; **CARS** : β -caryophyllène synthase; **9CARS** : 9-épi-caryophyllène synthase ; **CDP-ME** : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol; **CDP-ME2P** : CDP-ME-2-phosphate; **cMEPP** : 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate; **CINS** : cinéole synthase; **CMK** : 4-(cytidine 5' -diphospho) 2-C-méthyl-D-érythritol kinase; **CMS** : 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate transférase; **DMAPP** : diméthylallyl diphosphate; **DXP** : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate; **DXR** : DXP réductoisomérase; **DXS** : DXP synthase; **FPP** : farnésyl diphosphate; **FPPS** : FPP synthase; **GERDS** : germacrène D synthase; **G3P** : glycéraldéhyde 3-phosphate; **GPP** : géranyl diphosphate; **GPPS** : GPP synthase; **HDS**, 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butényl 4-diphosphate synthase; **HDR** : 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butényl 4-diphosphate réductase; **HMBPP** : 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butényl 4-diphosphate; **HMGCoA** : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA; **HMGR** : hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase; **HMGS** : hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase; **IDI** : isopentényl diphosphate isomérase; **IPP** : isopentényl diphosphate; **LIMS** : limonène synthase; **LINS** : linalol synthase; **LPPS** : lavandulyl diphosphate synthase ; **MDC** : mévalonate pyrophosphate décarboxylase; **MDS** : 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; **MEP** : 2-C-méthyl-D-érythritol 4 phosphate; **MK** : mévalonate kinase; **MVA** : mévalonate; **MVAP** : MVA-5-phosphate; **MVAPP** : MVA-5-diphosphate; **PHLS** : β -phellandrène synthase; **PMK** : 5-phosphomévalonate kinase.

II.2.3 Culture des lavandes et utilisation par l'homme

II.2.3.1 *Historique de la culture des lavandes*

Les lavandes sont utilisées depuis l'antiquité pour leurs propriétés antiseptiques et calmantes ainsi que pour leurs parfums (Cavanagh and Wilkinson 2002). Le nom lavande viendrait d'ailleurs du terme latin « lavare » qui signifie laver, associant la plante à la notion de propreté. Malgré des synonymies et quelques confusions botaniques, des écrits reportent l'utilisation ancienne de la lavande fine ou lavande vraie ou lavande officinale (*L. angustifolia* anciennement *L. vera* ou *L. officinalis*), de la lavande aspic (*L. latifolia* anciennement *L. spica*) et du lavandin (*L. x intermedia*). En effet, les grecs et les romains l'utilisaient pour parfumer et assainir les bains (Upson et al. 2004). On lui prêtait aussi des vertus contre la bronchite et les problèmes intestinaux (Lis-Balchin 2002). Au Moyen-Age, la lavande rentre dans la composition du vinaigre des quatre voleurs. Selon la légende, ce vinaigre aurait permis à des brigands de détrousser les personnes mortes de l'épidémie de peste qui a sévi au 17^{ème} siècle dans le sud de la France sans être contaminés (Faculté de médecine de Paris 1837) (**Figure 12a**).

A partir du milieu du 19^{ème} siècle et jusqu'au début du 20^{ème} siècle, l'économie de la cueillette se développe en Provence. La lavande fine est alors récoltée dans son milieu naturel dans les baïassières, sorte de lavanderaies naturelles et distillée sur place grâce aux alambics ambulants (Duru and Naviner 1998) (**Figure 12b**). Au début, la cueillette était effectuée par des paysans et des bergers qui voyaient là un revenu d'appoint. Puis cette pratique s'organise et c'est surtout les femmes et les enfants qui sont dévolus à cette tâche (Moulin 2003) (**Figure 12c**). Un bon coupeur peut récolter jusqu'à 100 kg par jour. Progressivement, les baïassières vont être entretenues et étendues par labourage, désherbage et/ou apport de fumure. Ces pratiques sont encouragées car elles permettent l'utilisation de terres impropres aux autres cultures de par la pauvreté ou l'aridité des sols. Cette cueillette permet aussi d'éviter l'exode rural en stimulant l'activité économique (Chaisse et al. 2014a).

C'est en Provence que la lavande connaît son âge d'or avec le développement de l'industrie du parfum à Grasse. A la fin des années 1890, des distilleries s'implantent un peu partout. Ce n'est que vers 1920, sous la pression de la demande en huile essentielle de lavande pour la parfumerie, du fait de l'épuisement des baïassières surexploitées et de l'apparition d'une réglementation de la cueillette (**Figure 12d**), que les premières cultures vont être mises en place. La culture de la lavande va même

s'étendre jusqu'aux versants sud-ouest du Massif central (Lot et Tarn-et-Garonne). Initialement cantonnée aux mauvaises terres, la culture de la lavande se généralise et prend place à côté des cultures vivrières, allant même jusqu'à les remplacer ("bonne baïassière vaut mieux que champ de blé"). C'est le cas du plateau de Valensol (Alpes-de-Haute-Provence) où la culture de l'amandier a été supplantée par celle du lavandin (Ricorday et al. 2008). Le lavandin, hybride vigoureux mais stérile, découvert en 1930, est aussi l'objet d'une culture organisée systématiquement. Vers 1960, la production de lavande s'industrialise avec l'apparition des premiers lessiviers comme Soupline et Monsieur Propre (Monge 2012). Le record de production d'huile essentielle de lavande fine est atteint avec 150 tonnes.



Figure 12 : Photos d'archives liées à l'utilisation et la récolte des lavandes

(a) Recette du vinaigre des quatre voleurs parue dans le codex de 1837 (Faculté de médecine de Paris 1837). (b) Carte postale représentant un distillateur mobile. Extraite de (Duru and Naviner 1998). (c) Carte postale représentant deux ramasseurs de lavande (<http://www.au-fil-du-groseau.fr>). (d) Affiche d'un arrêté préfectoral des Hautes-Alpes du 5 mai 1927 portant sur la récolte de la lavande (Duru and Naviner 1998).

Aujourd'hui l'aire de production des lavandes et lavandins se situe principalement dans la Drôme, le Vaucluse et les Alpes-de-Haute-Provence (**Figure 13**). Au total ce sont près de 20 000 hectares de cultures en France. La culture de la lavande aspic est cantonnée à l'Espagne et à une dizaine de tonnes d'huile essentielle par an (Upson et al. 2004) alors qu'il en est produit entre 40 et 80 tonnes par an pour la lavande fine et environ 1000 tonnes pour le lavandin (Chailan 2010).

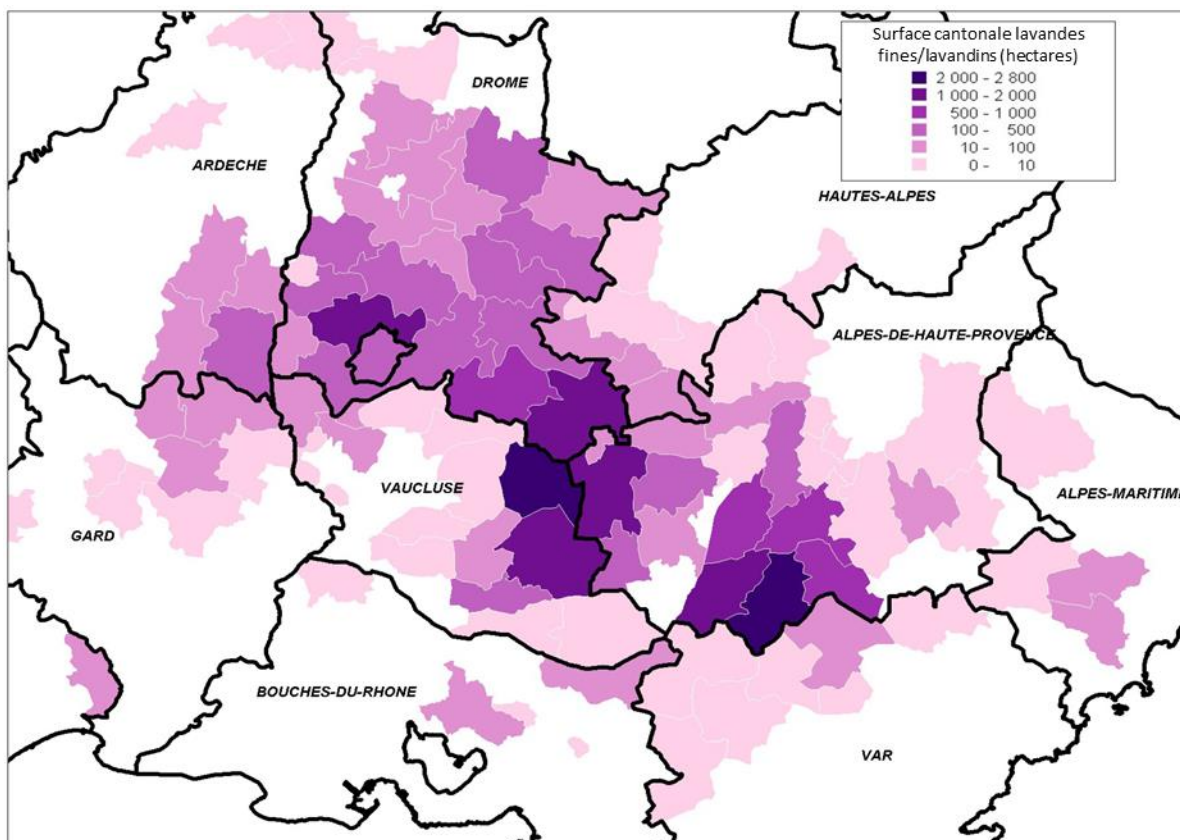


Figure 13 : Répartition des zones de production de lavande fine et de lavandin en France

Données de 2010 (Chailan 2010)

II.2.3.2 La sélection variétale

Au début du 20^{ème} siècle, les premières plantes cultivées sont sélectionnées dans le milieu naturel sur différents critères tels que la robustesse des plantes ou la densité et la taille des inflorescences. Propagés par semis et composés de nombreux génotypes, ces champs sont nommés *lavandes de population*. L'huile essentielle extraite de ces lavandes de populations est une huile de grande qualité, recherchée en parfumerie. Dans les années 50, pour augmenter les rendements et homogénéiser la qualité des huiles essentielles, les techniques de bouturage vont se développer et créer des variétés clonales de lavandes fines ou de lavandins. Les variétés de lavandes clonales les plus répandues sont 'Maillette' et 'Matheronne', créées dans les années 50. Pour le lavandin, stérile, le bouturage est le seul mode de propagation possible. Le lavandin clonal le plus répandu est le lavandin 'Grosso' apparu dans les années 2000 (Chailan 2010). Malgré une huile essentielle de moins bonne qualité due à sa plus forte teneur en camphre (**Tableau 1**), le lavandin est le plus cultivé en France avec 16 200 hectares contre 3

800 en lavande fine en 2013 (Chaisse et al. 2014b). Le lavandin présente un rendement en huile essentielle bien meilleur que la lavande fine (de 60 à 150 kg/hectare contre environ 20 kg/hectare). Son huile essentielle est plutôt utilisée pour les détergents, les savons et les eaux de toilette. L'huile essentielle de lavande fine est réservée à l'aromathérapie, à la parfumerie et aux soins cosmétiques. Pour valoriser au mieux l'huile essentielle de lavande fine, un label « Appellation d'Origine Contrôlée Huile Essentielle de Lavande de Haute-Provence » est créé dans les années 1980 (décret du 14/12/1981). Selon la norme AFNOR (ISO 3515 2002), l'huile essentielle de lavande fine doit être composée d'acétate de linalyle entre 30 et 46 % et de linalol pour 25 à 38 %. L'acétate de lavandulyle doit être au-dessus de 2 % ; par contre le camphre et le bornéol ne doivent pas excéder 0,5 % chacun.

Entre les années 1950 et 1990, la sélection variétale s'est principalement axée sur le rendement et la qualité de l'huile essentielle. Elle est empirique et consiste à sélectionner en champ les individus présentant les meilleurs rendements. Mais ces dernières années, la profession a fait face à une expansion de la maladie du dépérissement des lavandes, ce qui a orienté les recherches vers des variétés plus tolérantes à cette maladie comme le clone de lavande fine 'Diva', la lavande de population 'Rapido' ou bien le lavandin 'Grosso'. Je détaillerai les causes et les conséquences de cette maladie dans le sous-chapitre II.3 intitulé « *Les facteurs qui menacent les lavandes* ». A ce jour, il existe de nombreuses variétés de lavande fine et de lavandin même si seules quelques variétés sont utilisées pour la production d'huile essentielle. En 2004, Upson dénombrait pas moins de 156 variétés pour la lavande fine, 67 pour le lavandin et une seule pour la lavande aspic (Upson et al. 2004). On peut citer des variétés ornementales comme la lavande fine « Blue Mountain White » dont les fleurs sont blanches (Upson et al. 2004) ou encore la « lavande bleue » utilisée exclusivement pour les bouquets séchés.

II.2.3.3 Production d'huile essentielle et importance socio-économique

Les pays producteurs d'huile essentielle de lavande fine sont la France avec 47 tonnes, la Bulgarie avec 85 tonnes et la Chine avec 40 tonnes en 2012 (Les synthèses de FranceAgriMer 2013). Les productions d'huile essentielle de lavande fine entre 2005 et 2012 sont représentées dans le **Tableau 3**. On peut voir que la production française d'huile essentielle de lavande fine est en déclin, et ceci à cause de la maladie du dépérissement et des événements climatiques extrêmes (gel/sécheresse) alors que la Bulgarie augmente sa production et parvient même sur certaines parcelles à avoir le même rendement que le lavandin (Les synthèses de FranceAgriMer 2013). La Chine présente aussi une production d'huile essentielle de lavande fine non négligeable avec entre 10 et 40 tonnes annuelles mais seulement 10 tonnes sont exportées sur le marché mondial du fait d'une consommation nationale importante (Les synthèses de FranceAgriMer 2013). Même si, en France, la production d'huile essentielle est concentrée dans la Drôme, le Vaucluse et les Alpes-de-Haute-Provence, on en trouve aussi dans le Tarn et le Lot. Cette production, principalement grâce à la cueillette en milieu naturel est connue pour être de très grande qualité chimique avec de fortes teneurs en acétate de linalyle et de lavandulyle (Nathalie Moulin ; comm. personnelle). Concernant le lavandin, la France est le premier producteur mondial avec environ 1000 tonnes, suivi par l'Espagne avec environ 80 tonnes (Les synthèses de FranceAgriMer 2013). La lavande aspic est uniquement cultivée en Espagne avec moins de 10 tonnes chaque année.

PRODUCTION MONDIALE DE LAVANDE FINE (tonnes)							
ANNEES	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2012
France	80	60	50	40	38	33	47
Bulgarie	60	50	35	30	26	22	85
Chine	40	40	15	5	9	6	40
Ukraine	40	20	15	15	7	12	15
Moldavie	5	5	5	5	2.5	3	10
TOTAL	225	175	120	95	82.5	76	197

Tableau 3 : Production mondiale d'huile essentielle de lavande fine de 2005 à 2012

Données de (Gomme et al. 2010a; Les synthèses de FranceAgriMer 2013)

Pour faire face à la concurrence internationale, à la maladie du dépérissement et à l'image un peu vieillissante des lavandes, les professionnels des plantes aromatiques et médicinales se sont structurés en France dans les années 1970-1980 autour d'instituts techniques. Le CRIEPPAM (Centre Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales) et l'Itepmi (Institut technique interprofessionnel des plantes à parfum médicinales et aromatiques) sont chargés de la sélection variétale et de l'amélioration des techniques agricoles. Le CIHEF (Comité Interprofessionnel des Huiles Essentielles Françaises) est une association interprofessionnelle créée en 1997 entre les organisations professionnelles nationales les plus représentatives de la filière des huiles essentielles françaises. Le CNPMAI (Conservatoire National des Plantes à parfum, Médicinales, Aromatiques et Industrielles) constitue des collections de la diversité des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM), assure la prospection et la conservation des espèces et valorise la diversité sauvage. L'association « Les routes de la lavande » est chargée du volet touristique et patrimonial (Monge 2012). Cette association a favorisé l'attractivité touristique autour de la lavande avec la mise en place d'itinéraires routiers en France dans les régions productrices de lavandes (Figure 14). Ils permettent de valoriser le « patrimoine lavande » incluant musées, visites de distillerie, paysages de cartes postales et produits régionaux. L'image renouvelée de la lavande en fait un produit d'appel et un atout majeur pour la Provence (Monge 2012).

La présence de la culture de la lavande fine et du lavandin en Provence est donc d'une grande importance socio-économique puisqu'elle permet le maintien sur le territoire d'environ 2 000 exploitations et près de 10 000 emplois dans des endroits parfois à faible potentiel. Maintenir la culture de la lavande est donc important pour éviter la désertification de certaines zones (montagnes de moyennes altitudes) et valoriser des territoires difficiles (Ricorday et al. 2008). « L'or bleu de Provence » rapporte chaque année environ 31,7 millions d'euros dont 1,7 millions lié au tourisme. On peut aussi ajouter la production d'environ 100 tonnes de miel de lavande (Association pour le développement de l'apiculture provençale 2012). Tout cela participe à la dynamique économique de ces régions et on estime que les emplois liés à la lavande sont au nombre de 30 000. Déjà bien ancrée dans la tradition et le paysage de Provence, la lavande est indissociable de la Provence et en est même son emblème. Elle est synonyme d'authenticité et de bien-être. Malheureusement, à l'heure actuelle, elle est menacée par divers facteurs que nous allons détailler dans le chapitre suivant.



Figure 14 : Les six itinéraires touristiques proposés par "Les routes de la lavande"

D'après (<http://www.moveyouralps.com/fr/routes-de-la-lavande/itineraire-lavande>)

II.3 Les facteurs qui menacent les lavandes

II.3.1 La maladie du dépérissement dans les cultures

Un des fléaux majeurs qui touche la lavande à l'heure actuelle est la maladie du dépérissement. Ses symptômes sont un flétrissement et un jaunissement de tout ou partie de la plante. En fonction des conditions environnementales, deux issues sont possibles, la mort et plus rarement une régénération de la plante. Les professionnels de la lavande ont pris conscience du problème à partir des années 1970 avec une première vague particulièrement destructrice. Il faut noter que des écrits remontant à 1917 relataient déjà cette maladie chez la lavande (Chaisse et al. 2013). La maladie du dépérissement de la lavande est provoquée par une bactérie sans paroi : le phytoplasme du Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*) (Cousin et al. 1970; Quaglino et al. 2013). Celui-ci prolifère dans les canaux du phloème de la lavande et bloque la circulation de la sève élaborée, favorisant un assèchement par l'intérieur de la plante (Figure 15). Il peut affecter d'autres plantes d'intérêt économique comme la vigne, le tabac, la

sauge sclarée, le fraisier, la tomate ou encore des adventices comme l'ortie dioïque et le liseron des champs (Garnier 2000; Cimerman et al. 2009). Le phytoplasme est transporté de plante en plante par une seule espèce d'insecte piqueur-suceur : *Hyalesthes obsoletus* (Sforza et al. 1999). Durant l'été, les œufs sont pondus au collet des plantes, les larves se développent durant tout l'automne et l'hiver, en se nourrissant sur les racines. Au début de l'été, les larves émergent sous la forme d'adultes ailés qui se nourrissent de sève sur les parties aériennes des lavandes. Le vecteur acquiert le phytoplasme qui va circuler vers l'hémolymphe et se développer dans les glandes salivaires. Ainsi, des phytoplasmes seront transmis de plante en plante lors des prochaines piqûres de nourrissage (Figure 15).

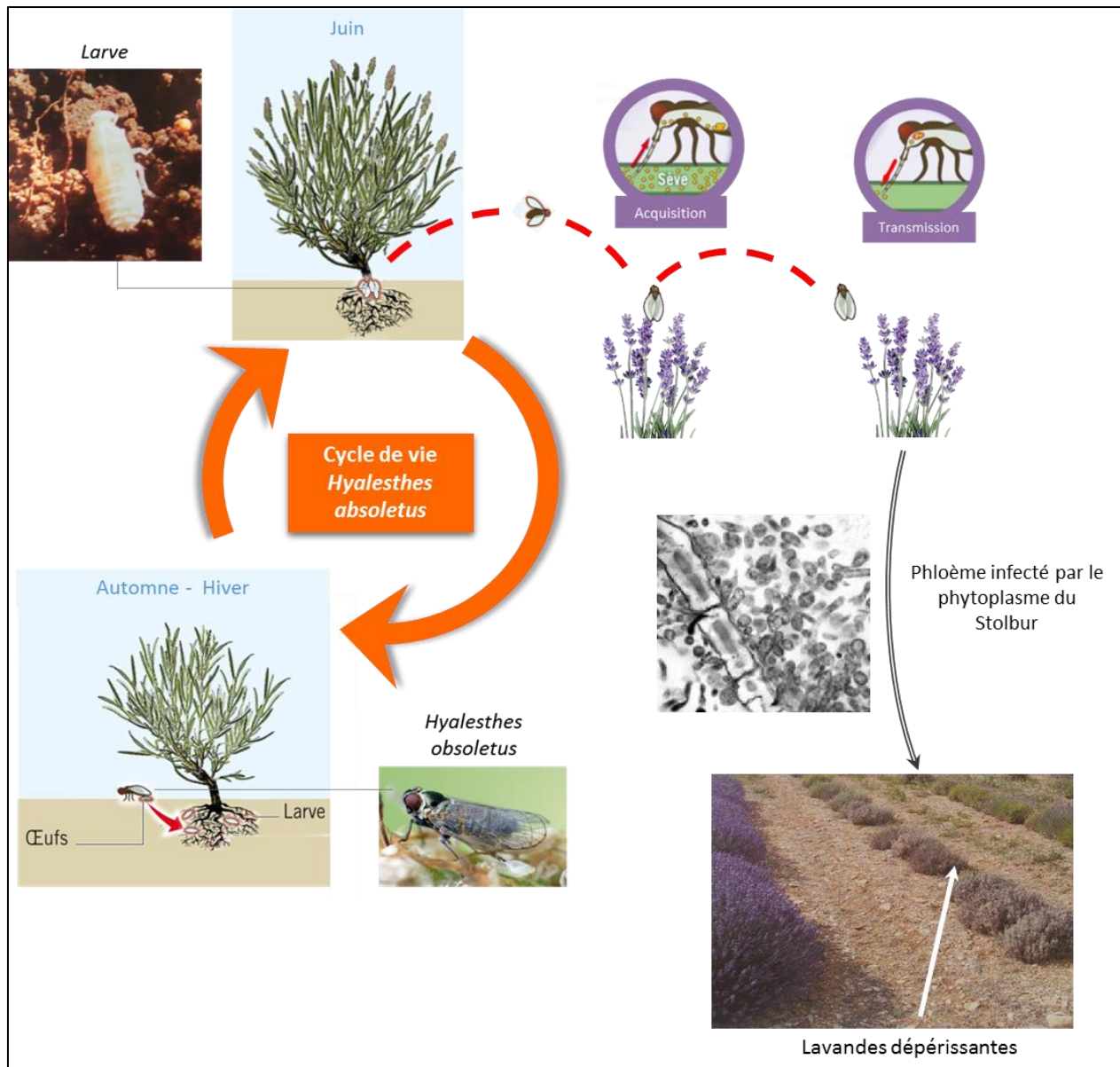


Figure 15 : Cycle de vie de *Hyalesthes obsoletus* et transmission de la maladie du dépérissement sur la lavande
D'après le cycle de l'itepm (2012) ; photo de *Hyalesthes obsoletus* markro.forum.de (2014) ; photo de phloème infecté de lavande de l'itepm (2012) ; photo de lavande dépérissante (Gomme et al. 2010a)

Les conséquences de l'expansion de la maladie pour la filière lavandicole sont nombreuses : perte de production de lavande d'environ 40 % sur les 10 dernières années ; augmentation des prix de l'huile essentielle et diminution de la durée d'exploitation d'une plantation de 15 à 5 ans. Des programmes de recherches financés par le Compte d'affectation spécial pour le développement agricole et rural (CASDAR) ont été mis en place afin de mieux comprendre et de lutter contre cette maladie. Entre 2007 et aujourd'hui trois programmes de recherche ont été financés par le ministère de l'agriculture et FranceAgriMer impliquant plusieurs partenaires et des organismes de recherche publics ; ils sont récapitulés dans le **Tableau 4**. Ces programmes ont permis, entre autre, de mieux comprendre le cycle de vie de *Hyalecthes obsoletus* et du phytoplasme du Stolbur; de mettre en place un moyen d'évaluation de la contamination des plantes par PCR quantitative ; de créer et caractériser des variétés tolérantes à la maladie; d'évaluer des moyens de lutte contre *Hyalecthes obsoletus* (filet anti-insecte, couvert végétal perturbant le vol de l'insecte ou pulvérisation de kaolinite, **Figure 16**) (Chaisse et al. 2010; Fabre et al. 2011a; Fabre et al. 2011b). Les moyens de lutte directs contre *Hyalecthes obsoletus* comme les insecticides sont inenvisageables car le pic de vol de l'insecte correspond au pic de floraison des lavandes et est concomitant avec le butinage des abeilles. Quel que soit le moyen de lutte utilisé, celui-ci ne doit en aucun cas perturber les abeilles qui sont déjà fortement menacées par ailleurs.

La recherche de variétés tolérantes a donné de bons résultats avec la création du lavandin 'Grosso' ou de la lavande clonale 'Diva' qui se sont montrés plus tolérants au dépérissement. Cette meilleure tolérance est associée à présence plus faible de larves dans les racines de ces plantes par rapport aux plantes sensibles (Chaisse et al. 2012a). Cela laisse penser que ces plantes seraient moins attractives pour la cicadelle. On peut envisager une possible médiation chimique entre la lavande et l'insecte comme c'est le cas dans la relation tripartite entre le pommier, le phytoplasme *Candidatus Phytoplasma mali* et le vecteur *Cacopsylla picta* (Mayer et al. 2008). Ainsi, le phytoplasme infecte le pommier et le conduit à augmenter ses émissions de β -caryophyllène. Cette surémission augmente l'attractivité envers l'insecte vecteur et favorise donc la transmission du phytoplasme. Les premiers résultats sur les différences d'émission entre les lavandes fines infectées ou non par le phytoplasme *Candidatus Phytoplasma solani* montrent aussi une augmentation de la quantité de β -caryophyllène chez les lavandes infectées (Genest 2014; Daussy 2015). Des tests de choix en olfactomètre sont actuellement en cours pour vérifier l'attractivité liée à la surémission de β -caryophyllène chez la lavande.

Cependant, il est important de noter que cette notion de tolérance au dépérissement est labile. De manière empirique, on constate que les espèces tolérantes un jour ne le restent pas et sont, année après année, de plus en plus touchées par la maladie. Il est bien entendu que les facteurs environnementaux tels que la qualité du sol, la température, les précipitations ainsi que les autres cultures environnantes peuvent influencer l'occurrence de la maladie et son impact. Par exemple, de fortes pluies durant la période de vol de *Hyalecthes obsoletus* peuvent réduire les effectifs et ainsi limiter la contamination. A contrario, les fortes périodes de sécheresse des années 2003 et 2006 ont aggravé les symptômes de la maladie. La prise en compte de l'environnement au sens large dans la lutte contre cette maladie est donc primordiale.

Nom de programme	Période	Partenaires	Référence
Amélioration des stratégies de lutte contre le dépérissement de la lavande et du lavandin	2008-2010	CIHEF, CRIEPPAM, Itepmi, LBVpam, INRA	CASDAR AP07 n° 7040
Dépérissement de la lavande et du lavandin : mise en œuvre d'un programme de recherches appliquées afin d'apporter des solutions de lutte aux producteurs	2012-2014	Itepmi, ITSAP, LBVpam, IMBE, CRIEPPAM, FREDON PACA	CASDAR IP n°1104
ECHoStol : Étude des facteurs sensoriels intervenant dans le Choix de plantes et dans le comportement alimentaire des adultes de <i>Hyalosthes obsoletus</i> afin d'améliorer la lutte contre les phytoplasmoses à Stolbur dans les cultures de lavande/lavandin, vigne et tabac	2013-2015	Itepmi, INRA, IFV, ANITTA, LBVpam	CASDAR RFI n° 1204

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des trois programmes de recherche sur la maladie du dépérissement financés par le ministère de l'agriculture

CIHEF : Comité Interprofessionnel des Huiles Essentielles Françaises. **CRIEPPAM** : Centre interprofessionnel d'expérimentation en plantes à parfum aromatiques et médicinales. **Itepmi** : Institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, médicinales et aromatiques. **INRA** : Institut National de Recherches Agronomiques. **ITSAP** : Institut scientifique et technique de l'apiculture et de la pollinisation. **IMBE** : Institut méditerranéen de biodiversité et d'écologie. **FREDON Paca** : Fédération régionale de défense contre les organismes nuisibles de la région Provence Alpes Côte d'Azur. **IFV** : Institut Français de la Vigne et du Vin. **ANITTA** : Association Nationale Interprofessionnelle et Technique du Tabac

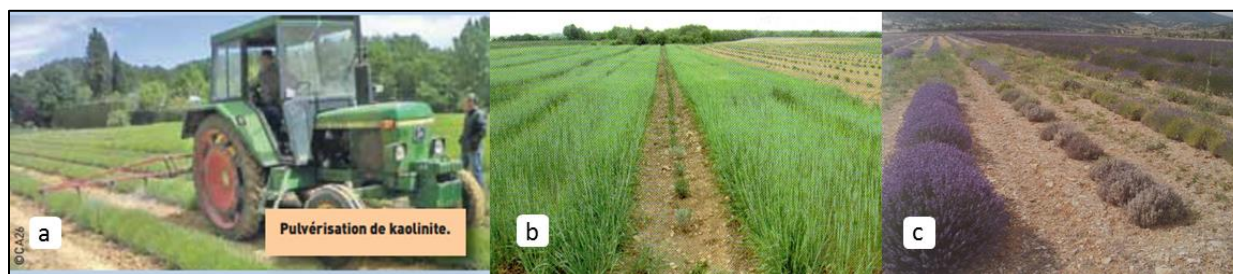


Figure 16 : Photos des différents essais réalisés pour lutter contre la maladie du dépérissement

(a) Pulvérisation de kaolinite sur un champ de lavande. La kaolinite réduit la prévalence de la maladie même si l'on ne connaît pas son mécanisme d'action. Elle constitue probablement une barrière physique aux piqûres de *Hyalosthes obsoletus* **(b)** Test d'enherbement inter-rang dans un champ de lavande (Krausz et al. 2011). L'enherbement est une barrière physique au vol de *Hyalosthes obsoletus* et diminue la température du sol réduisant le passage des larves au stade ailé. **(c)** Test de variétés sensibles (rang de droite) et tolérantes (rang de gauche) au dépérissement dans un même champ (Gomme et al. 2010b).

II.3.2 La fermeture du milieu dans les populations sauvages

De nombreux indicateurs existent pour mesurer l'état des champs cultivés de lavandes et l'incidence de la maladie du dépérissement. Ce type de données n'existe pas pour les populations sauvages de lavande fine, lavande aspic et lavandin. Depuis l'arrêt de la cueillette en milieu naturel, très peu de données ont été publiées sur la dynamique de ces populations au cours des années. Un état des lieux relativement exhaustif a été mené par Bernard Pasquier, directeur du CNPMAI de 1996 à 2002 (comm. pers.). Dans ce travail, 282 populations de lavande fine, 160 populations de lavande aspic et 47 populations de lavandin ont été recensées et décrites sur l'ensemble de leurs aires de répartition. Malgré des descriptions minutieuses pour chaque site, il n'est fait aucune mention de la présence de la maladie du dépérissement. Le principal risque mentionné est la fermeture du milieu à cause de l'embroussaillage par diverses espèces telles que le genévrier, le buis ou le genêt. Cette évolution de la végétation est principalement due au changement de pratiques agricoles et notamment à l'abandon du pâturage. Dans le Verdon, Nathalie Moulin est cueilleuse de plantes aromatiques et effectue un travail méticuleux d'historienne en analysant les données d'archives et en récoltant des témoignages sur les pratiques et métiers anciens. Lorsqu'on l'interroge sur les menaces qui pèsent sur la lavande, c'est la fermeture du milieu qui la préoccupe davantage que la maladie du dépérissement (comm. pers.). Aucun témoignage ne rapporte d'observation de dépérissement dans les populations sauvages de lavandes des Causses.

II.3.3 Le changement climatique

Une autre menace à prendre en compte est associée au changement climatique. Une étude sur le changement climatique a montré que la limite du climat méditerranéen est remontée de pratiquement 250 km vers le Nord entre 1980 et 2009 (Lelièvre et al. 2011) (Figure 17). Certaines zones méditerranéennes sont même devenues semi-arides comme c'est le cas des plaines qui environnent Montpellier. Les projections pour les années à venir prévoient que le climat méditerranéen pourrait s'étendre sur toute la moitié sud de la France d'ici 2100. On peut s'interroger sur l'évolution de la distribution des lavandes dans ce contexte, d'autant plus que les régions Méditerranéennes montagneuses ont été montrées comme très sensibles aux divers modèles de changements climatiques (Thuiller et al. 2005). Le réchauffement climatique entraîne l'augmentation d'événements climatiques extrêmes comme des sécheresses printanières et estivales importantes, prolongées ou répétées. Ces phénomènes accentuent l'incidence du dépérissement, la sévérité des symptômes et le taux de la mortalité des plantes. De plus, le passage du stade de larve au stade adulte ailé de *Hyalesthes obsoletus* est très dépendant de la température. Si la température augmente, il est fort possible que la date d'émergence soit plus précoce et que la période de vol de l'insecte soit plus longue, augmentant ainsi la transmission du phytoplasme. De plus, avec l'augmentation globale de la température, des régions jusque-là épargnées par la maladie du dépérissement pourraient en être atteintes (Vallée du Rhône par exemple).

Prévoir les conséquences du changement climatique pour une plante est un défi. Des études montrent que les modifications du climat vont avoir pour conséquence des déplacements d'espèces et des modifications de communautés végétales (Thuiller et al. 2005; Bellard et al. 2012). Chez le thym par

exemple, le changement climatique a déjà modifié la répartition naturelle des différents chémotypes en l'espace de 40 ans (Thompson et al. 2013). Certains chémotypes caractérisés comme sensibles au gel et donc cantonnés à des zones plus douces en 1970 se retrouvent désormais sur des sites où il n'y avait que des chémotypes tolérants au gel auparavant. Qu'en est-il pour la lavande ? Peut-on imaginer un déplacement des lavandes vers le nord, une modification de la chimie des plantes ou tout simplement une disparition à cause d'un potentiel d'adaptation faible? Pour évaluer le potentiel d'adaptation des populations de lavandes, nous avons réalisé un état des lieux de la diversité génétique et chimique des lavandes sauvages qui est présenté dans le chapitre 1 de la thèse.

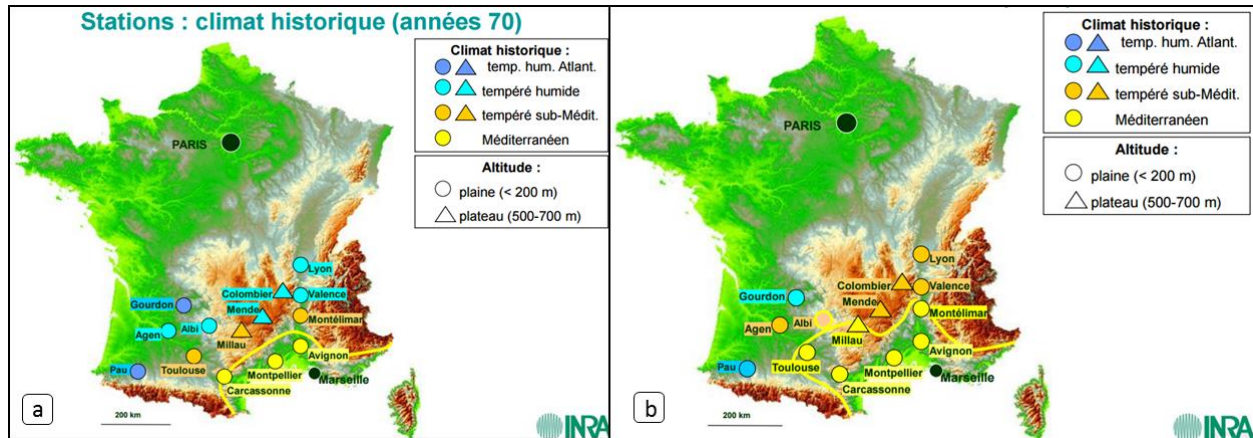


Figure 17 : Cartes de l'évolution du climat méditerranéen entre 1970 (a) et 2009 (b)

D'après (Lelièvre et al. 2011)

III. LE STRESS HYDRIQUE

Avec 70 % de la consommation mondiale, l'agriculture est le secteur le plus demandeur en eau (Alcamo et al. 2000). Le changement climatique et l'augmentation de la population mondiale font craindre une diminution de la disponibilité en eau de par le monde dans les années à venir. Dans certaines régions, le rapport consommation/disponibilité est déjà très fort comme aux Etats-Unis, en Espagne ou en Inde (Figure 18). Outre les problèmes sanitaires que cela va poser, les tensions géopolitiques pour l'accès à l'eau pourraient s'accroître. Dans ce contexte plus qu'alarmant, il est primordial de comprendre les effets de la sécheresse et plus particulièrement du stress hydrique sur les végétaux.

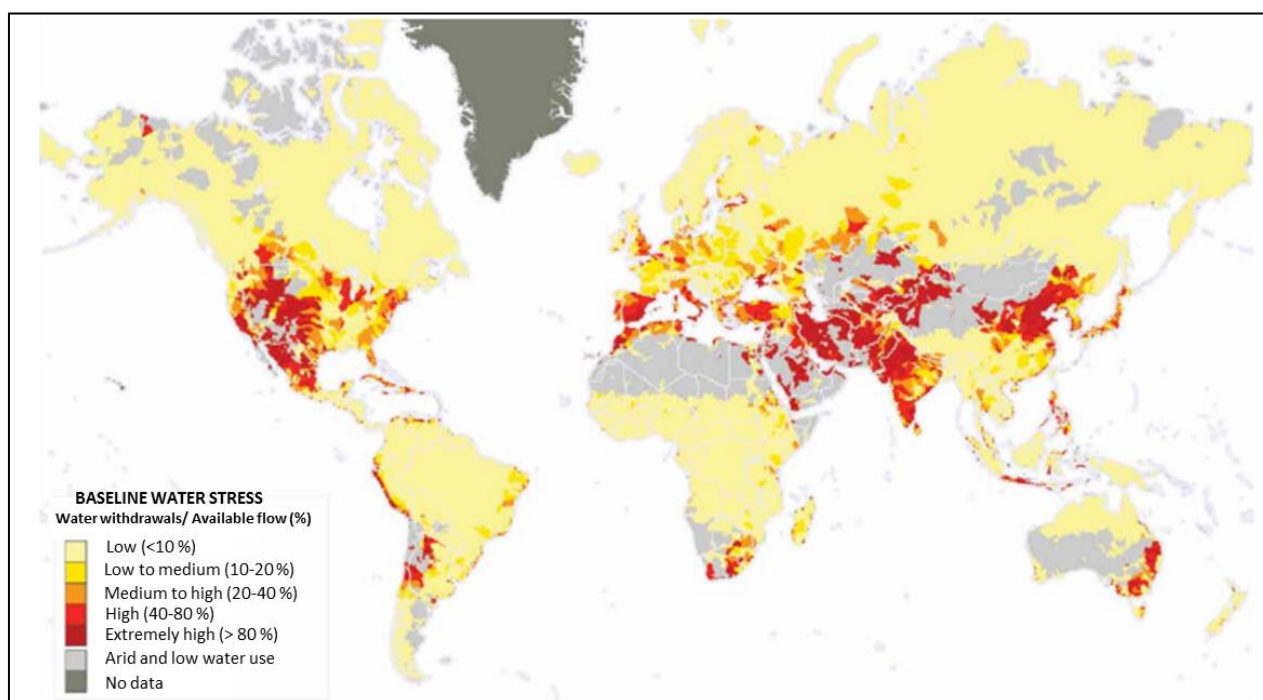


Figure 18 : Carte mondiale du rapport entre consommation et disponibilité en eau.

Modifié d'après (Gassert et al. 2013) . Calcul de la consommation en eau en 2010 et calcul de la disponibilité en eau moyenne de 1950 à 2008

III.1 Importance et fonctions de l'eau chez les végétaux

Constituant 80 % du végétal, l'eau est d'une importance primordiale pour les plantes. Elle possède des fonctions mécaniques et biochimiques (Figure 19). Ainsi la présence de l'eau de manière intracellulaire permet non seulement de maintenir l'organisation en bicouche des membranes mais provoque aussi une pression de turgescence responsable de la rigidité et de l'élongation cellulaire. La pression d'eau dans la plante est régulée grâce au processus d'évapotranspiration. Au niveau des stomates, l'eau s'évapore dans l'atmosphère créant une force de succion permettant de faire circuler l'eau des racines aux feuilles.

C'est le principal processus responsable de la circulation de l'eau dans la plante. A côté de ces fonctions mécaniques, l'eau est aussi le solvant d'un grand nombre de réactions biochimiques ainsi qu'un réactif indispensable comme c'est le cas pour la photosynthèse.

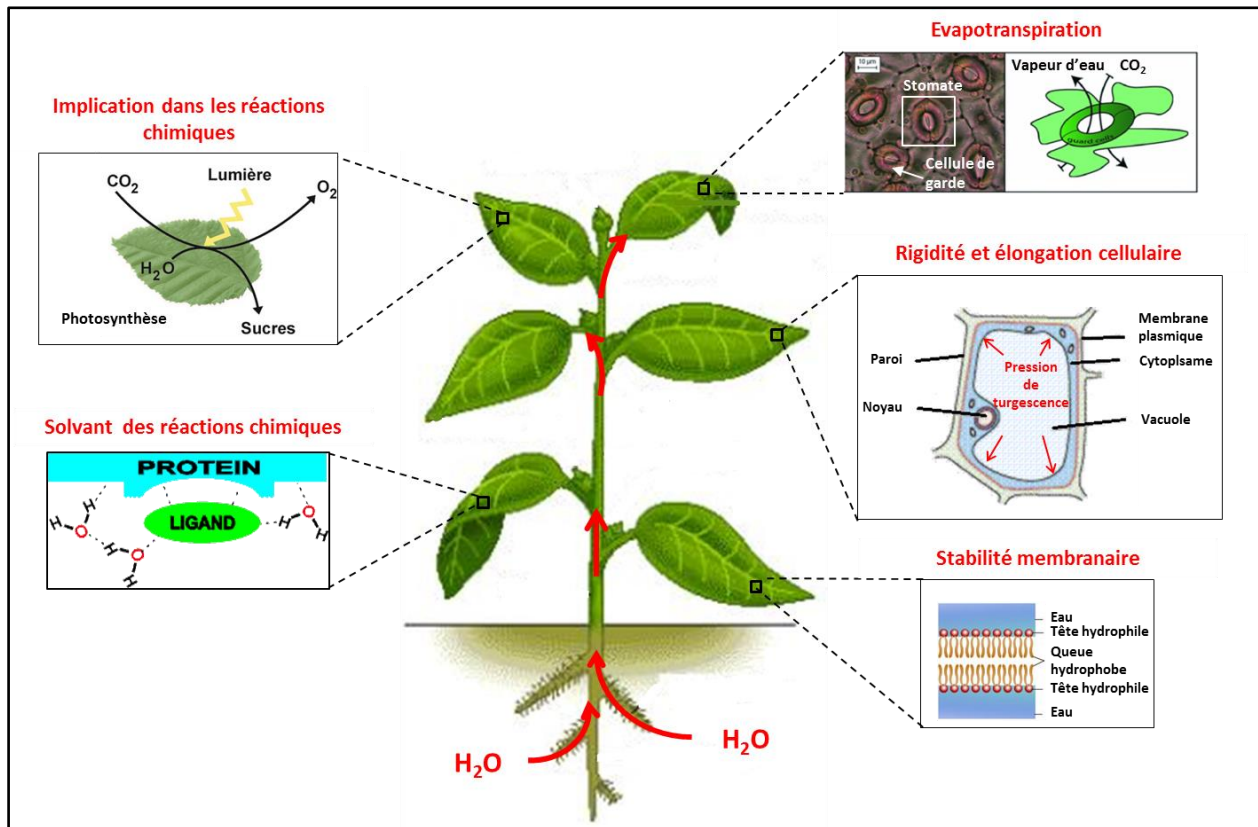


Figure 19 : Vue d'ensemble des rôles de l'eau chez les végétaux

Images modifiées d'après : eilensvocabularywords.com; promhaie.ne; environmental-sciences-blog.com; biologyjunction.com; sites.psu.edu et lsbu.ac.uk

III.2 Déficit hydrique et régulation de l'eau dans la plante

L'eau est un élément primordial chez tous les végétaux et sa régulation est essentielle pour la survie de la plante surtout lorsque l'eau vient à manquer. Lorsque la quantité d'eau captée par la plante est inférieure à la quantité d'eau perdue par évapotranspiration, un déficit hydrique apparaît. Les effets de ce déficit dépendent de l'âge, de l'organe considéré, de l'intensité et de la durée du stress. Globalement et pour l'ensemble des plantes, le déficit hydrique engendre une diminution voire un arrêt de la croissance (Singh-sangwan et al. 1994; Costa França et al. 2000; Baher et al. 2002), un flétrissement des parties aériennes et, si le stress est trop intense ou trop long, la mort de la plante. Toutes les plantes ne présentent pas les mêmes stratégies face au stress. Nous allons voir dans la suite de ce chapitre les différents éléments de réponse des végétaux face au stress hydrique.

III.2.1 Fermeture des stomates

Le principal mécanisme responsable de la circulation de l'eau dans la plante est l'évapotranspiration qui a lieu au niveau des stomates (Figure 19). Pour faire monter l'eau des racines aux parties aériennes de la plante, la quantité d'eau transpirée doit être importante. Lorsque l'eau devient moins disponible, la plante limite ces pertes d'eau par évapotranspiration. Elle ferme donc ses stomates. Cette fermeture est contrôlée en partie par l'acide abscissique, hormone végétale produite dans les racines suite à la détection du stress hydrique et transportée par le xylème jusqu'aux feuilles puis jusqu'aux cellules de gardes des stomates (Khalil and Grace 1993). L'acide abscissique provoque deux types de réponses, une réponse à court terme (quelques secondes) et une à long terme (quelques minutes à une heure). La première permet une fermeture rapide des stomates grâce à l'activation de transporteurs d'anions par transduction du signal dépendante ou non du calcium (McAinsh 1990; Geiger et al. 2011). La deuxième réponse induit des changements métaboliques et notamment des modifications du degré de phosphorylation de certaines protéines dont des facteurs de transcription (Kline et al. 2010). Même si la fermeture des stomates permet de limiter les pertes d'eau, elle n'est pas sans conséquence puisque les stomates sont aussi le lieu des échanges gazeux entre le milieu extérieur et intérieur nécessaires à la photosynthèse. Nous détaillerons les relations entre la photosynthèse et l'état d'ouverture des stomates dans la suite du chapitre.

III.2.2 Production d'osmoprotectants

Les osmoprotectants regroupent des ammoniums quaternaires (glycine bêtaïne, proline bêtaïne) ; des polyols (sorbitol, mannitol, pinnitol) et des acides aminés (proline) (Mahajan and Tuteja 2005) dont la synthèse est inductible par l'acide abscissique (Singh et al. 2001). Grâce au principe de l'osmose, l'accumulation intracellulaire d'osmoprotectants augmente la force d'entrée d'eau dans les cellules, compensant en partie le manque d'eau. Des lignées transgéniques de pétunia surexprimant le gène Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase d'*Arabidopsis thaliana* induisant l'accumulation de proline, ont montré une meilleure tolérance au stress hydrique que les lignées non transformées (Yamada et al. 2005). On attribue aussi d'autres fonctions à la proline comme la stabilisation de molécules et de membranes (Hoekstra et al. 2001) ou encore un rôle d'antioxydant (Hare and Cress 1997; Vendruscolo et al. 2007). En effet, à l'instar de l'eau, les osmoprotectants permettent de stabiliser la conformation des protéines et pallient le manque d'eau.

Parmi les osmoprotectants, on peut aussi citer les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) qui sont un groupe important de protéines hydrophiles. Ces protéines ont été mises en évidence durant les derniers stades de l'embryogenèse de la graine. Leur accumulation coïncide avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation de la graine. Même si le mécanisme d'action exact n'est pas encore connu, on pense que l'accumulation de protéines LEA influence les forces osmotiques, permet de stabiliser les molécules et les protéines, voire empêche leur agrégation en conditions limitantes en eau (Goyal et al. 2005). En plus de leur utilité durant l'embryogénèse de la graine, ces protéines LEA font partie de la réponse de la plante au stress hydrique. Ainsi, il a été montré qu'un gène de protéine LEA d'orge était

capable d'augmenter la tolérance au stress hydrique de plantes transgéniques de blé (Sivamani et al. 2000) et de riz (Xu et al. 1996).

III.2.3 Régulation du transport de l'eau intracellulaire par les aquaporines

Un autre élément d'adaptation des membranes au stress hydrique sont les aquaporines. Elles ont la capacité de faciliter et de réguler les échanges d'eau à travers les membranes. Ces aquaporines font partie d'une famille appelée « Major Intrinsic Proteins » (MIP) que l'on trouve chez tous les êtres vivants. Elles sont divisées en quatre sous-familles selon leurs homologies de séquence et leurs localisations subcellulaires (Chaumont et al. 2005). Elles sont principalement présentes dans les membranes cellulaires et tonoplastiques où elles participent au transport de l'eau et d'autres composés comme le glycérol, le CO₂, l'urée ou la silice (Maurel 2007). Chez *Juglans regia* il a été montré une très forte corrélation entre l'expression de deux aquaporines suite à l'exposition à la lumière et l'augmentation de la conductance hydrique foliaire suggérant leur rôle prépondérant dans le contrôle du transport de l'eau (Cochard et al. 2007). De par leur rôle dans le transport de l'eau à travers les membranes, les aquaporines peuvent être impliquées dans la réponse au stress hydrique. Ainsi, une étude comparative menée sur deux cultivars de riz, l'un tolérant et l'autre non, soumis à un stress hydrique, a montré une expression différentielle du gène RWC3 codant pour l'aquaporine du même nom (Lian et al. 2004). Le cultivar tolérant présentait un plus fort taux de transcription du gène RWC3 et une plus grande quantité d'aquaporines. De plus, la surexpression de ce gène chez le cultivar de riz sensible a permis d'améliorer sa tolérance au stress hydrique. *A contrario*, la surexpression du gène d'aquaporine PIP1b d'*Arabidopsis thaliana* dans du tabac n'a eu aucun effet sur sa tolérance au déficit hydrique (Aharon et al. 2003). Par contre, en condition d'irrigation normale, cette surexpression a induit une augmentation de la croissance, de la photosynthèse et de la transpiration. Le mécanisme d'action exact et les rôles des aquaporines restent encore à élucider et aucune conclusion générale ne peut être tirée sur leur implication dans la tolérance au stress hydrique, même si elles jouent un rôle important dans la régulation du transport de l'eau dans les cellules.

