

BIOGÈNESE DES MONOTERPÈNES (*)

III - Monoterpènes synthétases

A. LAMARTI (), A. BADOUC (***), G. DEFFIEUX (***),
J.-P. CARDE (****)**

Le diphosphate de gèranyle (GPP) est le précurseur physiologique universel des monoterpènes. Il est cyclisé à partir de son isomère allylique tertiaire, le (-)-3R ou (+)-3S diphosphate de linalyle selon la stéréospécificité des enzymes. Les monoterpènes synthétases produisent à partir du GPP une variété de monoterpènes. Les réactions catalysées par ces enzymes sont régiospécifiques avec un degré modéré d'énantiosélectivité. Les trichomes sécréteurs des Lamiacées ont constitué un bon matériel de départ pour la purification de ces enzymes. La purification de la (4S)-limonène synthétase, la première à être séquencée, a débouché sur la production d'anticorps pouvant être utilisés en immunocytologie pour une éventuelle localisation sub-cellulaire.

(*) *Manuscrit reçu le 25 Avril 1994.*

(**) *Département de Biologie, Faculté des Sciences Mhanach II, BP 2121 Tetouan, Maroc.*

(***) *Laboratoire de Mycologie et Biologie végétale, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux II, 3, place de la Victoire, 33000 Bordeaux Cedex*

(****) *CNRS URA 568, Laboratoire de Physiologie cellulaire végétale, Université de Bordeaux I, av des Facultés, 33405 Talence Cedex.*

MONOTERPÈNES ACYCLIQUES

1 - Précurseurs acycliques

Dans la biosynthèse des précurseurs acycliques, le transfert du groupe prényle se fait par une condensation "tête-queue" (1'-4) entre le diphosphate d'isopentényle et le diphosphate de diméthylallyle pour donner le diphosphate de géranyle (GPP) ou son isomère le diphosphate de néryle (NPP), précurseurs des monoterpènes selon le processus suivant : le DMAPP perd son groupement diphosphate pour donner naissance à un carbocation allylique qui réagit avec le groupement méthylène de l'IPP, avec déshydrogénation (= déprotonation) en C₂ et formation d'une double liaison (Figure 1), comme l'ont proposé Poulter et Rilling (1-2).

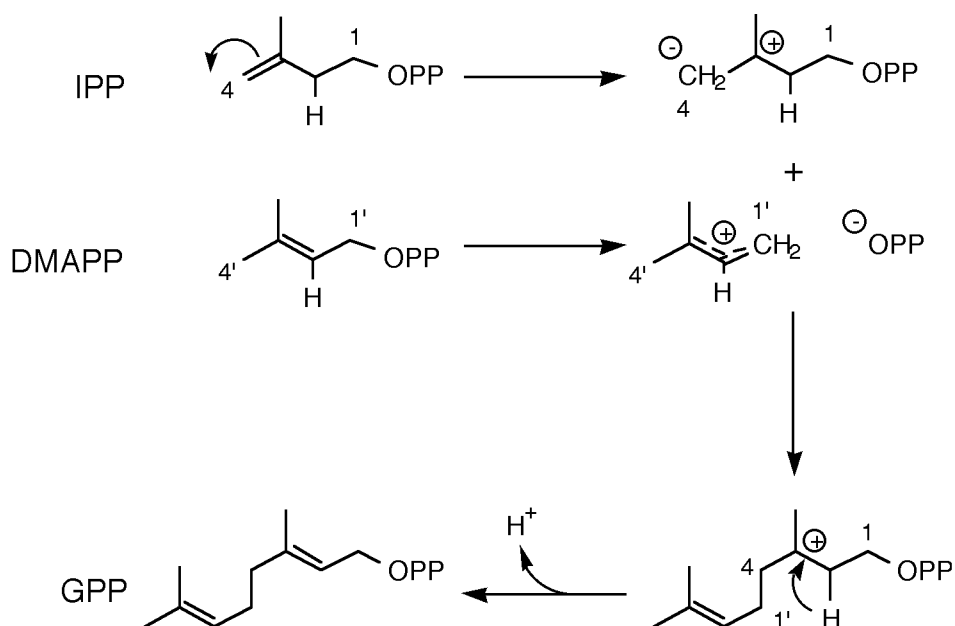
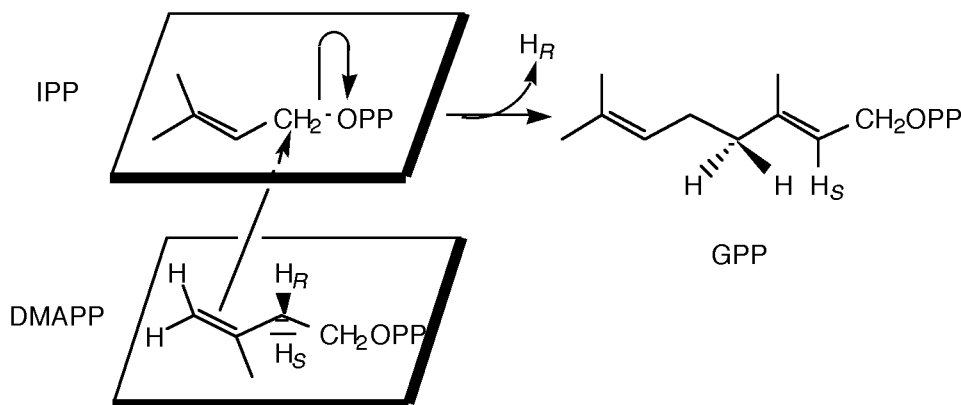


Fig. 1 : Biosynthèse du diphosphate de géranyle (GPP) par le mécanisme d'ionisation - condensation - élimination (1-2).

L'origine du diphosphate de néryle a longtemps posé problème. Deux hypothèses ont été émises, l'une considérant l'isomérisation *trans-cis* du GPP, l'autre suggérant la formation d'emblée du NPP au cours de la condensation des deux unités isopréniques (3-4).

On admet maintenant que le DMAPP est additionné sur l'IPP avec une élimination stéréospécifique du proton sur le C₂ de l'IPP (5) :



La position du proton éliminé détermine la nature de la double liaison. Cette dernière permet une conformation *E* (= *trans*) ou *Z* (= *cis*) donnant le GPP ou le NPP pour les monoterpènes :

- départ du proton H_R -> liaison *trans* (GPP)
- départ du proton H_S -> liaison *cis* (NPP)

La position du proton de départ dépend de la configuration du site actif de la prényltransférase et non d'un processus chimique.

D'autres précurseurs des monoterpènes (Figure 2) pourraient être le diphosphate de linalyle (LPP) et le diphosphate de terpényle (TPP) formés à partir du GPP (6-7).