III.2.4 Modification de la composition de la paroi cellulaire

La diminution de la pression de turgescence induite par le manque d'eau va provoquer le rétrécissement du plasmalemme et donc des tensions avec la paroi cellulaire. Pour éviter un tel phénomène, des réarrangements dans la composition de la paroi cellulaire peuvent se produire afin d'augmenter sa flexibilité. Par exemple chez *Craterostigma wilmsii*, une plante reviviscente, la composition des parois cellulaires est différente entre des plantes soumises à un stress hydrique et des plantes témoins (Vicré et al. 1999; Vicré et al. 2004). Les parois cellulaires des plantes en stress hydrique présentent une plus faible proportion de glucose mais une plus forte proportion de galactose dans les xyloglucanes (composants de l'hémicellulose). Les auteurs attribuent cette diminution de glucose dans les xyloglucanes à un clivage de ces derniers permettant d'avoir de plus petites chaînes, plus flexibles rendant la paroi cellulaire plus souple aux variations de la pression de turgescence. Chez d'autres

espèces comme *Myrothamnus fabellifolia*, la paroi cellulaire est constitutivement « préparée » à faire face à un stress hydrique. En effet, elle présente des quantités d'arabinose inhabituellement fortes permettant une grande flexibilité et une meilleure capacité d'absorption de l'eau (Moore et al. 2006).

III.2.5 Modifications morphologiques

Pour faire face à la diminution de la quantité d'eau disponible dans le sol, certaines plantes augmentent leur surface racinaire afin de puiser une plus grande quantité d'eau dans le sol (Wu and Cosgrove 2000). C'est le cas chez le maïs dont un déficit hydrique modéré stoppe la croissance des feuilles et de la tige mais pas celle des racines (Sharp et al. 1988). Ce type de régulation, arrêt de la croissance foliaire versus augmentation de la croissance racinaire, permet un meilleur ratio absorption/demande au niveau de la plante entière. De façon générale, les modifications morphologiques sont des réponses à plus long terme que les réponses biochimiques. Les plantes bien adaptées aux milieux secs mettent en place des stratégies très efficaces de survie, comme une limitation de la surface des feuilles parfois réduites à des épines, la présence d'une grande densité de poils pour maintenir une micro-atmosphère humide ou encore le stockage de réserves d'eau.

Toutes les modifications que nous avons vues sont d'ordre général et concernent la gestion de l'eau en elle-même. Nous allons maintenant nous intéresser à l'impact d'un déficit hydrique sur la photosynthèse.

III.3 Stress hydrique et photosynthèse

III.3.1 Bref rappel du fonctionnement de la photosynthèse

La photosynthèse se déroule en deux grandes étapes, la fixation de l'énergie lumineuse avec production d'ATP (Adénosine triphosphate) et de pouvoir réducteur, utilisés sous forme de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) dans la deuxième étape pour produire des molécules organiques comme les sucres grâce à la fixation de carbone.

III.3.1.1 *Réactions photochimiques : fixation de l'énergie lumineuse*

La fixation de l'énergie lumineuse se déroule dans la membrane des thylakoïdes et implique des pigments chlorophylliens et des transporteurs d'électrons tels que les quinones, la ferrédoxine et des protéines variées. La fixation de l'énergie lumineuse a lieu dans deux structures particulières nommées photosystèmes I (PSI) et photosystème II (PSII) (**Figure 20**). Ce sont des complexes qui associent pigments chlorophylliens et protéines. Les centres réactionnels de ces photosystèmes contiennent deux molécules de chlorophylle a associées à des protéines permettant l'absorption à 680 nm pour le PSII (P680) et à 700 nm pour le PSI (P700). Ce sont ces molécules qui donnent un électron de haute énergie à

la chaîne de transport d'électron. La photosynthèse démarre classiquement au niveau du PSII où la chlorophylle du centre réactionnel donne un électron de haute énergie à une phéophytine puis à une plastoquinone. Cet électron est ensuite transporté par la chaîne de transport d'électron composée d'un complexe de cytochromes et c'est grâce à ce transport et à l'énergie qu'il libère que des ions H^+ s'accumulent dans le lumen du thylakoïde (**Figure 20**). Ce gradient de protons est ensuite utilisé pour la production d'ATP par une ATP synthase. A la fin de la chaîne de transport, l'électron est transféré à la chlorophylle du centre réactionnel du PSI. C'est à ce moment qu'il regagne de l'énergie grâce à la lumière utilisée par la NADP réductase pour réduire le $NADP^+$ en $NADPH+H^+$. Le bilan des réactions photochimiques est donc la production d'ATP et de $NADPH+H^+$ qui seront utilisés pour la biosynthèse de composés organiques par le cycle de Calvin.

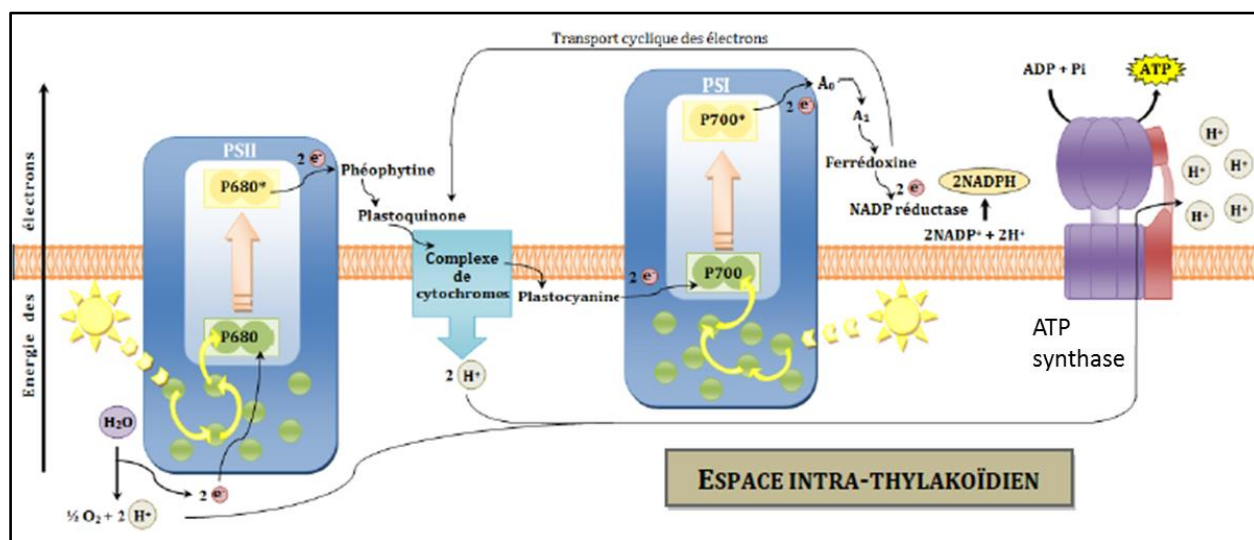


Figure 20 : Fonctionnement de la fixation de l'énergie lumineuse

PSI et PSII : photosystème I et II ; P680 : centres réactionnels du PSII ; P700 : centres réactionnels du PS I. Extraite de cours-pharmacie.com

III.3.1.2 Le cycle de Calvin

Le cycle de Calvin se déroule dans le chloroplaste en trois grandes étapes (**Figure 21**). i) fixation du carbone du CO_2 sur le ribulose diphosphate grâce à la Rubisco (ribulose diphosphate carboxylase). ii) réduction des molécules avec consommation de $NADPH + H^+$ et d'ATP. iii) régénération de l'accepteur de CO_2 , le ribulose diphosphate. Pour avoir un gain net d'une molécule de phosphoglyceraldéhyde, le cycle de Calvin doit fixer trois molécules de CO_2 . Le phosphoglyceraldéhyde produit est ensuite utilisé pour former des glucides et d'autres composés organiques.

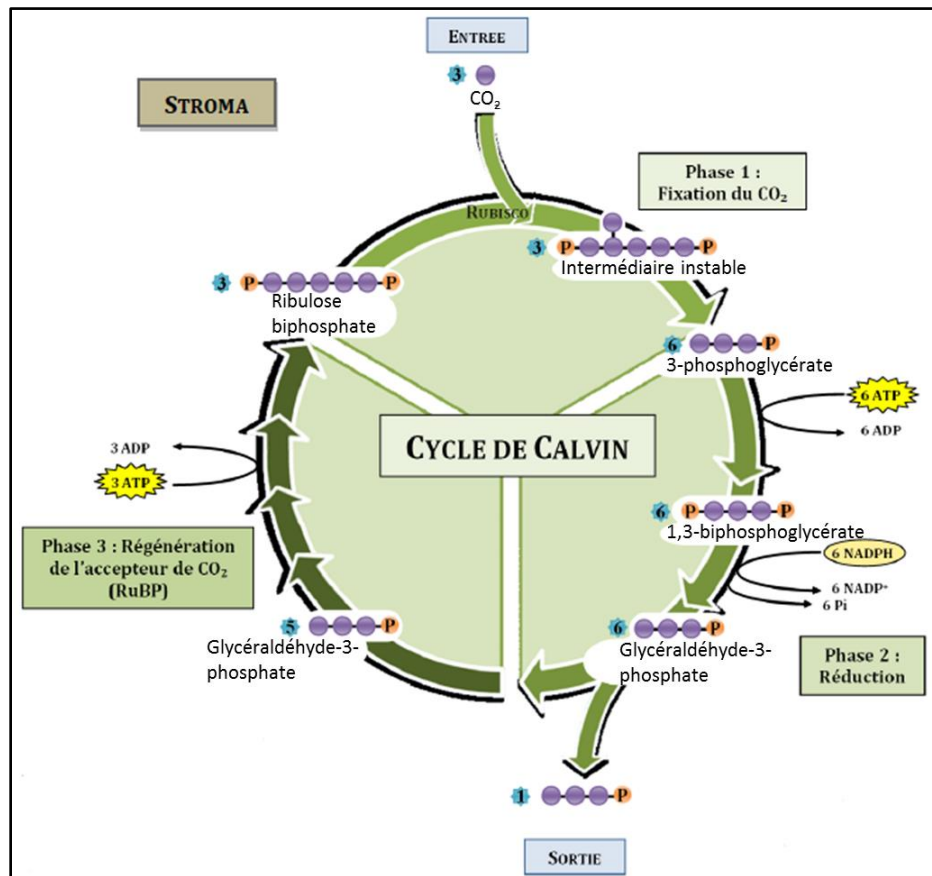


Figure 21 : Le cycle de Calvin

Extraite de cours-pharmacie.com

III.3.2 Impact du stress hydrique sur la photosynthèse

Lors d'un stress hydrique, le taux de fixation de carbone par le cycle de Calvin diminue (Lawlor and Cornic 2002; Dias and Brüggemann 2010; Fábíán et al. 2013). Ce ralentissement du cycle de Calvin est dû à deux phénomènes, la fermeture des stomates et les modifications d'activité des enzymes du cycle. La fermeture des stomates provoque une diminution de la concentration en CO_2 dans la feuille et ralentit donc son assimilation par la Rubisco (Figure 22). Les modifications d'activité enzymatique touchent principalement la Rubisco et la non régénération du ribulose-1-5-phosphate qui permet la fixation du carbone (Dias and Brüggemann 2010). Dans la grande majorité des cas, le principal phénomène responsable de la diminution du rendement photosynthétique est la fermeture des stomates et donc la diminution de la disponibilité en CO_2 (Lawlor and Cornic 2002; Bota et al. 2004; Flexas et al. 2004). Ainsi le suivi de la photosynthèse, de l'activité de la Rubisco et de la conductance stomatique chez trois espèces d'arbustes a montré que l'activité de l'enzyme ne diminue que peu et uniquement lorsque le stress hydrique est sévère. *A contrario*, la photosynthèse et la conductance stomatique diminuent progressivement et de manière concomitante (Bota et al. 2004). Quel que soit le phénomène responsable du ralentissement du cycle de Calvin, une des conséquences majeures est une diminution de la consommation par ce cycle de cofacteurs réduits (NADPH) et donc d'une augmentation de ces

mêmes cofacteurs oxydés (Figure 22). En effet, le NADPH produit par les photosystèmes n'est plus recyclé en NADP^+ induisant un blocage de la chaîne de transport d'électrons. Ceci a pour conséquence d'empêcher la chlorophylle de revenir à un état désexcité et peut induire à terme une dégradation des photosystèmes (photoinhibition) (Reddy et al. 2004).

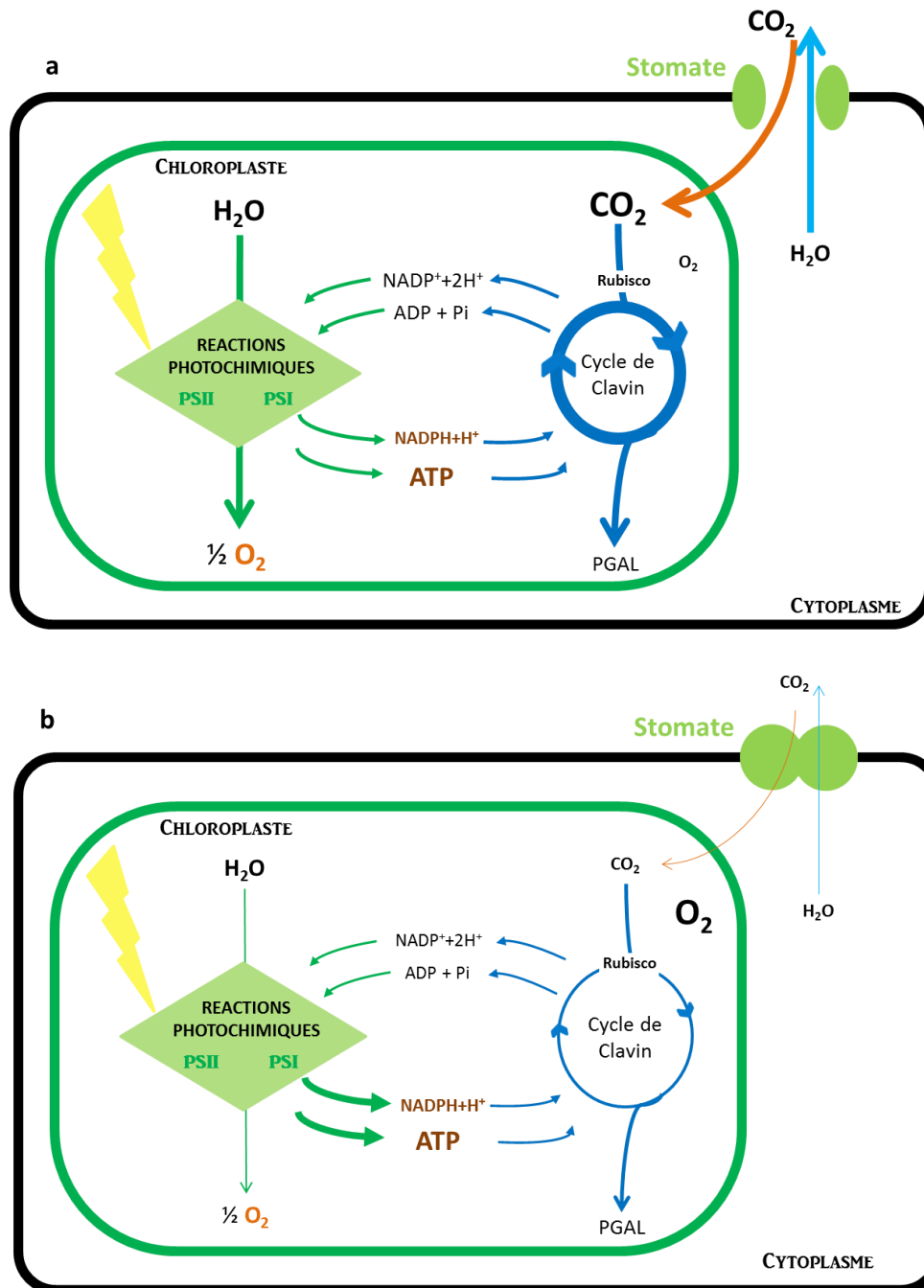


Figure 22 : Fonctionnement de la photosynthèse en condition hydrique normale (a) et en déficit hydrique (b)
PS I et PS II : photosystèmes I et II ; **Rubisco** : ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase. En condition de stress hydrique, les réactions photochimiques continuent de fonctionner alors que le cycle de Calvin est ralenti par le manque de CO_2 induit par la fermeture des stomates. Le $\text{NADPH} + \text{H}^+$ et l'ATP vont s'accumuler dans la cellule.

III.3.3 Mécanismes de contrôle du stress hydrique au niveau de la photosynthèse

III.3.3.1 Diminution de l'énergie lumineuse capturée

Lors d'un stress hydrique, le ralentissement du cycle de Calvin, alors que l'absorption des photons est maintenue, crée un excès d'énergie au niveau des deux photosystèmes. Pour éviter les conséquences délétères, une des stratégies est de diminuer la quantité d'énergie lumineuse capturée. Cela peut se faire par enroulement des feuilles sur elles-mêmes afin de diminuer la surface de contact avec la lumière. Ce processus est décrit chez *Craterostigma wilmsii* et *Xerophyta viscosa*, deux plantes reviviscentes (Sherwin and Farrant 1998). Un autre moyen de diminuer l'énergie lumineuse capturée est de « camoufler » l'appareil photosynthétique grâce à des pigments tels que les anthocyanes (Farrant 2000). Ce mécanisme est retrouvé chez les plantes « homoiochlorophyllous » (Dinakar et al. 2012). Chez les plantes « poikilochlorophyllous », la stratégie est plus radicale puisqu'elle consiste en la dégradation pure et simple de tout l'appareil photosynthétique permettant de capturer l'énergie lumineuse (photosystèmes et membrane des thylakoïdes) (Dinakar et al. 2012).

III.3.3.2 Quenching photochimique, non photochimique et émission de fluorescence

Le quenching est l'action de désactiver un état excité d'une entité moléculaire par transfert d'énergie, d'électron ou par un mécanisme chimique. Lorsque la chlorophylle est excitée, trois voies sont possibles pour sa désexcitation : (i) le quenching photochimique qui passe par le transport d'électrons, (ii) le quenching non photochimique qui est l'émission de chaleur et (iii) l'émission de fluorescence, donc de lumière rouge (Cruz de Carvalho 2008; Murchie and Lawson 2013) (**Figure 23**). Ces processus sont détaillés ci-dessous :

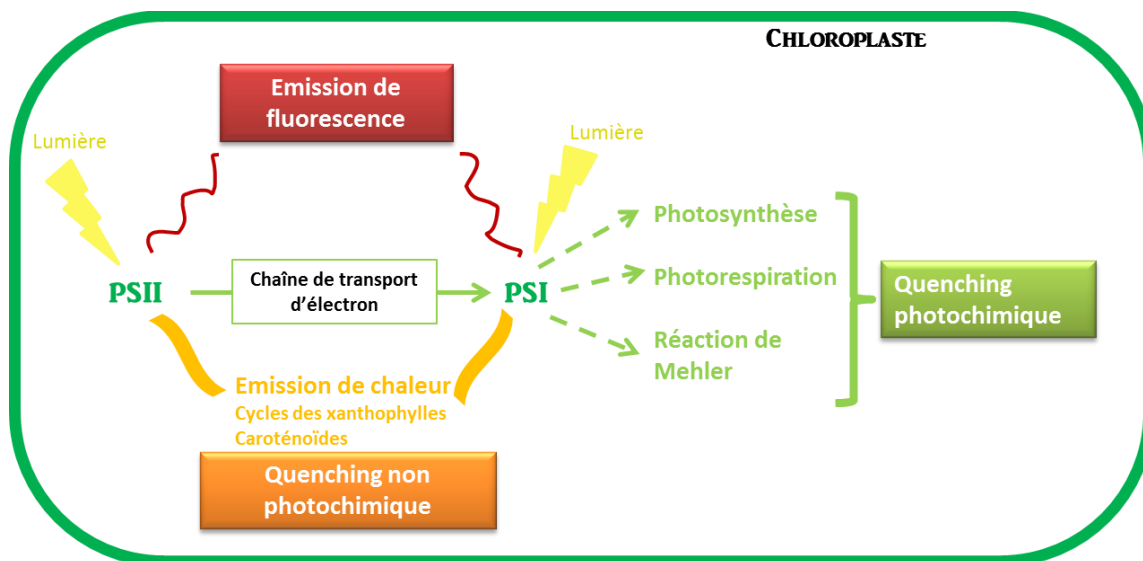


Figure 23 : Vue d'ensemble des différentes voies de dissipation de l'énergie lumineuse capturée par les photosystèmes I et II

(i) **Quenching photochimique** : Le quenching photochimique est l'utilisation de l'énergie lumineuse capturée, et donc du transport d'électrons par trois processus : la photosynthèse, la photorespiration et la réaction de Mehler. (Cruz de Carvalho 2008). Nous ne détaillerons par la photosynthèse déjà évoquée au paragraphe précédent (Figure 22).

La voie de Mehler au niveau du PSI («cycle water-water»)(Figure 24): c'est le transport d'électrons du PSI vers l'oxygène moléculaire avec production de superoxyde $O_2^{\cdot -}$ ①, un puissant oxydant (Mehler 1951). Le superoxyde est converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) ②. Une ascorbate peroxydase (APX) réduit H_2O_2 en eau et oxyde l'ascorbate en monodehydroascorbate (MDA) ③. MDA est ensuite réduit via la ferredoxine ce qui consomme encore des électrons ④. Cette voie alternative peut absorber jusqu'à 30 % du flux d'électrons. Le superoxyde peut aussi être converti en radical HO^{\cdot} très nocif pour la cellule ⑤.

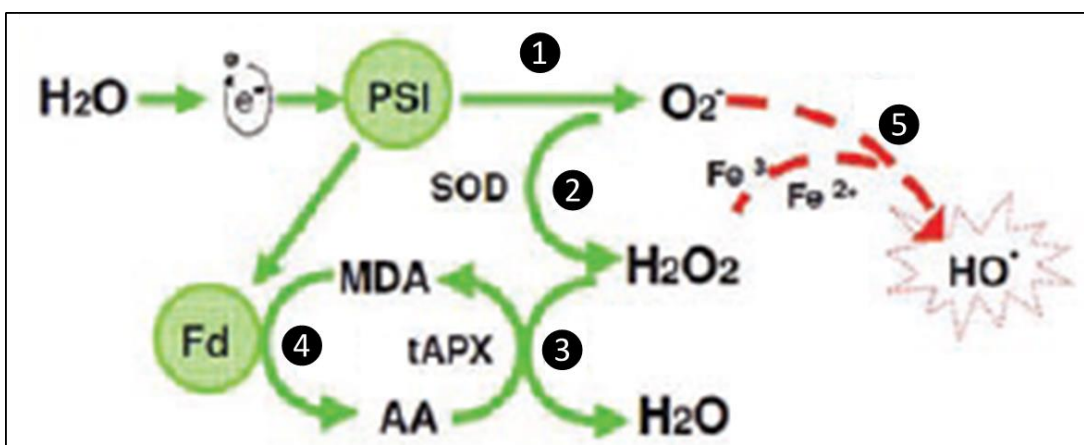


Figure 24 : La voie de Mehler

Modifié d'après (Cruz de Carvalho 2008)

Photorespiration(Figure 25): La Rubisco est l'enzyme clé du cycle de Calvin puisque c'est elle qui va permettre la fixation du carbone sur le ribulose-1,5-diphosphate grâce à son activité carboxylase. Mais elle possède aussi une activité oxygénase qui peut utiliser l'oxygène pour oxyder le ribulose-1,5-diphosphate engendrant une voie métabolique particulière nommée photorespiration (Spreitzer and Salvucci 2002). Cette voie métabolique produit du glycolate ① qui est transporté dans le peroxysome où il est transformé en glycine avec production d' H_2O_2 ②. Une fois transportée dans la mitochondrie, la glycine est transformée en sérine avec libération de CO_2 et de NH_3 ③ qui revient dans le peroxysome pour donner du glycérate. Le glycérate est ensuite converti en glycérate phosphate grâce à la consommation d'un ATP ④ (Apel and Hirt 2004).

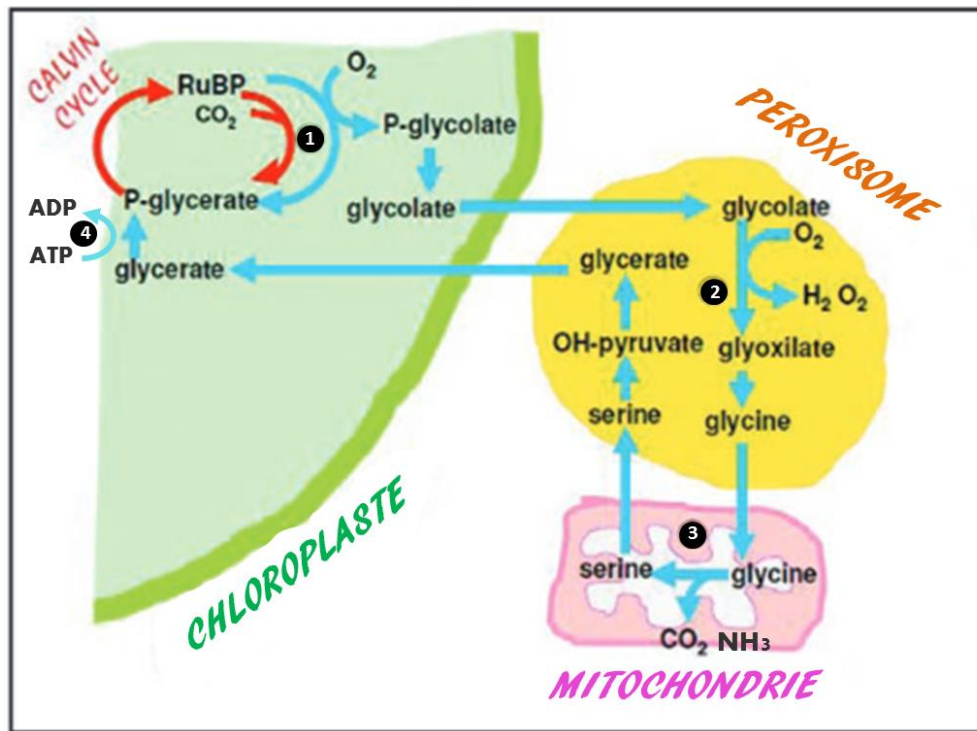


Figure 25 : Schéma de la photorespiration

Modifié d'après (Cruz de Carvalho 2008).

Contrairement à la photosynthèse, la réaction de Mehler et la photorespiration ne fixent pas de carbone voire même en libèrent comme dans le cas de la photorespiration. De plus ces deux voies produisent des espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui, si elles ne sont pas contrôlées par la cellule, peuvent s'avérer dommageables. Pourtant, dans un contexte de stress hydrique avec une disponibilité en CO₂ limitée, ces deux voies représentent un moyen de maintenir le transport des électrons dans les photosystèmes et de protéger l'appareil photosynthétique d'une potentielle destruction. Cependant, certains auteurs considèrent que la photorespiration, qui représente environ 25% de la photosynthèse en conditions normales, n'est pas augmentée durant le stress hydrique (Biehler and Fock 1996; Lawlor and Tezara 2009). Il a été même montré chez le blé que la photorespiration diminuait avec le stress hydrique. Dans cette même étude, il a été mis en évidence une augmentation de la réaction de Mehler lors du stress hydrique, qui serait, selon les auteurs, le processus de quenching photochimique principal en conditions de stress hydrique. Pourtant, d'autres études sur des espèces différentes montrent que la photorespiration est augmentée durant le stress hydrique et qu'elle serait même le mécanisme principal du quenching photochimique (Lawlor and Cornic 2002; Noctor et al. 2002). Tous ces résultats soulignent la grande variabilité des réponses mises en place en fonction des espèces et des types de stress hydrique.

(ii) Quenching non photochimique : Le quenching non photochimique regroupe les processus de dissipation d'énergie sous forme de chaleur grâce au cycle des xanthophylles et aux caroténoïdes.

Cycle des xanthophylles: les xanthophylles sont des caroténoïdes particuliers dérivés des carotènes par ajout d'atomes d'oxygène. Ce cycle fait intervenir la conversion de la violaxanthine en anthéroxanthine puis en zéaxanthine ce qui permet la dissipation thermique de l'énergie lumineuse en excès (Müller et al. 2001). Le mécanisme d'action est encore mal connu mais ce processus est induit par une diminution de pH du lumen des thylakoïdes. En effet, l'excès de transport d'électrons par rapport à la capacité de fixation du carbone produit une accumulation d'ion H^+ dans le lumen et donc une diminution du pH activant le cycle des xanthophylles. Il a été aussi montré que la lutéine, une autre xanthophylle, était aussi impliquée dans ce processus (Müller et al. 2001).

Caroténoïdes: les caroténoïdes peuvent récupérer l'énergie en excès de la chlorophylle et la dissiper sous forme de chaleur par un mécanisme encore non élucidé (Walla et al. 2014).

(iii) La fluorescence chlorophyllienne: la chlorophylle a dissipé une partie de l'énergie capturée sous forme de fluorescence, donc de lumière rouge à des longueurs d'ondes proches de 700 nm (Pfündel 1998). En état de stress hydrique, l'émission de fluorescence chlorophyllienne augmente pour permettre la dissipation de l'énergie lumineuse en excès. La mesure de la fluorescence permet de quantifier certains paramètres comme l'efficacité photochimique maximale du PSII, l'efficacité photochimique du PSII, le niveau du quenching photochimique du PSII et le niveau du quenching non photochimique (Murchie and Lawson 2013). Ces paramètres sont obtenus en découplant les réponses photochimiques et non photochimiques. Pour cela, la feuille sur laquelle on effectue les mesures est soumise à différents types de lumière : la lumière actinique qui permet le fonctionnement des réactions photochimiques ; l'absence de lumière qui empêche toute fixation d'énergie et laisse toutes les chaînes de transport d'électrons disponibles et enfin des pulses de lumière saturante qui bloquent les chaînes de transport d'électrons. Le schéma typique de ce genre de mesure démarre sans lumière. Tous les centres réactionnels du PSII sont alors à l'état ouvert (la chaîne de transport d'électrons est libre) et il n'y a pas de quenching photochimique. L'émission de fluorescence (F_0) est alors à son minimum. L'application d'un pulse de lumière saturante va bloquer tous les centres réactionnels de transport d'électrons. L'émission de fluorescence va donc être à son maximum (F_m). Une lumière actinique est ensuite appliquée engendrant l'activation des réactions photochimiques; la fluorescence chlorophyllienne, diminue et atteint son niveau basal F' . Un nouveau pulse de lumière saturante est pratiqué et le maximum de fluorescence en condition lumineuse F_m' est obtenu. Cette valeur est plus faible que F_m à cause des processus de quenching non photochimique (non présent lorsque la feuille est au noir). La dernière mesure utile est la fluorescence minimale après passage de la lumière actinique F_0' .

A partir de ces différentes mesures de fluorescence chlorophyllienne, plusieurs paramètres sont calculés et servent d'indicateur sur le fonctionnement du PSII. Les plus utilisés sont reportés dans le **Tableau 5**.

Nom	Symbole	Formule	Description
Efficacité photochimique maximale du PSII	Fv/Fm	$(F_m - F_0)/F_m$	Indicateur de l'intégrité du PSII. Généralement autour de 0,83. Diminution associée à la dégradation du PSII. Utilisé comme indicateur de stress.
Efficacité photochimique du PSII	ϕ_{PSII}	$(F_m' - F')/F_m'$	Proportion de lumière absorbée par le PSII et utilisée pour les réactions photochimiques.
Quenching photochimique du PSII	qP	$(F_m' - F')/(F_m' - F_0')$	Indication de la proportion centres réactionnels du PSII ouverts.
Quenching non photochimique	NPQ	$(F_m - F_m')/F_m'$	Estimation de la perte d'énergie par la chaleur

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents paramètres calculés grâce aux mesures de fluorescence chlorophyllienne.

D'après (Butler 1978; Maxwell and Johnson 2000; Murchie and Lawson 2013)

La **Figure 26** présente le schéma-bilan des différentes modifications qu'apporte un stress hydrique sur la photosynthèse.

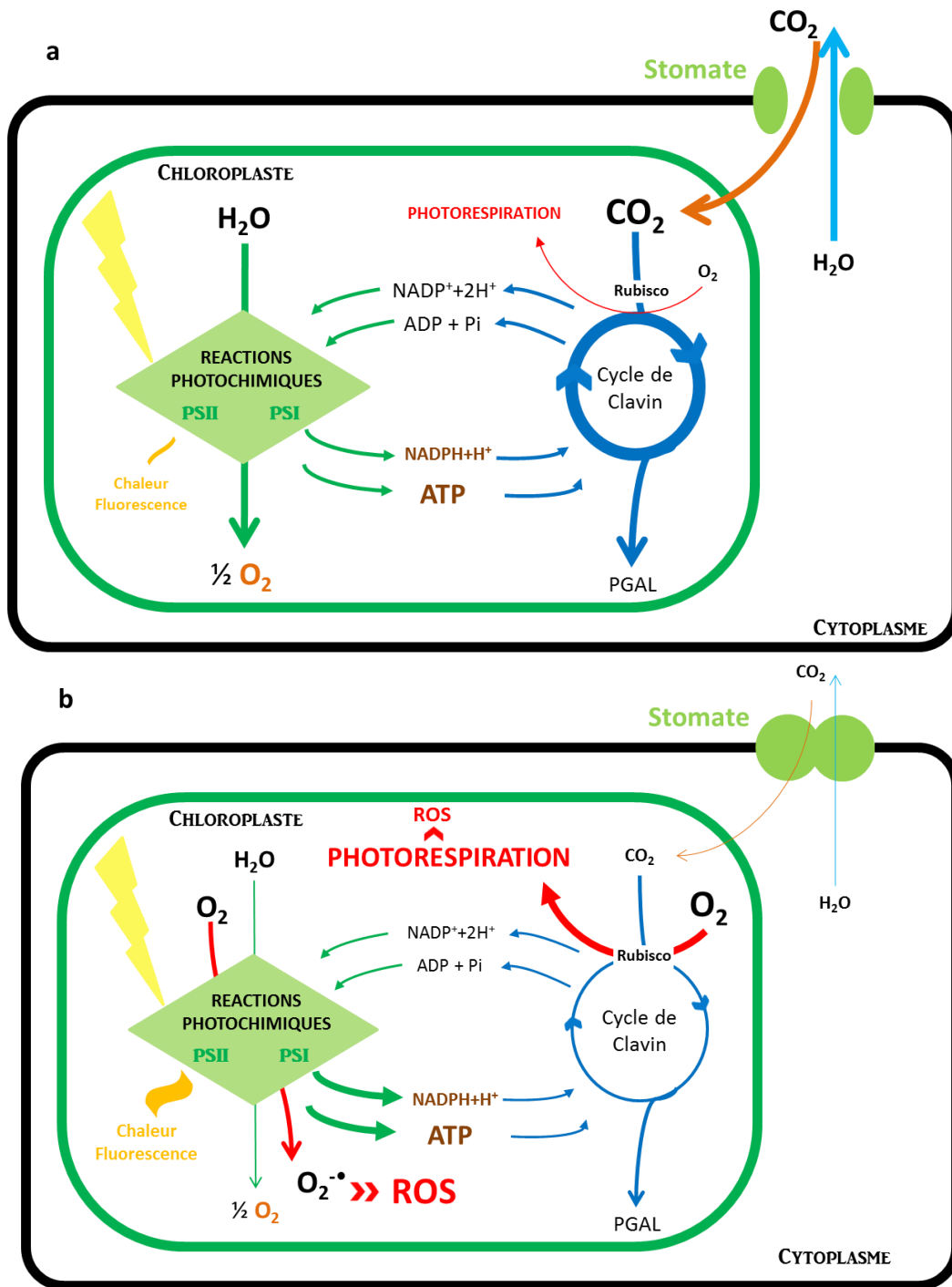


Figure 26 : Schéma-bilan de la comparaison du fonctionnement de la photosynthèse en conditions normales (a) et en conditions de stress hydrique (b)

III.3.3.3 Métabolismes spécialisés : plantes en C4 et CAM

Certains types de plantes de milieux chauds et secs présentent des variations au niveau du fonctionnement de la photosynthèse leur permettant de mieux gérer les problèmes antagonistes de la limitation des pertes d'eau et de l'absorption de CO_2 . Chez les plantes de métabolisme C4, la fixation du

carbone passe par une étape supplémentaire puisque le CO₂ est d'abord séquestré sur une molécule à 4 carbones, le malate, grâce à l'action de la phosphoénolpyruvate carboxylase. Ce n'est que dans un deuxième temps que le malate libère le CO₂ fixé pour la Rubisco. Le gros avantage de ce processus est que la phosphoénolpyruvate carboxylase a une plus grande affinité pour le CO₂ que pour l'O₂, contrairement à la Rubisco. De plus les échanges gazeux avec le milieu extérieur se réalisent dans une cellule différente de celle réalisant le cycle de Calvin. De cette manière, l'activité oxygénase de la rubisco est grandement atténuée car même si la concentration de CO₂ diminue, cela se produit uniquement dans la cellule où la phosphoénolpyruvate carboxylase agit. Un autre type de mécanisme permettant de gérer au mieux fixation de carbone et limitation en eau est le métabolisme CAM pour « Crassulacean Acid Metabolism ». Dans ce type de mécanisme, la fixation du carbone est découplée temporellement du fonctionnement du cycle de Calvin. Ainsi, le carbone est fixé la nuit lorsque les pertes d'eau sont plus faibles et que les stomates peuvent s'ouvrir. Le cycle de Calvin se produit le jour en présence de lumière grâce à la libération du CO₂ des molécules à 4 carbones.

III.4 Le stress hydrique et le stress oxydant

III.4.1 Production et contrôle des ROS cellulaires

III.4.1.1 *Production des ROS*

Les ROS sont des molécules extrêmement réactives qui peuvent oxyder différentes molécules comme l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines. Cela engendre de grands dommages dans le fonctionnement et la structure des cellules et peut conduire à leur mort (Cruz de Carvalho 2008). Ces ROS comprennent l'oxygène singulet (¹O₂), le superoxyde (O₂•⁻), le radical hydroxyl (•OH) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Figure 27) (Apel and Hirt 2004). Ils sont principalement produits dans le chloroplaste, le peroxysome et la mitochondrie (Mittler 2002). Le superoxyde produit en partie par la réaction de Mehler dans le PSI n'est pas très réactif avec les autres molécules et possède une durée de vie relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes), ce qui lui permet de diffuser dans différents compartiments de la cellule (Cadenas and Davies 2000). Sa nocivité est indirecte par la production d'autres ROS comme le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (Gardès-Albert et al. 2003). Un des ROS les plus nocifs est le radical hydroxyle car il est extrêmement réactif et possède une durée de vie inférieure à la microseconde. Il peut réagir de différentes manières : en arrachant un électron à une molécule pour donner un anion hydroxyle (-OH) ; en arrachant un hydrogène à un substrat organique (RH) entraînant des processus radicalaires en chaîne ; en s'additionnant sur des doubles liaisons (Gardès-Albert et al. 2003; St-Louis 2011) (Figure 27). Les conséquences de ces réactions oxydantes peuvent aussi bien être structurelles (déstabilisation des membranes à cause de la peroxydation des lipides), biochimiques (inactivation d'enzymes perturbant les voies métaboliques) et génétiques (mutations dans l'ADN). Pour contrôler ces réactions, la cellule possède des moyens enzymatiques et non enzymatiques.

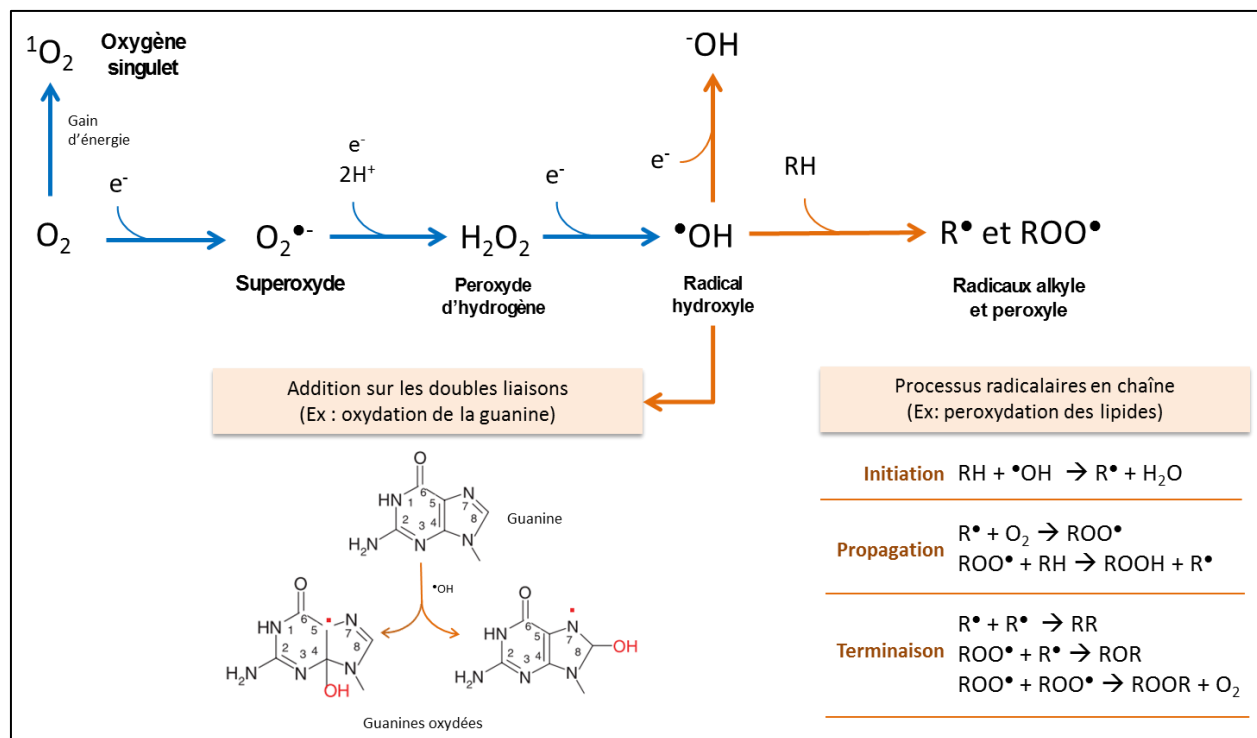


Figure 27 : Schéma des principaux ROS et de leurs dommages moléculaires

D'après (Gardès-Albert et al. 2003; St-Louis 2011)

III.4.1.2 Systèmes de contrôle du stress oxydant

Mécanismes enzymatiques

Les principales enzymes responsables de la détoxification des ROS cellulaires sont la superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxydase, la glutathion peroxydase et la catalase (Apel and Hirt 2004) (Figure 28). Elles sont présentes dans tous les compartiments cellulaires à l'exception de la catalase qui est uniquement localisée dans les peroxysomes. La superoxyde dismutase est en première ligne de la détoxification car elle convertit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Celui-ci va être ensuite pris en charge par l'ascorbate peroxydase, la glutathion peroxydase ou la catalase qui le transforment en eau. A part la catalase qui n'a pas besoin de réducteur pour fonctionner, les deux autres enzymes utilisent soit l'ascorbate soit le glutathion comme accepteur d'électrons. Une fois oxydés, ces deux réducteurs ont besoin d'autres enzymes pour revenir à leur forme réduite. On parle de cycle ascorbate-glutathion et de cycle glutathion-peroxydase, respectivement. En fonction du stress et de l'espèce la plante ne surproduit pas toutes les enzymes antioxydantes pour y faire face (Herbette et al. 2003; Cruz de Carvalho 2008).

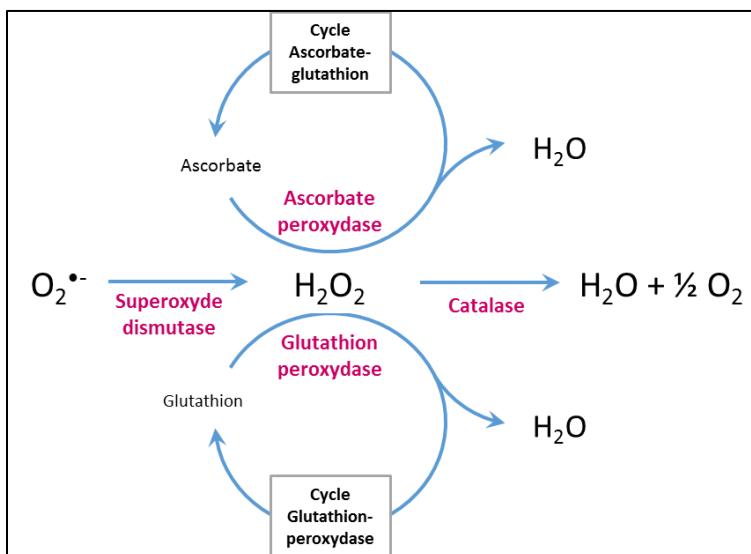


Figure 28 : Principales enzymes responsables de la détoxification des ROS

Mécanismes non enzymatiques

Dans les molécules antioxydantes on retrouve principalement l'ascorbate, le glutathion, l' α -tocophérol, les caroténoïdes (β -carotène en particulier), les polyphénols et les flavonoïdes (Shao et al. 2007; Cruz de Carvalho 2008; Gill and Tuteja 2010) (Figure 29). Elles peuvent agir soit directement sur les ROS, soit sur les molécules oxydées ou encore permettre de réduire d'autres antioxydants. L' α -tocophérol peut agir aussi bien en désactivant les ROS qu'en piégeant les radicaux peroxydes des lipides permettant de contrôler la peroxydation des lipides dommageable pour l'intégrité des membranes (Munné-Bosch 2005). Les molécules antioxydantes peuvent aussi travailler en synergie avec des enzymes antioxydantes comme c'est le cas de l'ascorbate et du glutathion dans le cycle ascorbate-glutathion (Figure 28). Concernant les caroténoïdes, il a été montré qu'ils pouvaient agir aussi bien par quenching physique c'est-à-dire en dissipant l'excès d'excitation par la chaleur (quenching non photochimique) que par quenching chimique avec transfert d'électron (Ramel et al. 2012).

60

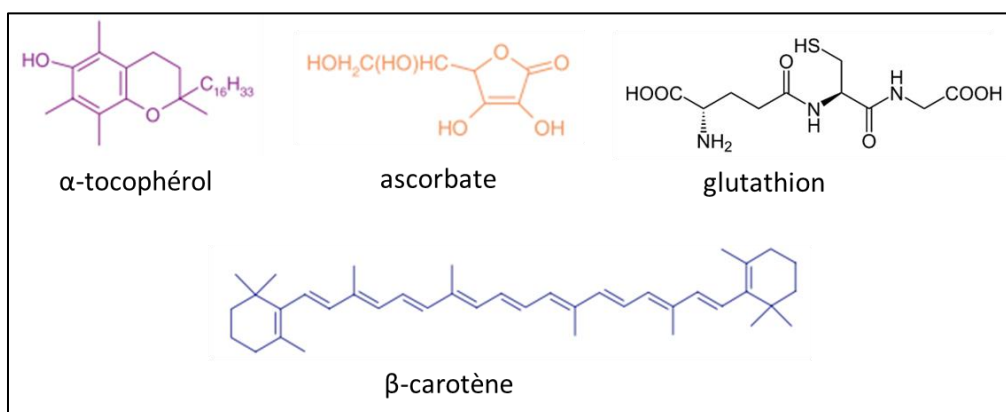


Figure 29 : Principales molécules antioxydantes

D'après (Gardès-Albert et al. 2003)

III.4.2 Relations entre le stress hydrique et le stress oxydant

En conditions normales, la plante contrôle finement la production et la détoxification des ROS. En cas de déficit hydrique, la photorespiration et la réaction de Mehler sont favorisées et induisent une surproduction des ROS. Il en est de même pour l'énergie non contrôlée par le quenching non photochimique ou par émission de fluorescence (Biehler and Fock 1996; Loggini et al. 1999; Miller et al. 2010). Il a été montré que l'augmentation des enzymes et/ou des molécules antioxydantes chez une plante est liée à une meilleure tolérance au stress (Loggini et al. 1999; Munné-Bosch and Alegre 2000; Liu et al. 2011). De plus, l'introduction de certains gènes impliqués dans la production d'enzymes ou de molécules antioxydantes a permis d'augmenter la tolérance des plantes au stress hydrique (Wang et al. 2005; Liu et al. 2008). Pourtant ce schéma n'est pas toujours aussi clair. Ainsi, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en ascorbate peroxydase cytosolique et/ou thylakoïdienne n'ont pas montré les mêmes réactions face au stress oxydatif (Miller et al. 2007). L'absence de l'ascorbate peroxydase thylakoïdienne rendait les plantes plus tolérantes au stress oxydatif alors que l'absence de l'ascorbate peroxydase cytosolique les rendait plus sensibles. De plus, lorsque les deux enzymes étaient manquantes, les plantes présentaient un faible taux d'oxydation des protéines et un fort taux d'anthocyanine connue pour son action antioxydante. Les auteurs ont proposé l'hypothèse d'une compensation entre les systèmes antioxydants. Chez le tabac, il a été clairement mis en évidence la mise en place de systèmes compensatoires (arrêt de la photosynthèse, induction d'oxydase homologue) lors de la double suppression de l'expression des gènes de la catalase et de l'ascorbate peroxydase. Ces systèmes alternatifs ont permis une tolérance face au stress oxydant semblable aux plantes témoins (Rizhsky et al. 2002).

Un autre élément dans la relation stress hydrique/stress oxydant est le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire. Ainsi, en tout début de stress, l'augmentation rapide de la quantité de ROS pourrait servir de signal d'alarme à la plante qui mettrait alors en place des systèmes de défense pour s'adapter aux changements environnementaux (Dat et al. 2000; Knight and Knight 2001; Vranová et al. 2002). Un des ROS les plus étudié pour son rôle dans la signalisation est le peroxyde d'hydrogène. En plus d'être le ROS le plus stable, il peut diffuser facilement d'un compartiment cellulaire à l'autre ce qui en ferait un second messenger de choix dans les cascades de signalisation. Ainsi, l'acide abscissique, produit dès le début du stress hydrique, induit une augmentation de peroxyde d'hydrogène. Chez le ciste, il a été proposé que cette production de peroxyde d'hydrogène induirait celle de l'ascorbate, et permettrait de limiter le stress oxydatif induit par le stress hydrique (Jubany-Marí et al. 2009). Des études plus approfondies sur le mécanisme de fermeture des stomates par les cellules de garde ont montré que l'acide abscissique engendrait une augmentation de peroxyde d'hydrogène à l'intérieur de la cellule. Celui-ci agirait en second messenger sur la cascade de signalisation liée au calcium permettant la fermeture des stomates (Pei et al. 2000; Kwak et al. 2003). Il a donc été proposé que l'augmentation des ROS au début d'un stress était nécessaire et bénéfique pour la mise en place des réponses cellulaires, mais qu'à trop grande concentration, ils engendreraient des dommages irréparables conduisant à la mort de la cellule (Cruz de Carvalho 2008).

III.5 Stress abiotiques et terpènes volatils

Dans cette partie nous allons nous intéresser à l'impact du stress hydrique sur la production des terpènes volatils et sur les facteurs pouvant expliquer ces variations. Nous verrons également les trois hypothèses proposées sur les rôles des terpènes dans l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques.