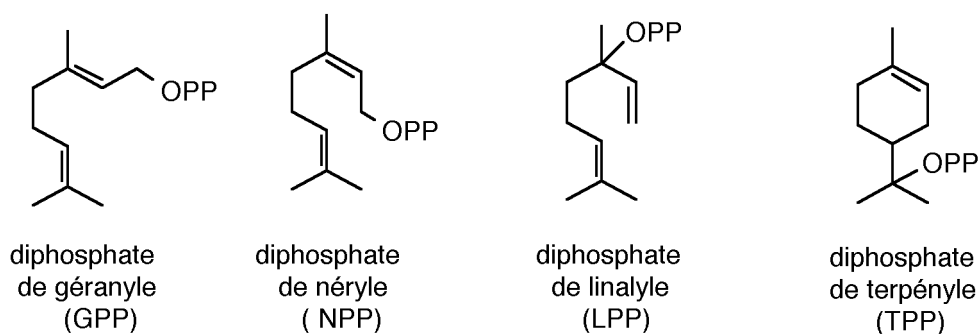


Fig. 2 : Structure des précurseurs des monoterpènes.

2 - Biosynthèse des monoterpènes acycliques

Les réactions enzymatiques impliquées dans leur biosynthèse ne sont pas encore totalement élucidées. Sangwan *et al.* (8) ont partiellement purifié une enzyme cytosolique, la géranol déhydrogénase qui catalyse dans les

feuilles de Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf., *Poaceae*) la conversion du géraniol en *trans*-citral.

A partir du GPP⁽⁹⁾ ou de son isomère le NPP⁽¹⁰⁾, ou même du LPP⁽¹¹⁻¹²⁾, le processus de biosynthèse des monoterpènes acycliques dans son ensemble passe par une série de carbocations et se décompose en une suite d'étapes : ionisation, transposition allylique ou migration du groupe diphosphate, rotation de liaison, réarrangement des cations et déshydrogénation. Les connaissances actuelles sont résumées dans la Figure 3. Le géraniol et le nérol dériveraient directement du GPP par hydrolyse. Le citronellol et le linalol proviendraient du GPP ou du LPP, l'un par réduction, l'autre par hydrolyse transposée.

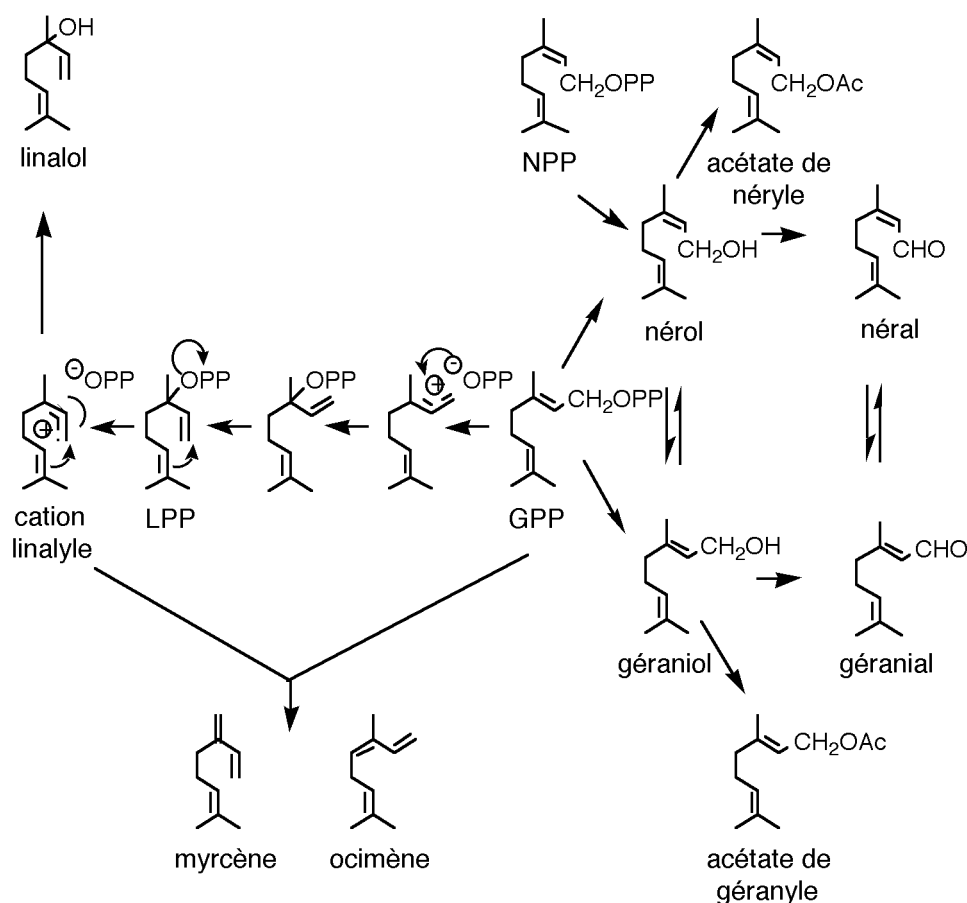


Fig. 3 : Étapes de biosynthèse des principaux monoterpènes acycliques⁽¹¹⁻¹²⁾.

Les aldéhydes - géraniol, néral, citronellal - proviendraient des alcools correspondants par oxydation enzymatique.

Les précurseurs directs de l'ocimène et du myrcène, hydrocarbures acycliques, et les étapes de leur formation restent encore à préciser. Loomis et Croteau (13) envisagent une 1,4-déshydratation du géraniol. Gleizes *et al.* (11), Alonso et Croteau (12) ont montré que ces composés seraient issus du GPP ou du LPP après transposition allylique par un mécanisme électrophile et rotation de liaison.

MONOTERPÈNES CYCLIQUES

1 - Précurseurs acycliques

Le NPP est plus propice à la cyclisation et il est apparu comme un précurseur préférentiel des monoterpènes cycliques dans la majorité des cas (14-16). Mais des travaux récents semblent infirmer ce rôle privilégié du NPP (17).

Le LPP se comporterait comme un substrat intermédiaire entre le GPP et les monoterpènes cycliques (18-19). Cependant, tous les efforts pour observer son interconversion directe n'ont pas abouti. Le LPP ne s'accumule pas à cause d'une haute réactivité (9).

Le GPP se prête chimiquement mal à la cyclisation par suite de sa configuration *trans* (20-21). Pourtant, il a été suggéré que le GPP est préféré comme substrat par certaines monoterpènes synthétases (= cyclases) (22-24).

Actuellement, le GPP est considéré comme le précurseur physiologique universel des monoterpènes et son isomérisation s'impose avant la cyclisation. Cette dernière passe par l'intermédiaire de son isomère allylique tertiaire, le diphosphate de linalyle (25-29). Il est récemment établi que le LPP se lie effectivement à l'enzyme pendant les processus de cyclisation (12,30).

2- Monoterpènes synthétases

Les monoterpènes cycliques dérivent d'un même mécanisme réactionnel électrophile (Figure 4) : ionisation en carbocation géranyle puis réarrangement avec migration du groupement diphosphate et isomérisation. Cette étape ionisation-isomérisation conduit en fonction de la stéréospécificité de l'enzyme au (-)-3*R* ou au (+)-3*S*-LPP (30). Le LPP subit ensuite une

rotation C₂-C₃ suivie par une ionisation donnant naissance au cation linalyle. Ce dernier régénère après sa cyclisation en C₆-C₁ son correspondant monocyclique, le carbocation (4*R*) ou (4*S*) - α -terpényle (³¹). Il s'agit d'un cation terpényle-8, véritable plaque tournante dans la biogénèse des monoterpènes cycliques (^{12,29}). En effet, on peut concevoir facilement qu'il soit à l'origine du limonène, du terpinolène et de l' α -terpinéol (Figure 5). Il peut également donner le cation terpényle-4, précurseur immédiat commun de l' α - et du γ -terpinène ainsi que du terpinène-4-ol.