III.5.1 Impact du stress hydrique sur le contenu et l'émission de terpènes volatils

Les études portant sur l'impact du stress hydrique sur le contenu en terpènes sont moins nombreuses que celles portant sur l'émission. Pour la plupart, les études sur les contenus en terpènes sont à visées agronomiques et s'intéressent aux variations d'huile essentielle concernant principalement les plantes aromatiques et médicinales. Il est difficile d'en extraire des généralités à cause de plusieurs facteurs. Le premier est la diversité des méthodologies, que ce soit en termes de type de stress hydrique, de durée ou d'intensité du stress (**Tableau 6**). Par exemple, l'épicéa a été analysé dans deux études distinctes avec des méthodologies différentes : privation d'eau dans Kainulainen et al. 1992 et maintien d'un stress hydrique à intensité constante pour Turtola et al. 2003. Les deux méthodologies ont amené des résultats différents. Kainulainen et al. ont reporté une augmentation de terpènes lors du stress hydrique alors que Turtola et al. n'observent aucun effet à intensité de stress constant. A contrario, chez la sauge officinale, une espèce proche des lavandes, des études avec les deux méthodologies ont mis en évidence une augmentation de la production des terpènes volatils quel que soit l'intensité et la durée du stress hydrique (Bettaieb et al. 2009; Nowak et al. 2012). De plus, même si le protocole d'application du stress hydrique est le même, les résultats sont très dépendants de l'espèce, de l'organe et de la période de mesure (Llusià and Peñuelas 1998; Turtola et al. 2003). Même deux espèces proches comme le ciste de Montpellier et le ciste cotonneux ne réagissent pas pareil à un même stress. Le stress hydrique induit une augmentation des terpènes volatils de 90 % chez le premier alors que la production de terpènes du deuxième reste inchangée (Llusià and Peñuelas 1998). Le dernier élément expliquant la diversité de résultats obtenus provient de la quantification des terpènes. En effet, selon les objectifs de l'étude, les terpènes peuvent être extraits de manière différente : par distillation pour obtenir l'huile essentielle *sensu stricto*, ou par extraction solvant (Singh-sangwan et al. 1994; Kleinwächter et al. 2015). De plus, les résultats sont parfois exprimés en poids frais, en poids sec ou même par plante (non représenté dans le **Tableau 6**). Ceci peut engendrer des conclusions différentes (Gershenzon et al. 1978; Selmar and Kleinwächter 2013). En résumé, il est très difficile de dégager une tendance commune de l'impact du stress hydrique sur le contenu en terpènes. Cependant, plusieurs auteurs s'accordent à dire qu'un stress hydrique d'intensité moyenne aurait tendance à favoriser la production de terpènes volatils, alors qu'un stress sévère l'inhiberait (Yani et al. 1993; Niinemets 2010; Selmar and Kleinwächter 2013; Kleinwächter et al. 2015).

L'analyse de l'impact du stress hydrique sur les émissions de terpènes volatils est un domaine beaucoup plus étudié du fait de l'implication des terpènes volatils dans la chimie atmosphériques (Chameides et al. 1988; Genard-Zielinski et al. 2014). De même que précédemment, il existe une grande diversité de réponse (Sharkey and Loreto 1993; Bertin and Staudt 1996; Ormeño et al. 2007b). Dans une revue bibliographique de 2010, Peñuelas et Staudt dénombrèrent 16 résultats de recherche montrant

une augmentation de l'émission de terpènes volatils suite au stress hydrique, 34 montrant une diminution et 12 ne montrant aucun effet du stress hydrique (Peñuelas and Staudt 2010). Il est à noter que pour une même étude et une même espèce, les émissions de terpènes volatils peuvent être augmentées, diminuées ou inchangées en fonction de l'intensité du stress hydrique (Yani et al. 1993; Pegoraro et al. 2005; Monson et al. 2007; Genard-Zielinski et al. 2014). Certains travaux ont même mis en évidence des relations linéaires entre les émissions de terpènes volatils et le statut hydrique des plantes (Staudt et al. 2002; Pegoraro et al. 2004; Blanch et al. 2007). Ainsi, les émissions de terpènes volatils de *Quercus ilex* augmentent linéairement avec l'augmentation du stress hydrique alors que les émissions de *Pinus halepensis* diminuent avec l'augmentation du stress hydrique (Blanch et al. 2007). Une autre étude sur *Q. ilex* montre que la relation entre sévérité du stress hydrique et émission de terpènes est plutôt exponentielle et dans le sens de la diminution d'émission avec l'augmentation du stress hydrique (Lavoir et al. 2009). Chez *Rosmarinus officinalis*, les émissions de sesquiterpènes diminuent de manière exponentielle avec l'augmentation du stress hydrique ce qui n'est pas vrai chez les trois autres espèces analysées dans la même étude (*Cistus albidus*, *Pinus halepensis* et *Quercus coccifera*) (Ormeño et al. 2007b). Tous ces résultats montrent bien la complexité des phénomènes liants le stress hydrique et les terpènes volatils.

Même si beaucoup de recherches sont menées sur les émissions de terpènes volatils très peu d'études sont faites à la fois sur l'émission et le contenu en terpènes en condition de stress hydrique. L'application d'un stress hydrique sur *Pinus halepensis*, *Pistacia lentiscus*, *Cistus albidus* et *Cistus monspeliensis* a engendré des effets différents sur le contenu et l'émission de terpènes (Llusià and Peñuelas 1998). Pour *P. halepensis*, *P. lentiscus* et *C. monspeliensis*, le contenu en terpènes a augmenté tandis que *C. albidus* n'a montré aucune variation. Les émissions ont quant à elles été stoppées par le stress hydrique chez les quatre espèces. Les émissions de *Cupressus sempervirens* sont aussi diminuées puis stoppées avec l'application d'un stress hydrique mais, contrairement aux espèces précédentes, cela correspond bien à une diminution du contenu en terpènes (Yani et al. 1993). Une étude plus récente a mis en évidence la corrélation entre quantités de monoterpènes et sesquiterpènes émis et quantités de terpènes stockées chez 7 espèces d'arbres et 8 espèces d'herbacés (Ormeño et al. 2010) laissant penser que si une plante produit plus de composés suite à un stress, elle en émettra plus. Il est pourtant difficile de conclure sur le lien contenu-émission des terpènes lors d'un stress hydrique car les facteurs influençant l'émission ou non d'un composé d'une structure de stockage sont complexes (Niinemets et al. 2004) et que peu d'études sont disponibles.

Espèces	Traitement appliqué	Potentiel hydrique (-MPa)	Résultats	Composés modifiés	Référence
Sauge officinale <i>Salvia officinalis</i>	100 % CC pendant 2 semaines	1,2	Contrôle	Contrôle	(Bettaieb et al. 2009)
	50 % CC pendant 2 semaines	3,24	[HE] x4.5	↑ [tous les composés]	
	25 % CC pendant 2 semaines	4,57	[HE] x2.6	↑ [tous les composés]	
Origan du Mexique <i>Lippa bertandieri</i>	0.2L/pot/15j pendant 30, 60 et 90 jours	nd	Pas d'effet		(Turgut Dunford and Silva Vazquez 2005)
	0.4L/pot/15j pendant 30, 60 et 90 jours	nd			
	0.8L/pot/15j pendant 30, 60 et 90 jours	nd			
	1.2L/pot/15j pendant 30, 60 et 90 jours	nd			
Basilic <i>Ocimum basilicum</i>		0,3	Contrôle	Contrôle	(Simon et al. 1992)
	Privation eau pendant 21 jours	1,2	[HE] x2 ↓% Sesquiterpène	↑% Linalol et % methyl chavicol	
Citronelles <i>Cymbopogon nardus</i> <i>Cymbopogon pendulus</i>	1 arrosage/jour pendant 45 et 90 jours	0,7	Contrôle	Contrôle	(Singh-sangwan et al. 1994)
	1 arrosage/2 jours pendant 45 et 90 jours	1,2	[HE] ≈ et x1,3	↑ [geraniol] et [citral]	
	1 arrosage/3 jours pendant 45 et 90 jours	1,5	[HE] ≈ et x1,3	↑ [geraniol] et [citral]	
Pin d'alep <i>Pinus halepensis</i>	7 jours sans eau	nd	↑ [terpène] de 45 %	↑ [α-pinène], [β-pinène], [β-myrcène], [Δ ³ -carène], [β-phellandrène], [(+)-2-carène], [β-caryophyllène]	(Llusià and Peñuelas 1998)
Arbre à mastic <i>Pistacia lentiscus</i>	7 jours sans eau	nd	↑ [terpène] de 45 %	↑ [α-pinène], [β-pinène], [β-myrcène], [α-phellandrène], [limonène]	
Ciste de Montpellier <i>Cistus monspeliensis</i>	7 jours sans eau	nd	↑ [terpène] de 90 %	↑ [β-caryophyllène]	
Ciste cotonneux <i>Cistus albidus</i>	7 jours sans eau	nd	Pas d'effet		
Thym <i>Thymus vulgaris</i>	3 semaines à 17-20 % humidité	nd	Contrôle	Contrôle	(Kleinwächter et al. 2015)
	3 semaines à 6-10 % humidité	nd	↑ [terpènes] par 15 % ↑ [monoterpènes] par 40 %		

	6 semaines à 6-10 % humidité	nd	↓[terpènes] ↑[monoterpènes] par 40 %		
	9 semaines à 6-10 % humidité	nd	↓[terpènes] ↑[monoterpènes] par 14 %		
Sauge officinale <i>Salvia officinalis</i>	8 semaines à 25 % humidité	nd	Contrôle	Contrôle	(Nowak et al. 2012)
	8 semaines à 8% humidité	nd	↑[monoterpène] par 33 %		
Epicéa <i>Picea abies</i>	Privation eau	nd	↑[terpènes]	↑[Tricyclène], [α-pinène], [camphène]	(Kainulainen et al. 1992)
Menthe poivrée <i>Mentha x piperita</i>	Solutions à un potentiel de -0,05; -0.2; -0.4 et -0.6 MPa appliquée pendant 1 ou 2 semaines	0,25	↑[HE] avec ↑ stress hydrique à 1 et 2 semaines ↑% Sesquiterpène	↑% menthol et menthone inchangée	(Charles et al. 1990)
		0,46			
		0,65			
		0,87			
Romarin <i>Rosmarinus officinalis</i>	Quantité d'eau chez stress divisé par deux par rapport control pendant 1,5 an	nd	[Terpènes] ≈	Pas d'effet	(Peñuelas and Llusà 1997)
Menthe indienne <i>Satureja Douglasii</i>	Forte humidité (valeur nd) pendant 75 jours	1	Contrôle	Contrôle	(Gershenzon et al. 1978)
	Forte humidité (valeur nd) pendant 75 jours	1,5	[HE] ≈	↑ % isomenthone et % piperitone ↓% pulegone et % piperitenone	
Armoise annuelle <i>Artemisia annua</i>	100 % humidité pendant 9 mois	0,25	Contrôle	Contrôle	(Yadav et al. 2014)
	60 % humidité pendant 9 mois	0,27	↓ % Monoterpène dans HE		
	40 % humidité pendant 9 mois	0,33	↑ % Sesquiterpène dans HE avec ↑ stress hydrique		
Pin sylvestre <i>Pinus sylvestris</i>	26 % humidité pendant 1 an	nd	Contrôle	Contrôle	(Turtola et al. 2003)
	19 % humidité pendant 1 an	nd	↑ [monoterpène] (ns)	↑[α-pinène] et [myrcène] (ns)	
	9 % humidité pendant 1 an	nd	↑ [monoterpène] (x2)	↑[α-pinène] et [myrcène] (x2)	
Epicéa <i>Picea abies</i>	27 % humidité pendant 1 an	nd	Contrôle	Contrôle	
	18 % humidité pendant 1 an	nd	[monoterpène] ≈		
	9 % humidité pendant 1 an	nd	[monoterpène] ≈		

Tableau 6 : Revue bibliographique de l'impact du stress hydrique sur la production de terpènes volatils.

Réalisée sur des articles sélectionnés pour leur approche expérimentale rigoureuse. Les groupes contrôles ont été inclus dans le tableau afin de pouvoir comparer les différentes façons de les obtenir et le potentiel hydrique des plantes. HE : huile essentielle ; nd : non défini ; ns : non significatif ; ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; x 2 : multiplication par 2 ; [X] : quantité de X par poids de plante ; % X : pourcentage de X par rapport au total ; ≈ : pas de changement

III.5.2 Rôles possibles des terpènes volatils face aux stress abiotiques

Il a été avancé que les terpènes volatils pouvaient faire partie de la réponse de certaines plantes aux stress abiotiques afin d'améliorer leur tolérance (Holopainen and Gershenzon 2010; Loreto and Schnitzler 2010; Peñuelas and Staudt 2010). Trois hypothèses expliquant la fonction des terpènes volatils lors d'un stress abiotique ont été proposées. Ces hypothèses peuvent s'appliquer à différents stress abiotiques qui présentent des conséquences physiologiques et biochimiques similaires comme l'apparition d'un stress oxydant.

➤ **Les terpènes volatils agiraient comme des antioxydants**

Grâce à leurs doubles liaisons conjuguées, les terpènes volatils possèderaient des activités antioxydantes (Vickers et al. 2009). Des fumigations de plante avec de l'isoprène ou des monoterpènes ont permis de réduire les dommages oxydatifs créés par l'ozone (Loreto et al. 2001; Velikova et al. 2005; Calfapietra et al. 2008) et les ROS (Loreto and Velikova 2001; Affek and Yakir 2002; Velikova et al. 2004). De plus, les monoterpènes émis par le chou blanc sont capables de diminuer la quantité d'ozone présent dans des enceintes jusqu'à 25 % (Pinto et al. 2007). Mais tous les monoterpènes émis par le chou blanc ne réagissent pas avec l'ozone de la même manière. Ainsi, l' α -thujène, l' α -pinène, le sabinène, le β -pinène, le β -myrcène et le limonène sont impliqués dans la diminution de l'ozone alors que le 1,8-cinéole est inefficace.

➤ **Les terpènes volatils agiraient comme stabilisateurs membranaires**

Il a été proposé que les terpènes, de par leur hydrophobicité, pourrait interagir et stabiliser les lipides membranaires. Ainsi, des fumigations d'isoprène (Singsaas et al. 1997) et de monoterpènes (Loreto et al. 1998; Delfine et al. 2000) ont permis d'augmenter la tolérance à la chaleur chez différentes espèces de plantes (*Pueraria lobata* et *Quercus alba* L. (Singsaas et al. 1997) ; *Quercus ilex* L. (Loreto et al. 1998) et *Quercus suber* (Delfine et al. 2000)). L'explication de ce résultat résiderait dans l'action stabilisatrice des terpènes au niveau des membranes. Des études plus récentes ont clairement mis en évidence l'amélioration de la stabilité des membranes des thylakoïdes soumises à de fortes températures grâce à l'isoprène (Velikova et al. 2011; Velikova et al. 2012). De plus, des travaux de modélisation informatique des interactions entre une membrane et l'isoprène ont montré que l'isoprène peut s'intégrer à l'intérieur de la bicouche lipidique engendrant une meilleure stabilisation de la membrane durant l'augmentation de température (Siwko et al. 2007).

➤ **La biosynthèse des terpènes volatils serait une voie métabolique de secours**

La voie de biosynthèse des terpènes volatils pourrait être aussi une voie de secours pour dissiper l'énergie lumineuse capturée par la photosynthèse et ne pouvant pas être allouée à la croissance (Sanadze 2004). La plante modulerait ainsi les allocations de carbone fixé par la photosynthèse en fonction de ces besoins. Chez le peuplier, il a été montré qu'une augmentation de la concentration de CO₂ (800 et 1 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) dans l'air induisait une augmentation de la biomasse de 60 et 80 % et une diminution de la production d'isoprène de 21 et 41 % (Rosenstiel et al. 2003). Ainsi, lorsque les

conditions environnementales sont favorables à la croissance (disponibilité en carbone forte), la voie des terpènes est pénalisée en faveur de la croissance de la plante.

Il est très difficile de prouver le rôle exact des terpènes *in planta*. En effet, la production de ROS, la déstabilisation des membranes et le blocage de la photosynthèse sont des paramètres qui s'influencent l'un l'autre lors d'un stress abiotique puisque tous les stress abiotiques produisent un stress oxydatif. Il se traduit par l'apparition de ROS qui peuvent oxyder les lipides membranaires provoquant la déstabilisation des membranes. Mais ces ROS peuvent aussi altérer des molécules et enzymes du métabolisme et ainsi induire un blocage de la photosynthèse (Mittler 2002; Miller et al. 2010). Une molécule capable de canaliser les ROS permet aussi, de manière indirecte, d'améliorer la stabilité membranaire et de protéger le métabolisme. Dans ce contexte il est très difficile de déterminer à quel niveau se situe l'action des terpènes volatils.

De plus, beaucoup d'études mettent en avant le rôle des terpènes en se basant sur une meilleure ou une moins bonne tolérance à un stress en fonction de la présence/absence de terpènes volatils (soit par fumigations soit par des surexpressions/suppressions de certains gènes) (Singsaas et al. 1997; Delfine et al. 2000; Affek and Yakir 2002; Velikova et al. 2011). Mais cette notion de tolérance peut être très dépendante des paramètres mesurés. Par exemple, l'augmentation du nombre de paramètres physiologiques et biochimiques mesurés sur deux cultivars de peuplier désignés comme tolérant ou non à l'ozone a totalement remis en cause cette affirmation (Ryan et al. 2009). La question de la raison d'être des terpènes est encore en débat et certains auteurs proposent même une hypothèse « opportuniste » de leur biosynthèse (Peñuelas and Llusà 2004; Owen and Peñuelas 2005). Etant au début de la voie de terpènes « essentiels » comme les caroténoïdes ou les chlorophylles, leur production serait due au hasard. L'évolution aurait alors permis leur sélection chez certaines plantes grâce aux bénéfices qu'ils apportent.

OBJECTIFS DE LA THESE

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à caractériser les stratégies mises en place par la lavande fine face à un arrêt prolongé de l'apport en eau. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la variation de la composition en terpènes induite par le stress hydrique, en tentant de mieux comprendre les rôles adaptatifs des terpènes. En étudiant la variabilité de la composition chimique des lavandes fines sauvages et cultivées, nous avons mis en évidence différents chémotypes dont nous avons comparé les réponses physiologiques et biochimiques au stress hydrique. Ces réponses ont aussi été comparées avec des espèces proches et sympatriques. Enfin, dans le but de fournir de nouveaux outils pour tester expérimentalement le rôle des terpènes dans la tolérance au stress, nous avons caractérisé une enzyme clé de la voie du camphre.

Objectifs de la thèse :

- Caractériser la structuration de la variabilité chimique des lavandes fines sauvages et cultivées.
- Caractériser la stratégie de la lavande fine face au stress hydrique.
- Caractériser l'impact du stress hydrique sur la composition en terpènes et fournir des éléments sur le rôle adaptatif des terpènes.
- Caractériser fonctionnellement une ou des enzymes clés de la synthèse des terpènes potentiellement impliqués dans la réponse aux stress abiotiques.

68

Les différents éléments de réponse apportés par la thèse ont été structurés en trois chapitres, chacun se présentant sous la forme d'un article scientifique.

Dans le premier chapitre, j'ai poursuivi la caractérisation de la diversité génétique et chimique de la lavande fine sauvage et cultivée démarrée au laboratoire BVpam en 2010. Malgré l'importance économique et patrimoniale de la lavande en France, aucun état des lieux de la diversité n'avait été encore publié. L'échantillonnage ainsi que les analyses génétiques ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire. J'ai participé au traitement des données génétiques et je me suis attachée à caractériser la diversité chimique des inflorescences, identifier les chémotypes et comparer les résultats chimiques aux résultats génétiques. Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis à *Journal of chemical ecology* sous le titre « Chemical variation over the natural range of the true lavender ».

Le deuxième chapitre présente la caractérisation au cours du temps des réponses physiologiques et biochimiques de la lavande lors d'un stress hydrique. Le but de cette expérimentation en conditions contrôlées était triple : i) caractériser la stratégie de réponse de la lavande fine au stress hydrique ; ii) comparer la tolérance avec des espèces proches (lavande aspic et lavandin) et entre chémotypes de

lavande fine ; iii) caractériser l'impact du stress hydrique sur le contenu en terpènes et faire apparaître des corrélations entre les modifications du contenu terpénique et la tolérance des plantes. Ce chapitre fait l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction pour la revue *Plant Physiology and Biochemistry* et intitulé « Impact of water stress over time on two sympatric species of lavender and their sterile hybrid ».

Le dernier chapitre vise à mieux connaître les voies de biosynthèse des terpènes et le fonctionnement des terpène synthases en particulier. Pour cela, nous avons mené le clonage et la caractérisation fonctionnelle d'une enzyme, la bornyl diphosphate synthase. Une banque d'EST réalisée sur la lavande au laboratoire BVpam avait permis de mettre en évidence une séquence proche de celle de la bornyl diphosphate synthase de sauge (seul gène de bornyl diphosphate synthase identifié à ce jour). La caractérisation fonctionnelle a permis de mettre en évidence que cette enzyme catalyse la formation du bornyl diphosphate, précurseur du bornéol et du camphre. Ce chapitre fait l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction pour la revue *Phytochemistry* et intitulé «Bornyl diphosphate synthase from *Lavandula angustifolia*: a major monoterpene synthase involved in essential oil quality».

Il est à noter que ma participation à ces trois chapitres s'est effectuée à différents niveaux et sera précisée à chaque début de chapitre.

CHAPITRE 1 : ETUDE DE LA VARIABILITÉ CHIMIQUE ET GÉNÉTIQUE DE LA LAVANDE FINE SUR SON AIRE DE RÉPARTITION

Le premier objectif de cette thèse est d'évaluer la diversité génétique et chimique de la lavande fine sur l'ensemble de son aire de répartition. Ce travail a été initié au laboratoire dans le cadre du programme CASDAR « *Amélioration des stratégies de lutte contre le dépérissement de la lavande et du lavandin* » et devait apporter des éléments de réponse sur le réservoir de diversité chimique et génétique disponible et sur l'effet de la domestication sur ces paramètres. En effet, on sait qu'une faible diversité génétique peut engendrer des conséquences graves pour la pérennité de l'espèce ; et ceci est particulièrement vrai dans le contexte de changement climatique actuel. D'un point de vu plus pragmatique, la connaissance de la diversité génétique et chimique peut s'avérer utile pour les programmes de sélections variétales. Pour réaliser ce travail, des échantillonnages ont été menés sur 36 sites dont 18 de lavandes sauvages et 18 de lavandes cultivées. A chaque site, des prélèvements de feuilles pour le génotypage et d'inflorescences pour l'analyse chimique ont été effectués sur 20 individus sélectionnés au hasard. Lors de mon arrivée au laboratoire, l'échantillonnage et le génotypage avaient déjà été réalisés. Mon travail a donc consisté principalement en l'analyse chimique des inflorescences et la détermination de la diversité chimique sur 14 populations sauvages de lavande fine. Quatre populations de lavandes fine ont été écarté de l'échantillonnage afin d'alléger le processus d'analyse tout en conservant une bonne représentation des différentes localités. Ces recherches ont donné lieu à un article de recherche intitulé « *Chemical variation over the natural range of the true lavender* » qui a été soumis à la revue *Journal of Chemical Ecology*. Cet article vous est présenté dans la suite. Concernant le génotypage, au vue de ma participation réduite à ce travail mais de l'intérêt complémentaire des résultats, j'ai décidé de vous les présenter de manière succincte à la suite de ceux sur la chimie. En annexe 1 vous trouverez les résultats de génotypage de manière plus complète. Il s'agit d'un acte de colloque des Secondes rencontres végétales du Massif Central dont j'ai participé à la rédaction.

I. EVALUATION DE LA DIVERSITÉ CHIMIQUE DE LA LAVANDE FINE SUR L'ENSEMBLE DE SON AIRE DE RÉPARTITION

Résumé en français

La lavande fine *Lavandula angustifolia* Miller est une plante méditerranéenne cultivée en Provence pour son huile essentielle. Les inflorescences de la lavande produisent de grandes quantités de composés organiques volatils utilisés en parfumerie et en aromathérapie. Malgré l'importance économique de la lavande, peu d'études ont porté sur la diversité chimique des lavandes dans l'ensemble de leur milieu naturel. Grâce à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, nous avons analysé la composition chimique de 14 populations provenant de l'ensemble de l'aire de répartition de la lavande fine. Les plantes ont été cultivées dans les mêmes conditions environnementales afin d'analyser leur diversité chimique intrinsèque. Nous avons identifié 63 composés, ce qui représente 59 à 92 % de l'extrait total. Afin de déterminer la structure chimique, nous avons utilisé le package R DAPC (Discriminant Analysis of Principal Component). Quatre profils chimiques ont clairement été identifiés : (i) le centre de l'aire de répartition avec un profil chimique similaire aux plantes cultivées et dominé par l'acétate de linalyle, le linalol et le caryophyllène oxyde; (ii) la population du sud de l'Italie avec une forte diversité de composés et une forte concentration de 1,8-cinéole; (iii) les populations du sud du Massif Central avec une forte concentration d'acétate de linalyle et de lavandulyle, deux composés d'importance pour la qualité de l'huile essentielle; (iv) les populations pyrénéennes dominées par le linalol, le bornéol, et le 1,8-cinéole et caractérisées par la présence de pipéritone, de camphre et de p-cymen-8-ol. La répartition spatiale des profils chimiques est en accord avec la provenance des plantes. Cela suggère que les terpènes sont impliqués directement ou indirectement dans des processus adaptatifs et qu'ils peuvent conférer un bénéfice aux plantes.

CHEMICAL VARIATION OVER THE NATURAL RANGE OF THE TRUE LAVENDER

YOLANDE DESPINASSE^{*}, SANDRINE MOJA¹, CYRILLE CONORD¹, CATHERINE SOLER¹, FREDERIC JULLIEN¹,
BERNARD PASQUIER², JEAN-MARIE BESSIERE³, SYLVIE BAUDINO¹, FLORENCE NICOLE¹

* Corresponding author: yolande.despinasse@univ-st-etienne.fr

Phone: +33 4 77 48 50 41

¹Université de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire BVpam, EA2061, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42000 Saint-Etienne, France

²CNPMAI, route de Nemours, Milly La Forêt

³ENSCM, 8 Rue de l'École Normale, 34090 Montpellier

Abstract-The true lavender *Lavandula angustifolia* Miller is a Mediterranean aromatic shrub cultivated in Provence for its Essential Oil (EO). Lavender inflorescences produce large amounts of Volatile Organic Compounds (VOCs) used in perfumery and therapeutics. Despite the economic importance of the lavender market, little is known about the wild compartment and more particularly the wild intra-specific chemical diversity. Using gas chromatography coupled to mass spectrometry, we analyzed the chemical composition of 14 populations originating from the entire native range of the true lavender. Plants were grown in the same conditions in common garden to focus on the genetic component of the chemical variability. We identified 63 compounds, which represented 59 to 92% of the total extract. To explore the structure of chemical diversity, we used the R package DAPC (Discriminant Analysis of Principal Component). Four chemical profiles were clearly identified and were spatially delimited: (i) the center of the native range with a chemical profile similar to domesticated plants and dominated by linalyl acetate, linalool and caryophyllene oxide; (ii) the Southernmost Italian population with a high diversity of compounds and high abundance of 1,8-cineol; (iii) the Western populations in South of Massif Central with high abundance of valuable linalyl and lavandulyl acetates; (iv) the Pyrenean populations dominated by linalool, borneol and 1,8-cineol and characterized by the presence of piperitone, camphor and p-cymen-8-ol. This spatial repartition of chemical profiles is in accordance with actual position of plants. This suggests that adaptive processes also impact terpene.

Key Words-*Lavandula angustifolia* Miller, subspecies *pyrenaica*, terpene, DAPC, 1,8-cineol, camphor, linalool, linalyl acetate.

INTRODUCTION

The true lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) is a medicinal and aromatic plant of the Lamiaceae family. The plant grows in open, arid habitat and is endemic to a Mediterranean climate. The distribution of the species is determined by the occurrence of calcareous sedimentary rocks and schists.

Upson et al. (2004) identified two subspecies: *L. angustifolia sp angustifolia* in South of France and Italy, and *L. angustifolia sp pyrenaica* in Spanish Pyrenees. The Pyrenean lavender is characterized by broader bracts, larger flowers with a darker hue, and a felt-like indumentum of the calyx due to short highly-branched hairs.

The subspecies *angustifolia* is cultivated for its essential oil (EO) that is used in perfumery, cosmetics and therapeutics since antiquity (Cavanagh and Wilkinson 2002). *L. angustifolia sp angustifolia* has been domesticated in the early twentieth century in Provence. Seeds from wild populations in the surrounding scrublands were selected for yield and EO quality and grown in fields. Around 1950, to meet the increasing demand on lavender EO and standardize yield and composition, cultivars were created by developing softwood and hardwood cutting techniques. The standard lavender EO is rich in mono- and sesquiterpenes that are part of biogenic Volatile Organic Compounds (VOCs) (Upson et al. 2004, Guitton et al. 2010b, 2010a). The two major compounds are monoterpenes: linalyl acetate (from 30 to 46%) and linalool (from 25 to 38%). Together with lavandulyl acetate (more than 2%), these compounds are the most valuable components according to the AFNOR Norm for lavender EO (ISO 3515 2002). On the contrary, the quality of EO is depreciated if camphor and borneol exceed 0.5% each.

Despite the symbolic and economic status of lavender EO, to date, no inventory has been conducted on the chemical diversity of the wild subspecies *angustifolia*, contrary to other non-cultivated species of the genus *Lavandula* such as *L. stoechas*, *L. latifolia* and *L. multifida*. In *L. stoechas*, different studies identify a high level of variability in EO composition within wild populations collected in different areas (Crete and Greece (Skoula et al. 1996); Algeria (Benabdelkader et al. 2011)). In *L. latifolia* (Muñoz-Bertomeu et al. 2007) the chemical profiles are variable amongst geographical regions and are correlated with bioclimatic belts. Populations with high proportions of linalool are associated with supra-Mediterranean climate, while thermo-Mediterranean climate promote 1,8-cineol accumulation and low proportion of linalool. In *L. multifida*, the three chemical groups identified within 12 wild Tunisian populations do not show a clear pattern with bioclimatic or geographical regions (Chograni et al. 2010). These studies show that the main differences between chemical profiles lay in the ratio of major compounds. In all these studies however, it is not possible to disentangle the environmental influence from the genetic component of the variability in secondary metabolites composition. The ability of an organism to modify its secondary metabolites composition to handle changes in the environment is called phenotypic plasticity. The phenotypic plasticity may occur at different levels of the terpene biosynthetic pathway.

At the transcription level, environmental factors can have an influence on the functioning of terpene synthases (TPS), the enzymes responsible for terpene production. This was demonstrated in poplar *Populus spp.* where TPS activity is induced by the feeding of caterpillars (Arimura et al. 2004). The enzymatic activity of TPS can also be modified by environmental factors such as in *Quercus ilex L.*, in which monoterpenes synthases activities are inhibited when the rate of CO₂ is elevated (Loreto et al. 2001). Finally, the substrate availability may depend on metabolic regulation affected by environmental variations. In grey poplar *Populus X canescens*, Mayrhofer et al (2005) demonstrated that the availability of dimethylallyl-diphosphate (DMAPP) is controlled by circadian rhythms and thereof the fluctuations of light and temperature (Mayrhofer et al. 2005, Tholl 2006). DMAPP is the precursor of geranyl diphosphate (GPP) or farnesyl diphosphate (FPP), responsible for the synthesis of mono- and sesquiterpenes, respectively.

The variability in chemical composition can also be genetically determined. The genetic basis of chemical variability can be demonstrated using reciprocal transplants or culture in the same conditions as in a common garden. Genetic inheritance of different chemical profiles within a species introduces the concept of chemotype. A chemotype is a chemically distinct entity within the same species that might or might not be reflected in different phenotypes (Loreto et al. 2009). In *Thymus vulgaris*, six chemotypes (carvacrol, thymol, linalool, thuyanol-4, α -terpineol and geraniol) were identified and related to allelic variants using crossing experiments (Vernet et al. 1986). These six chemotypes show clear spatial segregation because two phenolic chemotypes (carvacrol and thymol) are freezing sensitive while linalool, thuyanol-4, α -terpineol and geraniol chemotypes are freezing tolerant (Thompson et al. 2003). Several studies showed the role of terpenoids in responses to abiotic stress such as light, temperature or drought in different plants (Vickers et al. 2009, Holopainen and Gershenson 2010). The exact mechanisms are not elucidated yet but terpenoids could act by controlling oxidative stress or by stabilizing membranes (Velikova et al. 2011, 2012). Despite the results of these different studies, the evolutionary and adaptive role of secondary metabolites is still debated as discussed in Bagnoli et al. (2012). It is probably due to the fact that little is known about the mechanisms by which environmental factors result in change in the production of secondary metabolites that alter a plant's fitness in the wild. Given their major roles in plant defense, pollination and survival, secondary metabolites may however be key level in adaptation.

In this study, we perform a “common garden” experiment to explore the adaptive role of secondary metabolites to the environment. We use the chemical composition of 14 wild populations of lavender as a marker of intra-specific diversity and seek for spatial structure of chemical diversity. Differential production of terpenes can reveal new insights into environmental influences. This is the first study, to date, to consider the chemical diversity of wild lavender over its native range. To identify spatial structure of chemical diversity, we performed a new unsupervised statistical approach called DAPC (Discriminant Analysis on Principal Component (Jombart 2008, Jombart et al. 2010)). This method is able to overcome the constraints of metabolomic data, finds the optimal number of chemical groups and pinpoints discriminant compounds between groups.

METHODS AND MATERIALS

Plant Sampling. The French national conservatory of fragrant, medicinal, aromatic and industrial plants (Conservatoire National des Plantes à Parfum, Médicinales, Aromatiques et Industrielles, CNPMAI) located at Milly la Forêt (France) collected seeds from 282 populations of wild lavenders (*Lavandula angustifolia* Miller) over its natural range from 1996 to 2006 to constitute an ex situ bank of wild diversity. A selection of populations was grown in common garden in similar conditions. Within this pool, we selected 14 wild populations homogeneously located within the native distribution area of the species (Upson et al. 2004), including two populations in Spain and two in Italy (Table 1, Fig. 2). Five plants from 10 to 13 years old were sampled per population. Ten full-blooming inflorescences were collected per plant and placed in paper envelopes for drying and storage before VOCs extraction. For comparison purposes with domesticated lavender, we also sampled 5 plants in 5 cultivated fields located within the main production area in the South of France (Fig. 2).

VOCs Extraction and Analysis. For each sample, 600 mg of dried inflorescences were placed in 4 mL of hexane containing 200 μ L.L⁻¹ of (Z)-3-hexenol as internal standard (Sigma-Aldrich). After an overnight incubation at 4 °C, supernatant was collected in analysis vials and stored at -20 °C until analyses could be

performed. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analyses were then performed with an Agilent 6850N GC, equipped with a 5973N mass selective detector and a DB-5 MS column (30 m \times 0.25 mm with a 0.25 μ m film-Agilent 122-5532). The initial temperature of injector and detector were at 250 $^{\circ}$ C and 260 $^{\circ}$ C respectively. The gas carrier was helium at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. The injection volume was 2 μ L with a split ratio of 5:1. The oven's initial temperature was maintained at 40 $^{\circ}$ C during 6 min after injection; then ramped at 1 $^{\circ}$ C.min⁻¹ to 60 $^{\circ}$ C, 2 $^{\circ}$ C.min⁻¹ to 140 $^{\circ}$ C and 12 $^{\circ}$ C.min⁻¹ to 240 $^{\circ}$ C. The oven temperature would finally remain at 240 $^{\circ}$ C for 5 minutes. The preprocessing of GC-MS analyses was performed with the R package MSeasy (Nicolè et al. 2012) which detects putative compounds in complex metabolic mixture. In brief, all mass spectra of all 65 samples were computed in one matrix. Unsupervised hierarchical clustering was then performed to group similar spectra into one cluster. We visually checked the correspondence of each cluster to a putative molecule and merged or split these when needed. A relative area for each compound was calculated by correcting for differential evaporation during sample handling using the internal standard. Identification of compounds is ultimately based on the comparison of retention time and mass spectra to commercial standards when available. Identification is otherwise performed by using reference libraries of mass spectra (Johnston 1989) and retention indices (i.e. Kovats indices (Adams 2007)) calculated with retention time of n-alkanes C8-C20 (Fluka). For quantification purposes, we first verified the quasi perfect linearity between the range of concentration from 0 to 300 mg dry inflorescence per mL and the areas of peaks ($r^2=0.999$). We secondly checked for machine repeatability by analyzing five samples thrice, and find 100% repeatability for the number of peaks and 99.5% for peak areas.

Post-processing of GC-MS Analyses. Based on our final matrix with individuals in rows and compounds in columns, our first aim was to find a structure among the individuals based on their chemical compositions without labeling the data (no information about geographical localization and population group is taken into account). The data of chemical composition however usually present multicollinearity because the synthesis and production of one compound is not independent of others. Furthermore, classical statistical methods require the number of variables (compounds) to be less than the number of observations (individuals) which is rarely the case with metabolomic data. The Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC, (Jombart et al. 2010)) overcomes these constraints and allowed us to perform unsupervised and untargeted analysis. DAPC can be applied to very large datasets of any quantitative data and is implemented in the package adegenet (Jombart and Ahmed 2011). It is a multivariate method that uses Principal Component Analysis (PCA) as a prior step to Discriminant Analysis (DA). This approach ensures that variables submitted to DA are perfectly uncorrelated, and that their number is less than that of analyzed individuals. DAPC uses sequential K-means and model selection with Bayesian Information Criterion (BIC) to infer the optimal number of clusters. We therefore first ran DAPC to define and describe clusters of chemically related individuals (function find.clusters, (Jombart et al. 2010). Discriminant analysis was then ran thereafter on the optimal number of clusters to determine the nature of clusters and to identify discriminant compounds (function dapc). The model of DAPC was finally evaluated by repeated stratified cross-validation (function xvalDapc). All statistical analyses were performed on R 2.15.0 version (CRAN R project).

RESULTS

Global Composition and Amount of VOCs. The final quantitative matrix contains 65 individuals from 14 wild populations and 63 compounds (Supplemental data A1, Table 1). The mean number of analyzed plants per population is 4.6 (range from 3 to 5). The identified compounds represent more than 70% of the total abundance for 12 populations out of 14. In the two remaining populations Fam and Ica, the identified compounds total 59% and 67% respectively. These two populations have the lowest and the highest total abundance of VOCs (0.8 and 35.2, Table 1; Kruskal-Wallis chi-squared= 48.4, df=13, P=5.5.10⁻⁶ overall populations) together with the lowest and the highest number of compounds (10.7 and 55.2, Table 1; Kruskal-Wallis chi-squared= 54.4, df=13, P=5.0.10⁻⁷ overall populations). In the case of the poorest population Fam, peaks are very small and not well defined. For the highly diverse and rich population Ica, certain compounds cannot be named with confidence. Over all of the populations, the bouquet of VOCs is mainly composed of monoterpenes (range from 48 to 86% of the total amount, Table 1) and secondarily sesquiterpenes (range from 4 to 17%, Table 1). For the two rates, no significant difference exists among wild populations, and between wild populations and cultivated plants.

Pop	N	Long (DD)	Lat (DD)	Altitude (m)	%Identified	%Mono	%Sesqui	Total amount	Number of compounds
Fahp	5	6.6	44.17	1400	83.4±10.9	73.2±14.1	6.9±3	1.4±0.7	29.6±5.2
Fam	3	7.08	43.76	772-800	59±18.5	48.4±17	9±3.1	0.8±0.3	10.7±2.3
Fav	5	5.45	43.9	450-600	92±3.8	78.4±8.5	12.1±6	4.5±4.7	32±9.8
Fbdr	3	5.66	43.32	725-800	71±4.1	53.3±9.6	17±13.2	2.4±1.1	22.3±3.1
Fdr	5	5.09	44.85	590-600	72.4±9.9	65.6±9.4	5±2.8	1.3±1	17.6±5.2
Fha1	4	6.69	44.93	1450-1600	77.8±16.4	70.3±18.9	6±3	2.3±1.9	21.8±6
Fha2	5	5.94	44.06	755-800	92.7±3.1	78.5±7.1	11.9±3.5	2.3±1.3	29±7.7
Fha3	5	5.85	44.12	1635-1800	80.9±7.1	67.7±9.8	10.8±3.6	1.2±0.6	27.2±7.8
Flot	5	1.53	44.95	250-400	88.7±7.3	77.6±9.1	6.8±2.4	7.4±3.5	41±7.6
Floz	5	3.37	44.22	980-1000	92±7.6	85.8±9	4.1±1	16±8.1	39±7.4
Ica	5	16.05	39.9	1150-1200	66.7±12.3	58±11.9	8.2±1.1	35.2±9.2	55.2±0.8
Ipi	5	7.23	44.34	1275-1400	74.5±10.1	66.3±8.6	4.8±1.6	1.1±0.4	13.4±1.5
Sar1	5	0.21	42.57	1000	88.5±2.4	79.7±4.3	7.5±3	12.8±3.9	48.4±2.9
Sar2	5	-0.55	40.51	1450-1600	84.4±2.7	76.8±3.9	5.1±1.4	5.4±2	43±2.5
Cult	25	-	-	-	83±9.1	70±12.1	10.7±4.8	1.1±0.6	29.1±7.9

Table 1 Characteristics of the 14 wild lavender populations (pop) and the cultivated populations (cult). The number of samples analyzed (N); Original localization: Longitude (Long), Latitude (Lat) in decimal degree (DD) and range of altitudes in meter (m); the mean percentage of identified compounds (%Identified), of monoterpenes (%Mono) and of sesquiterpenes (%Sesqui) ± standard deviation; the total amount of extracted compounds (total area relative to internal standard) as well as the total number of compounds ± standard deviation. The code of population are as follow: major letter for country (F: France, S: Spain, I: Italy); minor letter for local area (ar: Aragon, lot: Lot, loz: Lozere, av: Aveyron, dr: Drome, ha: Hautes-Alpes, bdr: Bouche-du-Rhone, am: Alpes-Maritimes, ahp: Alpes-de-Hautes-Provence, pi: Piemont, ca: Calabre) and Cult for cultivated lavender.

Unsupervised Identification of Chemical Profiles and Discriminant Analysis. In order to identify a structure among the sampled plants based on their chemical composition, we ran the unsupervised clustering method integrated in DAPC (Jombart and Ahmed 2011). The optimal number of clusters was detected by running K-means with increasing values of cluster on the new coordinates of a centered and scaled PCA. For each value of cluster, a Bayesian Information Criterion (BIC) measuring the goodness of

fit of the model was computed. We tested different number of principal components (PC). We found in our data that the optimal number of clusters and the composition of clusters are constant, whatever the number of retained PC once total inertia reaches more than 70% (i.e. for 3 or more PC retained). The optimal number of clusters that maximized the inter-group variance and minimized BIC was found to be 4. Thereafter, the discriminant analysis was applied on these 4 groups. The original data was once again submitted to a centered and scaled PCA. At this step, retaining too many components can lead to overfitting and instability in the membership probabilities (Jombart et al. 2010). Thus, three PCs were retained to represent approximately 70% of the variation in the original data. The new coordinates of the individuals on the retained PCs were analyzed by discriminant analysis (DA) using the optimal number of clusters. Stratified cross-validation using a ratio of 2:1 for training and validation sets with 1000 repetitions gives 97% of good assignment with two discriminant axes. Using the loadingplot function, five compounds were identified as the most discriminant according to their contribution on the two discriminant axis: piperitone, linalyl acetate, p-cymen-8-ol, camphor and borneol. Fig. 1a shows a graphical representation of the discriminant model. The first axis isolates cluster 4 from other clusters while second axis separates the cluster 1, 2 and 3. Cluster 4 is composed of the 5 samples originating from the isolated Calabrese population (Ica), at the southern limit of the sub-species range. No specific compounds discriminate this population from the three other clusters but it's overall chemical profile differed with the highest number of compounds (55.2 vs 47.0 for cluster 2, 40.9 for cluster 1, 23.4 for cluster 3, Kruskal-Wallis chi-squared= 43.5, df=3, P<0.0001) and the highest amount of compounds (35.2 vs 12.1 for cluster 1, 10.4 for cluster 2 and 1.7 for cluster 3, Kruskal-Wallis chi-squared= 46.2, df=3, P<0.0001). On the second axis, cluster 1 is characterized by a high abundance of linalyl acetate and low amount of piperitone, p-cymen-8-ol, borneol and camphor. Linalyl acetate is the major compound of cluster 1 and reaches more than 40% of the total compounds (Fig. 1b). Interestingly, the third major compound of cluster 1 is the lavandulyl acetate. Opposite to cluster 1 on the second axis, cluster 2 is rich in piperitone, p-cymen-8-ol, borneol and camphor. Borneol is the second major compound with 8.5 % while linalyl acetate is not in the three major compounds as commonly observed in true lavender (Upton et al. 2004, Guitton et al. 2010b). Cluster 2 shows a clear distinct chemical profile dominated by linalool and borneol. Cluster 3 is intermediate between clusters 1 and 2. Its chemical composition is very similar to the typical chemotype of cultivated lavender (Fig. 1b) with linalyl acetate and linalool as the two major compounds. With 41 samples, cluster 3 is the largest cluster but also the most homogeneous with the lowest intra cluster variability.

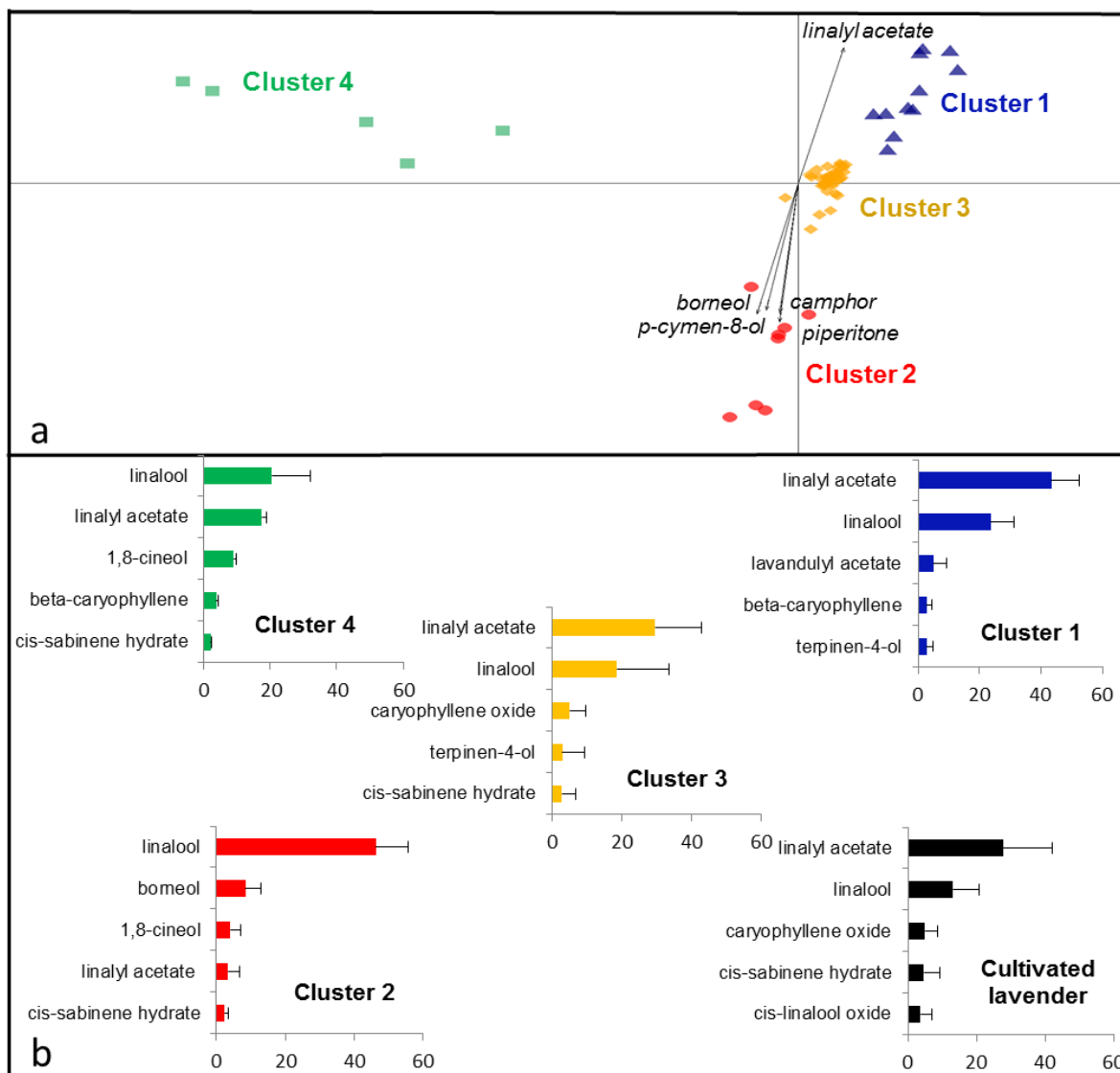


Fig.1 (a) Discriminant analysis based on the chemical composition of 65 individuals of wild lavender. The arrows indicate the most discriminant compounds. The different symbols materialized clusters. (b) For each cluster and for cultivated lavenders, the relative percentage of the total amount of secondary metabolites is represented for the five major compounds.

Spatial Structure of the Four Chemical Profiles. When we map the four identified clusters, a clear geographical pattern comes into view (Fig. 2). Cluster 4 is only composed with individuals from Ica population in the South of Italy. Cluster 2, the linalool-borneol chemotype, corresponds to the Pyrenean and Spanish populations (all individuals of Sar1 and 3/5 individuals of Sar2). Cluster 1, the chemical profile rich in lavandulyl and linalyl acetate, is present in populations in the south of Massif Central in France (all plants from Flot, 4/5 of Floz and 2/5 of Fav). Cluster 3 with similar chemical composition to cultivated lavenders is found in all populations located in the center of lavender native range (Fdr, Fha1, Fha2, Fha3, Fbdr, Fam, Fahp, Ipi). Two individuals from the Spanish population Sar2 and four from the south of Massif Central (1/5 Floz and 3/5 Fav) are also assigned to the cultivated-like cluster 3 because they showed very low chemical profiles with low amount of VOCs. The cluster 3 has significantly the

lowest amount of VOCs (Kruskal-Wallis, chi-squared=46.2, df=3, $P < 0.0001$). In a global study, (Martin 2001) studied the yield and content of EO in the CNPMAI collection of wild lavenders. This study confirms our result with populations from the south of Massif Central experiencing the significantly highest content of EO per 100 g of dried inflorescence (4.3 mL/100 g for south of Massif Central vs 3.1 for centre of native range). The yield is however, not significantly different between populations from the centre of the native area and populations from the south of Massif Central (respectively 1.31 and 1.34 mL/plant). This result indicates that individuals from cluster 3 are larger than individuals from the south of Massif Central. When correlating latitude, longitude and altitude with discriminating compounds and major compounds, a negative and significant correlation is found between linalool, 1,8-cineol, borneol, piperitone, camphor and p-cymen-8-ol with latitude and longitude. In the case of 1,8-cineol, all southern populations in Spain, Pyrenees and South of Italy has the highest amount. For other compounds, the correlations with latitude and longitude are due to their specific presence in the isolated Pyrenean chemotype. Only camphor was positively correlated with altitude (Spearman $\rho = 0.26$, $S = 33659$, $P = 0.03$).

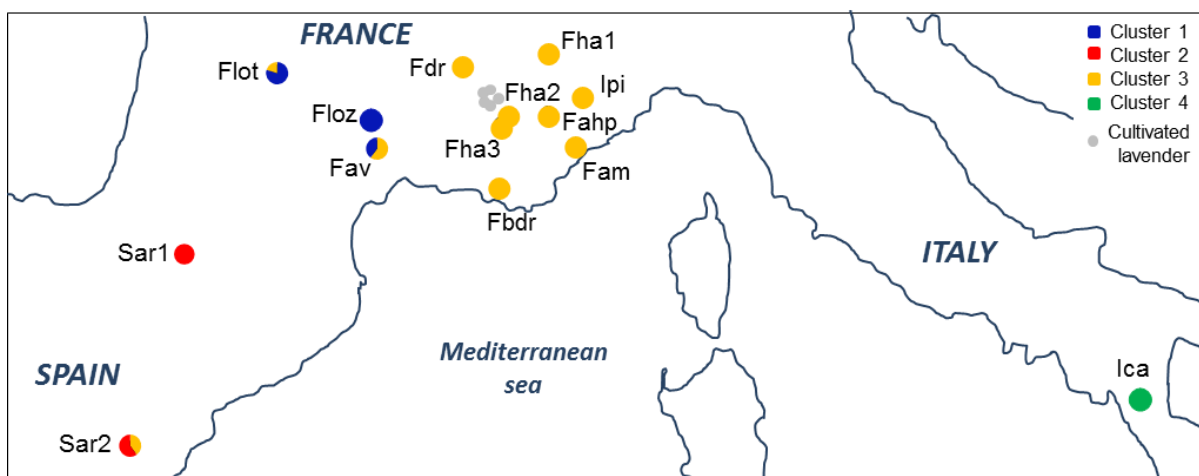


Fig. 2 Geographical repartition and the cluster membership for each individual of the 14 studied wild lavender populations. Cultivated lavender is also represented.

DISCUSSION

The composition in secondary metabolites of 65 samples originating from 14 populations from the native range of the subspecies *L. angustifolia sp angustifolia* was used as intra-specific markers of diversity. We found variability in the chemical profiles with significant differences for the quantity and the number of compound and also for the total amount of VOCs between populations. The proportion of monoterpenes and sesquiterpenes is conserved among populations and is similar to the literature reviewed (An et al. 2001, Shellie et al. 2002). To identify the spatial structure of chemical diversity, we performed an unsupervised statistical approach called DAPC (Discriminant Analysis on Principal Component, (Jombart 2008, Jombart et al. 2010)) which combined a principal component analysis and a discriminant analysis successively. DAPC integrates the two steps in one process and assists in choosing the optimal number of PC to retain for DA. Following individuals attribution to groups, classical supervised analyses can be performed which includes Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA) that is commonly used for metabolomic data. In our case, discriminant analysis based on principal components provides

more biologically meaningful results than PLSDA and results of DAPC prove to be more robust to changes in model parameters (number of retained PC). Four clusters with distinct chemical compositions and separated spatial distribution were identified: i) a traditional linalool/linalyl acetate profile very similar to the one found in cultivated plants (cluster 3) and located in the center of the native range; ii) a Pyrenean profile rich in linalool and borneol (cluster 2); iii) an Italian chemical profile rich in 1,8-cineol and highly diverse in VOCs (cluster 4); iv) a chemical profile extremely rich in linalyl and lavandulyl acetates in the south of Massif Central (cluster 1).

Cluster 2 includes almost all plants of the two populations in Pyrenees and corresponds to *Lavandula angustifolia sp pyrenaica*. The chemical profile is dominated by linalool, borneol, 1,8-cineol and camphor and appears to be closer to the chemical composition of the Spike lavender *Lavandula latifolia* Medik (1,8-cineol/camphor/linalool; (Herraiz-Peñalver et al. 2013)) than to the chemical composition of the subspecies *L. angustifolia sp angustifolia* (linalyl acetate/linalool/caryophyllene oxide; (Guitton et al. 2010a)). This finding is in accordance with recent phylogenetic study in the genus *Lavandula* using plastidial marker (Moja et al. 2015). The authors found that *L. angustifolia sp pyrenaica* was genetically more related to *L. latifolia* than *L. angustifolia sp angustifolia* and suggests treating *L. angustifolia sp pyrenaica* as a separate species. Moreover, the occurrence of the two subspecies *L. angustifolia sp angustifolia* and *L. angustifolia sp pyrenaica* is described as mutually exclusive while *L. angustifolia sp pyrenaica* and *L. latifolia* overlap (Upson et al. 2004), suggesting possible gene flow.

Cluster 4 is the southernmost population of *Lavandula angustifolia*, in southern Italy. Using compounds as markers indicates an important differentiation from all other populations on the first axis of PCA (44% of total inertia). This result is effectively confirmed by genetic data (Conord et al. 2012) and suggests the absence of gene flow and local adaptation. The Calabrese population appears to be a relict that has been isolated for some time. Médail and Diadema (2009) indicated that the South of Italy was a glacial refugia during Pleistocene climatic cycles which led to isolated populations. Furthermore, the high variability within the five sampled plants of Calabre could be explained by the high number and total amount of compounds within the cluster. Similarly to the Pyrenean populations, the important genetic and chemical differentiations of the Calabrese population raise the question of its subspecies status.

All populations in the center of the native range around Provence express the typical chemotype of the cultivated lavenders. The chemical profiles are extremely homogeneous despite the important number of individuals, indicating important gene flow within the central area (Conord et al. 2012). The similarity to the crop plants could be explained by the fact that domestication took place very locally from the wild reservoir. Domesticated lavenders probably originated by selecting seeds from wild populations and the culture of lavender was mainly located where the species were abundant, namely in the center of the native range. Surprisingly, the content of EO by dry weight unit is the lowest for these populations but the large size of the plants compensates and the yield per plant was similar to other populations (Martin 2001).

Our study highlights an interesting chemical profile for the production of high quality essential oil. Indeed, in cluster 1, the most valuable compounds linalool, linalyl and lavandulyl acetate sum up to 70.5% on average (while it was only 43.9% in cultivated plants and should be maximized according to the AFNOR standard). Moreover, the chemical profile of cluster 1 matches the other requirements of the AFNOR standard (ISO 3515 2002): low proportion of camphor (less than 0.5%) and 1,8-cineol (less than 1%). Constituted by populations from Lot, Lozere and Aveyron, cluster 1 appears to be promising for future breeding programs to improve the quality of EO. The production of lavender EO in this region exists and has a good reputation for its high quality EO (Nathalie Moulin, GIE plante infuse, personal

communication). However, to date, this production is anecdotal compared to the tonnage of essential oil obtained in the central area.

The adaptive role of VOCs and particularly terpenoids to environmental changes are still not very clear even if different authors show their implications in many ecological processes such as pollinator attraction (Gershenzon and Dudareva 2007) or tolerance to abiotic stresses (Vickers et al. 2009, Holopainen and Gershenzon 2010). By performing a common garden experiment, we explore the genetic component of chemical diversity. We found that the southernmost populations have the highest content in 1,8-cineol. Similar results were found in *L. latifolia* in Spain (Muñoz-Bertomeu et al. 2007). Muñoz-Bertomeu et al. (2007) found that warmer and drier climates favor the accumulation of 1,8-cineol in plants, while fresher climates favor linalool. Populations in intermediate climate are likely to have intermediate levels of 1,8-cineol and linalool. In another study on *L. latifolia*, Herraiz-Peñalver et al. (2013) found that linalool and camphor contents are inversely correlated and that camphor contents increased at low altitude. In our study, we found the opposite result with a significant but tenuous positive correlation between camphor and altitude. The high level of camphor is associated to the subspecies *pyrenaica* located at high altitude in the Pyrenees. Together with the low R^2 (Spearman $\rho=0.26$), this result urges caution to avoid misinterpretation.

In the context of climate change, pinpointing compounds potentially involved in plant tolerance to high temperature, high light, or water stress is of particular interest. In the case of *Thymus vulgaris*, climate change has already modified the repartition of the six chemotypes. Freezing sensitive chemotypes (carvacrol and thymol) are now present in populations that were exclusively composed of freezing tolerant plants 30 years prior (linalool, thuyanol-4, α -terpineol and geraniol chemotype) due to climate warming (Thompson et al. 2007). Our study highlights camphor, linalool and 1,8-cineol as interesting compounds to study lavender adaptation. Further analyses are needed to demonstrate the implication of these terpenes in the adaptation to environmental factors. Very few studies have experimentally demonstrated the action of terpenoids in response to abiotic stress. Delfine et al. (2000) and Singsaas (2000) used fumigation of plants with terpenes to demonstrate their role in thermotolerance. The use of experimental approaches in controlled conditions should be developed in the future to establish causal links and elucidate the exact mechanisms by which terpenes act as a response to abiotic factors.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was funded by the fund for agricultural and rural development and targeted research (CASDAR). We are grateful to Romain Laneyrie, Nicolas Boyer, Philippe Moja, Méluzine Godin, Sarah Martineau for their help in plant sampling. We also thank Cédric Yvin (ITEIPMAI) and Eric Chaisse (CRIEPPAM) for their technical contributions and expertise. We thank Mark H Van Niekerk for his kind help in English correction of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCE

- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography - mass spectrometry. Allured Publ. Corporation, Carol Stream (Ill.)
- An M, Haig T, Hatfield P (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.
- Arimura G, Huber DPW, Bohlmann J (2004) Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (–)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *Plant J* 37:603–616.
- Bagnoli F, Fineschi S, Loreto F (2012) Volatile isoprenoids and abiotic stresses. In: *The Ecology of Plant Secondary Metabolites*. Cambridge University Press.
- Benabdelkader T, Zitouni A, Guitton Y, et al (2011) Essential Oils from Wild Populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Composition, Chemical Variability, and in vitro Biological Properties. *Chem Biodivers* 8:937–953.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM (2002) Biological activities of Lavender essential oil. *Phytother Res* 16:301–308.
- Chograni H, Zaouali Y, Rajeb C, Boussaid M (2010) Essential Oil Variation among Natural Populations of *Lavandula multifida* L. (*Lamiaceae*). *Chem Biodivers* 7:933–942.
- Conord C, Despinasse Y, Moja S, et al (2012) Menaces sur l’or bleu – étude de la diversité génétique des lavandes fines sauvages et cultivées. Actes des secondes rencontres végétales du Massif Central, Limoge.
- Delfine S, Csiky O, Seufert G, Loreto F (2000) Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytol* 146:27–36.
- Gershenson J, Dudareva N (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* 3:408–414.
- Guitton Y, Nicolè F, Moja S, et al (2010a) Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiol Plant* 138:150–163.
- Guitton Y, Nicole F, Moja S, et al (2010b) Lavender inflorescence. *Plant Signal Behav* 5:749–751.
- Herraiz-Peñalver D, Cases MÁ, Varela F, et al (2013) Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil from Spanish wild populations. *Biochem Syst Ecol* 46:59–68.

Holopainen JK, Gershenzon J (2010) Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci* 15:176–184.

ISO 3515 (2002) Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.).

Johnston C (1989) The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data, Volumes 1-7 (McLafferty, Fred W.; Stauffer, Douglas B.). *J Chem Educ* 66:A256.

Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24:1403–1405.

Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* btr521.

Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet* 11:94.

Loreto F, Bagnoli F, Fineschi S (2009) One species, many terpenes: matching chemical and biological diversity. *Trends Plant Sci* 14:416–420.

Loreto F, Fischbach RJ, Schnitzler J-P, et al (2001) Monoterpene emission and monoterpene synthase activities in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex* L. grown at elevated CO₂ concentrations. *Glob Change Biol* 7:709–717.

Martin E (2001) Evaluation de populations de lavandes et de clones de lavandin a des fins de sélection. Université d'Anger.

Mayrhofer S, Teuber M, Zimmer I, et al (2005) Diurnal and Seasonal Variation of Isoprene Biosynthesis-Related Genes in Grey Poplar Leaves. *Plant Physiol* 139:474–484.

Médail F, Diadema K (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *J Biogeogr* 36:1333–1345.

Moja S, Guitton Y, Nicolè F, et al (2015) Genome size and plastid trnK-matK markers give new insights into the evolutionary history of the genus *Lavandula* L. *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol* 0:1–9.

Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Segura J (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.

Nicolè F, Guitton Y, Courtois EA, et al (2012) MSeasy: unsupervised and untargeted GC-MS data processing. *Bioinforma Oxf Engl* 28:2278–2280.

Shellie R, Mondello L, Marriott P, Dugo G (2002) Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr A* 970:225–234.

- Singsaas EL (2000) Terpenes and the thermotolerance of photosynthesis. *New Phytol* 146:1–2.
- Skoula M, Abidi C, Kokkalou E (1996) Essential Oil Variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Growing Wild in Crete (Greece). *Biochem Syst Ecol* 24:255–260.
- Tholl D (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 9:297–304.
- Thompson JD, Chalchat J-C, Michet A, et al (2003) Qualitative and Quantitative Variation in Monoterpene Co-Occurrence and Composition in the Essential Oil of *Thymus vulgaris* Chemotypes. *J Chem Ecol* 29:859–880.
- Thompson JD, Gauthier P, Amiot J, et al (2007) Ongoing adaptation to mediterranean climate extremes in a chemically polymorphic plant. *Ecol Monogr* 77:421–439.
- Upton T, Andrews S, Royal Botanic Gardens K (2004) *The Genus Lavandula*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey.
- Velikova V, Sharkey TD, Loreto F (2012) Stabilization of thylakoid membranes in isoprene-emitting plants reduces formation of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* 7:139–141.
- Velikova V, Várkonyi Z, Szabó M, et al (2011) Increased Thermostability of Thylakoid Membranes in Isoprene-Emitting Leaves Probed with Three Biophysical Techniques. *Plant Physiol* 157:905–916.
- Vernet P, Gouyon RH, Valdeyron G (1986) Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica* 69:227–231.
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat Chem Biol* 5:283–291.

II. EVALUATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE LA LAVANDE FINE

L'analyse de la structuration de la diversité chimique nous a permis de mettre en évidence quatre chémotypes bien distincts qui correspondent aussi à des provenances géographiques différentes. Afin de savoir si ces différences chimiques sont aussi supportées par des différences génétiques, nous avons analysé leur structuration génétique. Nous avons utilisé le jeu de données obtenu par empreinte génétique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et l'avons restreint aux individus utilisés précédemment. La matrice de présence/absence des 206 marqueurs a été analysée en coordonnées principales après calcul des distances de Jaccard.

Matériels et méthodes. Le génotypage a été réalisé grâce à la technique d'empreinte génétique AFLP (Vos et al. 1995). L'ADN total de feuille a été extrait avec le kit d'extraction « DNeasy 96 extraction kit » de QUIAGEN selon les instructions du manuel. La procédure d'AFLP a été faite avec les enzymes de restriction EcoRI et MseI conformément au protocole décrit dans (Gaudeul et al. 2000; Nicolè et al. 2007). Trois couples d'amorces indépendantes ont été sélectionnées en fonction de la lisibilité, de l'homogénéité de la répartition des fragments et de la répétabilité. Au total, nous avons obtenu 206 marqueurs avec un taux de répétabilité de 100 % (GeneMapper (Applied Biosystems), Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems)). Les fragments ont été séparés par électrophorèse (ABI Prism 3100 DNA sequencer ; Applied Biosystems, Foster City, California) et analysés en fonction de leur présence (noté 1) ou absence (noté 0). Ainsi pour chaque individu nous avons obtenu une série de 0 et de 1 pour chaque individu. A partir de cette matrice nous avons réalisé une analyse en coordonnées principales basée sur les distances de Jaccard. Ces analyses statistiques ont été effectuées sur R (version 2.15) avec le package ad4 (Dray and Dufour 2007).

Résultats. La figure 3a présente la structuration génétique de tous les individus. Chaque point correspond à un individu et la couleur traduit son appartenance à l'un des quatre chémotypes. On peut voir que les chémotypes 1 et 3 sont très proches alors que les chémotype 4 et 2 sont très différents et bien individualisés. Avec le chémotype 2, on retrouve les deux plantes pyrénéennes classées avec le chémotype 3 mais qui sont donc génétiquement plus proches de celles du chémotype 2. Ces deux plantes ont été enlevées lors de l'analyse de la structuration génétique des chémotypes 1 et 3 (Fig. 3b). Contrairement à la chimie, l'analyse génétique ne permet pas de bien différencier les plantes du chémotypes 1 et 3 (encart de la Fig. 3b) même si les plantes du chémotype 1 sont plutôt localisées sur la gauche du graphique. La classification des individus par population montre que la diversité génétique est très faible entre les populations et que la diversité génétique des lavandes de population cultivées n'est pas plus faible que celle des lavandes sauvages. En conclusion de ces résultats nous pouvons dire que les résultats de la structuration de la diversité chimique et génétique sont en adéquation même si les différences génétiques entre les chémotypes 1 et 3 ne sont pas aussi marquées que pour la chimie. De

plus, même si le nombre d'individus a été réduit pour ces analyses, les résultats sont identiques à ceux obtenus sur l'échantillonnage complet (annexe 1).

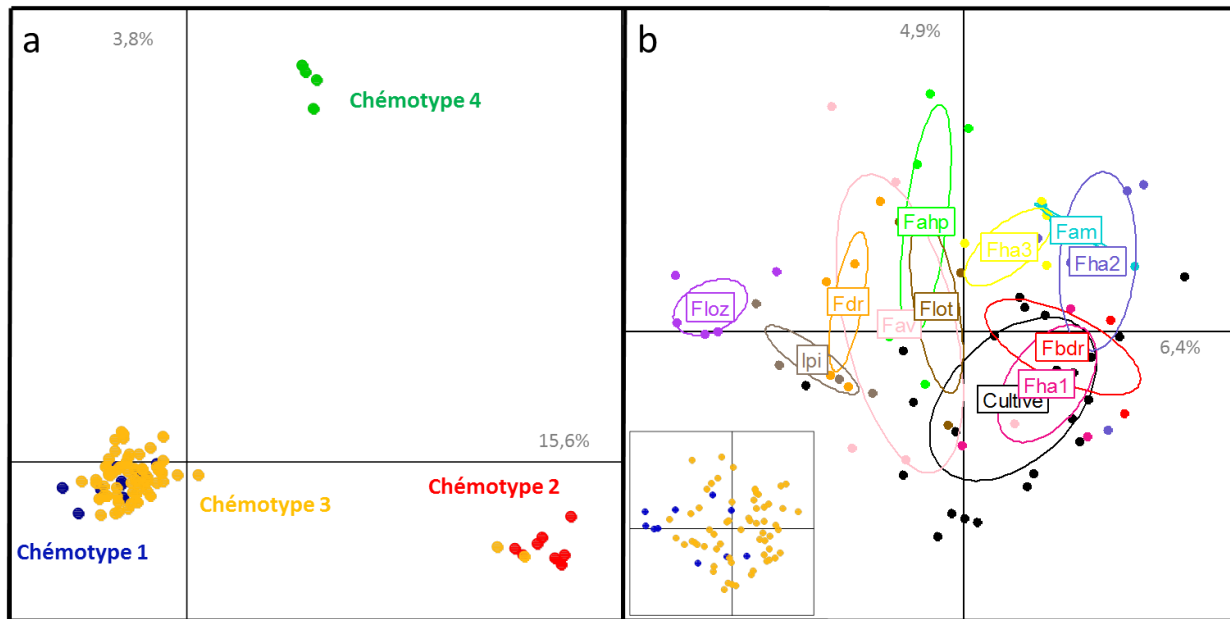


Fig. 3 Structuration de la diversité génétique de la lavande fine. Les deux graphiques sont le résultat d'analyses en coordonnées principales basées sur les distances de Jaccard. Les pourcentages d'inertie expliquée sont indiqués pour chaque axe. a) Structuration de la diversité génétique des quatre chémotypes de lavande et b) Structuration de la diversité génétique des chémotypes 1 et 3 représentée en fonction des populations dans le graphique principal et des chémotypes dans l'encart (chémotypes 1 (bleu) et 3 (orange)).

CHAPITRE 2 : CARACTÉRISATION DE L'IMPACT DU STRESS HYDRIQUE SUR LES LAVANDES

Dans ce chapitre nous avons cherché à comparer les réponses au stress hydrique de la lavande fine, la lavande aspic (*Lavandula latifolia* Medik.) ainsi que leur hybride stérile, le lavandin (*Lavandula x intermedia*) très utilisé pour la production d'huile essentielle. La lavande aspic se répartit naturellement plus au sud que la lavande fine et à plus basse altitude tandis que le lavandin se retrouve dans les zones de recouvrement de ces deux espèces parentes. La question se posait donc de savoir si ces trois taxa réagiraient de la même manière ou non au stress hydrique. De plus, la lavande aspic présente une chimie très différente de la lavande fine alors que la chimie de l'hybride est intermédiaire. Etant donné que les terpènes peuvent être impactés par le stress hydrique et qu'ils peuvent potentiellement être impliqués dans les mécanismes de réponse au stress, il nous semblait intéressant d'inclure l'analyse des terpènes dans l'étude. Nous avons aussi décidé d'évaluer la réponse au stress hydrique au sein des différents chémotypes mis en évidence dans le chapitre 1. Cela permettait d'évaluer au mieux la diversité de réponse au stress hydrique au sein des lavandes fines et de mettre en évidence des sensibilités potentiellement différentes pouvant être liées ou non avec leur provenance et leur chimie. Pour réaliser ces expériences, nous avons décidé d'appliquer un arrêt de l'apport en eau afin de se rapprocher de ce qui se passe lors d'une sécheresse. Cette expérimentation s'est étalée sur 18 jours car nos expériences préliminaires nous ont montré qu'après cette période la grande majorité des paramètres mesurés ne variaient plus. Les résultats de ces expériences sont regroupés sous forme d'article scientifique que nous prévoyons de proposer à la revue « Plant Physiology and Biochemistry ». Pour ces travaux ma participation est allée de la mise en place du protocole à la rédaction de l'article en passant par la réalisation des échantillonnages et des expérimentations.

Résumé en français

Le milieu méditerranéen est caractérisé par des étés chauds et secs ce qui le rend très sensible au réchauffement climatique engendrant une augmentation de la fréquence et de l'intensité des sécheresses. Produisant de grandes quantités d'huile essentielle riche en mono- et sesquiterpènes, les lavandes sont des plantes bien adaptées au climat méditerranéen. Cependant, le déclin des populations de lavande françaises à cause de la maladie du dépérissement est aggravé par les épisodes de sécheresse. Pour mieux comprendre les conséquences d'un stress hydrique sur les lavandes, nous avons réalisé des expériences de stress hydrique par arrêt de l'approvisionnement en eau sur des lavandes d'un an. Nous avons comparé l'évolution physiologique, biochimique et chimique de deux espèces de lavandes, la lavande fine (*Lavandula angustifolia* Mill.), la lavande aspic (*Lavandula latifolia* Medik.) et de leur hybride stérile le lavandin (*Lavandula x intermedia*). La variabilité intraspécifique de réponse au stress hydrique a aussi été évaluée chez la lavande fine. Pour cela, quatre populations de lavandes fine ont été sélectionnées. Elles appartiennent au quatre chémotypes indentifiés grâce à la chimie de leurs inflorescences. Elles représentent aussi très bien la diversité géographique et génétique de la lavande fine sur l'ensemble de son aire de répartition (sud du Massif Central, Pyrénées, sud de l'Italie et Hautes-Provence). Les résultats montrent que le lavandin est plus rapidement et à plus faible intensité de stress impacté par le stress hydrique. La lavande fine par contre, a montré une stratégie d'économie d'eau basée sur une fermeture rapide des stomates et une forte synthèse de proline. Cette stratégie lui permet de maintenir son contenu en eau (RWC) et l'intégrité de son photosystème jusqu'à un faible potentiel hydrique (-4 MPa). La comparaison des quatre populations de lavande fine a mis en évidence une stratégie d'économie d'eau assez similaire avec toutefois une moins bonne efficacité chez la population pyrénéenne. Son contenu en eau et l'intégrité du photosystème sont diminués dès -2.2 MPa. C'est la population du Massif Central qui s'est révélée mettre en place la stratégie d'économie d'eau la plus efficace. L'analyse de la composition en terpène au cours du stress hydrique a mis en évidence des différences de profils chimiques aux jours 9 et 12 chez la lavande fine du Massif central, le lavandin et la lavande aspic. Cependant très peu de composés communs ont pu être retrouvés entre les populations et la sévérité du stress. On a notamment retrouvé une augmentation des composés de la voie du camphre chez les plantes stressées de la lavande fine du Massif Central et du lavandin aux jours 9 et 12 respectivement.

Impact of water stress over time on two sympatric species of lavender and their sterile hybrid

Yolande Despinasse^{1*}, Sophie Genest¹, Catherine Soler¹, Florence Gros¹, Sandrine Moja¹, Frédéric Jullien¹, Thomas Michel², Xavier Fernandez², Elena Ormeño³, Anne Bousquet-Mélou³, Amélie Saunier³, Catherine Fernandez³, Sylvie Baudino¹, Florence Nicolè¹

¹ Université de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire BVpam, EA2061, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42000 Saint-Etienne, France

² LCMBA UMR CNRS 6001, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

³ IMBE CNRS UMR 7263, Centre Saint-Charles, Case 4, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 03, France

*Corresponding author: yolande.despinasse@gmail.com

Mediterranean biome is characterized by hot and dry summers and it is particularly sensitive to global warming because drought frequency and severity increase. Lavenders are characteristic aromatic lime-tolerant shrub of the Mediterranean region. Rich in mono and sesquiterpenes, lavenders are normally well adapted to Mediterranean summer drought. However, the recent decline of populations in France, especially during severe summer drought, lead us to analyze in details the reaction of lavenders to water stress by experimentally stopping the water intake in one-year old plants. We compare the evolution of physiological, biochemical and chemical parameters of two lavender species, the Fine lavender (*Lavandula angustifolia* Miller), the Spike lavender (*Lavandula latifolia* Medik.) and their sterile hybrid the Lavandin (*Lavandula x intermedia*). Intra-specific variability of response to water stress is also assessed within the Fine lavender species using the four existing inflorescences chemotype representative of the geographical and genetically diversity of Fine lavender (South of Massif Central, Pyrenees, South of Italy and Hautes-Provence). The different parameters show convergent results with the hybrid Lavandin more quickly impacted and by lower level of water stress than its two parental species. The fine lavender exhibits a more water safe strategy than the other taxa based on rapid stomatal closure and proline synthesis. This strategy allows it to maintain Relative water content (RWC) and photosystem integrity (PSII efficiency) until low water potential (-4 MPa). The four Fine lavender chemotype have similar strategies but the Pyrenean one show the less efficient water safe strategy because its RWC and PSII efficiency decreased since -2.2 MPa. Although, the South of Massif Central chemotype exhibits the more efficient water safe strategy. The terpenes composition significantly differed between stress and control plants at day 9 and 12. However, few common compounds could be identified between taxa or intensity of stress. More particularly, compounds of the camphor pathway were enhanced in stressed Fine lavenders and Lavandin.

INTRODUCTION

The Mediterranean forests, woodlands, and scrub represent one of the 26 biomes defined by the World Wild Fundation and is characterized by an important diversity of habitats and species. Vegetation types include forests, woodlands, savannas, shrublands and grasslands usually interleaved in complex patterns of mosaic habitat landscapes (Specht 1969). The Mediterranean flora is composed of plants adapted to the climatic vicissitudes of Mediterranean climate, i.e. dry and hot summers with annual summer drought, irregular precipitations, strong winds, fire and manmade degradations. Vegetation are usually low-lying, sparse and slowly growing. Garrigue is an example of low and soft-leaved scrubland characteristic of the biome, associated with limestone soils. Located on calcareous plateaus, common garrigue plants include trees such as kermes oaks, junipers and holm oaks, and aromatic lime-tolerant shrubs such as lavender, sage, rosemary and thyme. In the Mediterranean basin, the combination of summer droughts and irregular precipitations makes water one of the scariest resource (Joffre et al. 1999; Iglesias et al. 2006). Thus, Thuiller et al (2005) have classified the Mediterranean region as particularly sensitive to global warming. In France, between 1970 and 2009, droughts have dramatically increased in number and intensity (Lelièvre et al. 2011). Consequently, vegetal communities are altered and plant species respond to climate change though migration (according to (Lelièvre et al. 2011), Mediterranean climate moved 250 km to the North in France), phenotypic plasticity or genetic adaptation (Bellard et al. 2012). For instance, for the Mediterranean wild *Thymus officinalis*, the natural distribution of different genetically based chemical polymorphism has been strongly modified in the last 40 years due to climate warning (Thompson et al. 2013). In crops, it has been shown that pests and diseases of grapevine are influenced by climate warning (Boudon-Padieu and Maixner 2007). Temperature increase intensifies the risks of introduction of vectoring species notably by the extension of their natural range (up to the North). This is currently happening with the leafhopper *Scaphoideus titanus*, the vector of 'Flavescence dorée' or with the planthopper *Hyalosthes obsoletus*, the vector of Stolbur phytoplasma which induces yellow decline in lavender (Cousin et al. 1970; Quaglino et al. 2013). Furthermore, in lavender, the extensification of pests has been promoted by the extension of clonal monoculture which has reduced genetic diversity (Conord et al. 2012). In the last 20 years, a severe decline was observed in the French fields of lavenders due to the combined effects of the yellow decline disease and repeated and intense summer drought. Infected plants are yellowing, drying and finally dying. The intensity of damage is highly variable from year to year and is strongly linked to climatic conditions. Episodes of drought and heat waves generate a large increase in the incidence of lavender decline (Yvin 2010; Pillier 2012). These observations lead us to study the physiological, biochemical and chemical strategy of lavender in response to water stress.

At the plant level, water stress usually decreases growth and photosynthesis (Yordanov et al. 2000). The stomata close to limit transpiration and maintain water inside the plant (Khalil and Grace 1993); CO₂ uptake is then decreased and growth stopped. Different parameters can be measured to follow the state of the plant. The water potential of the plant measures the water pressure in the phloem and xylem ducts. The Relative Water Content (RWC) estimates the current water content of leaves relative to the maximal water content it can hold at full turgidity. Compared to water potential, it is a more appropriate measure of plant water status in terms of the physiological consequence of cellular

water deficit. To estimate the stomatal closure, the stomatal conductance measures the rate of water vapor exiting through the stomata of the leaf and is usually measured in $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. To assess the capacity of photosystem II (PSII) to capture light excitation, thus indirectly the functioning of photosynthesis, the ratio F_v/F_m can be measured. Also, qualitative and quantitative composition in pigment is an important indicator of plant response to stress (Munné-Bosch and Alegre 2000; Munné-Bosch 2005; Ramel et al. 2012).

Another way to maintain water in plant is to increase water uptake by increasing root surface (Wu and Cosgrove 2000) or produce osmolytes (Mahajan and Tuteja 2005). Increase of intracellular osmolyte concentration such as proline modifies osmotic pressure gradient and enhances the entry of water in cells. It also plays a role in stabilizing the proteins (Hare and Cress 1997). Drought-tolerant plants often showed significant increase of proline content under water stress (Ashraf and Foolad 2007). When water depletion persists, oxidative stress appears and, if it is not stemmed by the plant, led to irreversible physiologic and metabolic damages and cell death (Cruz de Carvalho 2008). To handle oxidative stress, plants possess an arsenal of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase or glutathione peroxidase (Apel and Hirt 2004)) and molecules (glutathione, α -tocopherol or β -caroten (Gill and Tuteja 2010)). Increasing the production of antioxidant enzymes and molecules is link to better stress tolerance (Apel and Hirt 2004; Munné-Bosch 2005; Cruz de Carvalho 2008).

French Lavender species are well-adapted shrubs to Mediterranean climate and produce essential oils (EOs) mainly composed of mono and sesquiterpenes. Formed of isoprene subunits, terpenes are a very diverse family from 5 to 40 carbons (McGarvey and Croteau 1995; Dudareva et al. 2004). Terpenes with low molecular weight and small number of subunits, i.e. mono (2 subunits) and sesquiterpenes (3 subunits), are usually volatile (Dudareva et al. 2004). In lavender, EOs is stored in specific glands named glandular trichomes (Perrin and Colson 1986; An et al. 2001; Lis-Balchin 2002; Iriti et al. 2006). The most productive organ is calyx due to high glandular trichome density, (Guitton et al. 2010a) but leaves produce some as well (Guitton et al. 2010a; Jullien et al. 2014). Three different species of lavender naturally occur in the South of France. Their repartition depends on the soil composition, altitude and vegetation cover (Lis-Balchin 2002; Upson et al. 2004). The most-known Fine lavender *Lavandula angustifolia* Miller grows in calcareous/limestone bedrock while the Spanish lavender *Lavandula stoechas* L. occurs in sandy and shale soils. The Spike lavender, *Lavandula latifolia* Medik. also prefers calcareous soil but usually grows at lower altitude than the Fine lavender (100-800 m for *Lavandula latifolia* Medik. and 500-1800 m for *Lavandula angustifolia* Miller; (Upson et al. 2004)). The distribution area of Fine and Spike lavenders sometime overlap and few sympatric populations were identified by the CNPMAI (Conservatoire National des Plantes à Parfum, Aromatiques et Industrielles; Bernard Pasquier, Pers. Com.). Interspecific hybridization occurs naturally and gives a sterile hybrid called Lavandin (*Lavandula x intermedia*). Lavandin is known to be much larger and robust than both parents, with massive inflorescences (Upson et al. 2004). It is then extensively cultivated and now dominates the world's production of lavender EO, despite lower quality EO due to high amount of camphor (Lis-Balchin 2002; Woronuk et al. 2011). Spike lavender also presents high amount of camphor making EO depressed and cultivation limited to small tonnage in Spain (Boelens 1995; Muñoz-Bertomeu et al. 2007a).

Water stress can modify quantity and quality of EO in aromatic plants. Total amount of EO, i.e. mono and/or sesquiterpenes, increases in water stress for sage (Bettaieb et al. 2009; Nowak et al. 2012), basil (Simon et al. 1992), *Thymus officinalis* (Kleinwächter et al. 2015), *Cistus monspeliensis*, *Pinus halepensis*, *Pistacia lentiscus* (Llusià and Peñuelas 1998), and *Mentha spicata* (Charles et al. 1990). However, other studies do not found impact of water stress on the production of EO in *Cymbopogon nardus* or *Picea abies* (Singh-sangwan et al. 1994; Turtola et al. 2003). Sometimes, they even found a reduction of EO, as in the case of *Satureja douglasii* (Gershenzon et al. 1978). The impact of water stress on the amount of EO and composition depends on species (Turtola et al. 2003) but also on stress intensity, duration and frequency (Selmar and Kleinwächter 2013; Kleinwächter et al. 2015). Terpenes play different function in nature. They are implied on pollinators attraction (Pichersky and Gershenzon 2002), inter and intra-plant communication (Baldwin et al. 2006; Ormeño et al. 2007a; Heil and Bueno 2007), plant direct defense (Dicke and Baldwin 2010; Kaplan 2012) and in response to abiotic stress (Holopainen and Gershenzon 2010; Loreto and Schnitzler 2010; Peñuelas and Staudt 2010). However, their role in abiotic stress is not fully understood. Three different hypotheses have been proposed. Thanks to their conjugated double bonds, volatile terpenes would have anti-oxidant properties (Loreto et al. 2001; Affek and Yakir 2002; Calfapietra et al. 2008; Vickers et al. 2009). Indeed, monoterpenes emitted by white cabbage reduce the amount of ozone in a Teflon chamber by 25% (Pinto et al. 2007). Secondly, the hydrophobicity of terpenes could also plays a role by interacting and stabilizing the membrane lipids (Singsaas et al. 1997; Delfine et al. 2000; Velikova et al. 2011; Velikova et al. 2012). The last hypothesis suggests that the metabolic pathway of terpenes would be a way to dissipate the excess carbon and energy from photosynthesis (Sanadze 2004). On poplar, an important increase of the concentration in carbon dioxide enhances biomass by more than 60% and decreases the production of isoprene by more than 21% (Rosenstiel et al. 2003). When environmental conditions are favorable and when carbon availability is high, the pathway of terpenes is held back to the benefit of growth. All these finding suggest an adaptive benefit of the production of terpene volatile by plant. It is especially true in a stressful environment (UV, temperature and drought) like Mediterranean region where many terpene producers are found (Owen et al. 1997; Owen et al. 2001).

In this study, we characterize the evolution of physiological and biochemical parameters after stopping water supply during 18 days in one-year old plants of lavender in phytotron. We compare the response to water stress among species and chemical types. Sympatric Fine lavender, Spike lavender and their natural hybrid Lavandin were compared and within the species of Fine lavender, the four existing chemical types were tested. Water stress was evaluated by measuring soil water content, water potential and relative water content (RWC). We also follow physiological changes with increasing water stress by measuring stomatal conductance, proline content (osmolyte), β -carotene content (antioxidant molecule), damages to photosynthesis in term of photosystem II efficiency (PSII) and chlorophyll a and b content. Leaf terpene content was also assessed during all the study.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Fine lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) and spike lavender (*Lavandula latifolia* Medik.) were collected in a wild population where the two species were in sympatry and hybridized to give sterile plants of lavandin (*Lavandula x intermedia*). Plants were collected at the same site at Le Rozier (Lozère, France) in the South of Massif Central the 27th September 2012. They experienced the same environment (calcareous soils, from 650 to 700 m altitude, other plants are *Buxus sempervirens*, *Cystus sessilifolius*, *Digitalis lutea* and *Juniperus communis*). All individuals were collected with five twig replicates by plant for spike and fine lavenders (respectively 29 and 59 individual plants), and 10 twigs replicates for the hybrid lavandins (10 individual plants). A total of 540 young shoots were propagated by hardwood cutting in the greenhouse of the horticultural school of Montravel (Loire, France). After approximately 2 months, they were transplanted and cultivated in cups of 0.4L for 7 months to complete rooting. Finally, 65 plants per species were randomly selected and transferred in larger pots of 1.6L specifically designed to limit root knotting. The weight of soil in each pot was controlled. Granulometric analysis indicated that the soil used during all the experiments was composed of 17% clay, 25% silt and 41% sand and has field capacity of 0.42 mL water/g dry soil (Laboratoire d'analyses des sols et des formations superficielles, Strasbourg, France). Plants were transferred and then cultivated in the greenhouse of the University of Saint Etienne (Loire, France) until they were more than one year-old and then, could be included in the experimental design. Just before the experiment, plants were conditioned for 30 days to the environmental conditions of the experiment in phytotron (21°C, 75% air humidity, 45 µE and day/night of 16h/8h) and irrigated with the same amount of water (25 % of field capacity every three days = non limiting water supply for lavenders). Plants were equally and randomly divided into two treatments: water stress and control. Water stress was created by stopping water intake at day 0. Responses of plants were followed over time for 18 days and were measured every three days on five plants per treatment. Eighteen days corresponded to the death of most sensitive plants. Because several measures were destructive, each plant was sampled once. After the measures, plant material was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for pigment and proline analysis.

Based on inflorescences, a study of the chemical diversity of wild Fine lavender showed that 4 chemically distinct populations could be identified (Despinasse et al, in prep). The Fine lavender sampled together with Spike lavender and lavandin, corresponds to the Massif Central chemotype, with an EO rich in lavandulyl and linalyl acetate. The blue lavender is a cultivated variety that has the common chemotype of all cultivars and of the wild plants from the centre of the distribution area. Plants were provided by the CRIEPPAM (Manosque, France) by cutting technics and were grown with the method described above. The Italian chemotype from the South of Italy is characterized by high diversity of compounds and high amount of 1,8-cineol. Finally, the Pyrenean chemotype is dominated by linalool, borneol, 1,8-cineol and with high level of camphor. The Italian and Pyrenean populations were obtained by seed germination and grown with the method described above. Seeds were harvested in the natural site and stored in CNPMAI (Milly-la-Forêt, France).

Plant and soil water status

The soil water content was measured with SM 150 Soil Moisture Kit (Delta-T Devices Ltd). To measure lavender water status, mid-day water potential was evaluated 5 hours after the lights were switched on, using a Scholander pressure chamber with a measurement range of 0 to -5 MPa (P F Scholander 1965). Water potential quantifies the tension or osmotic potential of the xylem vessels. To test for reliability, three measures were taken on one branch. Relative water content (RWC) is another appropriate measure of plant water status and estimates the current water content of leaves relative to the maximal water content it can hold at full turgidity. Normal values of RWC range from 98% in fully turgid transpiring leaves to about 30% in severely desiccated and dying leaves, depending on plant species. It was calculated with formula $RWC = \frac{\text{fresh weight} - \text{dry weight}}{\text{turgid weight} - \text{dry weight}} \times 100$. Three leaves were sampled per plant. Fresh weight was obtained just after sampling; turgid weight was measured after 24h of dark incubation in 50 mL of demineralised water and dry weight was measured after 48h at 80°C.

Stomatal conductance

Stomatal conductance measures the flow of water vapour exiting through stomata in $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and was measured with a Leaf porometer (SC-1, Decagon device). The variability among plants depends on stomatal density and speed of opening, depending on the leaf age and the type of plant (Medrano et al. 2002). For each plant, three measures were taken on different cut leaves randomly selected. The porometer was calibrated each days of experiment according to the manufacturer's instructions and was always kept at the same temperature than plants. Measurement was made in the 15 s after cutting leaves to avoid any disturbance of stomatal conductance due to the measurement.

Chlorophyll fluorescence

F_v / F_m is a measure of the maximum efficiency of the photosystem II (PSII), i.e. the efficiency if all PSII centres were open. It was determined using a chlorophyll fluorometer (OS-30p; Opti-Science). F_v is the variable fluorescence calculated by $F_v = F_m - F_0$. F_m is the maximal fluorescence, determined when a high intensity flash of light has been applied (0.8s of saturating flash of about $10,000 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). F_0 is the minimal fluorescence when PSII reaction center are assumed to be open (dark adapted). Following the adaptation to dark of 30 min, F_0 was determined by using light of $0.5 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. The consistencies of measures were tested with three replicates per plant.

Proline content

Proline was determined by the ninhydrin method (Bates et al. 1973). For each sample, 0.5 g of leave was mixed with 10 mL of 3 % sulfosalicylic acid. Two mL of this filtrate reacted with 2 mL of ninhydrin acid and 2 mL of glacial acetic acid for 1 h at 100 °C. Chromophore was extracted in 4 mL of toluene and absorbance was read at 520 nm. Toluene was used as blank. Proline concentration was determined using a standard curve made with commercial proline (Sigma-Aldrich) and expressed by dry weight.

Pigment content

Leaves collected during experiments were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. To extract pigment, around 0.03 g of leaves was ground in a mortar in liquid nitrogen. Pigments were extracted

with 2 mL acetone. The homogenate was sonicated and centrifuged at 15 000 *g* for 15 min at 4°C. The pellet was re-extracted in 2 mL acetone as described above. Supernatants were combined and stored at -20 °C until analysis. All the extractions were made under green light at 4 °C to prevent pigment degradation. Chromatographic procedure was performed as described by (García-Plazaola and Becerril 1999) with slight modification. The mobile phase is composed of acetonitrile:methanol:water (84:9:7) for solvent A and methanol:ethyl acetate (68:32) for solvent B. Run begun with linear gradient from 100 % A to 100 % B for 12 min, followed by an isocratic elution with 100 % B for 6 min. Then a linear gradient from 100 % B to 100 % A for 1 min was applied and an isocratic elution with 100 % A for further 6 min to re-equilibrate column. Peaks were detected and integrated at 445 nm by photodiode array detector. The column was Luna 5u C18 (2) 100A (150 x 4.6 mm, 5µm) equipped with a pre-column.

VOCs extraction and analysis

For each sample, 300 mg of fresh leave were put in 3 mL of dichloromethane containing 10 µL.mL⁻¹ of methyl undecanoat as internal standard (Fulka). After incubation at 4°C for 12h, supernatant was collected in analysis vials and stored at -20°C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analyses were performed with an Agilent 6850N GC, equipped with a 5973N mass selective detector and a DB-5 MS column (30m × 0.25 mm with a 0.25 µm film-Agilent 122-5532). The initial temperature of injector and detector were 250°C and 260°C respectively. The gas carrier was helium at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. The injection volume was 1µL with a split ratio of 2:1. The oven initial temperature was 40°C followed by a ramp at 3°C.min⁻¹ until 245°C. A preprocess of GC-MS results was performed with the R package MSeasy (Nicolè et al. 2012) which detects putative compounds in complex metabolic mixture. All mass spectra of all samples were first computed in one matrix. Then, unsupervised hierarchical clustering was performed to group similar spectra in one cluster. We visually checked the correspondence of each cluster to a putative molecule, and merge or split when needed. Finally, identification of compounds was based on the comparison of retention time and mass spectra to commercial standards when available. Otherwise, identification was performed by using reference library of mass spectra (Johnston 1989) and retention index (Kovats indices (Adams 2007)) calculated with retention time of n-alkanes C8-C20 (Fulka). For quantification purpose, relative area for each compound was calculated by correcting differential evaporation during sample handling using the internal standard and related to dry mass. We checked the linearity between a range of concentration from 0 to 166 mg fresh leave per mL and the areas of peaks ($R^2=0.997$). We also checked for machine repeatability by analysing five samples thrice. We found 100% repeatability for the number of peaks and 99.7% for peak areas.

Statistical analyses

All analyses were performed in R (version 2.15.0). All the mean comparisons between stress and control plants were performed with non-parametric Mann and Whitney tests. For terpene content, the percentage of the total area for each compound was calculated. Compounds with more than 1 % of the total area were retained and their relative area were used for PLS-DA (Partial Least Square - Discriminant Analysis). This analysis was performed with *plsda* function of mixOmics R package (Cao et al. 2011). At each date of the experiment, the discriminant analysis was applied on the chemical profiles to identify differences according to the water status (stress vs control). In PLS-DA, a coefficient called VIP (Variable Importance in the Projection) is determined for each variable. It ranges from 0 (not

discriminant) to 2 (highly discriminant). Only compounds with VIP higher than 1 are represented in the correlation circle (Fig. 2). Package ade4 and RVAideMemoire were respectively used for graphical representation and selection of discriminant compounds.

RESULTS

Evolution of the physiological and biochemical parameters after stopping water intake in the three taxa of lavenders

To analyse the response of plants to water stress, different parameters were measured every 3 days on 5 independent plants: water potential, relative water content, stomatal conductance, PSII efficiency, proline content and pigment content (chlorophyll a and b and β -caroten).

Plant and soil water status. For control plants, the soil water content range from 15 to 25% throughout the experiments, this indicates a non-limiting water supply (Fig. 1a). For stressed group, the soil water content presents the same progressive decrease in the three taxa over time. From the third day of experiment, the soil water content significantly differed between stress and control for the three taxa. At day 18, water is totally absent from the soil in stressed plants (Fig. 1a). In control plants, the water potential is constant between species and over time, and it ranges from -0.8 MPa to -1 MPa (Fig. 1b). Since these values are in normal range, these results confirm that control plants are not water-stressed. The water potential differed significantly between stress and control at day 3 for Lavandin and at day 6 for the Fine and Spike lavenders. Furthermore, Lavandin reaches a water potential critically low (less than -4MPa, thought device threshold is -5MPa) much earlier than the two parental species (day 9 for Lavandin, day 15 for Spike lavender and day 18 for Fine lavender). As of the day 6 in Lavandin and Spike lavender, the RWC of stressed group differ significantly from the control (51% vs 73 %, and 74% vs 77 % respectively, Fig 1c). In Fine lavender, the difference is only significant at day 12. The lowest value of RWC is about 25% and is reached at day 12 for Lavandin and day 15 for Spike lavender and day 18 for Fine lavender. Because there was no significant difference in soil water content among the three species (Fig. 1a), the difference in water potential and RWC clearly indicates that Lavandin is more sensitive to water deficit while Fine lavender is most tolerant because it maintains its RWC until the day 12 without water supply.

Stomatal conductance. In the control, values of stomatal conductance are highly variable among plants but are always higher than $100 \text{ mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 1d). In the stressed group, the variability among plants is lower. The difference between stress and control appears at day 6 for Lavandin and Fine lavender, and at day 9 for Spike lavender. When the stomatal conductance is about $40 \text{ mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, it means that all stomata are closed. This threshold is reached at day 6 for Lavandin, day 12 for Spike lavender and day 15 for Fine lavender.

Chlorophyll fluorescence. In control, PSII efficiency is constant over time and species, with an average value of 0.81 ± 0.01 (Fig. 1e) similarly to the optimal value of many plant species (0.79 to 0.81, (Maxwell and Johnson 2000)). Very soon at day 3, PSII efficiency is significantly different between stress and control in Lavandin, indicating a significant impact of water stress on the photosystem apparatus.

Comparatively, the two parental species maintain their photosynthetic apparatus consistent under water stress (until day 9 for Spike lavender and day 12 for Fine lavender).

Proline content. In all lavenders, proline content increases with water stress (Fig. 1f). Until day 9, this increase is significant for Lavandin and Spike lavender, and belatedly at day 12 for Fine lavender. At the end of the experiment at day 18, the proline content is multiplied respectively by 40 and 53 for Fine lavender and Spike lavender. In Lavandin, the ratio is only 15 and the final proline content is low. These results indicate that Lavandin may suffer more from water stress than the two parental species.

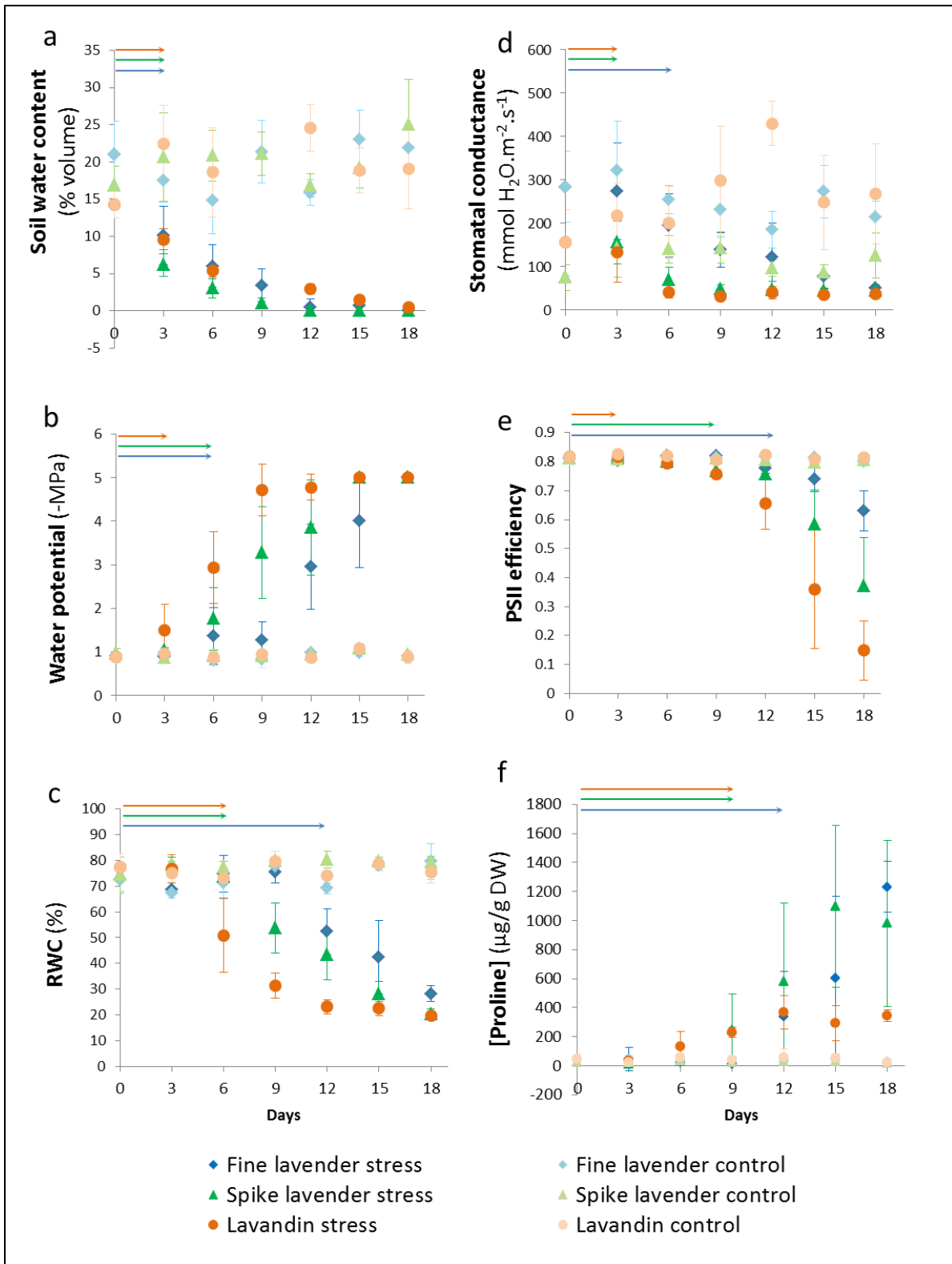


Fig. 1: Evolution of physiological parameters as a function of time for the three sympatric taxa of lavenders : (a) soil water content (b) Water potential (c) RWC: Relative water content (d) Stomatal

conductance (e) PSII efficiency: Photosystem II efficiency (f) proline content. Horizontal arrows end when means of control and stressed group are significantly different (non-parametric Mann and Whitney tests at p -value ≤ 0.05). RWC: Relative water content

Pigment content. For the three pigments analyzed (chlorophyll a and b and β -caroten), no major difference could be detected between control and stressed groups among time (Fig. 2). However, the pigment contents tend to be lower for stressed plants at the end of the experiment. Indeed, chlorophyll a and b content are significantly lower at day 18 for Fine lavender. For Lavandin chlorophyll b and β -caroten content falls down during the last three days in stressed plants. No significant differences are detected in Spike lavender.