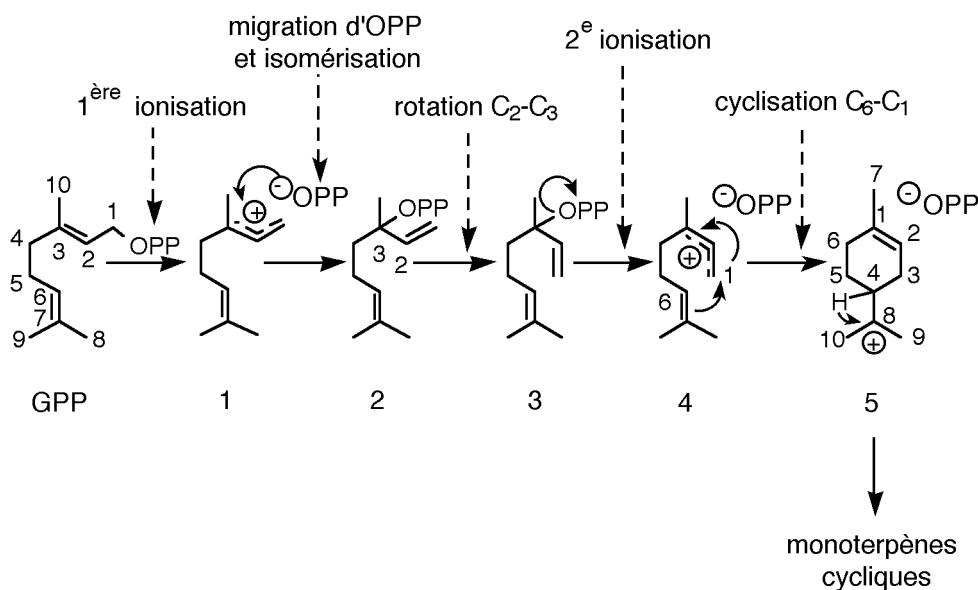


Fig. 4 : Mécanisme réactionnel d'ionisation-cyclisation du diphosphate de géranyle via le diphosphate de linalyle (^{9,12,28}).

- 1 : carbocation géranyle
- 2 : forme trans du LPP
- 3 : diphosphate de linalyle
- 4 : cation linalyle

5 : carbocation α -terpényle (cation terpényle-8)

Certains monoterpènes monocycliques tels le limonène, le terpinolène, l' α -terpinène, etc., présentent une structure chimique apparentée et peuvent être métaboliquement interconvertis. Ainsi, le terpinène-4-ol peut donner l' α - ou le γ -terpinène par simple déshydrogénation.

Les monoterpènes cyclases produisent à partir du GPP une variété de monoterpènes cycliques (^{18,32}). Les réactions catalysées par ces enzymes sont régiospécifiques (^{29,33}) et exigent des ions bivalents afin de neutraliser la charge négative du groupement diphosphate et d'aider ainsi à l'ionisation du GPP (³⁴⁻³⁵).

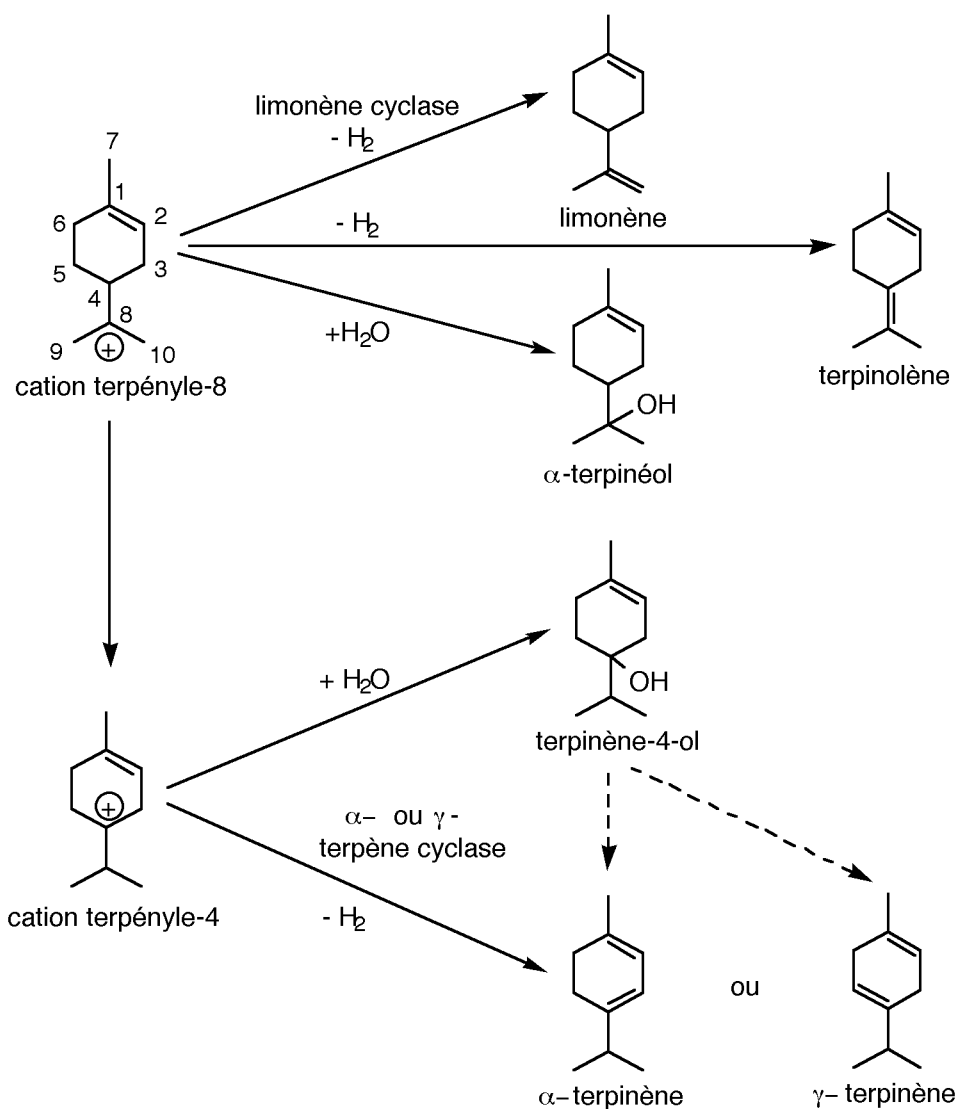


Fig. 5 : Voies de biosynthèse des monoterpènes cycliques à partir de différents cations terpényles (26,29,31).