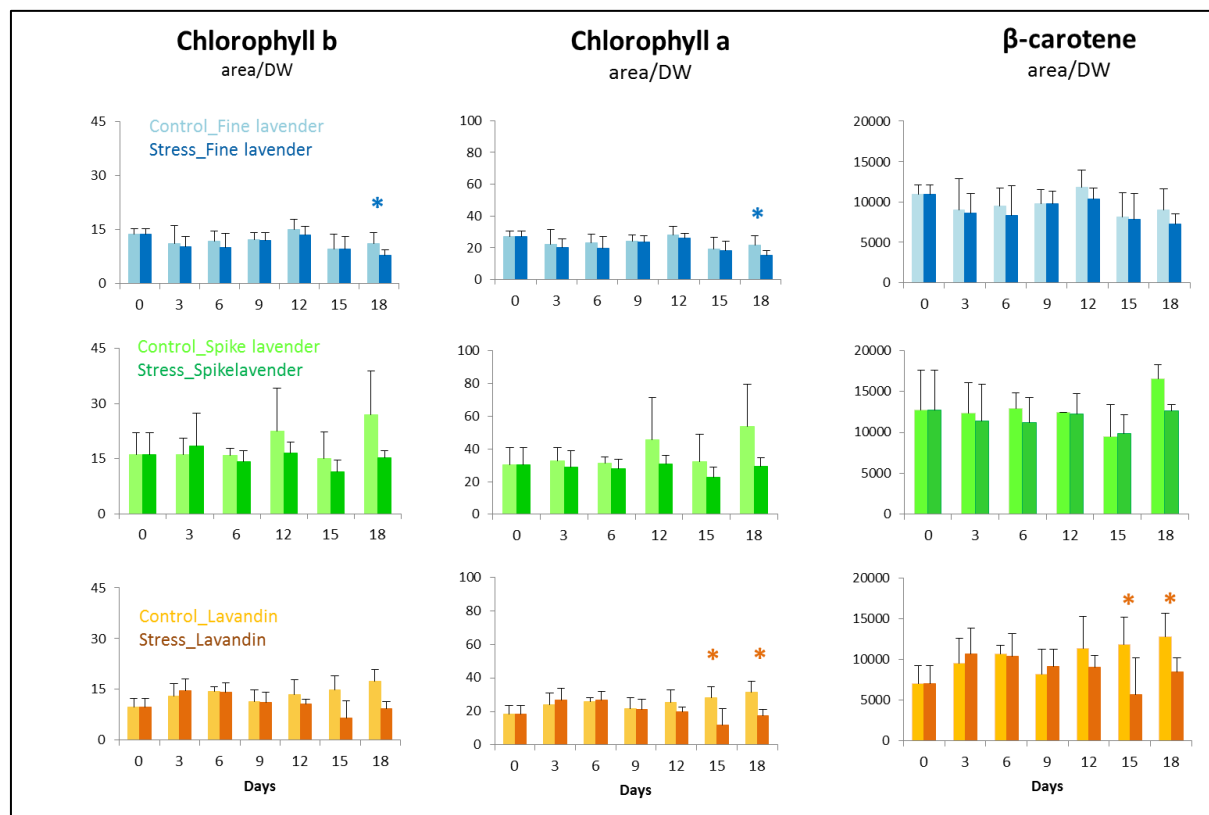


Fig. 2 Evolution of pigment contents of Fine lavender, Spike lavender and Lavandin during the water stress experiment. Pigment content are expressed in area of the peak by dry weight (DW). Asterisk represents significant differences between control and stressed group (Mann-Whitney test)

Impact of water stress on leaf terpene content and composition in the three taxa of lavenders

In order to know the impact of water stress on terpene, we analyse, for each plant, the terpene content and composition of leaves. In first time we determine terpene composition for the three species only with control plant. In a second time, we determine the impact of water stress on total amount and proportions of mono and sesquiterpene. In the last step we manage a partial least square discriminant

analyses (PLS-DA) to identify qualitative differences in the leaf chemical profile of control and stressed plants.

Initial differences in leaf terpene content and composition between the three taxa. In control plants, we respectively identified 43, 40 and 54 leaf compounds for Fine lavender, Spike lavender and Lavandin, representing from 85 to 92 % of the total content (Supplemental data A). Monoterpenes account for 76 % of the total blend for Fine lavender, 75 % for Spike lavender and 78 % for Lavandin. Remaining compounds are sesquiterpenes (Supplemental data A). Only 17 compounds exceed 1 % of the total content for Fine lavender, 14 for Spike lavender, and 13 for Lavandin. Terpene compositions of Spike lavender and Lavandin are close and largely dominated by 1,8-cineol (29 and 26% of the total respectively) and camphor (26 and 27%), while major compounds of Fine lavender are borneol (17%), α -cadinol (14%) and γ -cadinene (7 %) (Supplemental data A).

Impact of water stress on terpene content. In Fine lavender, water stress increased significantly the total amount of terpenes by 66 % at day 9 (Supplemental data B). In Spike lavender and Lavandin, the total amount of terpenes does not differ significantly between control and stress but the proportions of mono and sesquiterpenes varied. In Spike lavender at day 9, the proportion of monoterpenes increase by 16% and the proportion of sesquiterpenes decrease by 35%. At day 12, the phenomenon is reversed, the proportion of sesquiterpenes increases by 78% while the proportion of monoterpenes decreases by 4.5%.

Impact of water stress on terpene composition. For each date and each taxa, a Partial Least Square discriminant analysis was performed to separate the chemical profiles of control and stressed groups. Only most relevant results are presented in Fig. 3. In Fine lavender, chemical profiles differed between control and stress at day 9 with 86% of intergroup variance explained by the first discriminant axis and 11.5 % by the second axis (Fig. 3a). The first axis separates stress and control plants, with camphor, borneol, camphene and bornyl acetate (Fig. 3b). These compounds are 2.5 to 4 times higher in stressed group (Fig. 3c). These four compounds are involved in the same metabolic pathway called the camphor pathway. On the second axis, β -caryophyllene and carvone mostly differentiate two individual plants with different chemical profiles. In Spike lavender, the chemical profiles differed relatively clearly at day 12 with 87.2 % of intergroup variance on the first axis and 10.5 % on the second axis (Fig. 3d). However, the lack of statistical power did not allow detecting significant differences. Within the group of discriminant compounds, only caryophyllene oxide was significantly higher in control group in Spike lavender (Fig. 3e and f). In Lavandin, the chemical profiles only differed at day 12 (Fig. 3g) with significantly higher contents of borneol and camphene, and lower contents of caryophyllene oxide (90 % of intergroup variance on the first axis, 2.9% on the second axis) (Fig. 3h and i).

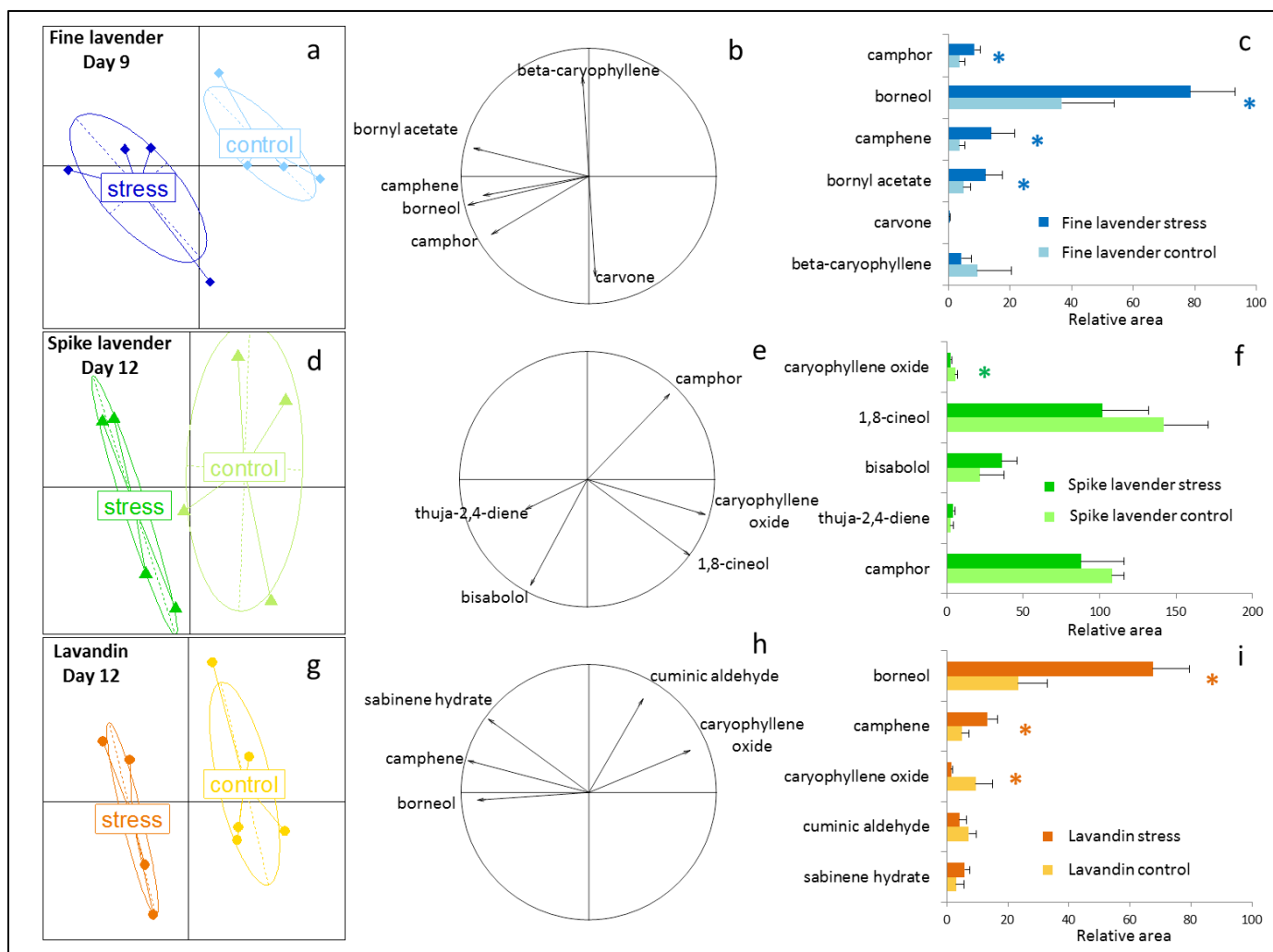


Fig. 3 Discriminant analysis of chemical profiles based on water stress status. PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) of chemical composition for Fine lavender (a), Spike lavender (d) and Lavandin (g). Discriminant compounds with VIP > 1 for Fine lavender (b), Spike lavender (e) and Lavandin (h). Histograms of the relative area of the discriminant compounds for Fine lavender (c), Spike lavender (f) and Lavandin (i). Asterisk indicates significant difference between stress and control (non-parametric Mann and Whitney test)

Intraspecific and interspecific variability of the response to water stress

To determine the intraspecific variability of response to water stress in Fine lavender, the same experiment was performed on four chemical types of Fine lavender. To facilitate comparisons between populations and taxa, we synthesized the information with a scheme where the arrows indicate the maintaining of physiological parameters (no significant difference between stress and control). Soil water content, RWC, water potential, stomatal conductance and PSII efficiency are represented. Since the pressure in xylem ducts is independent of plant size, parameters were depicted depending on the water potential. Thus, the tip of the arrow indicates the value of water potential from which the difference between stress and control is significant (Fig. 4a). Whatever the species or the population, the stomata started to close as soon as there is a significant variation of water potential in stressed plants (approximately between -1 and -2 MPa, red and green arrows) except for the Pyrenean population. After stomatal closure, the RWC is maintained until -4 MPa for Fine Lavender of Massif Central and -3 MPa for Blue lavender although Pyrenean and Italian populations began to lost water around -2 MPa. Often, the parameter that is maintained under the lowest water potential is PSII efficiency. Among Fine lavender chemical types, PSII efficiency ranged from -2 MPa (Pyrenean population) to -4 MPa (Massif Central population) with a mean value of -3 MPa (Italian population and Blue lavender). In spite of a common strategy in response to water stress, intraspecific variability exists. The population from the South of Massif Central is the most tolerant to water stress because physiological parameters are maintained until a low value of water potential. On the contrary, the Pyrenean population is the least resistant.

For comparison, in Lavandin and Spike lavender, 4 on 5 parameters are affected by water stress around -1.5 MPa (Fig. 4b). Surprisingly in lavandin, RWC is maintained until -3 MPa although PSII efficiency is reduced from -1.3 MPa. The rapid decrease of water potential for Lavandin can explain this result. In Spike lavender and lavandin, the decrease of soil water content is combined with stomatal closure and water potential decrease while in Fine Lavender populations (except Pyrenean), we observe a delay between change in soil water content and water stress occurrence. We can consider this two species as more sensitive to water stress than Fine Lavender.

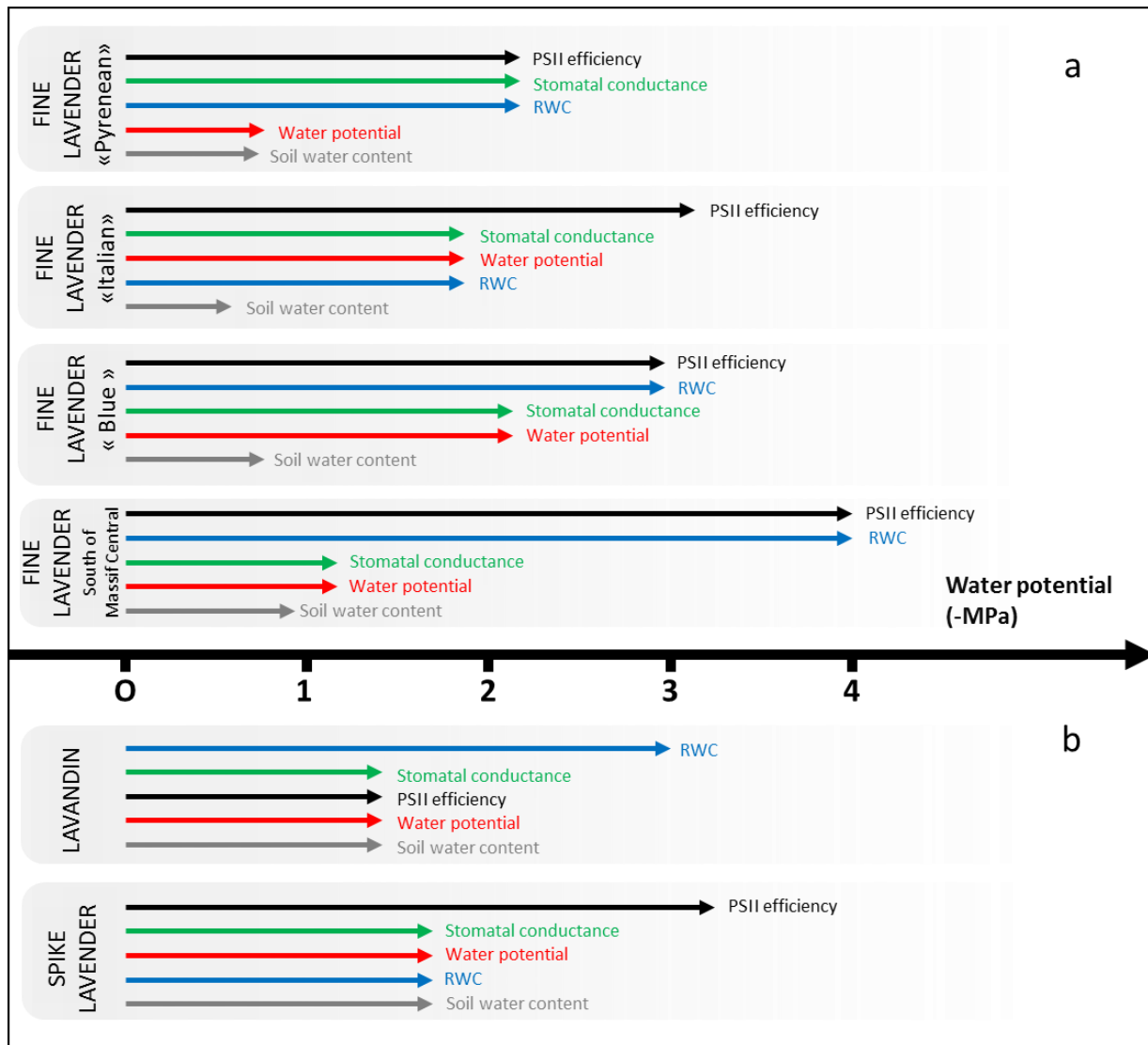


Fig. 4 Synthetic scheme representing the evolution of physiological parameters as a function of water potential for the different taxa and populations studied. The arrows indicate no significant difference between stress and control. The tip of the arrow indicates the value of water potential from which the difference between stress and control is significant for Fine lavender populations (a), Spike lavender and Lavandin (b)

DISCUSSION

Facing water stress, the three sympatric taxa of lavenders experienced an anisohydric behavior since the water potential decreases with increasing water stress (Schultz 2003; Sade et al. 2012). On the contrary, isohydric plants such as *Quercus cocifera*, *Arbutus unedo* and *Quercus agrifolia* maintain their water potential at -3.5 MPa throughout the summer drought (Abril and Hanano 1998; Werner et al. 1999). In general, the strategy of Mediterranean trees is based on keeping constant their water potential by increasing absorption of soil water with their deep root system (Abril and Hanano 1998; Werner et al.

1999). Usually, shrubs and other woody plants use other adaptive mechanisms. For example, the semi-deciduous *Cistus* spp. avoid drought through leaf abscission and change in leaf angle from horizontal to vertical during summer drought (Werner et al. 1999). Plants with this strategy can tolerate water potentials up to -4 and -7 MPa (Abril and Hanano 1998; Ormeño et al. 2007b; Galmés et al. 2007). Another way to reduce water loss is to reduce leaf area. In lavenders, leaves are narrow and small, and help reducing the water loss that occurs through transpiration. The grey color of the foliage also participates to prevent absorbing excess heat by reflecting the sunlight. Finally, the high density of branched trichomes (Upson et al. 2004), that gives the greyish color, improve lavender's drought resistance by retaining moisture and reducing transpiration. These morphological adaptations are strengthened by physiological mechanisms that we have been identified in this study. We find that Fine lavender presents a water saving strategy. Plant closes stomata as soon as the water potential decreases (around -1.3 MPa) and maintain plant water content and the integrity of the photosystem II until a very low level of water potential (-4 MPa). The different chemical types of Fine Lavender have the same strategy but intraspecific variabilities among parameters exist. Though, the population from the South of Massif Central is the more tolerant chemotype to prolonged water stress. On the contrary, the Pyrenean population is not well adapted to water stress. Indeed, the water potential differed in stressed plants at a relatively high water potential of -0.9 MPa but stomata only close at -2.2 MPa, causing significant loss of water content and degradation of photosystem II.

Interestingly, β -carotene, an important antioxidant generally associated with stress tolerance (Cruz de Carvalho 2008) does not increase during water stress in lavenders suggesting that it does not play any role in water stress. Chlorophyll a and b content slightly diminish in stressed plant in the end of experiment. Abiotic stress generated an excess of protons due to the decrease in photosynthetic capacity. To face the excess of protons, one strategy developed by some plants consists in destructing the photosynthetic pigments (Farrant et al. 2007). This is not the case in lavender because the PSII efficiency decreases drastically before the pigment contents. The damage and destruction of chlorophyll pigments and/or the chloroplast membranes are late consequences of the increasing water stress.

By comparison, the natural hybrid Lavandin shows the lowest tolerance to water stress with all physiological parameters impacted very early and as soon as -1.5 MPa. The plants always responded to water stress significantly earlier and/or at a higher water potential (Fig 1 and 2). Only water content is maintained until -3 MPa. Lavandin are usually larger than the parental species, and larger plant need more water, especially with restricted volume of soil in pots. However, when we compare the size of our experimental plants, no significant difference could be detected between Lavandin and Spike Lavender, excluding the role of plant size in our results. A more likely explanation is the lowest production of proline in Lavandin (about 2.8 times less than the parental species). Proline is an osmoprotectant and stabilizes proteins. A higher level of proline is generally associated with higher tolerance to water stress (Stewart et al. 1980; Yamada et al. 2005; Vendruscolo et al. 2007). Divergence between parental species can result in hybrids that are maladapted, nonviable or infertile (outbreeding depression (Waser and Price 1994)). Thus, hybridization can disrupt coadapted gene complexes or introduce maladapted genes. Spontaneous hybrids between Fine lavender and Spike lavender are sterile and may have lost certain adaptations to the Mediterranean environment, such as the production of proline to limit drought

effects. Other experiments with constant water stress performed over a longer period in situ showed that Lavandin modified significantly its root/shoot ratio, increasing the root biomass at the expense of above-ground biomass while Fine lavender does not (E Ormeno, Pers Com). It might be an alternative strategy to increase the absorption of water by the roots for Lavandin which might be more efficient with prolonged but lower water stress (contrary to our experimental treatment, Sharp et al. 1988). The behavior of lavandin during our experiment raises the question for the future of lavandin EO production. In the context of climate change, with increasing frequency of severe droughts, the culture of Lavandin may not be a sustainable strategy. Experiments in field conditions are needed to construct more realistic models.

On the other hand, the chemical type of Fine lavender from Massif Central was found to be the most tolerant to water stress because water content and photosystem are impacted only from -4 MPa. This chemotype also produces large amount of a highly valuable inflorescence EO, rich in linalyl and lavandulyl acetates (Despinasse et al.) and could be promising for breeding new varieties. Furthermore, the analyses of terpene content show very small fluctuations with water stress. Only Fine lavender from the South of Massif Central shows a significantly increase by 66% at day 9. This chemotype should be considered for future breeding program and could be promising in the context of global warming.

The fact that we do not find significant differences in the amount of EO could be explained by the presence of storage glands. However, several studies related anyway a variation in terpene content in species with storage glands during water stress: *Thymus daenensis* (Bahreinnejad 2013), *Thymus officinalis* (Kleinwächter et al. 2015) and *Mentha spicata* (Charles et al. 1990). Proportions of mono and sesquiterpene do not vary with water stress in Fine lavender and Lavandin but in Spike, proportion of monoterpenes increase by 16% and the proportion of sesquiterpenes decrease by 35% at day 9. In *Rosmarinus officinalis* such variation were also observed in terpene emission during water withholding (Ormeño et al. 2007b). However sesquiterpenes showed a decrease with water potential which is not the case in our study. Indeed, at day 12, the proportion of sesquiterpenes increases by 78% while the proportion of monoterpenes decreases by 4.5. In spite of the absence of variation on the total quantity of EO, we showed clear differences in the chemical profiles between stressed and control plants. The highest difference was found at day 9 for Fine lavender, 12 for Spike lavender and lavandin and correspond to a water potential of -1.3 MPa, -3.9 MPa and -4.8 MPa, respectively. Variation of chemical profiles occurs at mild level of water stress for Fine Lavender but at severe water stress for Spike lavender and Lavandin. Interpretation is complex but we can say that water stress modify the chemical profiles of lavenders.

Several compounds differed significantly between stress and control but few are common between taxa and between dates. In particular, borneol and camphene are multiplied by two in stressed plants of Fine lavender and lavandin. However, this modification occurs at different intensities of water stress: mild in Fine lavender (-1.3 MPa) and severe in lavandin (-4.8 MPa). These compounds derived from the camphor pathways, composed of borneol, camphene, bornyl acetate and camphor, that are major compounds in the leaves of lavenders (Wise et al. 1998; Whittington et al. 2002; Sarker et al. 2012). In the most tolerant population, these four compounds are multiplied from 2 to 4 times in stressed plants at early stage of water stress, suggesting a protective function. Interestingly, medicinal

study on borneol shows that it can increase the flexibility of an artificial bilayers membrane during temperature increase (Yin et al. 2014). This result cannot be generalized to other taxa and populations. Further investigations in lavenders are needed to enlighten the role of terpenes, more particularly the compounds of the camphor pathway, in water stress. This is a challenge since chemical profiles varied within one experiment depending on the phenological stages of the plant (*Artemisia annua*, (Yadav et al. 2014), on the intensity of water stress (*Vitis vinifera*, (Griesser et al. 2015), and the methodology ((Kainulainen et al. 1992; Turtola et al. 2003).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was granted by the Rhône-Alpes country and by a fellowship of PhD from the French Ministry of Research. We thank Nicolas Boyer, Aurélie Bony and Bertrand Ferraton for help in plant sampling and culture. We are also grateful to Adrien Faure, Thomas Gallon, Arthur Bassot and Zhenni Li for help in experimental design and achievement.

REFERENCES

- Abril, M., Hanano, R., 1998. Ecophysiological responses of three evergreen woody Mediterranean species to water stress. *Acta Oecologica* 19, 377–387.
- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography - mass spectrometry. Allured Publ. Corporation, Carol Stream (Ill.).
- Affek, H.P., Yakir, D., 2002. Protection by Isoprene against Singlet Oxygen in Leaves. *Plant Physiol.* 129, 269–277.
- An, M., Haig, T., Hatfield, P., 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.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216.
- Bahreinejad, B., 2013. Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. *Int. J. Plant Prod.*
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., Dahl, C.C. von, Preston, C.A., 2006. Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: “Talking Trees” in the Genomics Era. *Science* 311, 812–815.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., Courchamp, F., 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecol. Lett.* 15, 365–377.
- Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W.A., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2009. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Sci. Hortic.* 120, 271–275.
- Boelens, M.H., 1995. Chemical and sensory evaluation of *Lavandula oils*. *Perfum. Flavorist* 20, 23–51.

- Boudon-Padieu, E., Maixner, M., 2007. Potential effects of climate change on distribution and activity of insect vectors of grapevine pathogens. *Glob. Warm. Which Potential Impacts Vineyards*.
- Calfapietra, C., Scarascia Mugnozza, G., Karnosky, D.F., Loreto, F., Sharkey, T.D., 2008. Isoprene emission rates under elevated CO₂ and O₃ in two field-grown aspen clones differing in their sensitivity to O₃. *New Phytol.* 179, 55–61.
- Cao, K.-A.L., Boitard, S., Besse, P., 2011. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* 12, 253.
- Charles, D.J., Joly, R.J., Simon, J.E., 1990. Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. *Phytochemistry* 29, 2837–2840.
- Conord, C., Despinasse, Y., Moja, S., Rioux, D., Till-Bottraud, I., Jullien, F., Nicolè, F., 2012. Menaces sur l'or bleu – étude de la diversité génétique des lavandes fines sauvages et cultivées.
- Cousin, M., Moreau, J., Staron, T., Faivre-Amiot, A., 1970. Le “Deperissement jaune” du Lavandin nouvelle maladie a Mycoplasmes. *Ann. Phytopathol.* 2.
- Cruz de Carvalho, M.H., 2008. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal. Behav.* 3, 156–165.
- Delfine, S., Csiky, O., Seufert, G., Loreto, F., 2000. Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytol.* 146, 27–36.
- Despinasse, Y., Moja, S., Conord, C., Soler, C., Jullien, F., Pasquier, B., Bessière, J.-M., Baudino, S., Nicolè, F., n.d. Chemical variation over the natural range of the true lavender. In prep.
- Dicke, M., Baldwin, I.T., 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the “cry for help.” *Trends Plant Sci., Special Issue: Induced biogenic volatile organic compounds from plants* 15, 167–175.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J., 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1893–1902.
- Farrant, J.M., Brandt, W., Lindsey, G.G., 2007. An overview of mechanisms of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. *Plant Stress J.* 72:84.
- Galmés, J., Medrano, H., Flexas, J., 2007. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol.* 175, 81–93.
- García-Plazaola, J.I., Becerril, J.M., 1999. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Anal.* 10, 307–313.
- Gershenzon, J., Lincoln, D.E., Langenheim, J.H., 1978. The effect of moisture stress on monoterpene yield and composition in *Satureja douglasii*. *Biochem. Syst. Ecol.* 6, 33–43.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann, N., Becker, M., Varmuza, K., Liebner, F., Schuhmacher, R., Forneck, A., 2015. Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiol. Biochem.* 88, 17–26.
- Guitton, Y., Nicolè, F., Moja, S., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F., Legendre, L., 2010. Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiol. Plant.* 138, 150–163.
- Hare, P.D., Cress, W.A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79–102.
- Heil, M., Bueno, J.C.S., 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5467–5472.

- Holopainen, J.K., Gershenzon, J., 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci.* 15, 176–184.
- Iglesias, A., Garrote, L., Flores, F., Moneo, M., 2006. Challenges to Manage the Risk of Water Scarcity and Climate Change in the Mediterranean. *Water Resour. Manag.* 21, 775–788.
- Iriti, M., Colnaghi, G., Chemat, F., Smadja, J., Faoro, F., Visinoni, F.A., 2006. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. *Flavour Fragr. J.* 21, 704–712.
- Joffre, R., Rambal, S., Demesin, C., 1999. Functional attributes in Mediterranean-type Ecosystems, in: *Handbook of Functional Plant Ecology*. Francisco I. Pugnaire and Fernando Valladares, New York, pp. 347–380.
- Johnston, C., 1989. The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data, Volumes 1-7 (McLafferty, Fred W.; Stauffer, Douglas B.). *J. Chem. Educ.* 66, A256.
- Jullien, F., Moja, S., Bony, A., Legrand, S., Petit, C., Benabdelkader, T., Poirot, K., Fiorucci, S., Guitton, Y., Nicole, F., Baudino, S., Magnard, J.-L., 2014. Isolation and functional characterization of a τ -cadinol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Plant Mol. Biol.* 84, 227–241.
- Kainulainen, P., Oksanen, J., Palomäki, V., Holopainen, J.K., Holopainen, T., 1992. Effect of drought and waterlogging stress on needle monoterpenes of *Picea abies*. *Can. J. Bot.* 70, 1613–1616.
- Kaplan, I., 2012. Trophic Complexity and the Adaptive Value of Damage-Induced Plant Volatiles. *PLoS Biol* 10, e1001437.
- Khalil, A. a. M., Grace, J., 1993. Does Xylem Sap ABA Control the Stomatal Behaviour of Water-Stressed Sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) Seedlings? *J. Exp. Bot.* 44, 1127–1134.
- Kleinwächter, M., Paulsen, J., Bloem, E., Schnug, E., Selmar, D., 2015. Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*). *Ind. Crops Prod.* 64, 158–166.
- Lelièvre, F., Sala, S., Ruget, F., Voltaire, F., 2011. Evolution climatique du Sud de la France 1950-2009, Projet CLIMFOUREL PSDR-3, Régions L-R, M-P, M- A.
- Lis-Balchin, M., 2002. Lavender. The genus *Lavandula*, Taylor&Francis. ed, Medicinal and aromatic plants - industrial profiles. Lis-Balchin Maria.
- Llusià, J., Peñuelas, J., 1998. Changes in terpene content and emission in potted Mediterranean woody plants under severe drought. *Can. J. Bot.* 76, 1366–1373.
- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F., Pasqualini, S., 2001. Ozone Quenching Properties of Isoprene and Its Antioxidant Role in Leaves. *Plant Physiol.* 126, 993–1000.
- Loreto, F., Schnitzler, J.-P., 2010. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci.* 15, 154–166.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 139–158.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.
- McGarvey, D.J., Croteau, R., 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1015–1026.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulías, J., Flexas, J., 2002. Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Ann. Bot.* 89, 895–905.
- Munné-Bosch, S., 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* 162, 743–748.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210, 925–931.

- Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Segura, J., 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.
- Nicolè, F., Guitton, Y., Courtois, E.A., Moja, S., Legendre, L., Hossaert-McKey, M., 2012. MSeasy: unsupervised and untargeted GC-MS data processing. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 2278–2280.
- Nowak, M., Kleinwächter, M., Manderscheid, R., Weigel, H.-J., Selmar, D., 2012. Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 83, 133–136.
- Ormeño, E., Fernandez, C., Mévy, J.-P., 2007a. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry* 68, 840–852.
- Ormeño, E., Mévy, J.P., Vila, B., Bousquet-Mélou, A., Greff, S., Bonin, G., Fernandez, C., 2007b. Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere* 67, 276–284.
- Owen, S., Boissard, C., Street, R.A., Duckham, S.C., Csiky, O., Hewitt, C.N., 1997. Screening of 18 Mediterranean plant species for volatile organic compound emissions. *Atmos. Environ., BEMA: A European Commission Project on Biogenic Emissions in the Mediterranean Area* 31, Supplement 1, 101–117.
- Owen, S.M., Boissard, C., Hewitt, C.N., 2001. Volatile organic compounds (VOCs) emitted from 40 Mediterranean plant species: VOC speciation and extrapolation to habitat scale. *Atmos. Environ.* 35, 5393–5409.
- Peñuelas, J., Staudt, M., 2010. BVOCs and global change. *Trends Plant Sci.* 15, 133–144.
- Perrin, A., Colson, M., 1986. L'appareil sécréteur des lavandes et des lavandins. *Parfums Cosmétiques Arômes* 69, 61–63.
- P F Scholander, E.D.B., 1965. Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148, 339–46.
- Pichersky, E., Gershenzon, J., 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 237–243.
- Pillier, M., 2012. Percevoir les futures besoins des acteurs de la filière française des plantes à parfum, aromatiques et médicinales. Un éclairage sur l'activité de l'ITEIPMAI en 2025 (Agricultural Sciences).
- Pinto, D.M., Tiiva, P., Miettinen, P., Joutsensaari, J., Kokkola, H., Nerg, A.-M., Laaksonen, A., Holopainen, J.K., 2007. The effects of increasing atmospheric ozone on biogenic monoterpene profiles and the formation of secondary aerosols. *Atmos. Environ.* 41, 4877–4887.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P.A., Wei, W., Davis, R.E., 2013. "Candidatus *Phytoplasma solani*", a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* ijs.0.044750–0.
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiné, S., Triantaphylidès, C., Ravanat, J.-L., Havaux, M., 2012. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. *Plant Physiol.* 158, 1267–1278.
- Rosenstiel, T.N., Potosnak, M.J., Griffin, K.L., Fall, R., Monson, R.K., 2003. Increased CO₂ uncouples growth from isoprene emission in an agriforest ecosystem. *Nature* 421, 256–259.
- Sade, N., Gebremedhin, A., Moshelion, M., 2012. Risk-taking plants. *Plant Signal. Behav.* 7, 767–770.
- Sanadze, G.A., 2004. Biogenic Isoprene (A Review). *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 729–741.
- Sarker, L.S., Galata, M., Demissie, Z.A., Mahmoud, S.S., 2012. Molecular cloning and functional characterization of borneol dehydrogenase from the glandular trichomes of *Lavandula x intermedia*. *Arch. Biochem. Biophys.* 528, 163–170.

- Schultz, H.R., 2003. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant Cell Environ.* 26, 1393–1405.
- Selmar, D., Kleinwächter, M., 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* 42, 558–566.
- Sharp, R.E., Silk, W.K., Hsiao, T.C., 1988. Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials 1. *Plant Physiol.* 87, 50–57.
- Simon, J.E., Reiss-Bubenheim, D., Joly, R.J., Charles, D.J., 1992. Water Stress-Induced Alterations in Essential Oil Content and Composition of Sweet Basil. *J. Essent. Oil Res.* 4, 71–75.
- Singh-sangwan, N., Abad Farooqi, a. H., Singh Sangwan, R., 1994. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. *New Phytol.* 128, 173–179.
- Singsaas, E.L., Lerdau, M., Winter, K., Sharkey, T.D., 1997. Isoprene Increases Thermotolerance of Isoprene-Emitting Species. *Plant Physiol.* 115, 1413–1420.
- Specht, R., 1969. A comparison of the sclerophyllous vegetation characteristic of Mediterranean type climates in France, California, and Southern Australia. I. Structure, morphology, and succession. *Aust. J. Bot.* 17, 277–292.
- Stewart, C.R., Hanson, A.D., Turner, N.C., Kramer, P.J., 1980. Proline accumulation as a metabolic response to water stress. 173–189.
- Thompson, J., Charpentier, A., Bouguet, G., Charmasson, F., Roset, S., Buatois, B., Vernet, P., Gouyon, P.-H., 2013. Evolution of a genetic polymorphism with climate change in a Mediterranean landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2893–2897.
- Turtola, S., Manninen, A.-M., Rikala, R., Kainulainen, P., 2003. Drought Stress Alters the Concentration of Wood Terpenoids in Scots Pine and Norway Spruce Seedlings. *J. Chem. Ecol.* 29, 1981–1995.
- Upton, T., Andrews, S., Royal Botanic Gardens, K., 2004. The Genus *Lavandula*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey.
- Velikova, V., Sharkey, T.D., Loreto, F., 2012. Stabilization of thylakoid membranes in isoprene-emitting plants reduces formation of reactive oxygen species. *Plant Signal. Behav.* 7, 139–141.
- Velikova, V., Várkonyi, Z., Szabó, M., Maslenkova, L., Nogues, I., Kovács, L., Peeva, V., Busheva, M., Garab, G., Sharkey, T.D., Loreto, F., 2011. Increased Thermostability of Thylakoid Membranes in Isoprene-Emitting Leaves Probed with Three Biophysical Techniques. *Plant Physiol.* 157, 905–916.
- Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Vieira, L.G.E., 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant Physiol.* 164, 1367–1376.
- Vickers, C.E., Gershenson, J., Lerdau, M.T., Loreto, F., 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat. Chem. Biol.* 5, 283–291.
- Waser, N.M., Price, M.V., 1994. Crossing-Distance Effects in *Delphinium nelsonii*: Outbreeding and Inbreeding Depression in Progeny Fitness. *Evolution* 48, 842–852.
- Werner, C., Correia, O., Beyschlag, W., 1999. Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica* 20, 15–23.
- Whittington, D.A., Wise, M.L., Urbansky, M., Coates, R.M., Croteau, R.B., Christianson, D.W., 2002. Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15375–15380.
- Wise, M.L., Savage, T.J., Katahira, E., Croteau, R., 1998. Monoterpene Synthases from Common Sage (*Salvia officinalis*). *J. Biol. Chem.* 273, 14891–14899.
- Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., Mahmoud, S., 2011. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. *Planta Med.* 77, 7–15.

- Wu, Y., Cosgrove, D.J., 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J. Exp. Bot.* 51, 1543–1553.
- Yadav, R.K., Sangwan, R.S., Sabir, F., Srivastava, A.K., Sangwan, N.S., 2014. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. *Plant Physiol. Biochem.* 74, 70–83.
- Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Yoshida, Y., 2005. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J. Exp. Bot.* 56, 1975–1981.
- Yin, Q., Shi, X., Ding, H., Dai, X., Wan, G., Qiao, Y., 2014. Interactions of Borneol with DPPC Phospholipid Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 20365–20381.
- Yordanov, I., Velikova, V., Tsonev, T., 2000. Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. *Photosynthetica* 38, 171–186.
- Yvin, C., 2010. Synthèse des recherches conduites depuis 1994 sur les dépérissements des lavandes et lavandins. iteipmai.

SPPLEMENTAL DATA

Supplemental data A Terpene content and composition (percentage of total) of Fine lavender, Spike lavender and Lavandin. Only compounds up to 1% of total are show. SD: standard deviation

Fine lavender		Mean	SD
Total		400.3	194.9
% identified		91.7	4.1
% monoterpene		75.7	5.8
% sesquiterpene		15.4	3.4
Number of compounds		43.0	6.1
% Major compounds	borneol	16.8	8.1
	α -cadinol	14.3	5.9
	γ -cadinene	6.7	2.6
	1,8-cineol	4.2	2.6
	caryophyllene oxide	3.7	2.2
	δ -3-carene	3.2	2.3
	limonene	2.8	1.5
	camphene	2.4	2.5
	β -pinene	2.4	2.5
	α -pinene	2.2	0.8
	cryptone	2.0	2.0
	camphor	1.9	1.1
	piperitenone	1.8	0.4
	p-cymene	1.6	0.3
	β -caryophyllene	1.6	1.9
bornyl acetate	1.5	1.2	
1,10-cubenol di-epi	1.1	0.4	

Spike lavender			
		Mean	SD
Total		399.5	100.7
% identified		91.1	5.0
% monoterpene		74.9	6.1
% sesquiterpene		15.6	3.5
Number of compounds		40.0	6.3
% Major compounds	1,8-cineol	28.8	6.9
	camphor	26.2	4.0
	bisabolol	8.0	2.5
	limonene	3.0	4.9
	α -pinene	3.0	0.4
	α -cadinol	2.7	1.0
	β -pinene	2.7	0.4
	α -terpineol	1.9	0.3
	borneol	1.9	0.4
	camphene	1.4	0.2
	sabinene hydrate	1.3	0.3
	γ -cadinene	1.3	0.3
	caryophyllene oxide	1.1	0.5
thuja-2,4-diene	1.1	0.3	

Lavandin			
		Mean	SD
Total		655.5	398.4
% identified		85.2	5.2
% monoterpene		77.7	6.1
% sesquiterpene		6.8	3.1
Number of compounds		54.0	12.1
% Major compounds	camphor	26.9	7.5
	1,8-cineol	26.1	4.8
	borneol	6.4	3.2
	α -cadinol	2.9	1.3
	cryptone	2.3	0.7
	camphene	1.6	0.4
	cuminic aldehyde	1.6	0.5
	limonene	1.5	0.8
	γ -cadinene	1.4	0.6
	α -pinene	1.2	0.6
	caryophyllene oxide	1.2	1.2
	β -pinene	1.1	0.5
	sabinene hydrate	1.0	0.3

	day	traitement	Fine lavender		Spike lavender		Lavandin	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Total amount	0	control	508.2	287.6	391.5	73.8	853.7	381.7
	3	control	301.7	122.2	315.0	99.4	612.9	364.2
		stress	419.1	210.5	345.0	96.1	617.8	496.7
	6	control	327.4	62.4	384.1	91.1	421.7	230.6
		stress	343.5	220.1	280.9	49.6	413.2	109.7
	9	control	325.3 a	130.5	398.2	31.1	489.5	273.6
		stress	542.1 b	173.5	352.1	97.1	418.9	264.2
	12	control	540.4	278.9	454.5	161.6	364.7	164.2
stress		526.8	222.4	360.5	96.9	527.0	115.1	
15	control	424.4	139.5	452.5	84.0	652.9	228.0	
	stress	564.8	175.8	361.9	136.8	444.1	122.4	
18	control	374.6	201.4	400.8	125.8	1193.0	493.2	
	stress	342.3	155.1	313.2	73.6	1317.2	793.4	
% Monoterpene	0	control	61.6	4.4	81.0	2.7	70.6	9.2
	3	control	48.2	12.6	76.9	4.2	79.0	4.2
		stress	47.5	11.8	78.8	2.1	79.5	2.2
	6	control	61.2	4.4	75.5	3.0	82.8	2.1
		stress	55.7	3.7	79.5	3.9	79.3	3.2
	9	control	43.4	10.7	70.7 a	4.9	80.4	3.9
		stress	53.7	8.7	82.6 b	4.6	79.4	1.4
	12	control	46.7	10.6	74.6 a	12.7	74.0	7.0
stress		44.5	9.2	71.3 b	3.1	76.9	3.4	
15	control	53.0	3.7	72.7	3.4	77.2	2.2	
	stress	50.2	4.7	73.9	3.6	75.6	4.6	
18	control	55.5	8.1	73.0	3.3	80.1	2.4	
	stress	50.6	3.6	72.7	5.7	76.0	4.6	
% Sesquiterpene	0	control	25.1	5.2	13.6	3.4	7.1	2.3
	3	control	29.2	8.8	15.8	4.1	5.4	2.1
		stress	29.9	10.1	14.2	0.4	7.3	4.3
	6	control	22.0	5.7	16.9	0.5	4.9	2.4
		stress	23.3	3.4	14.6	3.5	5.2	1.6
	9	control	33.2	10.7	17.8 a	3.2	5.2	1.5
		stress	25.5	10.5	11.5 b	3.7	4.3	1.3
	12	control	31.1	7.2	10.6 a	4.0	9.4	4.2
stress		27.4	8.4	18.9 b	0.7	5.0	2.2	
15	control	27.3	4.7	17.1	1.7	8.1	4.0	
	stress	25.8	5.4	14.7	2.2	6.6	2.9	
18	control	28.8	10.0	17.5	1.4	7.3	3.4	
	stress	30.0	9.8	17.4	2.8	9.1	5.3	

Supplemental data B: Total amount of terpene, % mono and sesquiterpene comparison between control and stressed group among experiment for Fine lavender, Spike lavender and Lavandin. Bold letters indicate means significant different between control and - at each date (Mann-Whitney test at p-value<0,05). Means are indicates +/- standard deviation (SD), n=5.

Supplemental data D Means +/- standard deviation (SD) of physiological parameters for the four populations of Fine lavender.

	day	Traitement	Soil water content (% vol)		Water potential (-MPa)		RWC (%)		Stomatal conductance (mmol H ₂ O.m ⁻² .s ⁻¹)		PSII efficiency	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Fine lavender "Pyrenean"	0	Control	33.52	5.03	0.67	0.05	74.17	3.35	226.87	159.22	0.82	0.01
	3	Stress	25.61 a	2.87	0.83	0.08	79.57	7.09	301.07	126.92	0.76	0.05
		Control	31.38 b	4.08	0.88	0.05	73.75	2.55	301.81	163.02	0.77	0.06
	6	Stress	21.30 a	5.22	0.67	0.09	80.87	7.83	235.21	93.18	0.81	0.02
		Control	35.00 b	5.01	0.74	0.08	67.26	10.26	152.89	68.87	0.79	0.02
	9	Stress	11.03 a	2.72	0.83	0.12	74.84	7.50	204.04	139.43	0.80	0.02
		Control	27.12 b	4.95	0.80	0.08	67.66	7.50	354.98	219.30	0.80	0.01
	12	Stress	8.00 a	1.49	0.94 a	0.26	73.64	5.11	205.48	99.03	0.78	0.05
		Control	27.80 b	3.10	0.64 b	0.08	78.39	6.83	212.33	104.73	0.79	0.02
	15	Stress	4.63 a	0.91	1.46 a	0.34	57.59	10.87	103.38	54.99	0.78	0.02
		Control	22.56 b	3.36	0.69 b	0.11	76.19	3.92	187.78	79.37	0.80	0.01
	18	Stress	2.88 a	1.51	2.27 a	0.58	59.67 a	12.80	80.12 a	31.92	0.76	0.05
		Control	20.98 b	4.67	0.83 b	0.11	83.15 b	3.26	174.62 b	96.74	0.79	0.02
	Fine lavender "Italian"	0	Control	19.98	2.76	0.69	0.03	78.01	2.52	216.42	122.08	0.80
3		Stress	20.275 a	3.73	0.68	0.06	67.02	15.47	192.86	90.20	0.80	0.01
		Control	28.70 b	4.01	0.74	0.12	72.35	5.00	142.89	120.98	0.81	0.01
6		Stress	12.68 a	4.03	0.72	0.10	95.94	55.25	265.29	121.70	0.81	0.01
		Control	32.22 b	5.16	0.57	0.12	71.37	4.37	297.13	168.63	0.81	0.01
9		Stress	9.72 a	2.05	0.81	0.04	74.88	6.86	138.73	71.99	0.78 a	0.02
		Control	34.72 b	1.29	0.71	0.09	68.48	7.85	169.42	116.96	0.80 b	0.01
12		Stress	6.31 a	2.50	1.05	0.38	63.48	10.32	98.61	53.88	0.80	0.02
		Control	29.68 b	2.46	0.72	0.10	74.51	5.04	127.83	55.16	0.81	0.01
15		Stress	4.93 a	1.82	1.95 a	1.24	57.35 a	21.90	82.10 a	36.50	0.78	0.05
		Control	21.18 b	1.96	0.625 b	0.10	67.51 b	4.43	170.08 b	88.07	0.80	0.01
18		Stress	3.36 a	1.48	3.01 a	1.00	47.04	12.88	69.96 a	28.07	0.70 a	0.14
		Control	21.52 b	2.58	0.76 b	0.09	67.24	4.18	231.62 b	133.91	0.80 b	0.01
Fine lavender "Blue lavender"			Control	28.70	3.63	0.78	0.12	80.42	2.60	285.95	82.06	0.81
	3	Stress	14.34 a	2.48	0.87	0.10	77.73 a	2.32	206.29	105.92	0.82	0.01
		Control	25.70 b	1.83	1.01	0.12	70.42 b	1.23	266.52	81.21	0.81	0.01
	6	Stress	8.28 a	0.94	1.09	0.32	88.82 a	2.63	205.44	82.83	0.81	0.02
		Control	30.92 b	3.00	0.86	0.15	81.87 b	2.63	251.14	115.24	0.82	0.01
	9	Stress	4.94 a	1.62	2.14 a	0.52	75.33	7.76	68.13 a	28.57	0.80	0.01
		Control	36.60 b	5.34	0.82 b	0.12	83.16	1.86	201.15 b	58.41	0.81	0.02
	12	Stress	4.22 a	1.33	2.97 a	0.36	48.88 a	6.87	96.74 a	23.35	0.76 a	0.03
		Control	33.80 b	6.83	0.88 b	0.12	75.60 b	2.77	278.30 b	103.69	0.80 b	0.01
	15	Stress	3.14 a	0.34	4.63 a	0.49	30.38 a	4.69	64.47 a	20.55	0.60 a	0.22
		Control	34.78 b	2.52	0.90 b	0.21	67.07 b	2.88	225.05 b	100.44	0.80 b	0.01
	18	Stress	4.02 a	0.27	5.00 a	0.00	27.11 a	2.37	54.67 a	10.02	0.73 a	0.01
		Control	40.08 b	5.54	0.83 b	0.10	76.58 b	5.17	250.87 b	36.52	0.79 b	0.03

Fine lavender South of Massif Central	0	Control	20.96	4.50	0.92	0.09	72.45	4.33	284.54	81.11	0.81	0.02
	3	Stress	10.14 a	3.93	0.90	0.13	68.56	1.18	273.93	111.38	0.80	0.01
		Control	17.48 b	2.89	0.98	0.10	67.32	2.04	321.62	113.12	0.81	0.01
	6	Stress	5.98 a	2.86	1.37 a	0.65	74.73	7.18	195.78 a	73.30	0.82	0.01
		Control	14.84 b	4.48	0.81 b	0.12	71.19	6.01	254.68 b	33.15	0.81	0.01
	9	Stress	3.44 a	2.19	1.28 a	0.42	75.41	4.05	139.34 a	39.60	0.82	0.01
		Control	21.36 b	4.24	0.83 b	0.20	77.75	1.79	231.67 b	62.92	0.82	0.01
	13	Stress	0.48 a	1.07	2.96 a	0.98	52.33 a	8.98	121.23	78.76	0.77 a	0.02
		Control	15.86 b	1.72	0.98 b	0.04	69.19 b	2.17	186.29	42.30	0.81 b	0.02
	15	Stress	0.70 a	1.03	4.00 a	1.06	42.25 a	14.27	77.20 a	27.97	0.74 a	0.04
		Control	23.02 b	3.89	0.98 b	0.08	77.93 b	1.87	273.35 b	60.97	0.81 b	0.01
	18	Stress	0.08 a	0.18	5.00 a	0.00	28.26 a	2.92	51.60 a	7.76	0.63 a	0.07
		Control	21.88 b	2.98	0.90 b	0.09	79.58 b	6.95	214.86 b	36.36	0.79 b	0.01

CHAPITRE 3 : CARACTÉRISATION DE LA BORNYL DIPHOSPHATE SYNTHASE CHEZ LA LAVANDE FINE : UNE MONOTERPÈNE SYNTHASE IMPLIQUÉE DANS LA QUALITÉ DE L'HUILE ESSENTIELLE

Afin de mieux connaître les voies métaboliques des terpènes volatils de la lavande fine, le laboratoire BVpam a réalisé une banque d'EST en 2008 sur un mélange d'inflorescences et de feuilles du cultivar 'Diva' de lavande fine. Ce cultivar est une lavande fine clonale dont la culture est très répandue en France. A ce moment-là, seulement 3 gènes de terpène synthases étaient connus chez les lavandes alors qu'elles font partie des plantes aromatiques et médicinales les plus cultivées en France. De plus, la présence de la maladie du dépérissement en Provence engendrait un besoin croissant de recherche sur les lavandes et sur leurs terpènes en particulier. En effet, l'implication potentielle des terpènes volatils dans la relation tritrophique entre l'insecte, le phytoplasme et les lavandes rendait l'étude des terpènes volatils importante. Dans ce cadre-là, la connaissance des gènes et des enzymes impliqués dans les voies métaboliques des terpènes volatils est un outil primordial pour comprendre leur production et leur régulation (Guitton et al. 2010a). De l'analyse de la banque d'EST a découlé l'identification de six enzymes impliquées dans la formation de l'IPP et du DMAPP, d'une prényl transférase (**Tableau 2**, Introduction) et de trois sesquiterpène synthases caractérisées et publiées en 2015 (Jullien et al. 2014). A mon arrivée au laboratoire, une partie du gène de la bornyl diphosphate synthase avait été identifiée. La majeure partie de mon travail a été expérimental et a consisté dans le clonage de l'ADNc, sa surexpression en système bactérien et la caractérisation enzymatique de sa protéine. Ces recherches vous sont présentées sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis à la revue « Phytochemistry ».