Alonso et Croteau (12) ont purifié à homogénéité pour la première fois une monoterpène cyclase, la γ -terpinène synthétase, des feuilles de Thym (*Thymus vulgaris* L., *Lamiaceae*). La réaction donne environ 95% de γ -terpinène et des faibles quantités de limonène, α -terpinène, α -thujène, α -terpinéol et terpinène-4-ol.

3- *Menthane*

Chez le genre *Mentha*, les cellules sécrétrices des trichomes ont été isolées. Ces structures sont capables de synthétiser des monoterpènes à partir de sources carbonées primaires⁽³⁴⁾. Ces cellules isolées permettent d'étudier *in vitro* la biosynthèse des monoterpènes et constituent un bon matériel de départ pour la purification des enzymes⁽³⁶⁻³⁷⁾. Ainsi, Alonso *et al.* (1992) ont purifié à homogénéité une enzyme monomérique soluble, la (4*S*) - limonène synthétase, à partir des cellules sécrétrices des trichomes des feuilles de Menthes poivrée (*Mentha X piperita* L.) et verte (*Mentha spicata* Huds.). L'enzyme catalyse la cyclisation du GPP et synthétise principalement l'énantiomère (-)-(4*S*) - limonène et de faibles quantités de myrcène, d' α - et de β -pinène⁽³⁵⁾ (Figure 6).

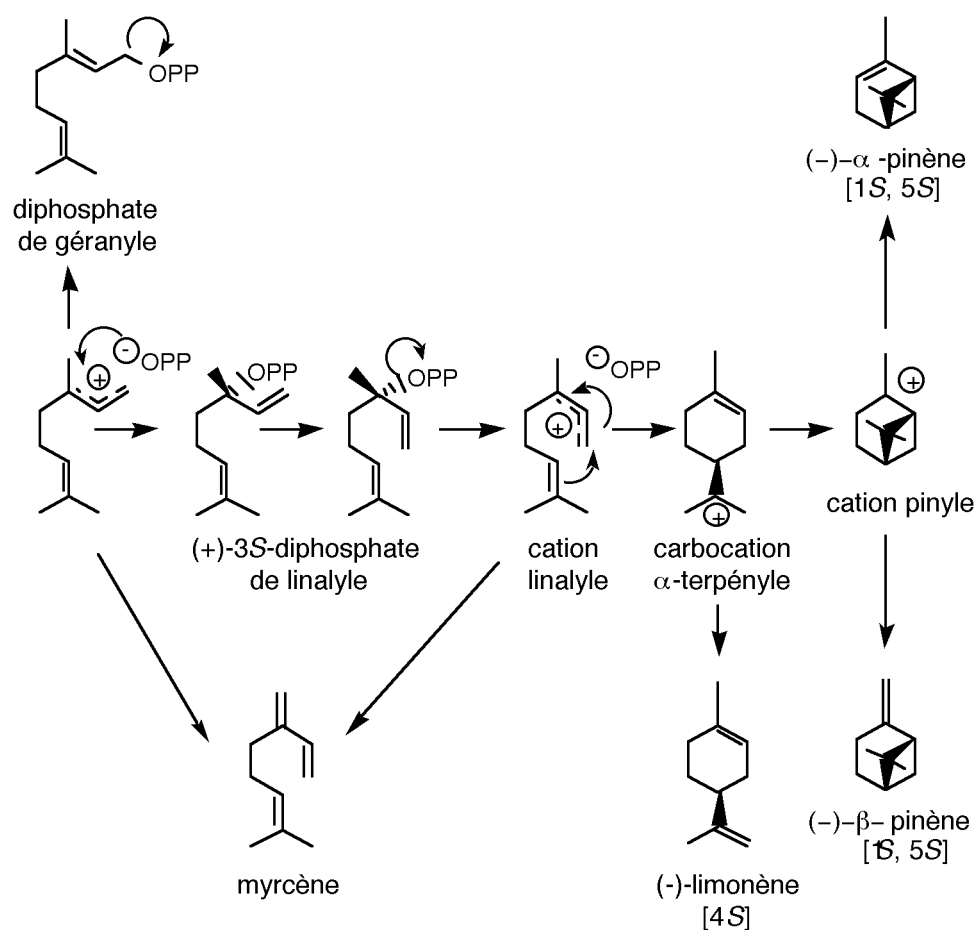


Fig. 6 : Mécanisme de la cyclisation du diphosphate de géranyle par la (4*S*)-limonène synthétase et biosynthèse du (-)-(4*S*)-limonène via le (+)-3*S*-diphosphate de linalyle⁽³⁵⁾.

Le site actif de l'enzyme porte un résidu histidine (39). La (4*S*)-limonène synthétase est la première monoterpène cyclase clonée à ce jour. La séquence complète de ses acides aminés a été déterminée (40).

La biosynthèse de la carvone *via* le limonène chez la Menthe verte passe par deux étapes (17,41) (Figure 7) : le (-)-4*S*-limonène est hydroxylé sur son carbone 6 par une enzyme sélective à cytochrome P-450 monooxygénase, la 4*S*-limonène-6-hydroxylase qui régénère le (-)-4*R*, 6*S*-*trans*-carvéol. Ce dernier est converti en (-)-4*R*-carvone suite à une déprotonation assurée par la (-)-*trans*-carvéol déshydrogénase. Ces transformations sont des étapes clés dans la biosynthèse des monoterpènes oxygénés chez les Menthes et les enzymes impliquées sont complètement régiospécifiques et présentent un degré modéré d'énantiosélectivité (41-42).

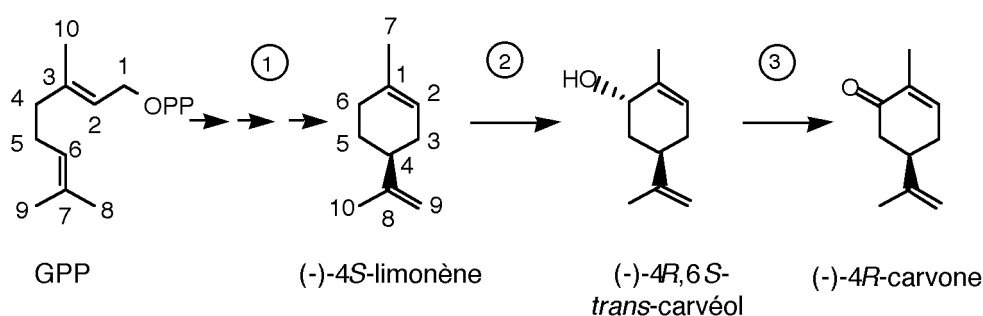


Fig. 7 : Voie de biosynthèse chez la Menthe verte de la carvone via le limonène (37).

- 1 : 4*S*-limonène synthétase
- 2 : 4*S*-limonène-6-hydroxylase
- 3 : (-)-*trans*-carvéol déshydrogénase

4- Pinane et fenchane

Des observations basées sur l'incorporation d'acide [2-¹⁴C] mévalonique montrent que le carbone 3 de l' α - et du β -pinène dérive du carbone 2 de l'acide mévalonique (43). Ces auteurs concluent à la fermeture du cycle butanique sur les carbones allyliques 1 et 2 de l'ion terpényle-8 donnant naissance au cation pinyle-2 (Figure 8). Ce dernier évoluerait par perte d'un proton vers la formation des α - et β -pinènes.