Résumé en français

L'huile essentielle de lavande de meilleure qualité est produite par quelques cultivars de *L. angustifolia* et utilisée principalement en parfumerie. Des composés indésirables tel que le camphre et le bornéol sont aussi synthétisés par la lavande, ce qui diminue la qualité de l'huile essentielle. Grâce à une banque d'EST, nous avons pu identifier puis caractériser une bornyl diphosphate synthase. Cette enzyme produit le précurseur du bornéol, le bornyl diphosphate. La caractérisation fonctionnelle de cette enzyme chez la lavande et chez *Salvia officinalis* a montré quelques différences dans la séquence d'acides aminés, dans les pH optimum et les propriétés catalytiques. Une modélisation de la structure tridimensionnelle du site catalytique a permis d'expliquer la faible efficacité de conversion du GPP en bornyl diphosphate de la bornyl diphosphate de lavande. Le taux de transcription de l'enzyme chez *L. angustifolia* et *L. latifolia* dans les feuilles et les fleurs n'a pas montré de corrélation claire avec l'accumulation de bornéol/camphre laissant supposer que la régulation n'a pas uniquement lieu au niveau transcriptionnel. L'analyse phylogénétique suggère que le gène de la bornyl diphosphate synthase de lavande pourrait être à l'origine des gènes des autres terpènes synthases du groupe b. Les connaissances apportées par cette étude pourront être le point de départ d'autres études sur l'amélioration de l'huile essentielle de lavande par ingénierie métabolique ou sélection variétale.

Bornyl diphosphate synthase from *Lavandula angustifolia*: a major monoterpene synthase involved in essential oil quality.

Yolande Despinasse^{1,2,3}, Sébastien Fiorucci⁴, Serge Antonczak⁴, Sandrine Moja^{1,2,3}, Aurélie Bony^{1,2,3}, Florence Nicolè^{1,2,3}, Sylvie Baudino^{1,2,3}, Jean-Louis Magnard^{1,2,3}, Frédéric Jullien^{1,2,3}

1 Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France

2 Université de Saint-Etienne, Jean Monnet, F-42000, Saint-Etienne, France.

3 Laboratoire de Biotechnologies Végétales Appliquées aux Plantes Aromatiques et Médicinales, EA 3061, 23 rue du Dr Michelon, F-42000, Saint-Etienne, France,

4 Institut de Chimie de Nice, UMR-CNRS 7272, Faculté des Sciences, Université de Nice-Sophia Antipolis, 06108 Nice Cedex 2, France

Corresponding author: Frédéric Jullien

e-mail: jullien@univ-st-etienne.fr; tel: +33 (0)4 77 48 15 23

Keywords *Lavandula angustifolia* L., terpene synthase, transcript regulation.

Abstract

Lavender essential oils (EOs) of highest quality are produced by few *L. angustifolia* cultivars and mainly used in perfume industry. Undesirable compounds like camphor and borneol are also synthesized by lavender leading to a depreciate EO. Here we report the cloning of bornyl diphosphate synthase (*LaBPPS*), an enzyme involve in the production of borneol, from an EST library. Compared to the BPPS of *Salvia officinalis*, the functional characterization of *LaBPPS* showed several differences in amino acids sequence, optimum pH and catalytic properties. A three dimensional structure model of the catalytic site was built in order to explain the low efficiency of *LaBPPS* to convert GPP into BPP. Quantitative PCR performed from leaves and flowers of *L. angustifolia* and *L. latifolia* samples did not show clear correlation between transcript level and the accumulation of borneol/camphor, suggesting that it is not a limiting enzyme of the pathway or that that the biosynthesis of these compounds is not only regulated at the transcriptional level. A phylogenetic analysis pointed out that *LaBPPS* can be an ancestor of others lavender TPSb and then borneol could be one of the first monoterpenes to be synthesized in the *Lavandula* subgenus. Knowledge gained from these experiments will facilitate future studies to improve the lavender oils through metabolic engineering or plant breeding.

Accession numbers: *LaBPPS*: KM015221

1 - Introduction

In 2012, cultivation of lavenders in south of France extended over 20,000 hectares leading to the production of respectively 1000 and 40 tons of lavandin (*L x intermedia*) and true lavender (*L angustifolia* subsp. *angustifolia*) essential oils (EOs). Besides the fact that lavender is a touristic emblem of Provence, this agricultural activity has a major economic interest and represents more than half of the world production of lavender EO. Quality of lavender EO depends on the amount of desirable major flavour compounds like linalool and linalyl acetate that are characteristic terpenes of lavender scent but also depends on an specific aromatic touch given by several minor compounds. Lavender EOs of highest quality are produced by few *L. angustifolia* cultivars and mainly used in perfume industry. Undesirable compounds like camphor and borneol can also be produced by lavender leading to a depreciate EO; such terpenes are highly produced in lavandin, an hybrid between *L. angustifolia* and *L. latifolia*, leading to a restricted use of its EO in soap industry. A genetic knowledge of camphor biosynthesis in lavender is therefore an important goal to develop new strategies leading to the production of lavender cultivars with improved EO depleted in camphor.

Monoterpenes and sesquiterpenes are the main components of lavender EO (Shellie et al. 2002; Lis-Balchin 2002) and are derived from the condensation of isopentenyl diphosphate (IPP) and its allylic isomer, dimethylallyl diphosphate (DMAPP). Condensation of one DMAPP and two IPP molecules catalyzed by farnesyl diphosphate synthase (FPPS) leads to the formation of FPP in the cytosol whereas the condensation of one DMAPP and one IPP catalyzed by geranyl diphosphate synthase (GPPS) leads to the formation of GPP in the plastid. GPP and FPP are substrates of terpene synthases for the synthesis of mono- and sesquiterpenes respectively. Terpene metabolism in lavender has been already well depicted (Fig. 1), leading to the characterization of four monoterpene synthases (Demissie et al. 2011; Demissie et al. 2012; Landmann et al. 2007) and five sesquiterpene synthases (Jullien et al. 2014; Lukman et al. 2013). Moreover, a cis-prenyl diphosphate synthase involved in lavandulyl diphosphate synthesis, a precursor *in planta* of lavandulol and lavandulyl acetate, was also characterized (Demissie et al. 2013). All these enzymes are responsible for the biosynthesis of the major terpenes found in lavender EO except for camphor and related compounds like borneol and bornyl acetate.

Bornyl diphosphate synthase (BPPS), which catalyzes the first enzymatic step of camphor biosynthesis, has been cloned only once in *Salvia officinalis* (*SoBPPS*; Wise et al. 1998). This TPS is a multi product enzyme giving both several monoterpenes as minor compounds and bornyl diphosphate (BPP) as a major prenyl diphosphate (Fig. 2). BPP is further dephosphorylated by an unknown enzyme, leading to the monoterpene borneol, then oxidized in camphor by a borneol dehydrogenase (Lukman et al. 2012). The homodimeric BPPS has focused a large attention and was the first mTPS to be crystallized (Whittington et

al. 2002). This study revealed that water molecules firmly anchored in the active site could prematurely quench carbocationic substrates leading to the synthesis of different monoterpenes. Recently, a computational enzymologic study of BPPS allowed to propose the formation of several possible carbocation intermediates (Fig. 2) in the active site, leading to side-product monoterpenes and pointed out electrostatic factors steering favorably the formation of the bornyl cation further stabilized by the diphosphate moiety in BPP (Weitman and Major 2010; Major and Weitman 2012).

In this study, we characterized the BPPS of lavender as a new TPS involved in major terpene biosynthesis in *Lavandula* species. 3D protein modeling of LaBPPS and SoBPPS were compared to discuss the link between structural modifications and product distribution. Terpene synthase transcript levels from qRT-PCR and essential oil accumulation in several *L. angustifolia* cultivars and *L. latifolia* were analyzed to examine the regulation of this TPS.

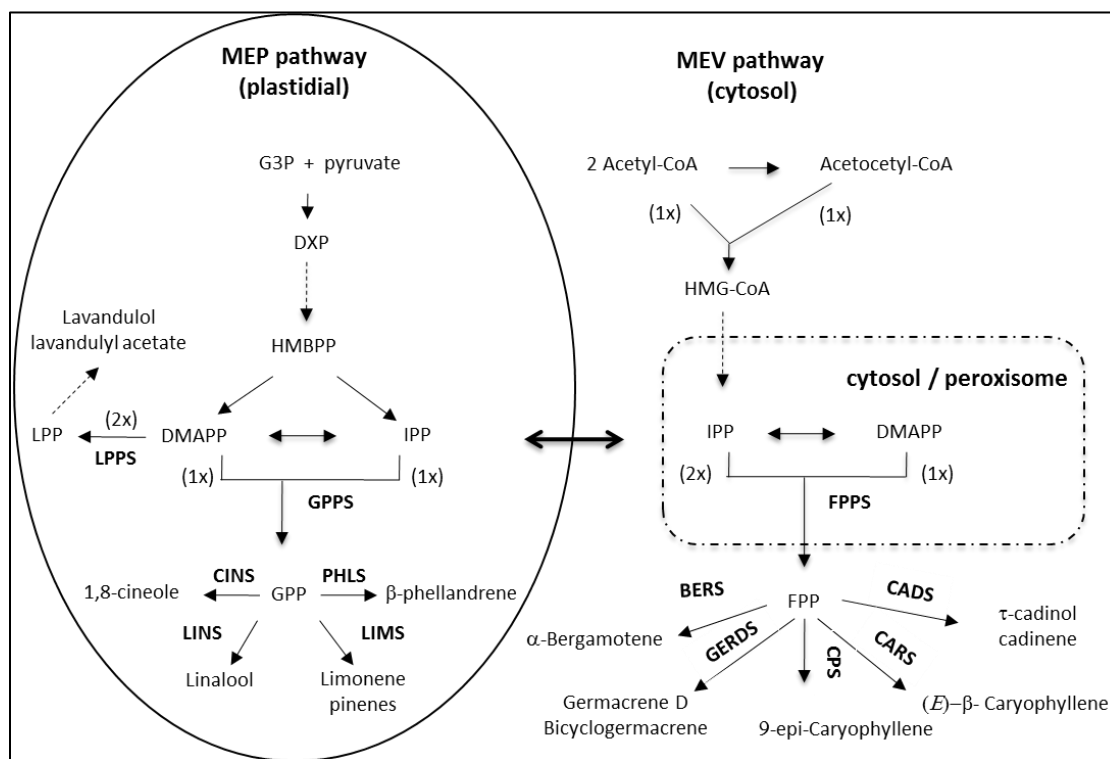


Fig. 1 Pathways of mono and sesquiterpene biosynthesis in *L. angustifolia* and *L. x intermedia*. BERS, α -bergamotene synthase; CADS, cadinol synthase; CARS, β -caryophyllene synthase; CDP-ME, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; CINS, cineole synthase; CPS, 9-epi-caryophyllene synthase; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; FPP, farnesyl diphosphate; FPPS, FPP synthase; GERDS, germacrene D synthase; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; GPP, geranyl diphosphate; GPPS, GPP synthase; HMBPP, 1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; LIMS, limonene synthase; LINS, linalool synthase; LPP, lavandulyl diphosphate; LPPS, LPP synthase; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4 phosphate; MEV, mevalonate; PHLS, β -phellandrene synthase. Modified from (Jullien et al. 2014)

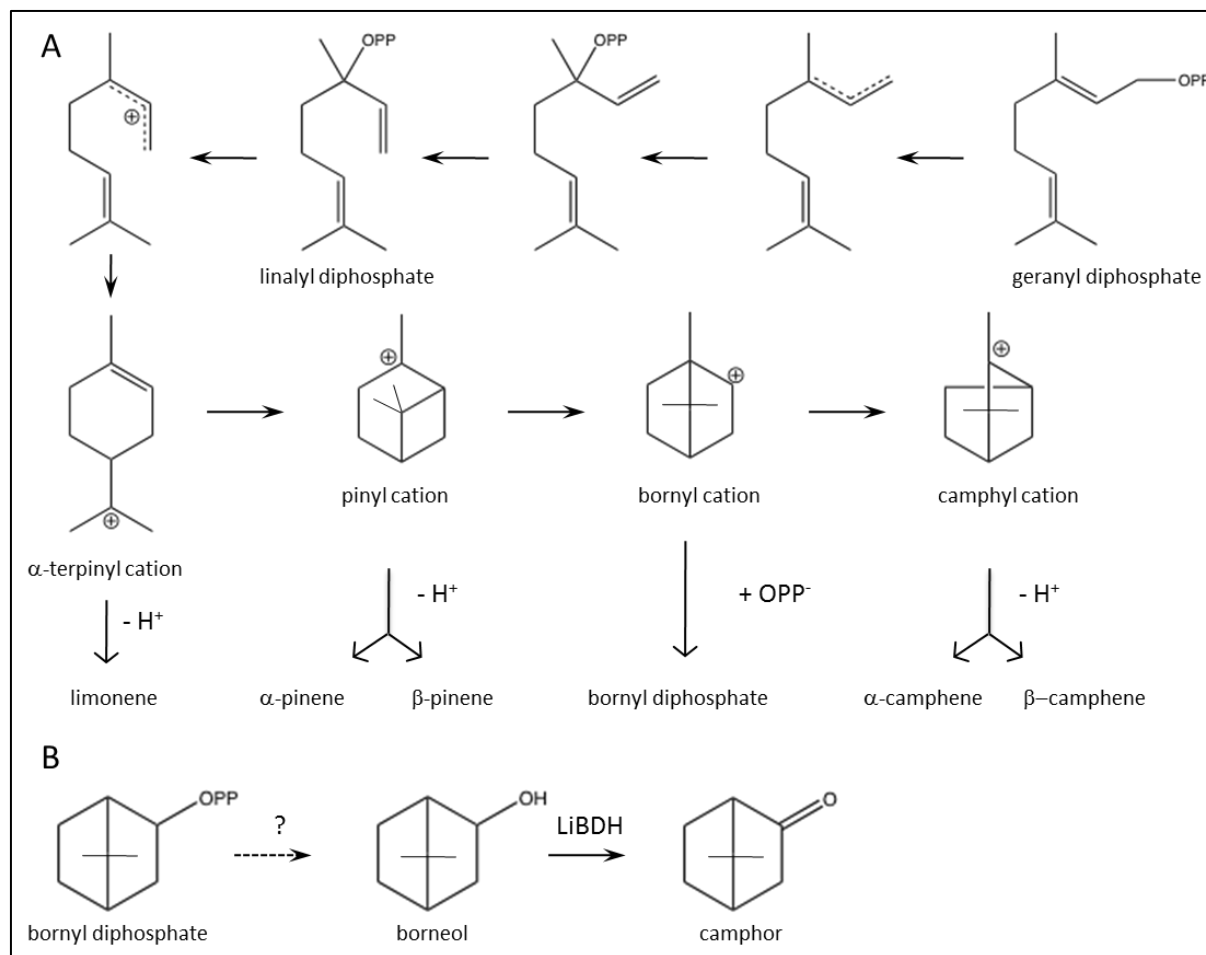


Fig. 2 Biosynthetic pathway of camphor from geranyl diphosphate. A, possible carbocation intermediates in BPPS (adapted from Major and Weitman 2012). B, Biosynthetic steps from BPP to camphor. LiBDH, borneol dehydrogenase (Lukman et al. 2012).

2 - Results and discussion

2.1. Sequence analysis

Partial sequences of *LaBPPS* were obtained from 12 sets of ESTs obtained from a 454 cDNA library (Jullien et al. 2014). Amplifications of 5' and 3' ends were carried out by RACE assays. Then primers were defined in both 5' and 3' UTR to amplify the *LaBPPS* in full length (Table S1). Open reading frame of putative *LaBPPS* coded for a protein with 602 amino acids with a predicted molecular mass of ca. 70.6 kDa and a pI of 4.92. The deduced amino acid sequence of *LaBPPS* contained three motifs present in typical plant terpene synthases including the RR(x8)W required for cyclisation in mTPSs (Williams et al. 1998) and both DDxxD and (N,D)D(L,I,V)x(S,T)xxxE motifs (Fig. 3), which are responsible for the enzymatic activity including coordination of divalent Mg^{2+} cations (Degenhardt et al. 2009). On the

contrary, the LQLYEASFLL motif that is thought to be part of the active site (McGeady and Croteau 1995, Wise et al. 1998) was only partially conserved in LaBPPS compared to SoBPPS. These two enzymes shared 50% identity for their amino acids. A sequence of 63 amino acids upstream to two arginine residues suggested the presence of a putative transit peptide but no clear prediction to address the protein to a specific subcellular compartment could be found from an analysis with several software : chloro-P (Emanuelsson et al. 1999), signal-P (Petersen et al. 2011) and predotar (Small et al. 2004).

Finally, the genomic structure of *LaBPPS* was investigated. *LaBPPS* gene was amplified from genomic DNA using the same primers as defined in Table S1. Sequencing results showed that the *LaBPPS* contained six introns and seven exons placing this gene in the Class III TPS clade (Fig. 4). The genomic structure of *LaBPPS* was very similar to others lavender genes encoding monoterpene synthases confirming the highly conserved length of the exons 4 and 5 (Fig.S1). Introns 3 and 4 of *LaBPPS* were respectively the smallest (72 versus 155 for *LaCINS*) and the longest (178 versus 58 for *LaCINS*) from the five compared lavender TPS genes.

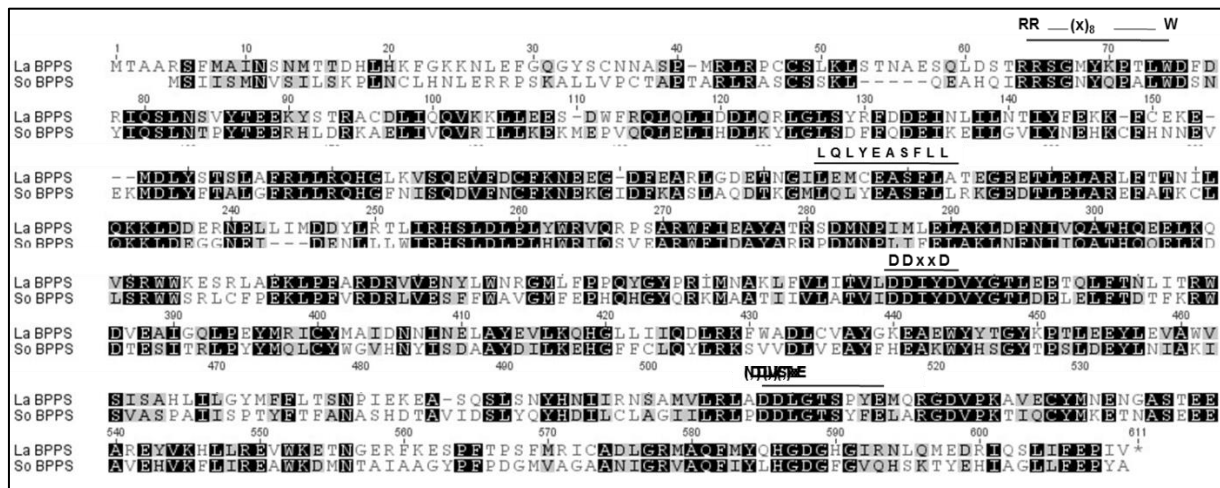


Fig.3 Paired alignment of the deduced amino acid sequences of *LaBPPS* (KM015221) and *SoBPPS* from *Salvia officinalis* (AF051900). The four conserved regions of terpene synthases are underlined.

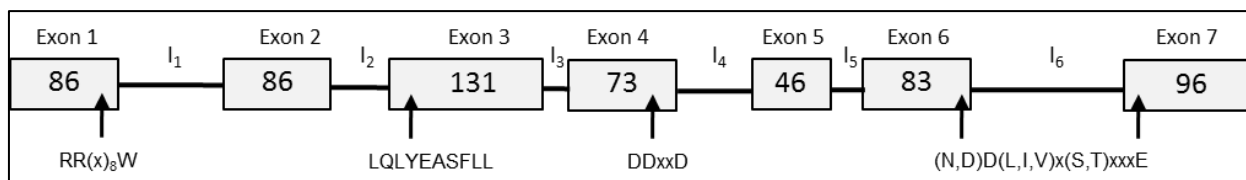


Fig. 4 Schematic representation of *LaBPPS* genomic DNA. Exons are denoted by rectangular boxes (Exon1 through Exon7), and introns are denoted by lines connecting adjacent exons (I1 through I6). Numbers inside the box indicate the number of amino acids encoded by that exon. The four conserved motifs are given below the exons, and the black arrows indicate their approximate position. Note: the conserved motif (N,D)D(L,I,V)x(S,T)xxxE amino acids is partly encoded by “Exon 6” and partly by “Exon 7”

2.2. Functional characterization

Recombinant LaBPPS was produced in the *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysS strain using the pHXGWA expression vector (Busso et al. 2005) and incubated with GPP. The purified LaBPPS produced several monoterpenes (Fig. 5a) and bornyl diphosphate (BPP). Alkaline phosphatase treatment was needed, after incubation with GPP, to dephosphorylate this prenyl diphosphate in borneol (Fig. 5b). Comparison of MS spectrum of borneol from standard and enzymatic activity is shown in Fig. 5c and d.

The optimum pH for the recombinant LaBPPS was found between 6.5 and 7 with a dramatic loss of enzymatic activity when the pH raised up to 7.5 (Fig. 6). Variation of pH did not affect the synthesis of all compounds in the same range; synthesis of BPP being mostly inhibited with a pH over 8 (data not shown). In order to compare product distribution of BPPS of *L. angustifolia* and *S. officinalis* in the same experimental conditions, SoBPPS was cloned using primers defined by Wise et al (1998). The *SoBPPS* cDNA was inserted in the pHXGWA expression vector, as reported previously for the *LaBPPS* and in vitro enzymatic activity of SoBPPS was performed at pH 6.5 (Fig. S1). SoBPPS catalyzed mainly the synthesis of borneol (75%) and less olefins (25%) as already reported by Wise et al. (1998) whereas LaBPPS produced less BPP and more terpenes like pinenes and camphene (Table 1). LaBPPS catalyzed specifically the synthesis of β -pinene whereas α -terpinolene and α -terpineol was found only in SoBPPS enzymatic assay. Finally, SoBPPS produced a higher amount of terpenes as LaBPPS suggesting a higher in vitro affinity for GPP substrate compared to those of LaBPPS (Fig. S1).

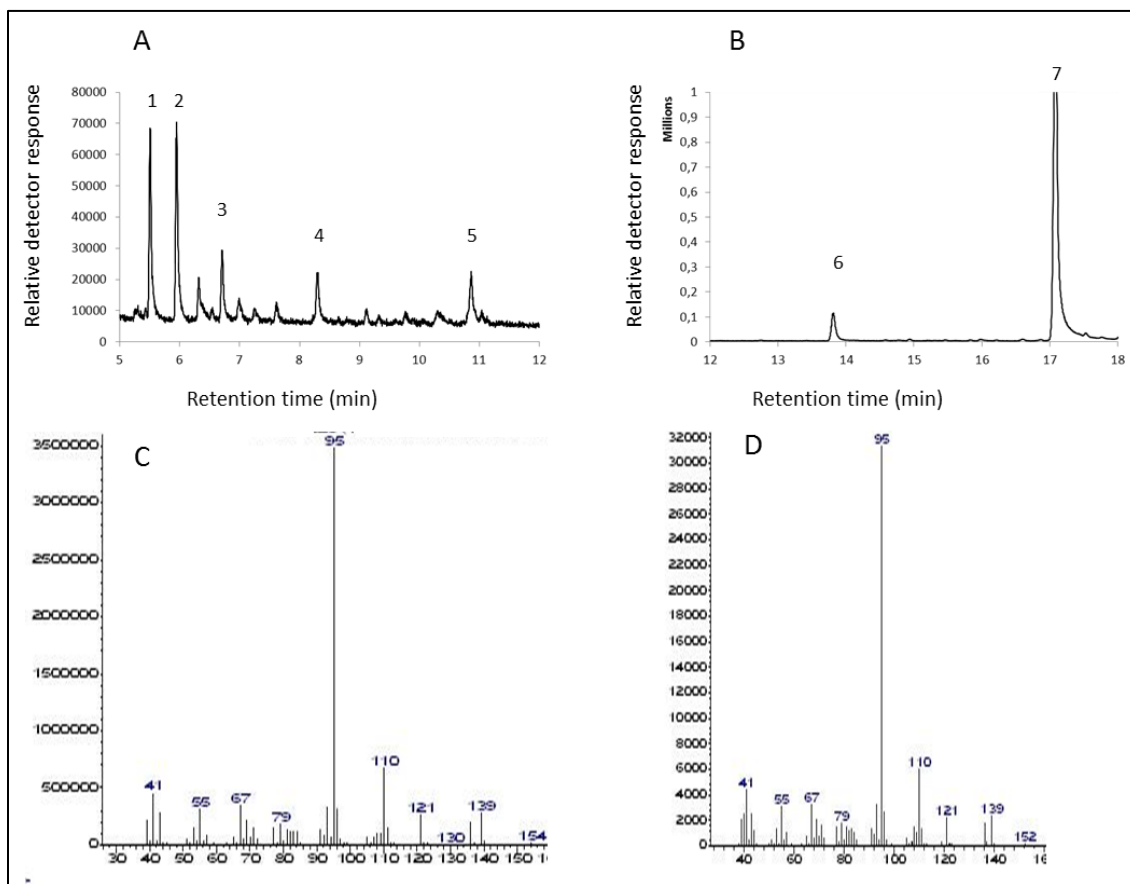


Fig. 5 Monoterpene products of LaBPPS measured in vitro and mass spectrum of borneol from NIST library and product of LaBPPS. The enzyme was expressed in *E. coli*, extracted and incubated with 50 mM GPP and 10 mM MgCl₂ and 1 mM MnCl₂ ions. A Products of LaBPPS after incubation, B products recovered after alkaline hydrolysis, C mass spectrum of borneol from NIST library, D mass spectrum of compound 6. Key to the terpene products was: 1 α -pinene, 2 camphene, 3 β -pinene, 4 limonene, 5 linalool, 6 borneol, 7 geraniol

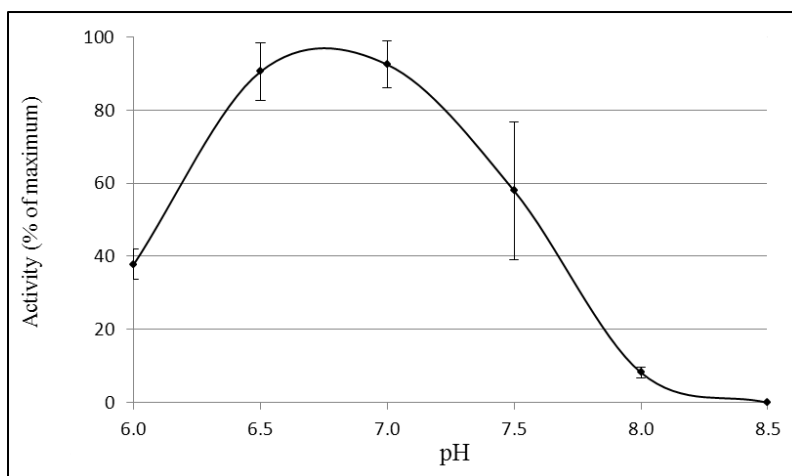


Fig. 6 Effect of pH on LaBPPS activity. Enzymatic activity was performed with 70 μ g of enzyme and 50 μ M GPP. Error bars indicate standard deviation, n=3.

Table 1: Identification and percentage distribution of compounds from in vitro enzymatic assay of LaBPPS and SoBPPS. Average and standard deviation are calculated from six and four independent experiments respectively for LaBPPS and SoBPPS. Three main compounds of both enzymatic assays are in bold letters.

Compounds	AI	AI	Average \pm standard deviation	
	Adams 1995	Calculated	LaBPPS	SoBPPS
α - pinene	932	931	23.6 ± 3.8	12.5 ± 4.4
camphene	946	947	18.5 ± 2.8	9.3 ± 4.7
β - pinene	974	976	8.0 ± 1.4	0
myrcene	988		0	1.6 ± 0.6
limonene	1024	1027	8.9 ± 2.3	8.9 ± 2.1
terpinolene	1086		0	5.6 ± 0.3
linalool	1095	1098	10.7 ± 1.9	1.8 ± 1.8
borneol	1165	1171	30.2 ± 7.6	57.8 ± 9.6
α -terpineol	1186		0	2.5 ± 0.1

2.3. Modelisation and structure / function comparison between SoBPPS and LaBPPS.

Subtle structural and physico-chemical differences have been observed between the active sites of LaBPPS homology model and SoBPPS crystal structure. These modifications affect their catalytic activity and may explain enzyme selectivity towards terpene and terpenoid compounds. Whittington et al. (2002) deciphered the substrate binding and selectivity of SoBPPS, emphasizing the crucial role played by residues W323, I344, V452 and F578. Among SoBPPS active site residues, V452, A453, S454 and F578 are replaced by I457, S458, A459 and H582 in LaBPPS, respectively (Fig. 7). Interestingly, the active site cavity volume is slightly higher in LaBPPS than in SoBPPS (780 vs 720 \AA^3) and the fraction of polar surface within the binding pocket is clearly in favor of LaBPPS (58 vs 44%). Such structural features, in conjunction with modifications of the physico-chemical properties of active site residues unravel the observed differences in substrate selectivity. In SoBPPS, the perfect fit of the substrate within the enzyme binding pocket prevents carbocation stabilization. The tight bounding between carbocations (terpinyl and bornyl cations) and the pyrophosphate co-product favors anti-Markovnikov reactions leading to the production of bornyl cation as the main carbocation (Whittington et al. 2002, Major et al. 2012). In the

case of LaBPPS, a higher fraction of polar residues interacting with the carbocation intermediate should increase its lifetime. The size of the binding pocket enables the classical Wagner-Meerwein rearrangement leading to the formation of more stable tertiary carbocations (pinyl and camphyl cations) and may explain the larger proportion of side products observed in LaBPPS, for instance (α - and β -) pinene and camphene.

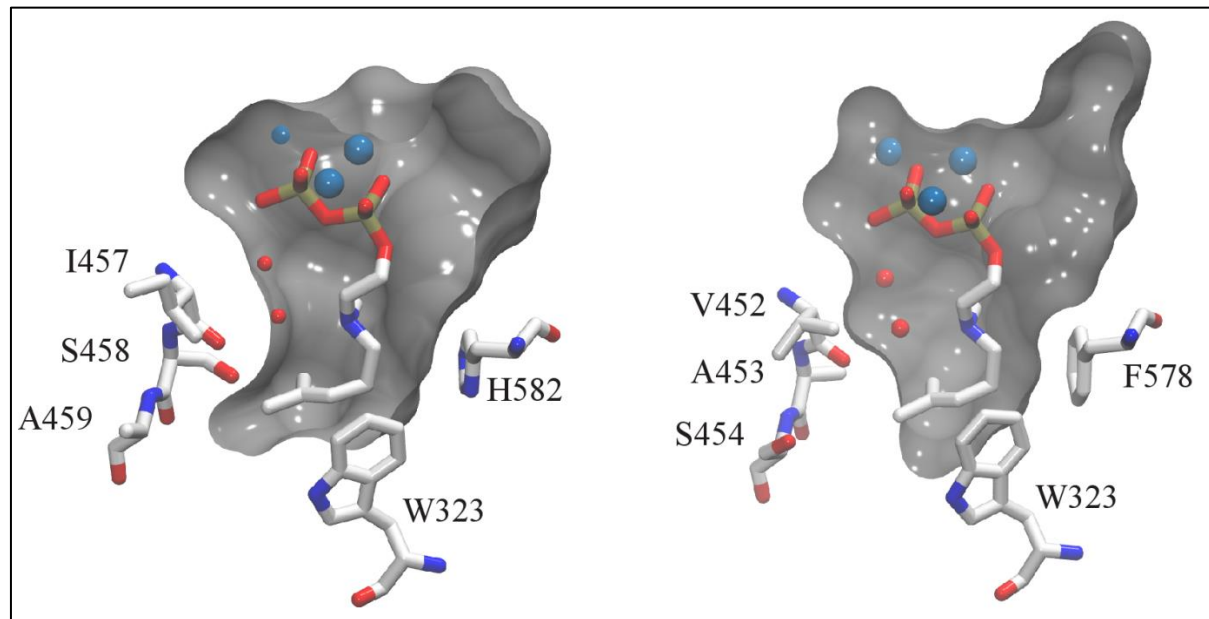


Fig. 7 LaBPPS (left) and SoBPPS (right) active site residues involved in carbocation stabilization. Shape of the active site is delimited in grey. Mg^{2+} ion and water molecules in the active site (#110 and #111 in SoBPPS) have been reported respectively as blue and red dots.

2.4. Bornyl diphosphate synthase expression in *L. angustifolia* cultivars and *L. latifolia*

A putative BPPS was sequenced from cDNA of *L. latifolia* using the same primers as for the LaBPPS. Protein alignment of both BPPS showed a high sequence homology with only 4 different amino acids (Fig. S2). Quantitative RT-PCR was performed on leaves of lavender of both species from three independent plants using the same primers (Fig. 8a). Two reverse transcription reactions were performed for each RNA extraction and each sample was analyzed in two repetitions leading therefore to 12 results per biological assay. Normalized expression relative to gene expression in leaves of *L. angustifolia* cv 'Diva' showed that LaBPPS was expressed in a range of 2 to 3 folds in the others lavenders samples.

Leaves were harvested on the same three plants for each sample. After hexane extraction, GC-MS analyses were performed in order to quantify borneol and camphor (Fig. 8b). Side products of the BPPS like pinene or camphene were not taken into account because they could be synthesized by others terpene synthases like limonene synthase. High amounts of borneol and camphor were noticed in *L. angustifolia* plants from a population of Calabre but were not correlated to a statistically significant expression of LaBPPS. Differences in the ability to convert BPP

into borneol in *L. angustifolia* and *L. latifolia* samples could explain the poor link observed between LaBPPS expression and camphor/borneol accumulation. Moreover, total terpene accumulation was higher in samples of *L. angustifolia* from Calabre and *L. latifolia* compared to *L. angustifolia* cv 'Diva' (data not shown) leading us to suppose that others factors like GPP supply are involved in terpene accumulation. Additional studies are needed to depict in more detail the role of substrate, and transcript accumulation of LaBPPS in the regulation of borneol biosynthesis.

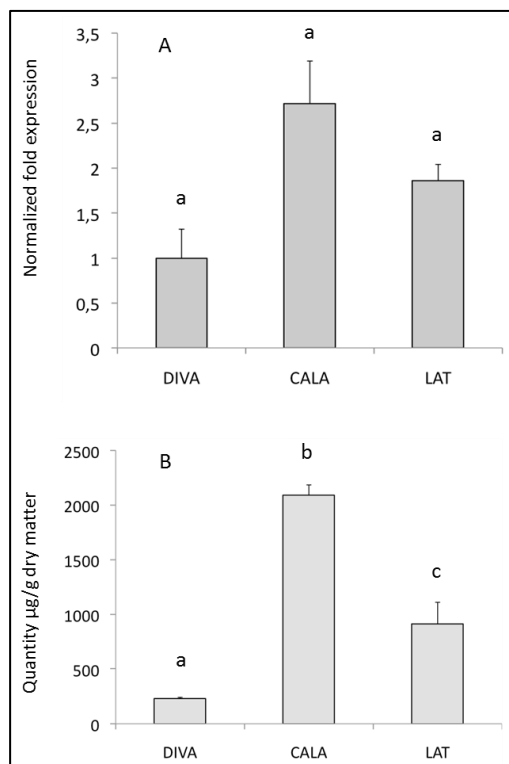


Fig. 8 Transcriptional activity of BPPS and terpene accumulation in leaves of *L. angustifolia* and *L. latifolia*. A Transcript levels of LaBPPS and LIBPPS normalized to β -actin, tubulin and GAPDH. B Borneol and camphor accumulation in *L. angustifolia* cv DIVA, *L. angustifolia* from Calabre (CALA) and *L. latifolia* (LAT). Statistical analyses were performed with the software REST for qPCR data and an ANOVA followed by a test of Fisher for terpene analysis. Values with different letters indicated a difference with a p value <0.05. Error bars indicate standard deviation n =12 in A and n=3 in B.

2.5. Phylogenetic analysis

A phylogenetic tree was constructed using all the available terpene synthases of lavender species and some sesquiterpene synthases of *Lamiaceae* (Fig. 9). LaBPPS was clustered into subfamily TPSb as expected from monoterpene synthases and rooted the TPSb lavender clade (Fig. 9). This result should underline that LaBPPS is an ancestor of others lavender TPSb and then borneol and perhaps camphor were among the first monoterpenes to be synthesized in the *Lavandula* subgenus. Polyploidy is common in the genus and several gene duplication has probably occurred further leading to the neofunctionalization

of several monoTPSs providing at least two subclade in lavender TPSb. This evolution process gets probably its paroxysm in species from the subgenus *Stoechas* (including *L. stoechas*, *L. viridis* and *L. pedunculata*) that synthesize the highest diversity of monoterpenes.

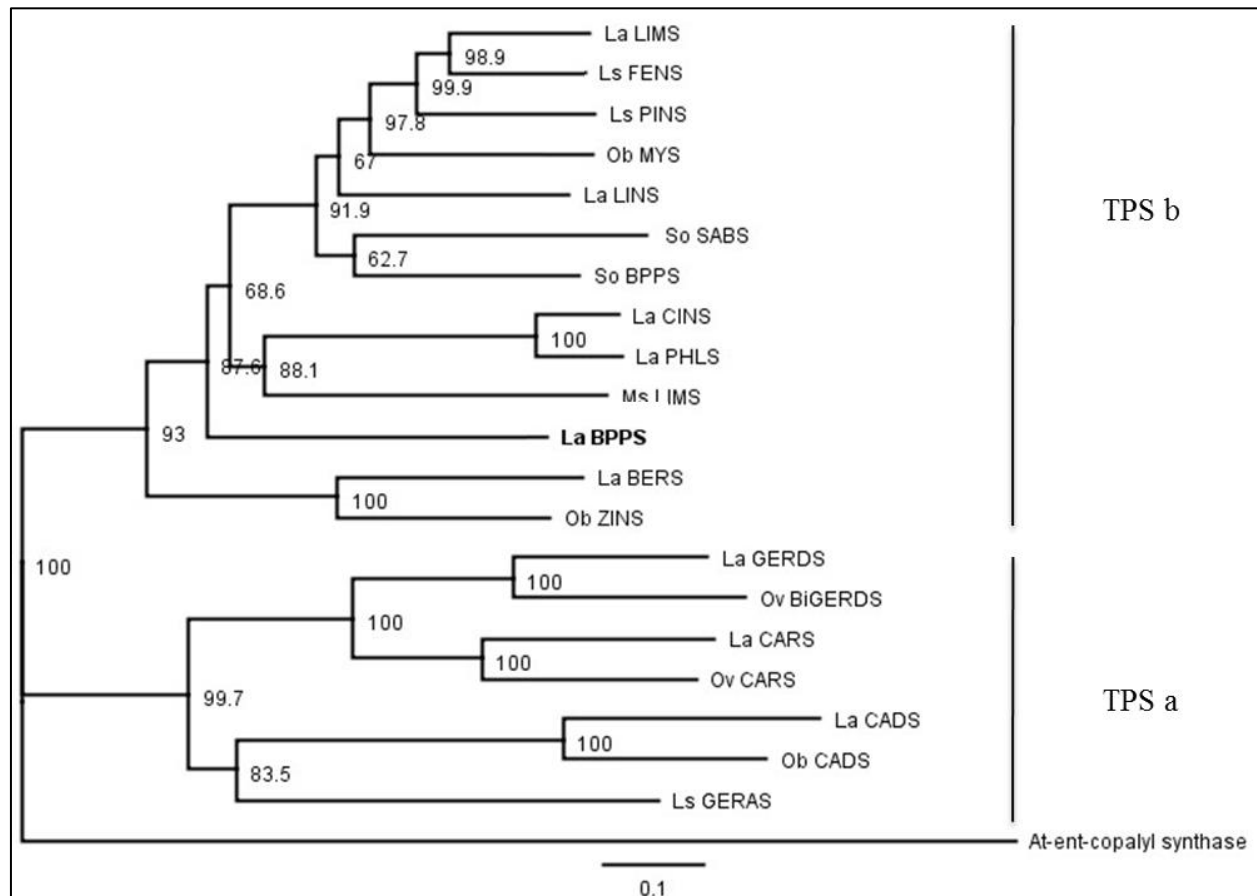


Fig. 9 Dendrogram analysis of monoterpene synthases of *L. angustifolia* mono and sesquiterpene synthases of *Lamiaceae* using the neighbour-joining method. **At** *Arabidopsis thaliana* : ent-copalyl synthase (NM116512); **La** *Lavandula angustifolia* : BERS α -bergamotene synthase (DQ263741); CADS τ -cadinol synthase (JX401282); CARS (E)- β -caryophyllene synthase (JX401283); CINS 1,8-cineole synthase (JN701461); GERDS germacrene D synthase (JX401284); LIMS limonene synthase (DQ263740); LINS linalool synthase (DQ263741); PHLS phellandrene synthase (HQ404305); BPPS bornyl diphosphate synthase (KM015221); **Ls** *Lavandula stoechas* : FENS fenchol synthase (JX501514); PINS α -pinene synthase (JX501515); Geras germacrene A synthase (JX501516); **Ms** *Mentha spicata* : LIMS (L13459); **Ob** *Ocimum basilicum* : CADS γ -cadinene synthase (AY693645); ZINS zingiberene synthase (AY693646); MYS myrcene synthase (AY693649); **Ov**, *Origanum vulgare* : CARS (GU385970); BiGERDS bicyclogermacrene D synthase (GU385973); **So** *Salvia officinalis* : SABS sabinene synthase; BPPS (AF051900).

3 - Conclusions

The culture of lavender in Provence is endangered both by phytoplasm disease and the production of cheaper lavender EO from emergent countries. The development of lavandin culture, a high productive hybrid between *L. angustifolia* and *L. latifolia* allowed to enhance the EO lavender productivity but with a lower value because the presence of borneol and camphor. To date, improvement of lavandin EO is processed by a costly fractionated distillation to remove camphor. A better knowledge of camphor biosynthesis in lavender could help to develop genetic markers for selective breeding and the production of new lavandin cultivars with an EO depleted in camphor. Moreover, *L. latifolia* is a lavender species that exhibit the highest resistance to phytoplasm disease but is known to produce an EO rich in camphor. A strategy of interference RNA could be applied to this species where a transformation technology has been developed (Munoz-Bertomeu et al. 2008, Mendoza-Poudereux et al. 2014). Finally, camphor is a main compound in all lavender species of the subgenus *Lavandula*. The characterization of the BPPS gene in several lavender species could lead to rebuild the evolutive history of this gene in the *Lavandula* genus.

4 - Experimental

4.1. Plant material

L. angustifolia plants cv 'Diva' grown in an experimental field in Manosque (Alpes de Haute Provence - France) were used to construct a 454 library previously reported in Jullien et al. 2014. *L. angustifolia* cv 'Diva', Calabre population and *L. latifolia* plants for quantification of BPPS gene expression were grown in field in Saint-Etienne.

4.2. RNA isolation and cloning

mRNA isolation using the nucleospin[®] RNA plant kit (Macherey Nagel) was followed by a reverse transcription. RACE assays were carried out to amplify 5' and 3' ends of the BPPS using the Marathon[®] cDNA amplification kit (Clontech, San Diego, CA), following the manufacturer's instructions. Sequences of primers used to clone LaBPPS in pGEMT were defined in both UTR (Table S1). DNA inserts cloned in the pGEMT[®]-Easy vector were sequenced by Eurofins MWG Operon (Germany, Ebersberg). For functional characterization the BPPS was cloned in the pHXGWA vector (Busso et al. 2005) using the Gateway technology. The 5' primer to clone gene in the entry vector (pENTR/D-TOPO) (Invitrogen,

USA) started three amino acids before the RR(x8)W sequence in order to delete the peptide signal and comprised an additional sequence for the hydrolysis of the GST-TPS recombinant protein by thrombin.

4.3. Expression of recombinant LaBPPS in *E. coli*

E. coli strain Rosetta (DE3) pLysS cells (Novagen, Darmstadt, Germany) were transformed with pHXGWA carrying the full length *LaBPPS* by heat shock. Production of the heterologous protein was performed during 14-16 h at 17°C and 150 rpm in terrific broth supplemented with 0.5% glycerol, 0.25 M D-sorbitol, 2.5 mM betaine after induction with 0.2 mM IPTG. The cells recovered by centrifugation were disrupted by incubation in native binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, 5% glycerol, 5 mM DTT, pH 8) supplemented with 0.5 mg/ml lysozyme and sonication. After clarification of the lysate by centrifugation, the recombinant protein was purified by binding to the Talon[®] metal affinity resin (Clontech) according to the manufacturer's instruction. The resin-bound protein was incubated overnight at 4°C in 200 µl of native binding buffer supplemented with 10 units of thrombin. The next day the TPS was recovered from the mixture by filtration. Protein concentration was measured using the Bio-Rad reagent with bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

4.4. Recombinant protein purification and electrophoresis

Enzymatic assays were performed in a final volume of 500 µl containing 15-70 µg purified recombinant protein, buffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1mg/ml BSA) and cofactors (10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). The reaction was started by addition of 50 µM geranyl or farnesyl diphosphate and the mixture was overlaid with 500 µl of hexane supplemented with methyl undecanoate (2 mg/L) as an internal standard. After 2-hour incubation at 30°C, the mixture was vigorously mixed and the upper hexane phase was collected, concentrated under nitrogen stream and analyzed by GC/MS. Negative controls were performed using the purified product from Rosetta (DE3) pLysS without expression vector.

4.5. GC-MS analysis

GC-MS analyses were performed on an Agilent GC 6850 gas chromatograph coupled with an Agilent 5973 ion trap mass detector. The instrument was equipped with a 30 m x 0.25 mm apolar capillary column DB5. Temperatures of injector and detector were 250°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 ml/min. Oven temperature settings were: 4 min at 60°C after injection followed by a 4°C/min

temperature ramp from 60°C to 240°C. Temperature was then kept on hold at 240°C for 5 min. Injection volume was 2 µl in split 1:2 mode. Molecule identification was performed using Wiley, NIST 05 and Adams mass spectra databases (Adams 2007). The GC products were *in fine* confirmed by comparing their retention time and mass spectrum to those of authentic α -pinene, β -pinene, camphene myrcene, limonene, linalool and borneol (Payan Bertrand France) Terpenes of *L. angustifolia* cv 'Diva' leaves and flowers were extracted with hexane as previously reported (Guitton et al, 2010) and analyzed as described above.

4.6. Transcript quantification by qPCR

LaBPPS expression levels were determined in leaves of both *L. angustifolia* and *L. latifolia* cultivars. Total RNAs were extracted from leaves of three plants using the Tri reagent kit (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) according to the manufacturer's instructions and treated with the RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, USA). A total of 2 µg of RNA was reverse transcribed using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) at 50°C for one hour with an oligo-dT primer. Each RNA sample was reverse-transcribed in two independent reactions.

Quantitative PCR was performed with CFX96™ real-time detection system (Bio-Rad, Hercules, USA) using the SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA). All reactions were carried out in a 20 µl volume using 2 µl of reverse transcribed cDNA as template and 500 nM of each of the primers according to the manufacturer's protocol. Each cDNA sample was amplified twice in two independent qPCR runs. As the RNA samples were reverse-transcribed in duplicate, this yielded four technical replicates per original sample. Three biological replicates were performed for each cultivar. The following thermal profile was used for all PCR reactions: 95 °C for 30 s, followed by 40 quantification cycles (95°C for 5 s, T_m (60°C) for 30s). After 40 cycles, a melting-curve analysis (65°C to 95°C, one fluorescence read every 0.5°C) was performed to check the specificity of the amplification.

Normalized expression values were calculated by the CFX96™ data manager (Bio-Rad, Hercules, USA) using *β -actin*, *tubulin* and *GAPDH* as referred in Jullien et al. 2014. The stability of expression of these reference genes was evaluated using Best-Keeper (Pfaffl et al. 2004), geNorm v. 3.5 (Vandesompele et al. 2002) and NormFinder (Andersen et al. 2004). We used REST 2009 (Pfaffl et al. 2002) to compare the expression level of a gene in a 'sample' group using a 'control' group as a reference by implementing a pairwise fixed reallocation randomization test (10000 iterations). Differences in expression between 'sample' and 'control' cDNAs are considered significant for p-values <0.05.

4.7. Model building and refinement

Blast search and sequence alignment were performed using the UniProt webserver and CLUSTAL software to identify similar sequences of LaBPPS. Homology modeling of LaBPPS was carried out with Modeller (Marti-Renom et al. 2000) using Bornyl diphosphate synthase (PDB identifier 1N20) as protein template. Homology model of LaBPPS with the highest DOPE score and no steric clash was then energy minimized using AMBER (Case et al. 2012) and the AMBER ff03 force-field Parameters. The solvation was treated implicitly with a generalized born model. The structural integrity of the homology model of LaBPPS was verified with Procheck (Laskowski et al. 1993). The positions of the magnesium ions, the water molecules and the substrate obtained from SoBPPS crystal structure were kept in order to compare structural features of enzyme active sites. Analysis of structural and physico-chemical properties of the binding pocket was achieved with the fpocket software (Le Guilloux et al. 2009).