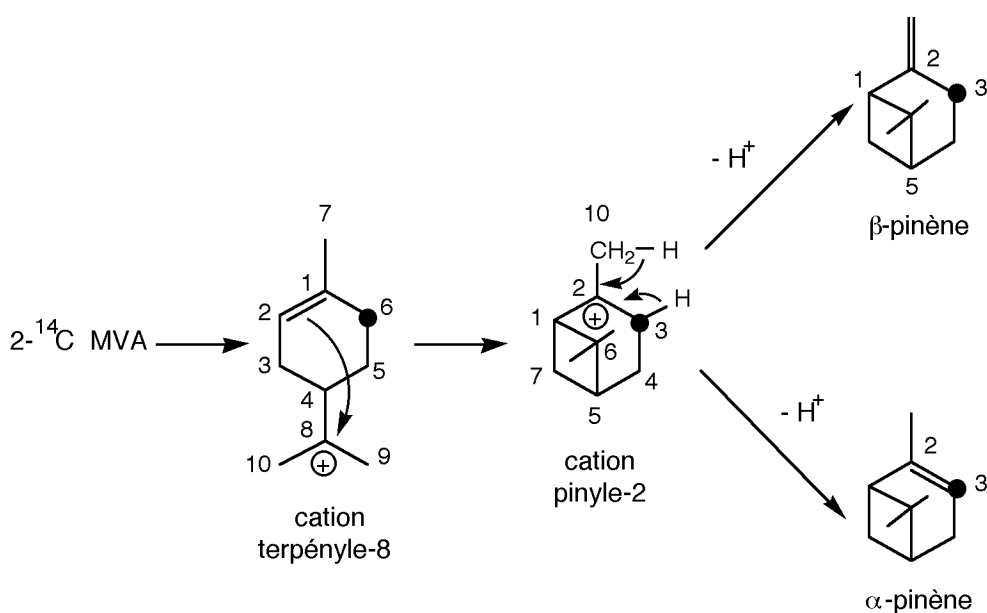
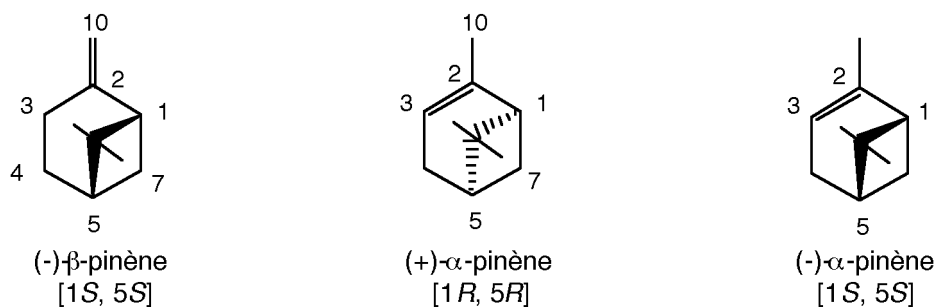


Fig. 8 : Mécanisme de bicyclisation du cation terpényle-8 et biosynthèse d' α - et de β -pinènes via le cation pinyle-2 (43).

Chez les genres *Pinus* et *Salvia*, les pinènes sont des constituants majeurs de l'essence. Gambliel et Croteau (44) ainsi que Schütte (15) ont observé deux énantiomères : (\pm)- α -pinène et (-)- β -pinène. Leurs formules sont indiquées ci-dessous :



Les feuilles de Sauge (*Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) renferment deux pinanes cyclases (I et II) (6) à stéréospécificité différente vis-à-vis du LPP (27,45). La première préfère l'énantiomère (-)-(3R)-LPP et la seconde l'énantiomère (+)-(3S)-LPP (Figure 9). Cependant, les deux pinènes cyclases sont incapables de distinguer entre la forme (4R) et (4S) du carbocation α -terpényle (46). Ce dernier est un intermédiaire universel dans la formation des monoterpènes cycliques. Le diphosphate (4RS)- α -terpényle constitue un inhibiteur compétitif modéré de la cyclisation du GPP par les pinènes synthétases (34).