Acknowledgements

This work was granted by the Rhône-Alpes country and by a fellowship of PhD from the French Ministry of Research. We thank Dr Busso who kindly provided the pHGGWA vector. We also thank Nicolas Boyer for the culture of lavender and tobacco plants. The CRIEPPAM is also thanked for providing *L. angustifolia* cv 'Diva' plants and essential oils. We are also grateful to the CNPMAI for providing wild fine lavender plants of a population from Calabre and spike lavender plants.

References

- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (fourth edition). Carol Stream, Allured Publ Corporation.
- Busso D, Busso BD, Moras D (2005) Construction of a set gateway-based destination vectors for high throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 343:313-321
- 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
- Case DA, Darden TA, Cheatham TE, III, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Walker RC, Zhang W, Merz KM, Roberts B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Swails J, Goetz AW, Kolossváry I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Wolf RM, Liu J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Cai Q, Ye X, Wang J, Hsieh M-J, Cui G, Roe DR, Mathews DH, Seetin MG, Salomon-Ferrer R, Sagui C, Babin V, Luchko T, Gusarov S, Kovalenko A and Kollman PA (2012). AMBER 12, University of California, San Francisco.
- Charles DJ, Renaud ENC, Simon JE (2002) Comparative study of essential oil quantity and composition from ten cultivars of organically grown lavender and lavandin. In: Lis-Balchin M (ed) *Lavender, the genus Lavandula*, Taylor & Francis, London, pp 232-42
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochem* 70:1621-1637
- Demissie ZA, Sarker LS, Mahmoud SS (2011) Cloning and functional characterization of β -phellandrene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Planta* 233: 685-696
- Demissie ZA, Cella MA, Sarker LS, Thompson TJ, Rheault MR, Mahmoud S (2012) Cloning, functional characterization and genomic organization of 1,8-cineole synthases from *Lavandula*. *Plant Mol Biol* 79: 393-411
- Demissie ZA, Erland LAE, Rheault MR, Mahmoud SS (2013) The biosynthetic origin of irregular monoterpenes in *Lavandula*. *J Biol Chem* 288 (9): 6333-41
- Emanuelsson O, Nielsen H, Von Heijne G (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8 (5) : 978-984
- Guitton Y, Nicolè F, Moja S, Valot N, Legrand S, Jullien F, Legendre L (2010) Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiol Plant* 138:150-163
- Jullien F, Moja S, Bony A, Legrand S, Petit C, Benabdelkader T, Poirot K, Fiorucci S, Guitton Y, Nicolè F, Baudino S, Magnard JL (2014) Isolation and functional characterization of a τ -cadinol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Plant Mol Biol* 84: 227-241

- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS and Thornton JM (1993). PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J App Cryst* 26:283-291
- Le Guilloux V, Schmidtke P, Tuffery P (2009) Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *Bioinformatics* 10:168
- Lukman SS, Galata M, Demissie ZA, Mahmoud SS (2012) Molecular cloning and functional characterization of borneol dehydrogenase from glandular trichomes of *Lavandula x intermedia*. *Arch Biochem Biophys* 528: 163-70
- Lukman SS Demissie ZA, Mahmoud SS (2013) Cloning of a sesquiterpene synthase from *Lavandula x intermedia* glandular trichomes. *Planta* 238: 983-89
- Major DT, Weitman M (2012) Electrostatically guided dynamics - The root of fidelity in a promiscuous terpene synthase ? *J Am Chem Soc* 134: 19454-62
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 291-325
- McGeady P, 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): 149-55.
- Mendoza-Poudereux I, Munoz-Bertomeu J, Navarro A, Arrillaga I, Segura J (2014) Enhanced levels of S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in spike lavender leaves. *Metab Eng* 23: 136-44.
- Munoz-Bertomeu J, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2008) Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metab Eng* 10: 166-77.
- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth* 8 (10): 785-786
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Edited by Krawetz SA, Misener S. Totowa, Humana Press, 365-386.
- Shellie R, Mondello L, Marriott P, Dugo G (2002) Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr A* 970: 225-34
- Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4 (6): 1581-1590
- Weitman M, Major DT (2010) Challenges posed to bornyl diphosphate synthase: diverging reaction mechanisms in monoterpenes. *J Am Chem Soc* 132: 6349-60

Wise ML, Savage TJ, Katahira E, Croteau R (1998) Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). J. Biol Chem 273 (24): 14891-99



Fig. S1 Comparison of amino acid sequences of bornyl diphosphate synthase from *L. angustifolia* cv'Diva' (LaBPPS) and *L. latifolia* (LIBPPS). Light blue and red colors are related to similar and non similar amino acids

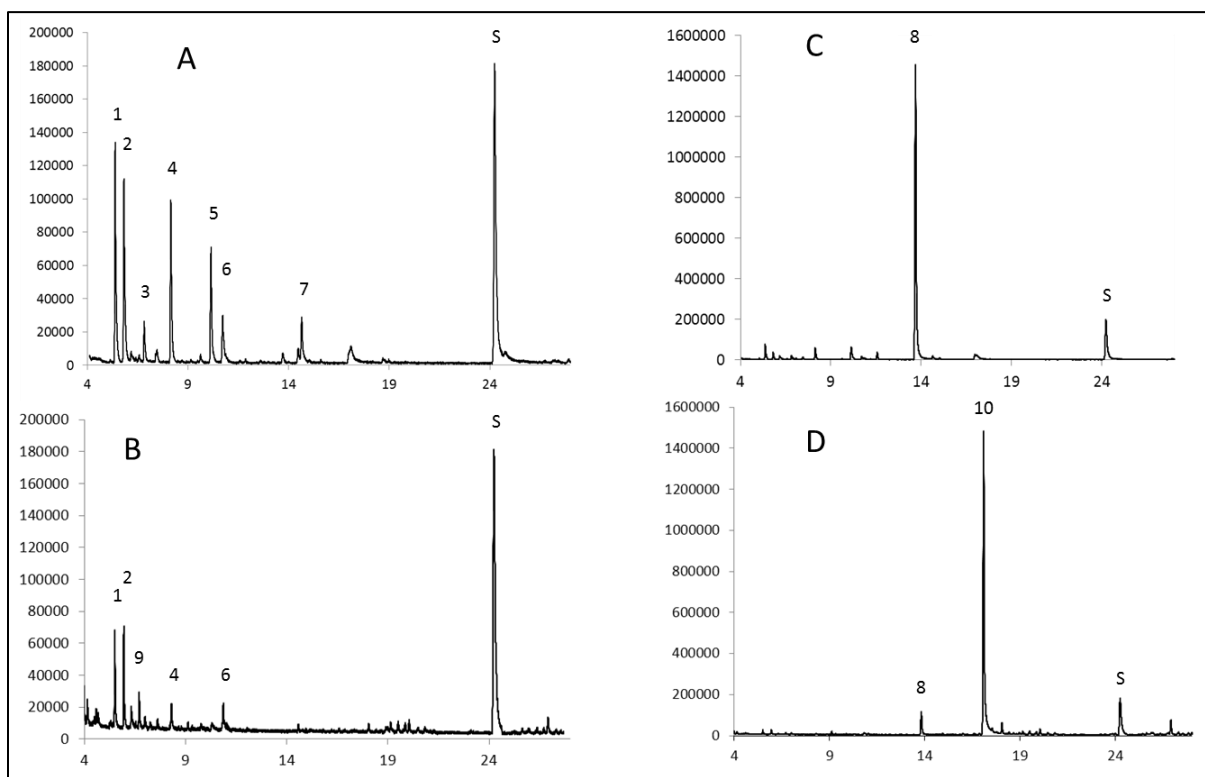


Fig. S2 Comparative enzymatic activity of LaBPPS and SoBPPS (Wise et al, 1998). Both sequences encoding BPPS were expressed in the same pHXGWA vector and enzymes were purified in the same experimental conditions. After purification, 50 μ g of both proteins were incubated in Landmann buffer pH6.5 (Landmann et al. 2007) for 2h at 30°C after the addition of 50 μ M GPP as substrate. A and B, products synthesized respectively by SoBPPS and LaBPPS. C-D products obtained from SoBPPS and LaBPPS enzymatic assays after incubation with 10 units of alkaline phosphatase overnight. 1 α -pinene, 2 camphene, 3 myrcene, 4 limonene, 5 α -terpinolene, 6 linalool, 7 α -terpineol, 8 borneol, 9 β -pinene, 10 geraniol, S internal standard (methyl undecanoate)

Table S1: Oligonucleotides and Tm used in this study

Target gene accession number	Primers	Amplicon length (bp)	Tm (°C)
Full length in pGEMT			
<i>LaBPPS</i> KM015221	F: 5'- ACTACGACGCTTCGTTCTGG R: 3'- CAGTCTTCGTATAGGCTTATATCG	1956	60
Full length in pENTR			
<i>LaBPPS</i>	F: 5' - CACCTTGGTTCCGCGTGGATCCGACTCTACAC GACGATCGGG R: 3' - CTATACAATAGGTTCAAATATCAAACCTCTGA ATGC	1653	60
q-RT-PCR			
<i>LaGAPDH</i> JX630157	F: 5'- CTGGAGAGGTGGAAGAGCTG R: 3'- GACTGTGGGAACTCGGAATG	130	63
<i>LaACTIN</i> GO448017	F: 5'- TGCTCAGTGGTGGATCGACTATG R: 3'- ACCACCTTAATCTTCATGCTGCTTG	95	60
<i>LaTUBULIN</i> GO448018	F: 5'- CCACAATCAAGACCAAGAGGACAATC R: 3'- CGCCAGGGACCACGGTTG	98	60
<i>LaBPPS</i>	F: 5'- GCGATCAATTCCAACATGAC R: 3'- GAGTTTGAGGGAGCAACACG	129	60

139

Table S2: Genomic structure of *LaBPPS* compared to those of *LaLIMS*, *LaLINS*, *LaBERS* (Landmann et al. 2007) and *LaCINS* (Demissie et al. 2012) showing the length of introns (I-VI) and exons (1-7).

Gene	1	I	2	II	3	III	4	IV	5	V	6	VI	7	Total
<i>LaLIMS</i>	246	65	272	81	396	105	216	82	138	105	250	74	291	2321
<i>LaLINS</i>	148	926	276	339	377	93	221	148	139	78	249	435	285	3714
<i>LaBERS</i>	82	140	256	91	379	79	218	90	138	94	250	89	294	2200
<i>LaCINS</i>	234	264	255	80	359	155	219	58	139	219	234	417	309	2942
<i>LaBPPS</i>	258	217	259	125	394	72	219	178	139	81	249	411	291	2893

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de cette thèse était d'étudier la diversité chimique des inflorescences de la lavande fine sur l'ensemble de son aire de répartition. Quatorze populations réparties en France, en Espagne et en Italie ont été analysées en GC/MS et 64 composés ont été identifiés. Grâce à l'utilisation de statistiques non supervisées, nous avons mis en évidence quatre chémotypes distincts : un chémotype similaire à celui des lavandes fines cultivées (chémotype 3), un chémotype avec une grande diversité de composés et une forte concentration de 1,8-cinéole (chémotype 4), un chémotype présentant de grandes proportions d'acétate de linalyle et de lavandulyle, à haute valeur ajoutée pour l'huile essentielle (chémotype 1) et enfin un chémotype dominé par le linalol, le bornéol et le 1,8-cinéole (chémotype 2). Les chémotypes 4 et 2 sont les plus atypiques et se trouvent être les chémotypes des populations provenant du sud de l'Italie et des Pyrénées, respectivement. En limite d'aire de répartition, ces populations présentent aussi des profils génétiques bien distincts des autres lavandes fines (Conord et al. 2012). L'isolement géographique, génétique et chimique de ces deux chémotypes indique des adaptations locales importantes et suggèrent un processus de spéciation en cours (Moja et al. 2015). Les deux autres chémotypes regroupent les populations du sud du Massif Central (chémotype 1) et celles provenant du centre de l'aire de répartition (chémotype 3). Là encore, on observe que des chémotypes distincts proviennent de régions distinctes même si la distinction de leurs profils génétiques est beaucoup moins évidente. Pourtant d'une manière globale, plus des populations sont proches géographiquement plus leurs profils chimiques et génétiques sont proches. On observe donc une bonne correspondance entre génétique, géographie et chimie à l'instar des études sur *Salvia fruticosa* (Skoula et al. 1999), *Pinus sylvestris* (Naydenov et al. 2005), *Cunila galioides* Benth (Fracaro et al. 2005) ou encore *Thymus vulgaris* (Granger and Passet 1973). La corrélation entre profils chimiques et génétiques n'est cependant pas une généralité. Par exemple elle n'est pas retrouvée chez le juniperus, le basilic ou encore le figuier (Adams et al. 2003; Masi et al. 2006; Oliveira et al. 2009). Le manque de corrélation chimie/génétique s'explique notamment par l'utilisation de marqueurs génétique criblant l'ensemble du génome et non pas seulement les gènes du métabolisme des terpènes ; par l'influence de l'environnement sur la production des terpènes ou encore par le fait qu'une modification génétique n'implique pas toujours une modification du phénotype. Dans notre cas, les données génétiques, chimiques et géographiques sont globalement en adéquation. Ceci nous amène à considérer les différences chimiques comme partie intégrante de l'adaptation des plantes à leur environnement. Cela soulève ainsi la question de leurs rôles écologiques. Chez *Quercus suber* par exemple, les profils d'émission sont associés à la provenance géographique des arbres et présentent un gradient de limonène ouest-est (du Portugal à l'Italie en passant par la France) dont la portée écologique est inconnue (Loreto et al. 2009). Pour mieux comprendre ces phénomènes, il serait intéressant de caractériser la chimie des différentes populations dans leur environnement naturel mais aussi de réaliser des expériences de transplantations réciproques afin d'évaluer la plasticité chimique des variations chimiques (Majetic et al. 2009). Chez *Thymus vulgaris*, six chémotypes existent dans la nature et sont définis en fonction du composé majoritaire de l'huile essentielle (Granger and Passet 1973). Ces

chénotypes présentent une localisation bien particulière en fonction de l'environnement même si, sur un même site, un mélange de chénotypes peut être retrouvé. L'analyse de la composition chimique sur différents sites a montré que lorsqu'un chénotype est minoritaire, la proportion de son composé majoritaire est réduite au profit du composé caractéristique du chénotype prépondérant sur le site (Thompson et al. 2003). Cet exemple soulève donc la question de l'influence de l'environnement local dans la production d'un composé et donc plus généralement sur le rôle adaptatif de ce composé. L'analyse de la composition chimique des quatre chénotypes de lavandes dans leur site naturel et dans les trois autres régions permettrait sûrement d'apporter quelques éléments de réponse quant au rôle potentiel de leurs composés.

Le deuxième objectif de la thèse était de caractériser l'impact du stress hydrique sur la physiologie et le contenu en terpènes volatils chez les lavandes. D'une manière générale les lavandes se sont montrées tolérantes à des valeurs de stress hydrique assez fortes. En effet, lorsque l'on détermine le potentiel hydrique à la perte de turgescence (noté π_{tip} pour « water potential at turgor loss »), on obtient -2,5 MPa. Cet indice est déterminé à partir des valeurs de RWC et de potentiel hydrique au cours du stress et correspond à la valeur de potentiel hydrique à partir de laquelle on peut considérer que la plante a perdu sa pression de turgescence (Bartlett et al. 2012). Il est utilisé afin de comparer la tolérance au stress hydrique de différentes espèces. Cette valeur de -2,5 MPa est conforme à la moyenne des plantes de milieu méditerranéen ce qui place les lavandes dans les plantes bien adaptées au climat méditerranéen. Pour comparaison, les plantes de milieu semi-désertique ont un potentiel hydrique à perte de turgescence d'environ -2,9 MPa et les plantes de milieu tempéré de -1,2 MPa. Même si nos résultats coïncident avec ceux attendus, des expérimentations en champs seraient nécessaires durant la période estivale afin de connaître l'intensité de stress hydrique que connaissent les lavandes dans leur milieu naturel et comment elles y font face sachant que d'autres stress tel que les UV ou la chaleur s'y rajoutent.

La comparaison des différents taxa nous a permis de mettre en évidence que les lavandes fines mettent en place une stratégie d'économie d'eau avec une fermeture rapide des stomates qui leur permettent de maintenir leur contenu en eau et l'intégrité de leur système photosynthétique sur une plus longue période que le lavandin ou la lavande aspic. Ces deux derniers sont affectés par le stress hydrique plus tôt et à des potentiels hydrique plus forts que les lavandes fines, laissant supposer leur moins bonne tolérance au stress hydrique. Au sein des lavandes fines, celle du Massif Central s'est montrée légèrement plus tolérante avec une stratégie particulièrement économe en eau grâce à la fermeture rapide des stomates. Ceci lui permet de maintenir son contenu en eau et son appareil photosynthétique stable jusqu'à un très faible potentiel hydrique (- 4 MPa). La population Pyrénéenne quant à elle peut être qualifiée de moins tolérante car la fermeture de ces stomates intervient à un potentiel hydrique plus faible et surtout se réalise en même temps que la diminution du contenu en eau et de l'intégrité du photosystème II. Lors d'un stress de faible intensité et de courte durée, la stratégie de la population pyrénéenne peut se révéler suffisante car elle permet de maintenir les échanges gazeux, donc la photosynthèse et la croissance (critères souvent retenus pour caractériser la tolérance ; Costa França et

al. 2000; Farahani et al. 2009). Elle permet aussi de limiter le stress oxydatif induit par le blocage de la photosynthèse (Lawlor and Cornic 2002; Bota et al. 2004; Flexas et al. 2004). Dans notre cas, nous pouvons considérer que la population du Massif Central est la plus tolérante à un stress sévère et de longue durée. Cette population est donc très prometteuse pour la sélection variétale puisque qu'elle présente un chémotype avec une huile essentielle de très bonne qualité et de forts rendements (Martin 2001). Il serait intéressant de tester la sensibilité de différentes populations du Massif Central à la maladie du dépérissement. S'il s'avérait que ces populations possèdent une bonne tolérance à la maladie, elles pourraient constituer un avenir prometteur pour la culture de la lavande.

L'impact du stress hydrique sur le contenu en terpène a montré un effet différentiel suivant le composé, la population et la date de prélèvement ne permettant pas de dégager de patrons généraux. Pourtant, la quantité totale de terpènes est multipliée par deux au jour 9 chez les lavandes fines du Massif Central soumises au stress hydrique. Cette augmentation est principalement due à l'augmentation des quatre composés de la voie du camphre : camphre, bornéol, camphène et bornyl acétate (Wise et al. 1998; Whittington et al. 2002; Sarker et al. 2012). De manière intéressante, le bornéol et le camphène sont aussi multipliés par trois chez les lavandins stressés au jour 12. Pourtant, ces surproductions ne correspondent pas à des états de stress hydrique identiques puisque la lavande fine est en stress hydrique faible (-1,3 MPa) alors que le lavandin est en stress intense (-4,8 MPa). On peut cependant s'interroger sur la fonction protectrice de l'augmentation de la voie du camphre, au moins chez la lavande fine du Massif Central. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences de fumigations sur des plantes en condition de stress hydrique. Ce type d'expérimentation a déjà été mené avec un mélange de monoterpènes (α -pinène, sabinène, β -pinène, cis-ocimène et trans-ocimène) chez *Quercus suber* pour mettre en évidence le rôle protecteur de ces composés face au stress thermique (Loreto et al. 1998; Delfine et al. 2000). Connaissant maintenant une des enzymes clé dans la formation du bornéol et du camphre chez la lavande : la bornyl diphosphate synthase, des expériences de génie génétiques sont envisageables. Par exemple, tester les effets morphologiques, physiologiques et biochimiques de la suppression de l'expression de cette enzyme lors d'un stress hydrique. On peut aussi envisager des transformations stables de gènes de terpène synthases exogènes comme cela a déjà été réalisées sur la lavande aspic afin d'étudier les voies métaboliques des terpènes (Muñoz-Bertomeu et al. 2008; Mendoza-Poudereux et al. 2014b). En vue d'obtenir des plantes avec des quantités de bornéol et de camphre différentes, les lavandes aspic pourraient être transformées avec le gène de la bornyl diphosphate synthase de sauge ou de lavande fine. En effet leur activité différentielle laisse supposer que la transformation de plante avec le gène de sauge donnera des plantes avec de plus fortes quantité de bornéol et de camphre. L'expérience « stress hydrique » pourrait alors corrélérer ou non une plus forte quantité des composés de la voie du camphre à une meilleure tolérance.

Parallèlement, le travail collaboratif entre le BVpam et l'IMBE de Marseille dans le cadre du programme CASDAR 2012-2014 devrait apporter des réponses complémentaires sur l'impact du stress hydrique sur le métabolisme des terpènes (Nicolè et al. 2014). En effet, ce travail a porté sur l'analyse de l'impact de la sécheresse sur différentes variétés de lavande et de lavandin cultivés sur toute la période de floraison. Des mesures morphologiques (auteur de la plante, diamètre longueur et nombre des épis floraux)

physiologiques (potentiel hydrique, transpiration, conductance stomatique, contenu en eau et photosynthèse) ainsi que des analyses du contenu et des émissions de terpènes, mais aussi de l'expression de certaines terpène synthases ont été réalisées. Les premiers résultats vont aussi dans le sens du moins bonne tolérance du lavandin au stress hydrique. De plus, les terpènes volatils contenus dans les feuilles ne montrent là aussi pas de très grande différence entre les plantes en stress et les plantes témoin. La chimie des fleurs est elle plus affectée par le stress hydrique et lorsque les composés sont modifiés c'est dans le sens d'une diminution. Il a été observé une diminution de linalol concomitante avec la diminution du taux de transcrite de la linalol synthase laissant présager un contrôle transcriptionnel. L'analyse de tous les résultats n'est pas encore terminée mais elle apportera sans doute de nouveaux éléments grâce à une approche plus globale intégrant contenu et émission de terpène mais aussi photosynthèse et régulation génique.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes mis en place par la lavande lors du stress hydrique et percevoir les relations entre les différentes voies du métabolisme des terpènes (aussi bien au niveau des terpènes volatils que des terpènes non volatils comme les caroténoïdes, les gibbérellines ou les stérols); des approches globales de métabolomique et de transcriptomique pourraient être utilisées (Deyholos 2010; Frank and Engel 2013; Ritter et al. 2014). La métabolomique permettrait d'analyser l'ensemble des métabolites modifiés par le stress hydrique et pas uniquement de certains comme c'est le cas dans notre étude. Relié avec d'autres paramètres physiologiques comme l'absorption de carbone et la photosynthèse, cela permettra de mieux comprendre les allocations de carbone chez la lavandes au cours du stress hydrique et les modulations potentielles terpènes volatils/terpènes non volatils. De plus, nous pourrions mettre en relation les variations de composés les uns avec les autres au cours du stress hydrique. Par exemple, chez *Rosmarinus officinalis* il a été montré que la quantité de lutéine diminue avec le stress hydrique alors que ce caroténoïde est une molécule importante pour faire face au stress oxydatif induit (Cruz de Carvalho 2008). Pourtant, le ratio lutéine/chlorophylle augmente de 80 % lors du stress hydrique ce qui montre que le romarin augmente bien sa capacité antioxydante par rapport à sa capacité de production du stress oxydatif (Munné-Bosch et al. 2001). Cet exemple illustre bien la nécessité de prendre en compte les variations de différentes molécules au cours du stress hydrique afin d'éviter toute erreur d'interprétation. Dans notre étude nous n'avons pu mettre en évidence de lien clair entre variation des terpènes volatils et variation de chlorophylle ou de β -carotène ce qui ne signifie pas que d'autres molécules comme la lutéine ou l' α -tocophérol n'y soient pas reliées. En parallèle de la métabolomique, l'analyse du transcriptome au cours du stress hydrique donnerait des informations complémentaires sur les régulations transcriptionnelles et leur cohérence avec les métabolites produits. En plus d'une meilleure compréhension des mécanismes de résistance mis en place lors d'un stress hydrique, elles permettraient sûrement d'être le point de départ d'autres recherches.

En conclusion, ce travail de thèse apporte de meilleures connaissances sur la diversité chimique des lavandes fines mais aussi sur leur tolérance au stress hydrique. La mise en évidence de l'implication potentielle de la voie du camphre dans la réponse au stress hydrique ainsi que la caractérisation d'une enzyme clé de cette voie permettra des études plus approfondies grâce notamment au génie génétique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abril M, Hanano R (1998) Ecophysiological responses of three evergreen woody Mediterranean species to water stress. *Acta Oecologica* 19:377–387.
- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography - mass spectrometry. Allured Publ. Corporation, Carol Stream (Ill.)
- Adams RP, Schwarzbach AE, Pandey RN (2003) The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. *Biochem Syst Ecol* 31:375–387.
- Affek HP, Yakir D (2002) Protection by Isoprene against Singlet Oxygen in Leaves. *Plant Physiol* 129:269–277.
- Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ (2005) Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci* 10:594–602.
- Aharon R, Shahak Y, Winer S, et al (2003) Overexpression of a Plasma Membrane Aquaporin in Transgenic Tobacco Improves Plant Vigor under Favorable Growth Conditions but Not under Drought or Salt Stress. *Plant Cell* 15:439–447.
- Alcamo J, Henrichs T, Rösch T (2000) World water in 2025 - Global modeling and scenario and analysis for the World Commission on Water for the 21 th century. Center for environmental systems research, University of Kassel
- An M, Haig T, Hatfield P (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.
- Apel K, Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399.
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59:206–216.
- Association pour le développement de l'apiculture provençale (2012) Production de miel de lavande. ADAPI Infos 13.
- Baher ZF, Mirza M, Ghorbanli M, Bagher Rezaii M (2002) The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L. *Flavour Fragr J* 17:275–277.
- Bahreinejad B (2013) Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*.
- Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, et al (2006) Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: “Talking Trees” in the Genomics Era. *Science* 311:812–815.

- Barkovich R, Liao JC (2001) REVIEW: Metabolic Engineering of Isoprenoids. *Metab Eng* 3:27–39.
- Bartlett MK, Scoffoni C, Sack L (2012) The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. *Ecol Lett* 15:393–405.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205–207.
- Battilana J, Emanuelli F, Gambino G, et al (2011) Functional effect of grapevine 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase substitution K284N on Muscat flavour formation. *J Exp Bot* err231.
- Baydar H, Kineci S (2009) Scent Composition of Essential Oil, Concrete, Absolute and Hydrosol from Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). *J Essent Oil Bear Plants* 12:131–136.
- Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, et al (2012) Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecol Lett* 15:365–377.
- Bergougnoux V, Caissard J-C, Jullien F, et al (2007) Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta* 226:853–866.
- Bertin N, Staudt M (1996) Effect of water stress on monoterpene emissions from young potted holm oak (*Quercus ilex* L.) trees. *Oecologia* 107:456–462.
- Bettaieb I, Zakhama N, Wannes WA, et al (2009) Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Sci Hortic* 120:271–275.
- Biehler K, Fock H (1996) Evidence for the Contribution of the Mehler-Peroxidase Reaction in Dissipating Excess Electrons in Drought-Stressed Wheat. *Plant Physiol* 112:265–272.
- Blanch J-S, Peñuelas J, Llusà J (2007) Sensitivity of terpene emissions to drought and fertilization in terpene-storing *Pinus halepensis* and non-storing *Quercus ilex*. *Physiol Plant* 131:211–225.
- Blande JD, Holopainen JK, Li T (2010) Air pollution impedes plant-to-plant communication by volatiles. *Ecol Lett* 13:1172–1181.
- Boelens MH (1995) Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* oils. *Perfum Flavorist* 20:23–51.
- Bohlmann J, Martin D, Oldham NJ, Gershenzon J (2000) Terpenoid Secondary Metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of a Myrcene/(E)- β -Ocimene Synthase. *Arch Biochem Biophys* 375:261–269.
- Bota J, Medrano H, Flexas J (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol* 162:671–681.
- Boudon-Padieu E, Maixner M (2007) Potential effects of climate change on distribution and activity of insect vectors of grapevine pathogens.
- Butler WL (1978) Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 29:345–378.

- Cadenas E, Davies KJA (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging1. *Free Radic Biol Med* 29:222–230.
- Caissard J-C, Meekijironenroj A, Baudino S, Anstett M-C (2004) Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *Am J Bot* 91:1190–1199.
- Calfapietra C, Scarascia Mugnozza G, Karnosky DF, et al (2008) Isoprene emission rates under elevated CO₂ and O₃ in two field-grown aspen clones differing in their sensitivity to O₃. *New Phytol* 179:55–61.
- Cao K-AL, Boitard S, Besse P (2011) Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* 12:253.
- Cao R, Zhang Y, Mann FM, et al (2010) Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 78:2417–2432.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM (2002) Biological activities of Lavender essential oil. *Phytother Res* 16:301–308.
- Chailan C (2010) Production et marchés des huiles essentielles de lavande & lavandins. Rapport d'activité 2010.
- Chaisse E, Candaele B, Taquin S, et al (2013) Dépérissement de la lavande: une histoire ancienne. *L'essentiel* 7.
- Chaisse E, Foissac X, Verdin E, et al (2010) Amélioration des stratégies de lutte contre le dépérissement de la lavande et du lavandin. CRIEPPAM
- Chaisse E, Fontaine M, Candaele B, et al (2014a) Retour sur notre passé : Du commerce des lavandes et de leur distillation dans le massif du ventoux.
- Chaisse E, Fontaine M, Candaele B, et al (2014b) Les données 2014 du CIHEF.
- Chameides WL, Lindsay RW, Richardson J, Kiang CS (1988) The role of biogenic hydrocarbons in urban photochemical smog: Atlanta as a case study. *Science* 241:1473–1475.
- Charles DJ, Joly RJ, Simon JE (1990) Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. *Phytochemistry* 29:2837–2840.
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 97:749–764.
- Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E (2011) The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J* 66:212–229.
- Cheng A, Lou Y, Mao Y, et al (2007) Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *J Integr Plant Biol* 49:179–186.

- Cimerman A, Pacifico D, Salar P, et al (2009) Striking Diversity of vmp1, a Variable Gene Encoding a Putative Membrane Protein of the Stolbur Phytoplasma. *Appl Environ Microbiol* 75:2951–2957.
- Cochard H, Venisse J-S, Barigah TS, et al (2007) Putative Role of Aquaporins in Variable Hydraulic Conductance of Leaves in Response to Light. *Plant Physiol* 143:122–133.
- Conord C, Despinasse Y, Moja S, et al (2012) Menaces sur l’or bleu – étude de la diversité génétique des lavandes fines sauvages et cultivées. *Sécondes rencontres végétales du Massif Central*
- Costa França MG, Pham Thi AT, Pimentel C, et al (2000) Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environ Exp Bot* 43:227–237.
- Cousin M., Moreau J., Staron T, Faivre-Amiot A (1970) Le “Deperissement jaune” du Lavandin nouvelle maladie a Mycoplasmes.
- Cruz de Carvalho MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* 3:156–165.
- Dat J, Vandenberghe S, Vranová E, et al (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci CMLS* 57:779–795.
- Daussy J (2015) Le phytoplasme du Stolbur (*Candidatus phytoplasma solani*) est-il capable de modifier la chimie des plantes infectées? *Laboratoire de biotechnologies appliquées aux plantes aromatiques et médicinales*
- Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70:1621–1637.
- Delfine S, Csiky O, Seufert G, Loreto F (2000) Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytol* 146:27–36.
- Demissie ZA, Cella MA, Sarker LS, et al (2012) Cloning, functional characterization and genomic organization of 1,8-cineole synthases from *Lavandula*. *Plant Mol Biol* 79:393–411.
- Demissie ZA, Erland LAE, Rheault MR, Mahmoud SS (2013) The biosynthetic origin of irregular monoterpenes in *Lavandula*: isolation and biochemical characterization of a novel cis prenyl diphosphate synthase gene - lavandulyl diphosphate synthase. *J Biol Chem*.
- Demissie ZA, Sarker LS, Mahmoud SS (2011) Cloning and functional characterization of β -phellandrene synthase from *Lavandula angustifolia*. *Planta* 233:685–696.
- Despinasse Y, Moja S, Conord C, et al Chemical variation over the natural range of the true lavender, in prep
- Deyholos MK (2010) Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant Cell Environ* 33:648–654.
- Dias MC, Brüggemann W (2010) Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. *Photosynthetica* 48:96–102.

- Dicke M, Baldwin IT (2010) The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the “cry for help.” *Trends Plant Sci* 15:167–175.
- Dray S, Dufour A. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Softw* 22:1–20.
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, et al (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:933–938.
- Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E (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, D’Auria JC, Nam KH, et al (1998) Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase – an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J* 14:297–304.
- Dudareva N, Murfitt LM, Mann CJ, et al (2000) Developmental Regulation of Methyl Benzoate Biosynthesis and Emission in Snapdragon Flowers. *Plant Cell* 12:949–961.
- Dudareva N, Negre F (2005) Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Curr Opin Plant Biol* 8:113–118.
- Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006) Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 25:417–440.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004) Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol* 135:1893 – 1902.
- Duru J-N, Naviner B (1998) *Parfums de lavande. Les routes de la lavande*
- Fábíán A, Jäger K, Barnabás B (2013) Developmental stage dependency of the effect of drought stress on photosynthesis in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Acta Agron Hung* 61:13–21.
- Fabre A, Balakishiyeva G, Ember I, et al (2011a) StAMP encoding the antigenic membrane protein of stolbur phytoplasma is useful for molecular epidemiology. *Bull Insectology* S21–S22.
- Fabre A, Danet J-L, Foissac X (2011b) The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* 472:37–41.
- Faculté de médecine de Paris (1837) *Codex, pharmacopée française*. Bechet Jeune
- Fahn A (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol* 108:229–257.
- Fantaye C, Degenhardt J, Gershenzon J (2014) Plant volatiles as key players in diverse ecological interactions. *Endocytobiosis Cell Res* 1–8.
- Farahani HA, Valadabadi SA, Daneshian AH, Khalvati mohammad A (2009) Medicinal and aromatic plants farming under drought conditions. *J Horticult For* 1:086–092.

- Fares S, Mereu S, Scarascia Mugnozza G, et al (2009) The ACCENT-VOCBAS field campaign on biosphere-atmosphere interactions in a Mediterranean ecosystem of Castelporziano (Rome): site characteristics, climatic and meteorological conditions, and eco-physiology of vegetation. *Biogeosciences* 6:1043–1058.
- Fares S, Park J-H, Gentner DR, et al (2012) Seasonal cycles of biogenic volatile organic compound fluxes and concentrations in a California citrus orchard. *Atmospheric Chem Phys Discuss* 12:17987–18027.
- Farrant JM (2000) A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecol* 151:29–39.
- Farrant JM, Brandt W, Lindsey GG (2007) An overview of mechanisms of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. *Plant Stress J* 72:84.
- Flexas J, Bota J, Loreto F, et al (2004) Diffusive and Metabolic Limitations to Photosynthesis under Drought and Salinity in C3 Plants. *Plant Biol* 6:269–279.
- Fortunati A, Barta C, Brillì F, et al (2008) Isoprene emission is not temperature-dependent during and after severe drought-stress: a physiological and biochemical analysis. *Plant J* 55:687–697.
- Fowler D, Pilegaard K, Sutton MA, et al (2009) Atmospheric composition change: Ecosystems–Atmosphere interactions. *Atmos Environ* 43:5193–5267.
- Fracaro F, Zacaria J, Echeverrigaray S (2005) RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochem Syst Ecol* 33:409–417.
- Frank T, Engel KH (2013) Metabolomic analysis of plants and crops. *Woodhead Publ Ser Food Sci Technol Nutr No251* 148–191.
- Galmés J, Medrano H, Flexas J (2007) Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol* 175:81–93.
- García-Plazaola JI, Becerril JM (1999) A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem Anal* 10:307–313.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D (2003) Espèces réactives de l’oxygène. Comment l’oxygène peut-il devenir toxique. *Actual Chim* 91–96.
- Garnier M (2000) The stolbur phytoplasma : an ubiquitous agent. *Comptes Rendus Académie Agric Fr* 86:27–33.
- Gassert F, Landis M, Luck M, et al (2013) AQUEDUCT GLOBAL MAPS 2.0. Working paper. World resources institute, Washington, DC
- Gaudeul M, Taberlet P, Till-Bottraud I (2000) Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Mol Ecol* 9:1625–1637.

- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KAS, et al (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* 4:ra32.
- Genard-Zielinski A-C, Ormeño E, Boissard C, Fernandez C (2014) Isoprene Emissions from Downy Oak under Water Limitation during an Entire Growing Season: What Cost for Growth? *PLoS ONE* 9:e112418.
- Genest S (2014) Identification des Composés Organiques Volatils émis par les plantes hôtes de *Hyalesthes obsoletus* vecteur du phytoplasme *Candidatus phytoplasma*. Laboratoire de biotechnologies appliquées aux plantes aromatiques et médicinales
- Gershenzon J, Lincoln DE, Langenheim JH (1978) The effect of moisture stress on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii*. *Biochem Syst Ecol* 6:33–43.
- Gershenzon J, McCaskill D, Rajaonarivony JIM, 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 ME, Croteau RB (2000) Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. *Plant Physiol* 122:205–214.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930.
- Gomme A, Krausz M, Chaisse E, et al (2010a) Situation des productions étrangères en lavandes. L'essentiel 2.
- Gomme A, Krausz M, Chaisse E, et al (2010b) DIVA: une lavande clonale tolérante au dépérissement à phytoplasme. L'essentiel 5.
- Gouinguéné SP, Turlings TCJ (2002) The Effects of Abiotic Factors on Induced Volatile Emissions in Corn Plants. *Plant Physiol* 129:1296–1307.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388:151–157.
- Granger R, Passet J (1973) *Thymus vulgaris* spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry* 12:1683–1691.
- Griesser M, Weingart G, Schoedl-Hummel K, et al (2015) Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). *Plant Physiol Biochem* 88:17–26.
- Grote R, Lavoit A-V, Rambal S, et al (2009) Modelling the drought impact on monoterpene fluxes from an evergreen Mediterranean forest canopy. *Oecologia* 160:213–223.
- Grote R, Mayrhofer S, Fischbach RJ, et al (2006) Process-based modelling of isoprenoid emissions from evergreen leaves of *Quercus ilex* (L.). *Atmos Environ* 40, Supplement 1:152–165.

- Guenther A, Hewitt CN, Erickson D, et al (1995) A global model of natural volatile organic compound emissions. *J Geophys Res Atmospheres* 100:8873–8892.
- Guitton Y (2010) Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula*: aspects évolutifs et physiologiques. Thèse. Université Jean Monnet- Saint Etienne
- Guitton Y, Nicolè F, Moja S, et al (2010a) Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiol Plant* 138:150–163.
- Guitton Y, Nicole F, Moja S, et al (2010b) Lavender inflorescence. *Plant Signal Behav* 5:749–751.
- Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21:79–102.
- Hassiotis CN, Ntana F, Lazari DM, et al (2014) Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of *Lavandula angustifolia* during flowering period. *Ind Crops Prod* 62:359–366.
- Heil M, Bueno JCS (2007) Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc Natl Acad Sci* 104:5467–5472.
- Hemmerlin A, Hoeffler J-F, Meyer O, et al (2003) Cross-talk between the Cytosolic Mevalonate and the Plastidial Methylerythritol Phosphate Pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *J Biol Chem* 278:26666–26676.
- Herbette S, Lenne C, De Labrouhe DT, et al (2003) Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. *Physiol Plant* 119:418–428.
- Herraiz-Peñalver D, Cases MÁ, Varela F, et al (2013) Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil from Spanish wild populations. *Biochem Syst Ecol* 46:59–68.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6:431–438.
- Holopainen JK, Gershenzon J (2010) Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci* 15:176–184.
- Hossaert-McKey M, Soler C, Schatz B, Proffit M (2010) Floral scents: their roles in nursery pollination mutualisms. *Chemoecology* 20:75–88.
- Iglesias A, Garrote L, Flores F, Moneo M (2006) Challenges to Manage the Risk of Water Scarcity and Climate Change in the Mediterranean. *Water Resour Manag* 21:775–788.
- Iriti M, Colnaghi G, Chemat F, et al (2006) Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. *Flavour Fragr J* 21:704–712.

ISO 3515 (2002) Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.).

Joffre R, Rambal S, Demesin C (1999) Functional attributes in Mediterranean-type Ecosystems. In: Handbook of functional plant ecology, Marcel Dekker, Inc. Francisco I. Pugnaire and Fernando Valladares, New York, pp 347–380

Johnston C (1989) The Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data, Volumes 1-7 (McLafferty, Fred W.; Stauffer, Douglas B.). J Chem Educ 66:A256.

Jubany-Marí T, Munné-Bosch S, López-Carbonell M, Alegre L (2009) Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. J Exp Bot 60:107–120.

Jullien F, Moja S, Bony A, et al (2014) Isolation and functional characterization of a τ -cadinol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Lavandula angustifolia*. Plant Mol Biol 84:227–241.

Kainulainen P, Oksanen J, Palomäki V, et al (1992) Effect of drought and waterlogging stress on needle monoterpenes of *Picea abies*. Can J Bot 70:1613–1616.

Kampranis SC, Ioannidis D, Purvis A, et al (2007) Rational Conversion of Substrate and Product Specificity in a *Salvia* Monoterpene Synthase: Structural Insights into the Evolution of Terpene Synthase Function. Plant Cell 19:1994–2005.

Kaplan I (2012) Trophic Complexity and the Adaptive Value of Damage-Induced Plant Volatiles. PLoS Biol 10:e1001437.

Kegge W, Pierik R (2010) Biogenic volatile organic compounds and plant competition. Trends Plant Sci 15:126–132.

Khalil A a. M, Grace J (1993) Does Xylem Sap ABA Control the Stomatal Behaviour of Water-Stressed Sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) Seedlings? J Exp Bot 44:1127–1134.

Kleinwächter M, Paulsen J, Bloem E, et al (2015) Moderate drought and signal transducer induced biosynthesis of relevant secondary metabolites in thyme (*Thymus vulgaris*), greater celandine (*Chelidonium majus*) and parsley (*Petroselinum crispum*). Ind Crops Prod 64:158–166.

Kline KG, Barrett-Wilt GA, Sussman MR (2010) In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. Proc Natl Acad Sci U S A 107:15986–15991.

Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. Trends Plant Sci 6:262–267.

Kolosova N, Gorenstein N, Kish CM, Dudareva N (2001) Regulation of Circadian Methyl Benzoate Emission in Diurnally and Nocturnally Emitting Plants. Plant Cell 13:2333–2347.

Krausz M, Gomme A, Chaisse E, et al (2011) Dépérissement: de nouveaux résultats encourageants et prometteurs. L'essentiel 4.

Kubitzki K, Kadereit JW (2003) The families and Genera of Vascular Plants- VII Flowering Plants-Dicotyledons, Springer. K.Kubitzki

- Kwak JM, Mori IC, Pei Z-M, et al (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 22:2623–2633.
- Landmann C, Fink B, Festner M, et al (2007) Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Arch Biochem Biophys* 465:417–429.
- Lane A, Boeckleemann A, Woronuk G, et al (2010) A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*. *Planta* 231:835–845.
- Lange BM, Mahmoud SS, Wildung MR, et al (2011) Improving Peppermint Essential Oil Yield and Composition by Metabolic Engineering. *Proc Natl Acad Sci* 108:16944–16949.
- Larkov O, Zaks A, Bar E, et al (2008) Enantioselective monoterpene alcohol acetylation in *Origanum*, *Mentha* and *Salvia* species. *Phytochemistry* 69:2565–2571.
- Laule O, Fürholz A, Chang H-S, et al (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6866–6871.
- Lavoir AV, Duffet C, Mouillot F, et al (2011) Scaling-up leaf monoterpene emissions from a water limited *Quercus ilex* woodland. *Atmos Environ* 45:2888–2897.
- Lavoir AV, Staudt M, Schnitzler JP, et al (2009) Drought reduced monoterpene emissions from the evergreen Mediterranean oak *Quercus ilex*: results from a throughfall displacement experiment.
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25:275–294.
- Lawlor DW, Tezara W (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann Bot* 103:561–579.
- Leguet A, Gibernau M, Shintu L, et al (2014) Evidence for early intracellular accumulation of volatile compounds during spadix development in *Arum italicum* L. and preliminary data on some tropical Aroids. *Naturwissenschaften* 101:623–635.
- Lelièvre F, Sala S, Ruget F, Voltaire F (2011) Evolution climatique du Sud de la France 1950-2009, Projet CLIMFOUREL PSDR-3, Régions L-R, M-P, M- A.
- Les synthèses de FranceAgriMer (2013) Production et marchés des huiles essentielles de lavandes et lavandins.
- Liang S-J, Wu H, Lun X, Lu D-W (2006) Secretory Cavity Development and Its Relationship with the Accumulation of Essential Oil in Fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle. *J Integr Plant Biol* 48:573–583.
- Lian H-L, Yu X, Ye Q, et al (2004) The Role of Aquaporin RWC3 in Drought Avoidance in Rice. *Plant Cell Physiol* 45:481–489.
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400:271–274.

- Lis-Balchin M (2002) Lavander. The genus *Lavandula*, Taylor&Francis. Lis-Balchin Maria
- Liu C, Liu Y, Guo K, et al (2011) Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environ Exp Bot* 71:174–183.
- Liu X, Hua X, Guo J, et al (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett* 30:1275–1280.
- Llusà J, Peñuelas J (2000) Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. *Am J Bot* 87:133–140.
- Llusà J, Peñuelas J (1998) Changes in terpene content and emission in potted Mediterranean woody plants under severe drought. *Can J Bot* 76:1366–1373.
- Llusà J, Peñuelas J, Alessio GA, Estiarte M (2006) Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of terpenes and other volatile organic compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. *Physiol Plant* 127:632–649.
- Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F (1999) Antioxidative Defense System, Pigment Composition, and Photosynthetic Efficiency in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought. *Plant Physiol* 119:1091–1100.
- Loreto F, Bagnoli F, Fineschi S (2009) One species, many terpenes: matching chemical and biological diversity. *Trends Plant Sci* 14:416–420.
- Loreto F, Ciccioli P, Cecinato A, et al (1996) Influence of Environmental Factors and Air Composition on the Emission of [alpha]-Pinene from *Quercus ilex* Leaves. *Plant Physiol* 110:267–275.
- Loreto F, Förster A, Dürr M, et al (1998) On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. *Plant Cell Environ* 21:101–107.
- Loreto F, Mannozi M, Maris C, et al (2001) Ozone Quenching Properties of Isoprene and Its Antioxidant Role in Leaves. *Plant Physiol* 126:993–1000.
- Loreto F, Pollastri S, Fineschi S, Velikova V (2014) Volatile isoprenoids and their importance for protection against environmental constraints in the Mediterranean area. *Environ Exp Bot* 103:99–106.
- Loreto F, Schnitzler J-P (2010) Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci* 15:154–166.
- Loreto F, 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.
- Lücker J, Bouwmeester HJ, Schwab W, et al (2001) Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside. *Plant J* 27:315–324.

- Lu S, Xu R, Jia J-W, et al (2002) Cloning and Functional Characterization of a β -Pinene Synthase from *Artemisia annua* That Shows a Circadian Pattern of Expression. *Plant Physiol* 130:477–486.
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139–158.
- Mahmoud SS, Croteau RB (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc Natl Acad Sci* 98:8915–8920.
- Maietti S, Rossi D, Guerrini A, et al (2013) A multivariate analysis approach to the study of chemical and functional properties of chemo-diverse plant derivatives: lavender essential oils. *Flavour Fragr J* 28:144–154.
- Majetic CJ, Raguso RA, Ashman T-L (2008) The impact of biochemistry vs. population membership on floral scent profiles in colour polymorphic *Hesperis matronalis*. *Ann Bot* 102:911–922.
- Majetic CJ, Raguso RA, Ashman T-L (2009) Sources of floral scent variation. *Can Environ Define Flor Scent Phenotype* 129–131.
- Martin DM, Gershenzon J, Bohlmann J (2003) Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce. *Plant Physiol* 132:1586–1599.
- Martin E (2001) Evaluation de populations de lavandes et de clones de lavandin a des fins de selection. *Universite d'Anger*
- Masi LD, Siviero P, Esposito C, et al (2006) Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur Food Res Technol* 223:273–281.
- Maurel C (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Lett* 581:2227–2236.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668.
- Mayer CJ, Vilcinskas A, Gross J (2008) Phytopathogen Lures Its Insect Vector by Altering Host Plant Odor. *J Chem Ecol* 34:1045–1049.
- Mayrhofer S, Teuber M, Zimmer I, et al (2005) Diurnal and Seasonal Variation of Isoprene Biosynthesis-Related Genes in Grey Poplar Leaves. *Plant Physiol* 139:474–484.
- McAinsh MR (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* 343:186–188.
- McCaskill D, Croteau R (1999) Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Tetrahedron Lett* 40:653–656.
- McConkey ME, Gershenzon J, Croteau RB (2000) Developmental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiol* 122:215–224.
- McGarvey DJ, Croteau R (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7:1015–1026.

- Medrano H, Escalona JM, Bota J, et al (2002) Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Ann Bot* 89:895–905.
- Mehler AH (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch Biochem Biophys* 34:339–351.
- Mendoza-Poudereux I, Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Segura J (2014a) Deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase is not a rate-determining enzyme for essential oil production in spike lavender. *J Plant Physiol* 171:1564–1570.
- Mendoza-Poudereux I, Muñoz-Bertomeu J, Navarro A, et al (2014b) Enhanced levels of S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in spike lavender leaves. *Metab Eng* 23:136–144.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33:453–467.
- Miller G, Suzuki N, Rizhsky L, et al (2007) Double Mutants Deficient in Cytosolic and Thylakoid Ascorbate Peroxidase Reveal a Complex Mode of Interaction between Reactive Oxygen Species, Plant Development, and Response to Abiotic Stresses. *Plant Physiol* 144:1777–1785.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410.
- Moja S, Guitton Y, Nicolè F, et al (2015) Genome size and plastid trnK-matK markers give new insights into the evolutionary history of the genus *Lavandula* L. *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol* 0:1–9.
- Monge R (2012) Les Routes de la Lavande : au carrefour du développement culturel et de la valorisation de la ressource. In: *Routes touristiques et itinéraires culturels, entre mémoire et développement*. Quebec, Canada, pp 139–147
- Monson RK, Trahan N, Rosenstiel TN, et al (2007) Isoprene emission from terrestrial ecosystems in response to global change: minding the gap between models and observations. *Philos Trans R Soc Lond Math Phys Eng Sci* 365:1677–1695.
- Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, et al (2010) Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Ind Crops Prod* 32:639–649.
- Moulin N (2003) Les cueilleuses “dans le sauvage”, femmes du Verdon et parfum de lavande. *Garance Voyag.* 19–23.
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol* 125:1558–1566.
- Munné-Bosch S (2005) The role of -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162:743–748.

- Munné-Bosch S, Alegre L (2000) Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210:925–931.
- Munné-Bosch S, Mueller M, Schwarz K, Alegre L (2001) Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *J Plant Physiol* 158:1431–1437.
- Munoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J (2006) Up-Regulation of 1-Deoxy-d-Xylulose-5-Phosphate Synthase Enhances Production of Essential Oils in Transgenic Spike Lavender. *Plant Physiol* 142:890–900.
- Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Segura J (2007a) Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochem Syst Ecol* 35:479–488.
- Muñoz-Bertomeu J, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2008) Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metab Eng* 10:166–177.
- Muñoz-Bertomeu J, Sales E, Ros R, et al (2007b) Up-regulation of an N-terminal truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase enhances production of essential oils and sterols in transgenic *Lavandula latifolia*. *Plant Biotechnol J* 5:746–758.
- Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot* ert208.
- Nagel R, Berasategui A, Paetz C, et al (2014) Overexpression of an Isoprenyl Diphosphate Synthase in Spruce Leads to Unexpected Terpene Diversion Products That Function in Plant Defense. *Plant Physiol* 164:555–569.
- Naydenov KD, Tremblay FM, Alexandrov A, Fenton NJ (2005) Structure of *Pinus sylvestris* L. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochem Syst Ecol* 33:1226–1245.
- Nelson R (1997) In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 305–306.
- Nicolè F, Guitton Y, Courtois EA, et al (2012) MSeasy: unsupervised and untargeted GC-MS data processing. *Bioinforma Oxf Engl* 28:2278–2280.
- Nicolè F, Moja S, Saunier A, et al (2014) Essai 1.1c : Tolérance variétale à la sécheresse.
- Nicolè F, Tellier F, Vivat A, Till-Bottraud I (2007) Conservation unit status inferred for plants by combining interspecific crosses and AFLP. *Conserv Genet* 8:1273–1285.
- Niinemets U, Loreto F, Reichstein M (2004) Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends Plant Sci* 9:180–186.