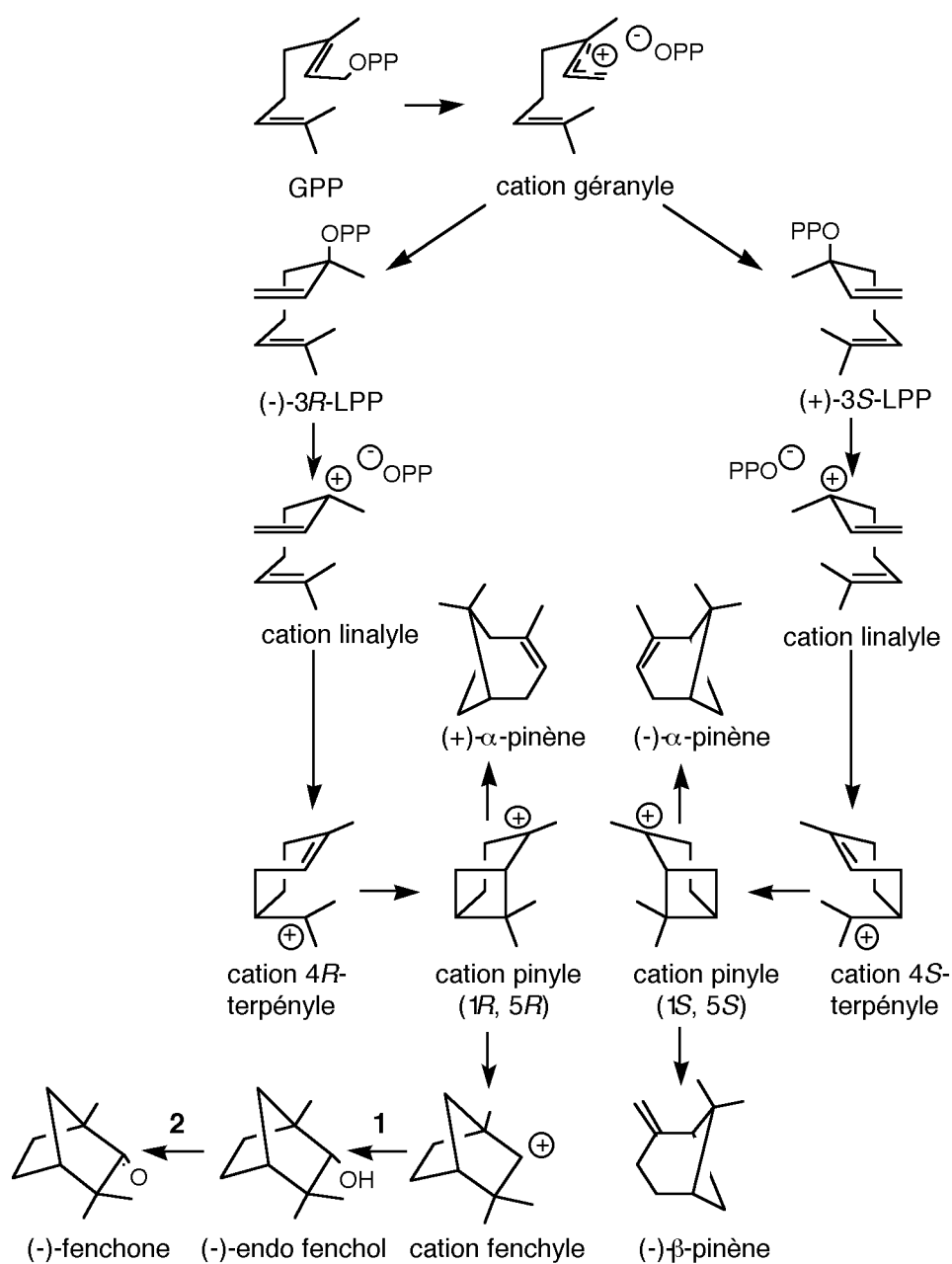


Fig. 9 : Voies de biosynthèse du (-)-α-pinène, du (-)-β-pinène (pinène cyclase II) et du (+)-α-pinène (pinène cyclase I) à partir du cation pinyle-2, cation à l'origine du (-)-endo-fenchol et de la (-)-fenchone via le cation fenchyle-2 .

1 : (-)-endo-fenchol déshydrogénase

2 : (-)-endo-fenchol synthétase

La biosynthèse de la fenchone chez des jeunes feuilles de plantules de 30 jours de Fenouil amer met en jeu deux enzymes solubles (23-24,47) : une (-)-endo-fenchol synthétase qui donne directement du (-)-endo-fenchol à partir de GPP et une (-)-endo-fenchol déshydrogénase qui conduit par oxydation à la formation de (-)-fenchone (Figure 9).

Le GPP est transformé en cation linalyle. Le cation fenchyle-2 proviendrait du cation terpényle-8 *via* le cation pinyle-2.

5- Bornane, thujane et carane

A partir de l'homogénat de jeunes feuilles de Sauge officinale (*Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*), 2 enzymes ont été partiellement purifiées (48-50). La bornéol synthétase convertit le diphosphate de bornyle en bornéol dont l'oxydation est catalysée par la bornéol déshydrogénase et aboutit au camphre (Figure 10).

La bicyclisation en C₇-C₃ du carbocation α -terpényle avec capture d'un anion diphosphate conduit au cation diphosphate de bornyle (25).

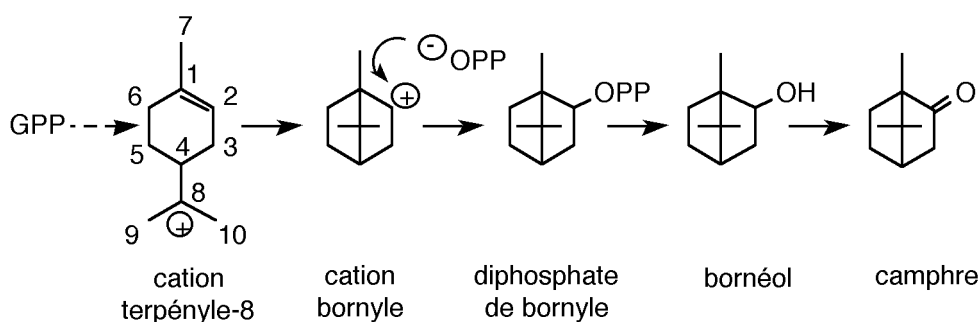
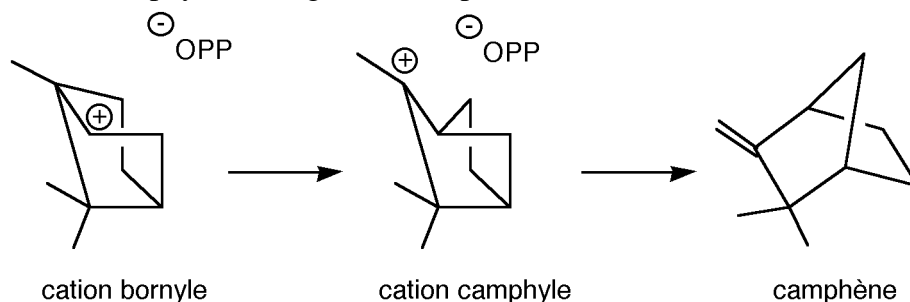


Fig. 10 : Biosynthèse du bornéol et du camphre à partir du GPP via le diphosphate de bornyle (51)

Le camphre peut aussi être formé à partir des pinènes comme l'ont montré Croteau *et al.* (27).

Le cation bornyle aboutit par une transposition de Wagner-Meerwein au cation camphyle, à l'origine du camphène (52) :



La sabinène et la thujone synthétase ont été isolées des feuilles de Sauge (⁵³). Ces 2 composés dérivent des cations sabinyle ou thujyle (Figure 11).

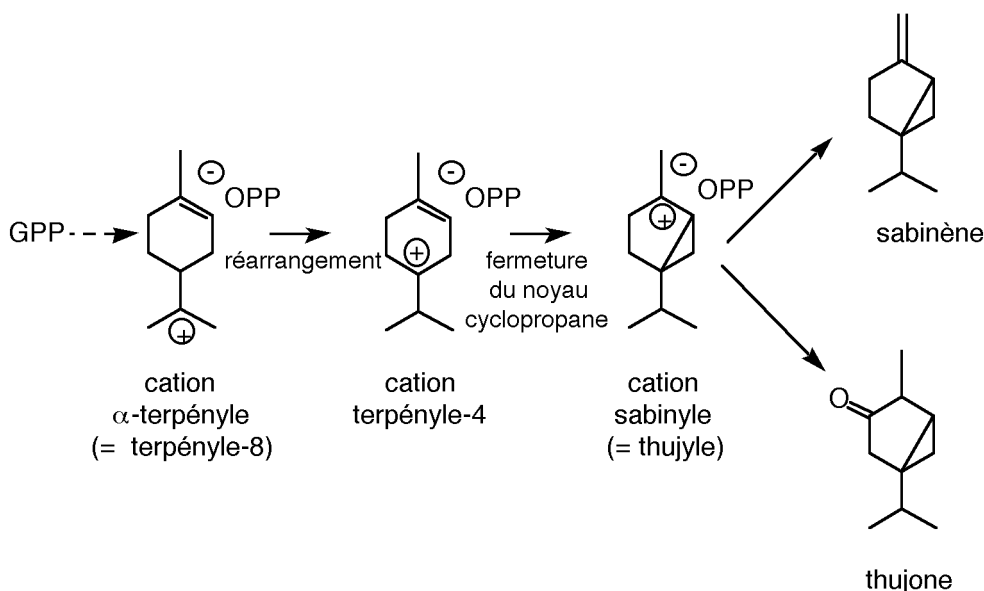


Fig. 11 : Biosynthèse du sabinène ou de la thujone à partir du GPP via le cation sabinyle (=thujyle) par la sabinène ou la thujone synthétase (⁵³).