- Niinemets Ü (2010) Mild versus severe stress and BVOCs: thresholds, priming and consequences. *Trends Plant Sci* 15:145–153.
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, et al (2002) Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: a Predominant Role for Photorespiration? *Ann Bot* 89:841–850.
- Nowak M, Kleinwächter M, Manderscheid R, et al (2012) Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. *J Appl Bot Food Qual* 83:133–136.
- Oldfield E, Lin F-Y (2012) Terpene Biosynthesis: Modularity Rules. *Angew Chem Int Ed* 51:1124–1137.
- Oliveira AP, Valentão P, Pereira JA, et al (2009) *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food Chem Toxicol* 47:2841–2846.
- Ormeño E, Baldy V, Ballini C, Fernandez C (2008) Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *J Chem Ecol* 34:1219–1229.
- Ormeño E, Fernandez C, Mévy J-P (2007a) Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry* 68:840–852.
- Ormeño E, Gentner DR, Fares S, et al (2010) Sesquiterpenoid Emissions from Agricultural Crops: Correlations to Monoterpenoid Emissions and Leaf Terpene Content. *Environ Sci Technol* 44:3758–3764.
- Ormeño E, Mévy JP, Vila B, et al (2007b) Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere* 67:276–284.
- Owen S, Boissard C, Street RA, et al (1997) Screening of 18 Mediterranean plant species for volatile organic compound emissions. *Atmos Environ* 31, Supplement 1:101–117.
- Owen SM, Boissard C, Hewitt CN (2001) Volatile organic compounds (VOCs) emitted from 40 Mediterranean plant species: VOC speciation and extrapolation to habitat scale. *Atmos Environ* 35:5393–5409.
- Owen SM, Peñuelas J (2005) Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends Plant Sci* 10:420–426.
- Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT (2006) Using “mute” plants to translate volatile signals. *Plant J* 45:275–291.
- Pegoraro E, Rey A, Barron-Gafford G, et al (2005) The interacting effects of elevated atmospheric CO₂ concentration, drought and leaf-to-air vapour pressure deficit on ecosystem isoprene fluxes. *Oecologia* 146:120–129.
- Pegoraro E, Rey A, Greenberg J, et al (2004) Effect of drought on isoprene emission rates from leaves of *Quercus virginiana* Mill. *Atmos Environ* 38:6149–6156.

- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, et al (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731–734.
- Peñuelas J, Llusà J (1997) Effects of Carbon Dioxide, Water Supply, and Seasonality on Terpene Content and Emission by *Rosmarinus officinalis*. *J Chem Ecol* 23:979–993.
- Peñuelas J, Staudt M (2010) BVOCs and global change. *Trends Plant Sci* 15:133–144.
- Perrin A, Colson M (1986) L'appareil sécréteur des lavandes et des lavandins. *Parfums Cosmétiques Arômes* 69:61–63.
- Peters RJ, Flory JE, Jetter R, et al (2000) Abietadiene Synthase from Grand Fir (*Abies grandis*): Characterization and Mechanism of Action of the “Pseudomature” Recombinant Enzyme. *Biochemistry (Mosc)* 39:15592–15602.
- P F Scholander EDB (1965) Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148:339–46.
- Pfündel E (1998) Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* 56:185–195.
- Phillips MA, Croteau RB (1999) Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci* 4:184–190.
- Pichersky E, Gershenzon J (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* 5:237–243.
- Pichersky E, Lewinsohn E (2011) Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 62:549–566.
- Pickard WF (2008) Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. *New Phytol* 177:877–888.
- Pillier M (2012) Percevoir les futures besoins des acteurs de la filière française des plantes à parfum, aromatiques et médicinales. Un éclairage sur l'activité de l'ITEIPMAI en 2025.
- Pinto DM, Tiiva P, Miettinen P, et al (2007) The effects of increasing atmospheric ozone on biogenic monoterpene profiles and the formation of secondary aerosols. *Atmos Environ* 41:4877–4887.
- Quaglino F, Zhao Y, Casati P, et al (2013) “Candidatus Phytoplasma solani”, a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *Int J Syst Evol Microbiol* ijs.0.044750–0.
- Raguso RA (2008) Wake up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 39:549–569.
- Raguso RA, Pichersky E (1999) New Perspectives in Pollination Biology: Floral Fragrances. A day in the life of a linalool molecule: Chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biol* 14:95–120.
- Ramel F, Birtic S, Cuiiné S, et al (2012) Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. *Plant Physiol* 158:1267–1278.

- Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, et al (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434:732–737.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161:1189–1202.
- Ricorday J, Ducaroir M, Ballan E (2008) Les paysages de Haute Provence : la révélation du “territoire lavande.” Grande traversée des Alpes
- Ritter A, Dittami SM, Goulitquer S, et al (2014) Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol* 14:116.
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, et al (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J Cell Mol Biol* 32:329–342.
- Rodríguez-Concepción M (2006) Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochem Rev* 5:1–15.
- Rodríguez-Concepción M, Forés O, Martínez-García JF, et al (2004) Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during *Arabidopsis* Seedling Development. *Plant Cell* 16:144–156.
- Rosenstiel TN, Potosnak MJ, Griffin KL, et al (2003) Increased CO₂ uncouples growth from isoprene emission in an agriforest ecosystem. *Nature* 421:256–259.
- Ryan A, Cojocariu C, Possell M, et al (2009) Defining hybrid poplar (*Populus deltoides* × *Populus trichocarpa*) tolerance to ozone: identifying key parameters. *Plant Cell Environ* 32:31–45.
- Sabillon D, Cremades LăiV (2001) Diurnal and seasonal variation of monoterpene emission rates for two typical Mediterranean species (*Pinus pinea* and *Quercus ilex*) from field measurements relationship with temperature and PAR. *Atmos Environ* 35:4419–4431.
- Sade N, Gebremedhin A, Moshelion M (2012) Risk-taking plants. *Plant Signal Behav* 7:767–770.
- Sanadze GA (2004) Biogenic Isoprene (A Review). *Russ J Plant Physiol* 51:729–741.
- Sarker LS, Demissie ZA, Mahmoud SS (2013) Cloning of a sesquiterpene synthase from *Lavandula x intermedia* glandular trichomes. *Planta* 238:983–989.
- Sarker LS, Galata M, Demissie ZA, Mahmoud SS (2012) Molecular cloning and functional characterization of borneol dehydrogenase from the glandular trichomes of *Lavandula x intermedia*. *Arch Biochem Biophys* 528:163–170.
- Sarker LS, Mahmoud SS (2015) Cloning and functional characterization of two monoterpene acetyltransferases from glandular trichomes of *L. x intermedia*. *Planta* 1–11.

- Schultz HR (2003) Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant Cell Environ* 26:1393–1405.
- Selmar D, Kleinwächter M (2013) Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Ind Crops Prod* 42:558–566.
- Sforza R, Bourgoïn T, Wilson SW, Boudon-Padieu E (1999) Field observations, laboratory rearing and descriptions of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur J Entomol* 409–418.
- Shalit M, Guterman I, Volpin H, et al (2003) Volatile Ester Formation in Roses. Identification of an Acetyl-Coenzyme A. Geraniol/Citronellol Acetyltransferase in Developing Rose Petals. *Plant Physiol* 131:1868–1876.
- Shao H-B, Chu L-Y, Lu Z-H, Kang C-M (2007) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int J Biol Sci* 4:8–14.
- Sharkey TD, Loreto F (1993) Water stress, temperature, and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. *Oecologia* 95:328–333.
- Sharp RE, Silk WK, Hsiao TC (1988) Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials 1. *Plant Physiol* 87:50–57.
- Shellie R, Mondello L, Marriott P, Dugo G (2002) Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Chromatogr A* 970:225–234.
- Sherwin HW, Farrant JM (1998) Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regul* 24:203–210.
- Simon JE, Reiss-Bubenheim D, Joly RJ, Charles DJ (1992) Water Stress-Induced Alterations in Essential Oil Content and Composition of Sweet Basil. *J Essent Oil Res* 4:71–75.
- Singh D, Scrivastava G, Abdin M (2001) Amelioration of negative effect of water stress in *Cassia angustifolia* by benzyladenine and/or ascorbic acid. *Biol Plant* 44:141–143.
- Singh-sangwan N, Abad Farooqi a. H, Singh Sangwan R (1994) Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. *New Phytol* 128:173–179.
- Singsaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD (1997) Isoprene Increases Thermotolerance of Isoprene-Emitting Species. *Plant Physiol* 115:1413–1420.
- Sivamani null, Bahieldin1 null, Wraith null, et al (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol* 155:1–9.
- Siwko ME, Marrink SJ, de Vries AH, et al (2007) Does isoprene protect plant membranes from thermal shock? A molecular dynamics study. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1768:198–206.

- Skoula M, Abidi C, Kokkalou E (1996) Essential Oil Variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Growing Wild in Crete (Greece). *Biochem Syst Ecol* 24:255–260.
- Skoula M, Hilali IE, Makris AM (1999) Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochem Syst Ecol* 27:559–568.
- Soler R, Harvey JA, Kamp AFD, et al (2007) Root herbivores influence the behaviour of an aboveground parasitoid through changes in plant-volatile signals. *Oikos* 116:367–376.
- Specht R (1969) A comparison of the sclerophyllous vegetation characteristic of Mediterranean type climates in France, California, and Southern Australia. I. Structure, morphology, and succession. *Aust J Bot* 17:277–292.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) RUBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Annu Rev Plant Biol* 53:449–475.
- Staudt M, Rambal S, Joffre R, Kesselmeier J (2002) Impact of drought on seasonal monoterpene emissions from *Quercus ilex* in southern France. *J Geophys Res* 107:9 PP.
- Stewart CR, Hanson AD, Turner NC, Kramer PJ (1980) Proline accumulation as a metabolic response to water stress. 173–189.
- St-Louis R (2011) Implication des espèces réactives de l’oxygène dans le contrôle central de l’osmorégulation. Thèse, Paris VI, Pierre et Marie-Curie
- Sundaresan V, Sahni G, Verma RS, et al (2012) Impact of geographic range on genetic and chemical diversity of Indian valerian (*Valeriana jatamansi*) from northwestern Himalaya. *Biochem Genet* 50:797–808.
- Taraborrelli D, Lawrence MG, Butler TM, et al (2009) Mainz Isoprene Mechanism 2 (MIM2): an isoprene oxidation mechanism for regional and global atmospheric modelling. *Atmos Chem Phys* 9:2751–2777.
- Tholl D, Chen F, Petri J, et al (2005) Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J* 42:757–771.
- Thompson J, Charpentier A, Bouguet G, et al (2013) Evolution of a genetic polymorphism with climate change in a Mediterranean landscape. *Proc Natl Acad Sci* 110:2893–2897.
- Thompson JD, Chalchat J-C, Michet A, et al (2003) Qualitative and Quantitative Variation in Monoterpene Co-Occurrence and Composition in the Essential Oil of *Thymus vulgaris* Chemotypes. *J Chem Ecol* 29:859–880.
- Thuiller W, Lavorel S, Araújo MB, et al (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8245–8250.

- Turgut Dunford N, Silva Vazquez R (2005) Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *J Appl Hortic* 7:20–22.
- Turtola S, Manninen A-M, Rikala R, Kainulainen P (2003) Drought Stress Alters the Concentration of Wood Terpenoids in Scots Pine and Norway Spruce Seedlings. *J Chem Ecol* 29:1981–1995.
- Upton T, Andrews S, Royal Botanic Gardens K (2004) *The Genus Lavandula*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey
- Varona S, Kareth S, Martín Á, Cocero MJ (2010) Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. *J Supercrit Fluids* 54:369–377.
- Velikova V, Edreva A, Loreto F (2004) Endogenous isoprene protects *Phragmites australis* leaves against singlet oxygen. *Physiol Plant* 122:219–225.
- Velikova V, Sharkey TD, Loreto F (2012) Stabilization of thylakoid membranes in isoprene-emitting plants reduces formation of reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* 7:139–141.
- Velikova V, Tsonev T, Pinelli P, et al (2005) Localized ozone fumigation system for studying ozone effects on photosynthesis, respiration, electron transport rate and isoprene emission in field-grown Mediterranean oak species. *Tree Physiol* 25:1523–1532.
- Velikova V, Várkonyi Z, Szabó M, et al (2011) Increased Thermostability of Thylakoid Membranes in Isoprene-Emitting Leaves Probed with Three Biophysical Techniques. *Plant Physiol* 157:905–916.
- Vendruscolo ECG, Schuster I, Pileggi M, et al (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J Plant Physiol* 164:1367–1376.
- Vernet P, Gouyon RH, Valdeyron G (1986) Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica* 69:227–231.
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat Chem Biol* 5:283–291.
- Vieira RF, Grayer RJ, Paton A, Simon JE (2001) Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem Syst Ecol* 29:287–304.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407–4414.
- Vranová E, Inzé D, Breusegem FV (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53:1227–1236.
- Walla PJ, Holleboom C-P, Fleming GR (2014) Electronic Carotenoid-Chlorophyll Interactions Regulating Photosynthetic Light Harvesting of Higher Plants and Green Algae. In: Demmig-Adams B, Garab G, III WA, Govindjee (eds) *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer Netherlands, pp 229–243

- Wang E, Wang R, DeParasis J, et al (2001) Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat Biotechnol* 19:371–374.
- Wang F-Z, Wang Q-B, Kwon S-Y, et al (2005) Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol* 162:465–472.
- Waser NM, Price MV (1994) Crossing-Distance Effects in *Delphinium nelsonii*: Outbreeding and Inbreeding Depression in Progeny Fitness. *Evolution* 48:842–852.
- Werner C, Correia O, Beyschlag W (1999) Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica* 20:15–23.
- Whittington DA, Wise ML, Urbansky M, et al (2002) Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15375–15380.
- Wise ML, Savage TJ, Katahira E, Croteau R (1998) Monoterpene Synthases from Common Sage (*Salvia officinalis*). *J Biol Chem* 273:14891–14899.
- Woronuk G, Demissie Z, Rheault M, Mahmoud S (2011) Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula essential* oil constituents. *Planta Med* 77:7–15.
- Wu Y, Cosgrove DJ (2000) Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J Exp Bot* 51:1543–1553.
- Xu D, Duan X, Wang B, et al (1996) Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol* 110:249–257.
- Yadav RK, Sangwan RS, Sabir F, et al (2014) Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. *Plant Physiol Biochem* 74:70–83.
- Yamada M, Morishita H, Urano K, et al (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J Exp Bot* 56:1975–1981.
- Yani A, Pauly G, Faye M, et al (1993) The effect of a long-term water stress on the metabolism and emission of terpenes of the foliage of *Cupressus sempervirens*. *Plant Cell Environ* 16:975–981.
- Yin Q, Shi X, Ding H, et al (2014) Interactions of Borneol with DPPC Phospholipid Membranes: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Int J Mol Sci* 15:20365–20381.
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. *Photosynthetica* 38:171–186.
- Yuan JS, Himanen SJ, Holopainen JK, et al (2009) Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends Ecol Evol* 24:323–331.
- Yvin C (2010) Synthèse des recherches conduites depuis 1994 sur les dépérissements des lavandes et lavandins. iteipmai

Zaouali Y, Boussaid M (2008) Isozyme markers and volatiles in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae): A comparative analysis of population structure. *Biochem Syst Ecol* 36:11–21.

Zulak KG, Bohlmann J (2010) Terpenoid Biosynthesis and Specialized Vascular Cells of Conifer Defense. *J Integr Plant Biol* 52:86–97.

ANNEXES

Annexe 1 : Acte des secondes rencontres végétales du Massif Central ; Limoges 2012

Actes des secondes rencontres végétales du Massif central - Limoges, 2012

Sujet 13

Menaces sur l'or bleu – étude de la diversité génétique des lavandes fines sauvages et cultivées

Threats to the blue gold of Provence – a study of genetic diversity in wild and cultivated lavenders.

par Cyrille CONORD ¹, Yolande DESPINASSE ¹, Sandrine MOJA ¹,
Delphine RIOUX ², Irène TILL-BOTTRAUD ², Frédéric JULLIEN ¹, Florence NICOLÉ ^{1a}.

¹ Laboratoire de Biotechnologies
Végétales appliquées aux
Plantes Aromatiques et
Médicinales (LBVpam, EA 3061),
Université Jean Monnet,
Faculté des Sciences et
Techniques
23 rue du Dr Paul Michelon,
42023 Saint-Etienne Cedex 2.

² Laboratoire d'Ecologie Alpine
(LECA, UMR 5653),
BP 53, 2233 rue de la Piscine
38041 Grenoble Cedex 9.

a : corresponding author

Cyrille Conord
Adresse actuelle / Present
address :
Ecole Nationale Supérieure
des Mines,
158 cours Fauriel,
42023 Saint-Etienne.

✉ conord@emse.fr
☎ 04 77 42 66 35

Yolande Despinasse
✉ yolande.despinasse@univ-st-
etienne.fr
☎ 04 77 48 50 41

Sandrine Moja
✉ sandrine.moja@univ-st-etienne.fr
☎ 04 77 48 15 25

Delphine Rioux
✉ delphine.rioux@uf-grenoble.fr
☎ 04 76 63 54 78

Irène Till-Bottraud
✉ irene.till@uf-grenoble.fr
☎ 04 76 51 45 24

Frédéric Julien
✉ julien@univ-st-etienne.fr
☎ 04 77 48 15 23

Florence Nicolé
✉ florence.nicole@univ-st-etienne.fr
☎ 04 77 48 50 41



Résumé

Depuis une dizaine d'années, la lavande fine française (*Lavandula angustifolia* Mill.) subit un déclin sévère. Dans ce contexte alarmant, le laboratoire BVpam de Saint-Étienne a réalisé une étude sur la diversité génétique des lavandes sauvages et cultivées. Globalement, les ressources génétiques naturelles sont faibles en comparaison à d'autres espèces de lavandes méditerranéennes. De plus, la domestication a contribué à réduire significativement la diversité génétique. Dans le contexte actuel de changement climatique, préserver la lavande implique de maintenir sa diversité génétique.

Mots-clés : ressources génétiques, AFLP, lavande fine, domestication,

Abstract

For a decade, French true lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) has been experiencing a severe decline. In this alarming context, the BVpam laboratory in Saint-Étienne conducted a study of the genetic diversity of wild and cultivated common lavenders. Overall, the natural genetic resources are low in comparison to other species of Mediterranean lavenders. Furthermore, domestication has contributed to significantly reduce the genetic diversity. In the current context of climate change, protecting lavender implies maintaining its genetic diversity and adaptive potential.

Keywords : genetic resources, AFLP, common lavender, domestication

Introduction

Depuis une dizaine d'années, la lavande fine française (*Lavandula angustifolia* Mill.) subit un déclin sévère dû aux effets conjoints de la maladie du dépérissement et des épisodes de sécheresse répétés.

Le phytoplasme de Stolbur (*Candidatus Phytoplasma solani*), responsable du dépérissement de la lavande, est transmis par des insectes piqueurs suceurs, les cicadelles, qui se nourrissent de sève élaborée. Les bactéries se multiplient dans les tubes criblés qui transportent la sève élaborée et bloquent le transport de la sève. Les plants atteints sont chétifs, jaunissants et présentent un dessèchement sectoriel qui peut parfois être total et brutal. L'intensité du dépérissement des plants est très variable d'une année à l'autre et est fortement liée aux conditions climatiques. Des épisodes de sécheresses et de canicules engendrent une forte augmentation de l'incidence du dépérissement. Sur des parcelles de lavandes fines suivies par l'ITEIPMAI et le CRIEPPAM, la sécheresse de 2003 et la canicule de 2004 ont fortement accru la mortalité des plants en 2004 (YVIN, 2010). L'automne particulièrement sec de 2007 a décimé près de 5000 hectares de lavandin, hybride de la lavande à haut rendement en huile essentielle (PILLIER, 2012).

Ainsi, depuis 2005, les surfaces cultivées de lavandes se sont amenuisées de 40% et le tonnage d'huile essentielle de lavande a chuté de 85 à 29 t. En 2011, la France a perdu sa place de premier producteur mondial au bénéfice de la Bulgarie.

Au niveau des populations sauvages, il est plus difficile d'évaluer avec fiabilité l'ampleur du déclin. D'après une étude menée sur les paysages de la lavande, le recul du pastoralisme a conduit à une régression importante des lavanderaies naturelles (RICORDAY et al., 2008). La lavande sauvage est présente de manière disséminée et discrète mais les « collines bleues » évoquées par les anciens n'existent plus ou presque.

À ce jour, aucun état des lieux n'a été mené pour évaluer les ressources génétiques de la lavande fine. Le réservoir de variabilité naturelle est inconnu. L'impact de la culture intensive et spéculative (sélection variétale, mécanisation, monocultures intensives) sur la diversité n'a pas été évalué. Dépérissement et réchauffement climatique conduisent à une réduction importante des effectifs qui pourrait engendrer une perte de diversité génétique, avec des conséquences graves sur le devenir de l'espèce. Des études ont mis en évidence qu'un faible niveau de diversité génétique conduit à l'extinction des populations sur des échelles de temps courtes (SACCHERI et al. 1998) et réduit significativement la résistance aux maladies (ZHU et al., 2000). Les ressources génétiques de la lavande fine sont-elles suffisantes pour lutter contre les maladies, s'adapter aux changements climatiques et assurer la persistance de l'espèce ?

Dans ce contexte alarmant, le laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales (LBVpam) de Saint-Étienne a réalisé une étude de la diversité génétique des lavandes fines sauvages et cultivées. L'échantillonnage a englobé 36 populations de lavandes, réparties sur la totalité de l'aire de répartition de *L. angustifolia* (France, Italie, Espagne). À travers cette étude, nous avons cherché à (i) établir un état des lieux inexistant à ce jour sur la structuration de la diversité génétique des plantes sauvages et cultivées de lavande fine ; (ii) Évaluer l'impact de la sélection variétale sur la diversité génétique.

Matériel et Méthodes

La Lavande fine

La lavande fine (*Lavandula angustifolia* Mill.) est une plante aromatique et médicinale de la famille des *Lamiaceae* qui pousse naturellement en Provence au dessus de 700 à 800 mètres sur sol calcaire et ensoleillé (UPSON et ANDREWS, 2004). Son aire de répartition naturelle s'étend des Pyrénées aux Alpes. Son parfum et ses propriétés thérapeutiques sont liés à la présence de nombreux composés organiques volatils, majoritairement des monoterpènes et sesquiterpènes (GUITTON et al., 2010). Autrefois, les plantes étaient directement cueillies dans les baïssières, nom provençal des populations sauvages. Vers la fin du XIX^e siècle, pour répondre à la demande des parfumeurs de Grasse, les plantes les plus vigoureuses et florifères sont mises en culture en Provence sous la forme de champs de « lavande de population ». Dans la première moitié du XX^e siècle, la culture de la lavande s'étend aux versants du sud-ouest du Massif central (Lot et Tarn-et-Garonne). À partir des années 1950, la culture s'intensifie et se mécanise. Des clones ou cultivars, propagés par bouturage, sont sélectionnés et mis en culture (« Maillette » et « Matheronne » constituent les deux clones de lavandes les plus cultivés). À cette même période, la culture du lavandin, un hybride spontané stérile de la lavande fine et de la lavande aspic se généralise. Les plants de lavandin sont plus volumineux et leur rendement en huile essentielle est 3 à 10 fois supérieur. La culture devient spéculative et les surfaces cultivées en lavandin supplantent progressivement les champs de lavandes. En 2012, 93 400 kg d'huile essentielle de lavandin ont été vendus contre 30 800 pour la la-

vande (soit 3 fois moins). Tandis que l'huile essentielle de lavande fine est destinée à la parfumerie de luxe, cosmétique et thérapeutique, l'huile essentielle de lavandin est destinée principalement à la parfumerie fonctionnelle (savons, lessives).

De nombreux cultivars de lavande fine ont été développés par la suite pour s'adapter à différentes conditions de culture (77-13, C15-50, B7) ou à la production de bouquets (« lavande bleue »). Plus récemment, un cultivar (« Diva ») et des populations (« Rapido », « Carla », « Sara ») ont été sélectionnés pour leur tolérance au dépérissement.

La lavande est une production emblématique du Sud-Est de la France. À ce jour, Alpes de Haute Provence, Hautes-Alpes, Drôme provençale, et Vaucluse concentrent 94 % de la production d'huile essentielle de lavande (environ 3500 hectares et 42 % du marché mondial en huile essentielle). D'autres pays produisent également de l'huile essentielle de lavande : la Bulgarie, la Chine, l'Ukraine et la Moldavie (FRANCEAGRIMER, 2011). La tendance actuelle de la production française et mondiale d'huile essentielle de lavande est à la baisse : - 60 % en 5 ans pour la France et - 67 % pour la production mondiale. Le dépérissement des cultures et les problèmes climatiques (sécheresse, gel) sont les raisons principales de la chute de production française de lavande (FRANCEAGRIMER, 2011).

Échantillonnage

Un échantillonnage exhaustif, garant de la diversité des individus, de la validité et de la représentativité de l'étude, a été mené dans les populations sauvages et des champs de populations cultivées. Trente six populations sauvages et issues de champs cultivés distribués sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce ont été récoltés durant l'été 2008. L'échantillonnage consiste à prélever 4cm² de feuilles placés dans un dessiccant puissant pour 20 plantes prises au hasard sur chaque site.

Parmi ces 36 sites, 18 populations sauvages réparties de façon homogène sur l'aire de distribution naturelle de l'espèce (France, Espagne, Italie) ont été échantillonnées dans la collection du CNP-MAI à Milly-la-Forêt (Tableau I). Dix-huit champs de différentes variétés ont été échantillonnés en partenariat avec le CRIEPPAM et l'ITEIPMAI sur l'ensemble de l'aire de production française. Cet échantillonnage comprend les lavandes de population, les cultivars les plus produits ainsi que les variétés récentes issues de la sélection pour la tolérance au dépérissement (Tableau I).

Génotypage

La méthode analytique développée pour caractériser la diversité génétique des individus est la méthode des AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ; VOS *et al.*, 1995). C'est une technique de génotypage par empreinte génétique qui permet d'obtenir de nombreux marqueurs moléculaires sur ADN nucléaire de jeunes feuilles sans connaissance *a priori* du génome. Cette technique, hautement répétable et facile à mettre en œuvre, en particulier chez des espèces non modèles, est couramment utilisée sur des problématiques variées (MULLER et WOLFENBARGER, 1999). Le protocole utilisé est décrit en détail dans NICOLE *et al.*, 2007 et GAUDEUL *et al.*, 2000.

Un jeu de 3 paires d'amorces indépendantes a été sélectionné sur des critères de lisibilité, de répartition homogène des fragments d'ADN et de répétabilité. Nous avons utilisé une méthode de

codage très restrictive permettant d'obtenir 206 marqueurs polymorphes hautement répétables [taux de répétabilité de 100%; GeneMapper (Applied Biosystems), Peak scanner version 1.0 (Applied Biosystems)]. Les échantillons mal résolus ont été éliminés et le génotypage a été obtenu sur 600 individus au total.

L'analyse des génotypes AFLP a été effectuée avec Genalex (PEAKALL ET SMOUSE, 2006) pour l'analyse de décomposition de la variance génétique (AMOVA). Le pourcentage de loci polymorphes, les indices de diversité couramment utilisés en génétique des populations (indice de Nei et hétérozygotie à l'équilibre panmictique H_s), les analyses en coordonnées principales sur les génotypes et les tests statistiques ont été réalisés avec R version 2.15 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

Résultats

L'échantillonnage a englobé 600 individus répartis sur la totalité de l'aire de répartition de la lavande fine *L. angustifolia* Mill. (France, Italie, Espagne), analysés par les méthodes d'empreintes génétiques AFLP. Le pourcentage de loci polymorphes varie de 8,8 à 45,6 entre les populations (tableau I).

Toutes plantes confondues (sauvages et cultivées), la variabilité génétique est répartie en 37% entre pays (France, Italie, Espagne), 19% entre populations (variabilité inter-populations) et 44% entre les individus dans une population (variabilité intra-population). Cette variabilité entre pays permet de très bien différencier les populations de Calabre (Italie) et les trois populations espagnoles par rapport aux autres populations, sauvages ou cultivées, toutes françaises (Figure 1a).

Variétés (population)	Type	Nombre de sites et Localités	n	% de loci polymorphes	Diversité génétique de Nei	Hétérozygotie panmictique H_s
Champs de population	Champs cultivés: lavande de populations	3 sites: Baronnie, Lesches en Diois, Sault	58	40,1	0,12	0,098
Lavande bleue	Champs cultivés: cultivar sélectionné pour le bouquet	1 site: Baronnie	20	32	0,1	0,074
Rapido & Carla	Champs cultivés: populations sélectionnées pour la tolérance au dépérissement	3 sites: Diois, Sault	52	41,4	0,13	0,108
Mallette	Champs cultivés: cultivar ancien	3 sites: Valreas, Ferrassières, Valensole	44	20,1	0,07	0,045
Matheronne	Champs cultivés: cultivar ancien	3 sites: Diois, Sault, Valensole	44	8,8	0,05	0,035
B7	Champs cultivés: cultivar récent	1 site: Romans	9	42,7	0,11	0,072
77-13	Champs cultivés: cultivar récent	1 site: Romans	6	39,8	0,15	0,091
C15-S0	Champs cultivés: cultivar récent	1 site: Diois	4	34	0,1	0,05
Diva	Champs cultivés: cultivar récent sélectionné pour la tolérance au dépérissement	2 sites: Sault, Crieppam	27	36,4	0,13	0,097
Espagne	Populations sauvages	3 sites: Aragon 1 et 2, Catalogne	54	32,03	0,1	0,074
France Lot	Populations sauvages	1 site	15	41,3	0,12	0,098
France Aveyron	Populations sauvages	1 site	20	43,2	0,13	0,108
France Lozère	Populations sauvages	1 site	19	36,9	0,1	0,079
France Drôme	Populations sauvages	1 site	20	42,2	0,14	0,104
France Bouche du Rhône	Populations sauvages	1 site	14	37,9	0,14	0,108
France Alpes de Haute Provence	Populations sauvages	1 site	18	45,6	0,16	0,131
France Haute-Alpes	Populations sauvages	5 sites	98	41,4	0,14	0,112
France Alpes maritimes	Populations sauvages	1 site	18	45,1	0,14	0,117
Italie Alpes	Populations sauvages	2 sites: Piemont, Ligurie	39	38,3	0,12	0,09
Italie Sud	Populations sauvages	1 site: Calabre	20	40,3	0,1	0,084
TOTAL			600	37,0	0,118	0,095

◀ Tableau 1

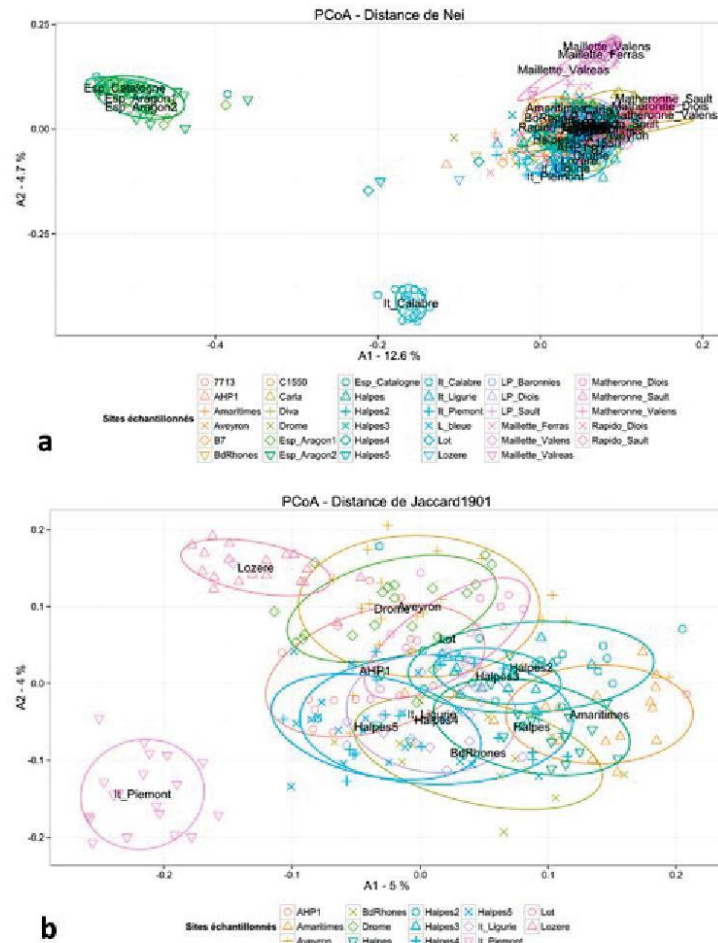
Répartition et diversité génétique des populations génotypées (n : nombre de plantes analysées).

Actes des secondes rencontres végétales du Massif central - Lmoges, 2012.

Figure 1 ▶

Structuration de la diversité génétique :
a) des lavandes fines sauvages et cultivées ;
b) des lavandes fines sauvages françaises et alpines.

Les graphiques correspondent à des biplots d'analyses en coordonnées principales ACoP basées sur les distances de Nei (NEI, 1979). Le pourcentage d'inertie expliqué est indiqué pour chaque axe. (LS=lavandes sauvages, It=Italie, Esp=Espagne, AHP=Alpes de Haute Provence, Halpes=Hautes-Alpes, LP=lavandes cultivées de population, Valens=Valensole, Ferras=Ferrassières).



La figure 1a est une analyse en coordonnées principales qui permet de représenter les similarités génétiques entre plantes dans un espace à deux dimensions. Chaque point correspond au génotype d'une plante et deux points proches sur le graphique sont proches génétiquement. Cette représentation illustre l'importante structuration géographique qui existe entre la population isolée de Calabre, les trois populations d'Espagne, et toutes les populations sauvages et cultivées de France et des Alpes. Ces quatre populations différenciées présentent de faibles hétérozygoties et plusieurs marqueurs privés exclusifs. Ceci tend à indiquer un isolement géographique assez ancien.

Les deux cultivars les plus anciens et les plus produits Mallette et Matheronne sont partiellement différenciés génétiquement sous l'effet de la sélection et montrent une variabilité génétique individuelle faible (44 plantes presque superposées sur l'ACoP car de génotypes très proches). Sauvages ou cultivées, les autres populations se différencient peu génétiquement car la plupart de la variabilité se situe entre les individus d'une même population. Ainsi, les lavandes de population, les cultivars récents et les populations sélectionnées sont proches génétiquement des populations sauvages.

Ces résultats confirment l'existence d'une sous-espèce pyrénéenne (*Lavandula angustifolia* subsp. *pyrenaica*) et interogent sur l'existence d'une sous-espèce italienne non nommée à ce jour.

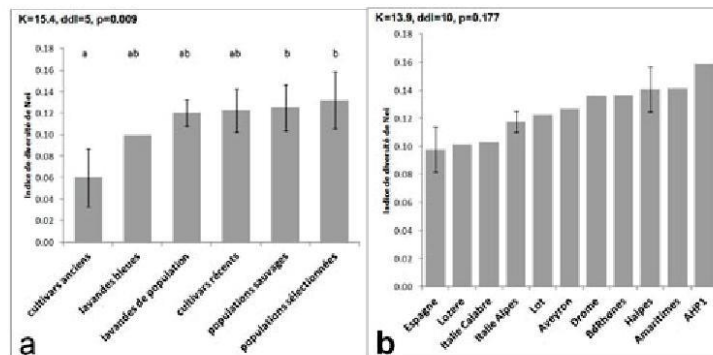
Si on se focalise sur la structuration de la diversité génétique des plantes sauvages françaises et alpines (figure 1b), on observe que la population alpine italienne du Piémont présente une signature génétique qui lui est propre contrairement à la population italienne, plus méridionale, de Ligurie. Cette différenciation résulte probablement d'une adaptation locale (altitude plus élevée, climat montagnard) et d'un flux de gènes réduit avec les autres populations. Dans les populations françaises sauvages, on distingue un gradient Est-Ouest (Lozère très différenciée, Drôme, Aveyron et Lot en haut à gauche et populations plus méridionales en bas à droite).

Le pourcentage de loci polymorphes des populations sauvages de lavande fine est en moyenne de $37\% \pm 8,8\%$ (tableau I). La diversité génétique de Nei est de 0,118 en moyenne et varie de 0,05 à 0,160 (NEI, 1978, N=600). Comparativement à d'autres espèces de lavandes méditerranéennes pour le même indice de diversité Hs (l'hétérozygotie calculée sous l'hypothèse de panmixie), le compartiment sauvage de *Lavandula angustifolia* présente une diversité génétique faible (Hs moyen = 0,100 ; min-max=0,074-0,131). L'hétérozygotie moyenne de *Lavandula multifida* estimée sur 8 populations sauvages est de 0,161 (0,095-0,206; N=80, CHOGRANI *et al.*, 2008) et celle de la lavande aspic *Lavandula latifolia* est estimée à 0,165 sur 21 populations sauvages (0,141-0,199; N=315, HERRERA *et al.*, 2008).

Les populations sélectionnées pour la tolérance au dépérissement, les cultivars récents, les lavandes de populations et la lavande bleue montrent une diversité génétique similaire à celle des populations sauvages (Figure 2a, Tableau I). Comme attendu, les cultivars les plus anciens et les plus produits, Maillette et Matheronne, propagés par bouturage, ne présentent quasiment aucune variabilité génétique (Indice de Nei en moyenne 0,06, 14% de loci polymorphes, Hs=0,04).

Les dernières variétés obtenues, issues de la sélection pour la tolérance au dépérissement, Rapido et Carla, sont aussi variables génétiquement que les lavandes de population et les lavandes sauvages (respectivement, indice de Nei=0,132, 0,120 et 0,133).

Dans les populations sauvages (figure 2b), les populations les plus différenciées génétiquement présentent la diversité génétique la plus faible : Espagne, Lozère, Calabre (respectivement, indice de Nei=0,098, 0,101, 0,103). Les populations plus orientales du Lot et de l'Aveyron, ainsi que les populations italiennes des Alpes, présentent aussi une diversité génétique réduite. La diversité génétique maximale est observée au centre de l'aire de répartition et proche des zones de culture (Alpes de Haute Provence, Alpes maritimes, Hautes Alpes, Bouche du Rhône). Ainsi, ces résultats montrent que plus les populations sont en limite d'aire de répartition, plus leur diversité génétique est faible et leur différenciation importante.



◀ Figure 2

Diversité génétique moyenne de Nei (\pm écart-type) chez la lavande fine a) entre les différents types de lavandes fines (cf Tableau I); b) pour les différentes populations sauvages françaises et alpines. Les différences sont testées avec un test non-paramétrique de Kruskal et Wallis. La significativité entre types de lavandes a été testée avec un test a posteriori de Bonferroni et est indiquée par des lettres différentes au dessus des barres.

Discussion

L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) considère une espèce vulnérable lorsque la taille de la population se situe en dessous de 1000 individus (UICN, 2000). En biologie de la conservation, Franklin a fixé le seuil à 500 individus pour éviter l'extinction à long terme (FRANKLIN, 1980). Sur la base de ces chiffres, une espèce cultivée comme la lavande fine ne peut pas être considérée comme potentiellement vulnérable ou en danger d'extinction. Cependant, ces seuils critiques basés uniquement sur un nombre d'individus ne tiennent pas compte des niveaux exceptionnellement bas de diversité génétique qui peuvent exister dans les populations domestiquées. Un faible niveau de diversité génétique implique un faible potentiel d'adaptation. Les monocultures, pourtant constituées de milliers d'individus identiques, sont extrêmement sensibles aux aléas environnementaux et aux maladies (ZHU *et al.*, 2000). Les clones de lavande bleue, très sensibles au dépérissement, ont quasiment disparu en quelques années.

Dans le contexte actuel d'un déclin sévère de la lavande fine française, nous avons établi le premier état des lieux sur la structuration de la diversité génétique des populations sauvages et cultivées. Le génotypage de 600 plantes de lavande fine prélevées dans 36 sites différents a montré une grande homogénéité génétique en France et dans les Alpes entre les populations sauvages et les champs cultivés. Seule une population relicte du sud de l'Italie et les populations espagnoles se différencient nettement génétiquement. L'analyse de la structuration de la diversité génétique permet donc de confirmer l'existence d'une sous-espèce pyrénéenne (*Lavandula angustifolia* subsp. *pyrenaica*) et soulève la question d'une sous-espèce italienne qui n'avait pas été identifiée à ce jour.

Nos résultats mettent en lumière un réservoir de diversité génétique faible chez les lavandes sauvages, en comparaison à d'autres lavandes méditerranéennes. Alors que l'hétérozygotie moyenne des lavandes fines sauvages est de 0,100 (0,074-0,131), la valeur moyenne pour *Lavandula multifida* est de 0,161 (0,095-0,206 ; CHOGRANI *et al.*, 2008) ; 0,165 pour la lavande aspic *Lavandula latifolia* (0,141-0,199 ; N=315, HERRERA *et al.*, 2008) ; et 0,549 pour *Lavandula luisieri*, (DELGADO *et al.*, 2009).

Le gradient Est-Ouest observé en France indique un isolement génétique par la distance. La différenciation des populations sauvages est d'autant plus importante qu'elles s'éloignent de la zone centrale de l'aire de répartition naturelle de l'espèce. Cette différenciation s'accompagne d'une réduction de la diversité génétique (consanguinité et dérive génétique dues à une absence de flux de gènes).

Les champs de population, les cultivars récents (B7, 7713, C1550) et les variétés sélectionnées pour leur tolérance au dépérissement (Rapido et Carla) ont une diversité génétique relativement similaire aux populations sauvages. Cependant, comme attendu, la propagation par bouturage de Maillette et Matheronne a conduit à une très faible diversité génétique chez ces cultivars.

Les processus de sélection variétale actuels semblent maintenir le niveau de diversité génétique. Globalement, c'est l'extension des monocultures de cultivars qui contribue à réduire significativement la diversité génétique globale des lavanderales, source d'adaptation aux variations environnementales. Ce type de cultures devrait être proscrit dans le futur. Dans le contexte actuel de changement climatique, la préservation de la lavande fine française doit s'orienter vers le maintien de la diversité génétique des cultures.

Le laboratoire BVpam a mis au point la technique d'empreinte génétique AFLP sur la lavande fine *Lavandula angustifolia* Mill. Cette technique génère un grand nombre de marqueurs répartis à travers tout le génome de la plante, et offre une image représentative de la diversité génétique. Cette technique constitue un outil fiable et robuste pour analyser la structuration de la variabilité naturelle mais aussi garantir l'identification et la traçabilité génétique des plantes. Sur le plan de la recherche appliquée, les résultats pourront être utilisés pour assister la sélection variétale.

Cette technique simple à mettre en œuvre, robuste et répétable peut s'appliquer à de nombreuses problématiques de la biodiversité végétale.

Bibliographie

- CHOGRANI H., CHOKRI M., BOUSSAID M. 2008. *Genetic diversity and population structure in Tunisian Lavandula stoechas L. and Lavandula multifida L. (Lamiaceae)*. *Biochemical Systematics and Ecology* 36 (5-6) : 349-359
- DELGADO F., RIBEIRO S., ALVES A., BETTEN-COURT E., DIAS S. 2009. *Morphological, ecological and genetic variability of Lavandula lusitanica (Rozema) Rivas-Martinez in Central eastern Portugal*. *Plant Genetic Resources* 8(1): 82-90.
- FRANCEAGRIMER. 2011. *Quelle politique de communication pour les produits lavande ? Les études de FranceAgriMer*. 31p
- FRANKHAM R., BALLOU J.D., BRISCOE D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- GAUDEUL M., TABERLET P., TILL-BOTTRAUD I. 2000. *Genetic diversity in an endangered Alpine plant, Eryngium alpinum L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers*. *Molecular Ecology*, 9, 1625-1637.
- GUITTON Y., F. NICOLÉ, S. MOJA, N. VALOT, S. LEGRAND, F. JULLIEN et L. LEGENDRE. 2010. *Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (Lavandula angustifolia and L. x intermedia) inflorescence development*. *Physiologia Plantarum* 138 (2), 150-163.
- HERRERA C.M., BAZAGA P. 2008. *Adding a third dimension to the edge of a species' range: altitude and genetic structuring in mountainous landscapes*. *Heredity* 100(3):275-85.
- IUCN Species Survival Commission. 2000. *IUCN Red List Categories and Criteria, Version 3.1*. IUCN, Gland, Switzerland.
- MUELLER U., WOLFENBARGER L. 1999. *AFLP genotyping and fingerprinting*. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 389-394.
- NEI, M. 1978. *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals*. *Genetics* 89,583-590.
- NICOLE F., TELLIER F., VIVAT A., TILL-BOTTRAUD I. 2007. *Conservation unit status inferred for plants by combining interspecific crosses and AFLP*. *Conservation Genetics* 8: 1273-1285.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. *GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- PILLIER M. *Percevoir les futures besoins des acteurs de la filière française des plantes à parfum, aromatiques et médicinales. Un éclairage sur l'activité de l'ITEIPMAI en 2025*. Mémoire de fin d'études. 52p
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2010. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- RICORDAY J., M. DUCARROIR, E. BALLAN. 2008. *Les paysages de Haute Provence : la révélation du « territoire lavande »*. Editeur Grande traversée des Alpes.
- SACCHERI, I., KUUSSAARI M., KANKARE M., VIKMAN P., FORTELIUS W. et HANSKI I. 1998. *Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation*. *Nature* 392, 491-494.
- URSON T., ANDREWS S. 2004 *The genus Lavandula*. *Kew*: Royal Botanic Gardens, Kew xiv, 442p.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PALEMAN J. AND KUIPER M. 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. *Nucleic acids research* 23, 4407-4414.
- YVIN C. 2010. *Synthèse des recherches conduites depuis 1994 sur les dépérissements des lavandes et lavandins*. Rapport d'activité. 47p.
- ZHU, Y. et al. *Genetic diversity and disease control in rice*. 2000. *Nature* 406, 718-722.

Annexes 2 : Poster présenté lors du congrès « Plant biology Europe FESPB/EPSO 2014 » de Dublin du 22 au 26 Juin 2014

Chemical diversity of wild lavender

yolande.despinasse@univ-st-etienne.fr

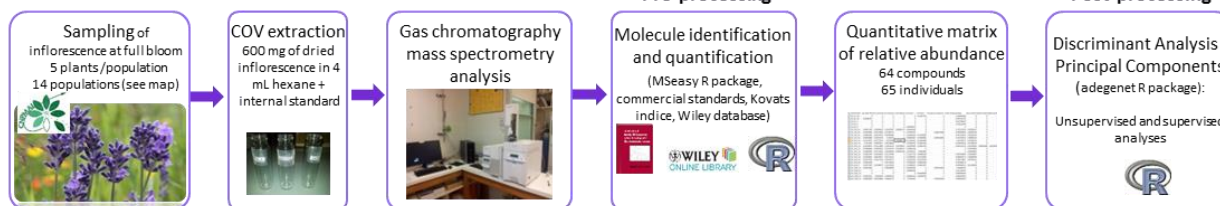
Yolande Despinasse¹, Sandrine Moja², Catherine Soler³, Cyrille Conord³, Frédéric Jullien³, Bernard Pasquier³, Jean-Marie Bessière⁵, Sylvie Baudino³, Florence Nicolé³
¹ Université de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire BVPam, EA2061, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42000 Saint-Etienne, France; ² CNPMAI, route de Nemours, 91490 Milly La Forêt; ³ ENSCM, 8 Rue de l'École Normale, 34090 Montpellier

Introduction: The common or true lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) is a medicinal and aromatic plant of the *Lamiaceae* family. The species is native from South of France and northern Spain. In southeastern France, and more particularly in Provence, lavender is cultivated for its well known inflorescence essential oil (EO) mainly composed of VOCs (Volatile Organic Compounds). Major compounds are essentially terpenes: **linalyl acetate, linalool and lavandulyl acetate**. These three compounds are the most valuable constituents for perfumery, cosmetics and therapeutics. Recently, lavender production declined in France as a result of the joint effects of **deperishment disease** and frequent severe spring and summer **droughts**. To study the role of terpenes in plant response to water stress, we first set up an inventory of chemical diversity on wild populations over the natural distribution area.



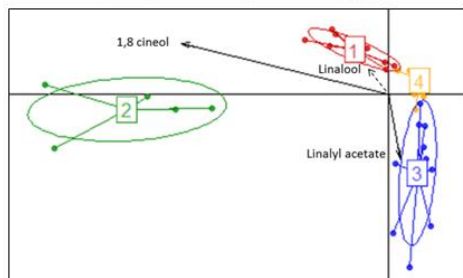
Objectives: (i) characterize different chemotypes among natural populations,
 (ii) identify spatial structure of chemical diversity
 (ii) point interesting terpenes for studying plant response to water stress

Material and methods



(i) Distinct chemical compositions among natural populations ? which compounds are discriminant?

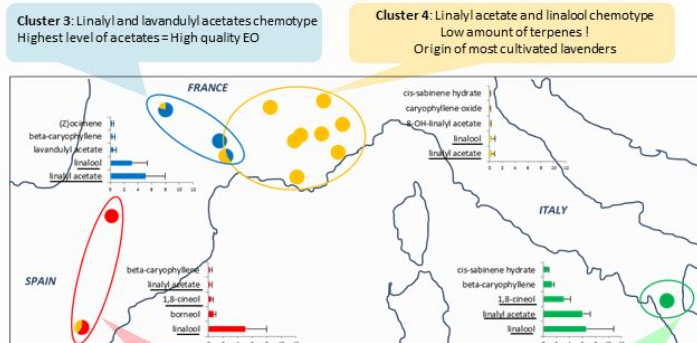
DAPC (10% error rate of cross-validation)



4 clusters ⇔ 4 chemical profiles

3 discriminant compounds
 1,8 cineol (1st, 2nd and 3rd PC)
 Linalyl acetate (2nd PC)
 Linalool (3rd PC)

(ii) Spatial structure of the 4 chemotypes



Cluster 3: Linalyl and lavandulyl acetates chemotype
 Highest level of acetates = High quality EO

Cluster 4: Linalyl acetate and linalool chemotype
 Low amount of terpenes !
 Origin of most cultivated lavenders

Cluster 1: Linalool+borneol/
 camphor chemotype =
 subspecies *Pyrenaica*

Cluster 2: 1,8 cineol chemotype
 High amount of EO with the highest
 diversity of compounds

The four chemotypes are spatially separated – southern clusters (1 & 2) have higher 1,8 cineol than northern (3 & 4)

(iii) Interesting compounds to study lavender response to water stress: 1,8 cineol, borneol/camphor, linalool

Conclusion and perspectives : Over its natural distribution area, common lavender exhibit chemical diversity. **Four spatially distinct chemical profiles** were identified: linalool + borneol / camphor, 1,8 cineol, linalyl & lavandulyl acetates, linalyl acetate + linalool. The spatial distribution of these chemotypes can be explained by low migration and **local adaptation** (*culture in constant environment in common garden*). In this respect, we identify three interesting compounds to study the role of terpenes on **tolerance to water stress: 1,8 cineol, borneol/camphor, linalool**.

This knowledge on chemical diversity could find **applications in plant breeding and varietal selection**. For instance, linalyl & lavandulyl acetates chemotype found in the Centre Region of France could be particularly interesting for perfumery.