Savage et Croteau (³⁰) ont purifié partiellement la carène synthétase à partir des plantes de 6 à 12 mois de *Pinus contorta* Dougl. (*Pinaceae*) issues de la germination des graines. Le (+)-3-carène est un monoterpène très fréquent chez les Conifères. Sa synthèse à partir du cation α -terpényle se fait par la fermeture du noyau cyclopropyle suite à une élimination de l'hydrogène en C₅, avec une migration de la double liaison C₁-C₂ en C₃-C₄ (Figure 12).

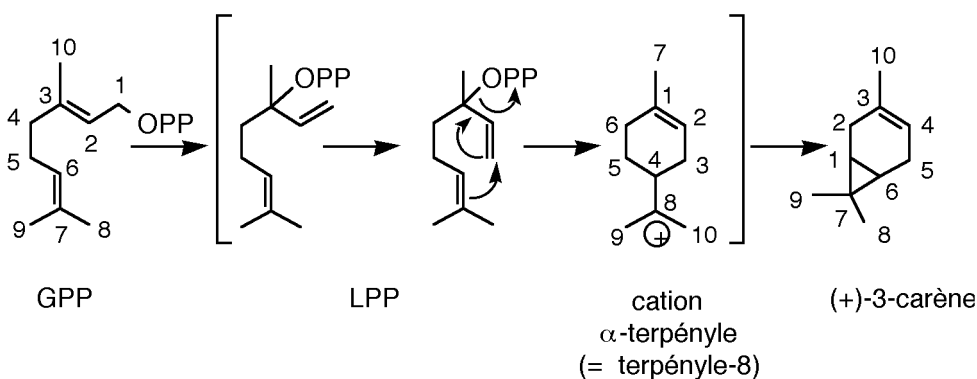


Fig. 12 : Mécanisme de biosynthèse du (+)-3-carène par la (+)-3-carène synthétase à partir du GPP via le diphosphate de linalyle (³⁰).

RÉFÉRENCES

- 1 - Poulter (C.D.), Rilling (H.C.) - The prenyl transfer reaction. Enzymatic and mechanistic studies of the 1'-4 coupling reaction in the terpene biosynthetic pathway. - *J. Acc. Chem. Res.*, 1978, **11**, 307-313.
- 2 - Poulter (C.D.), Rilling (H.C.) - Prenyltransferases and isomerases. - in Porter (J.W.) & Spurgeon (S.L.) *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. I*, New York, Wiley, 1981, pp. 161-224.
- 3 - De La Fuente (M.), Pérez (L.M.), Hashagen (U.), Chayet (L.), Rojas (C.), Portilla (G.), Cori (O.) - Prenyltransferases from the flavedo of *Citrus sinensis*. - *Phytochemistry*, 1981, **20**, 1551-1557.
- 4 - Stahl-Biskup (E.) - Monoterpene glycosides, state-of-the-art. - *Flav. Frag. J.*, 1987, **2**, 75-82.
- 5 - Endo (T.), Suga (T.) - Stereochemistry in the biosynthesis of geranyl diphosphate by geranyl diphosphate synthase from *Pelargonium roseum*. - *Phytochemistry*, 1992, **31**, 1565-1568.
- 6 - Gambliel (H.), Croteau (R.) - Pinene Cyclases I and II. Two enzymes from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze stereospecific cyclizations of geranyl pyrophosphate to monoterpene olefins of opposite configuration. - *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 740-748.
- 7 - Pérez (L.M.), Pauly (G.), Carde (J.P.), Belingheri (L.), Gleizes (M.) - Biosynthesis of limonene by isolated chromoplasts from *Citrus sinensis* fruits. - *Plant Physiol. Biochem.*, 1990, **28**, 221-229.
- 8 - Sangwan (R.S.), Sangwan (N.S.), Luthra (R.) - Metabolism of Acyclic Monoterpenes: Partial Purification and Properties of Geraniol Dehydrogenase from Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Stapf.) Leaves. - *J. Plant Physiol.*, 1993, **142**, 129-134.
- 9 - Croteau (R.) - Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. - *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 929-954.
- 10 - Ames (J.M.), MacLeod (G.) - Volatile components of Okra. - *Phytochemistry*, 1990, **29**, 1201-1207.
- 11 - Gleizes (M.), Marpeau (A.), Pauly (G.), Bernard-Dagan (C.) - Role of acyclic compounds in monoterpene biosynthesis in *Pinus pinaster*. - *Phytochemistry*, 1982, **21**, 2641-2644.
- 12 - Alonso (W.R.), Croteau (R.) - Purification and Characterization of the Monoterpene Cyclase γ -Terpinene Synthase from *Thymus vulgaris*. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **286**, 511-517.

- 13 - Loomis (W.D.), Croteau (R.) - Biochemistry of terpenoids. - *in* Stumpf (P.K.) & Conn (E.E.) *The biochemistry of plants, vol. 4.* Academic Press, 1980, pp. 363-418.
- 14 - Loomis (W.D.), Croteau (R.) - Biochemistry and physiology of lower terpenoids. - *Rec. Adv. Phytochem.*, 1973, **6**, 147-185.
- 15 - Schütte (H.R.) - Secondary plant substances. Monoterpenes. - *Progr. Bot.*, 1984, **46**, 119-139.
- 16 - Banthorpe (D.V.), Branch (S.A.) - The biosynthesis of C₅-C₂₀ terpenoid compounds. - *Nat. Prod. Rep.*, 1985, **2**, 513-524.
- 17 - Gershenzon (J.), Maffei (M.), Croteau (R.) - Biochemical and Histochemical Localization of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Spearmint (*Mentha spicata*). - *Plant Physiol.*, 1989, **89**, 1351-1357.
- 18 - Croteau (R.), Cane (D.E.) - Monoterpene and Sesquiterpene Cyclases. - *in* Law (J.H.) & Rilling (H.C.) *Steroids and Isoprenoids. Methods in enzymology, Vol. 110*, Academic Press, 1985, pp. 383-405.
- 19 - Suga (T.), Hirata (T.), Aoki (T.), Shishibori (T.) - Interconversion and cyclization of acyclic allylic pyrophosphates in the biosynthesis of cyclic monoterpenoids in higher plants. - *Phytochemistry*, 1986, **25**, 2769-2775.
- 20 - Loomis (W.D.) - Biosynthesis and metabolism of monoterpenes. - *in* Pridham (J.B.) *Terpenoids in plants*, New York, Academic Press, 1967, pp. 59-82.
- 21 - Beytia (E.), Valenzuela (P.), Cori (O.) - Terpene biosynthesis: Formation of nerol, geraniol and other prenyls by an enzyme system from *Pinus radiata* seedlings. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, **129**, 346-356.
- 22 - Croteau (R.), Karp (F.) - Biosynthesis of monoterpenes: preliminary characterization of bornyl pyrophosphate synthetase from Sage (*Salvia officinalis*) and demonstration that geranyl pyrophosphate is the preferred substrate for cyclization. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, **198**, 512-522.
- 23 - Croteau (R.), Felton (N.M.) - Substrate specificity of monoterpene dehydrogenases from *Foeniculum vulgare* and *Tanacetum vulgare*. - *Phytochemistry*, 1980, **19**, 1343-1347.

- 24 - Croteau (R.), Felton (N.M.), Ronald (R.C.) - Biosynthesis of monoterpenes: Conversion of the acyclic precursors geranyl pyrophosphate and neryl pyrophosphate to the rearranged monoterpenes fenchol and fenchone by a soluble enzyme preparation from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, **200**, 524-533.
- 25 - Wheeler (C.J.), Croteau (R.) - Monoterpene Cyclases. Stereoelectronic requirements for substrate binding and ionization. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 8213-8219.
- 26 - Wheeler (C.J.), Croteau (R.) - Direct demonstration of the isomerization component of the monoterpene cyclase reaction using a cyclopropylcarbinyl pyrophosphate substrate analog. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **84**, 4856-4859.
- 27 - Croteau (R.), Satterwhite (D.M.), Wheeler (C.J.), Felton (N.M.) - Biosynthesis of Monoterpenes. Stereochemistry of the enzymatic cyclizations of geranyl pyrophosphate to (+)- α -pinene and (-)- β -pinene. - *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 2075-2080.
- 28 - Croteau (R.), Alonso (W.R.), Koeppe (A.E.), Shim (J.H.), Cane (D.E.) - Irreversible Inactivation of Monoterpene Cyclases by a Mechanism-Based Inhibitor. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, **307**, 397-404.
- 29 - Davisson (V.J.), Neal (T.R.), Poulter (C.D.) - Farnesyl-Diphosphate Synthase. Catalysis of an Intramolecular Prenyl Transfer with Bisubstrate Analogs. - *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 1235-1245.
- 30 - Savage (T.J.), Croteau (R.) - Biosynthesis of Monoterpenes: Regio- and Stereochemistry of (+)-3-Carene Biosynthesis. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, **305**, 581-587.
- 31 - Arigoni (D.), Cane (D.E.), Shim (J.H.), Croteau (R.), Wagschal (K.) - Monoterpene cyclization mechanisms and the use of natural abundance deuterium NMR-short cut or primrose path ? - *Phytochemistry*, 1993, **32**, 623-631.
- 32 - Savage (T.J.), Hatch (M.W.), Croteau (R.) - Monoterpene Synthases of *Pinus contorta* and Related Conifers - A new class of terpenoid cyclase. - *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 4012-4020.
- 33 - Pyun (H.J.), Coates (R.M.), Wagschal (K.C.), McGeady (P.), Croteau (R.) - Regiospecificity and Isotope Effects Associated with the Methyl-Methylene Eliminations in the Enzyme-Catalyzed Biosynthesis of (*R*)- and (*S*)-Limonene. - *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3998-4009.

- 34 - McCaskill (D.), Gershenzon (J.), Croteau (R.) - Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). - *Planta*, 1992, **187**, 445-454.
- 35 - Rajaonarivony (J.I.M.), Gershenzon (J.), Croteau (R.) - Characterization and Mechanism of (4*S*)-Limonene Synthase, A Monoterpene Cyclase from the Glandular Trichomes of Peppermint (*Mentha X piperita*). - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **296**, 49-57.
- 36 - Gershenzon (J.), Duffy (M.A.), Karp (F.), Croteau (R.) - Mechanized techniques for the selective extraction of enzymes from plant epidermal glands. - *Anal. Biochem.*, 1987, **163**, 159-164.
- 37 - Gershenzon (J.), McCaskill (D.), Rajaonarivony (J.I.M.), Mihaliak (C.), Karp (F.), Croteau (R.) - Isolation of Secretory Cells from Plant Glandular Trichomes and Their Use in Biosynthetic Studies of Monoterpenes and Other Gland Products. - *Anal. Biochem.*, 1992, **200**, 130-138.
- 38 - Alonso (W.R.), Rajaonarivony (J.I.M.), Gershenzon (J.), Croteau (R.) - Purification of 4*S*-Limonene Synthase, a Monoterpene Cyclase from the Glandular Trichomes of Peppermint (*Mentha x piperita*) and Spearmint (*Mentha spicata*). - *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 7582-7587.
- 39 - Rajaonarivony (J.I.M.), Gershenzon (J.), Miyazaki (J.), Croteau (R.) - Evidence for an Essential Histidine Residue in 4*S*-Limonene Synthase and Other Terpene Cyclases. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **299**, 77-82.
- 40 - Colby (S.M.), Alonso (W.R.), Katahira (E.J.), McGarvey (D.J.), Croteau (R.) - 4*S*-Limonene Synthase from the Oil Glands of Spearmint (*Mentha spicata*) - cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. - *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 23016-23024.
- 41 - Karp (F.), Mihaliak (C.A.), Harris (J.L.), Croteau (R.) - Monoterpene biosynthesis: Specificity of the hydroxylation of (-)-limonene by enzyme preparations from Peppermint (*Mentha piperita*), Spearmint (*Mentha spicata*) and Perilla (*Perilla frutescens*) leaves. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, **27b**, 219-226.
- 42 - Croteau (R.), Karp (F.), Wagschal (K.C.), Satterwhite (D.M.), Hyatt (D.C.), Skotland (C.B.) - Biochemical Characterization of a Spearmint Mutant That Resembles Peppermint in Monoterpene Content. *Plant Physiol.*, 1991, **96**, 744-752.

- 43 - Banthorpe (D.V.), Ekundayo (O.), Njar (V.C.O.) - Biosynthesis of chiral α - and β -pinenes in *Pinus* species. - *Phytochemistry*, 1984, **23**, 291-294.
- 44 - Gambliel (H.), Croteau (R.) - Biosynthesis of (\pm)- α -Pinene and (-)- β -Pinene from Geranyl Pyrophosphate by a Soluble Enzyme System from Sage (*Salvia officinalis*). - *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 2335-2342.
- 45 - Croteau (R.), Satterwhite (D.M.), Cane (D.E.), Chang (C.C.), Cane (D.E.) - Biosynthesis of monoterpenes. Enantioselectivity in the enzymatic cyclization of (+)- and (-)-linalyl pyrophosphate to (+)- and (-)-pinene and (+)- and (-)- camphene. - *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 10063-10070.
- 46 - McGeady (P.), Pyun (H.J.), Coates (R.M.), Croteau (R.) - Biosynthesis of Monoterpenes: Inhibition of (+)-Pinene and (-)-Pinene Cyclases by Thia and Aza Analogs of the 4*R*- and 4*S*- α -Terpinyl Carbocation. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **299**, 63-72.
- 47 - Croteau (R.), Alonso (W.R.), Koepp (A.E.), Shim (J.H.), Cane (D.E.) - Irreversible inactivation of monoterpene cyclase by a mechanism-based inhibitor. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1984, **307**, 397-404.
- 48 - Croteau (R.), Karp (F.) - Biosynthesis of monoterpenes: enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to 1,8-cineole, α -terpineol and cyclic monoterpene hydrocarbons by a cell-free preparation from sage (*Salvia officinalis*). - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, **176**, 734-746.
- 49 - Croteau (R.), Karp (F.) - Demonstration of a cyclic pyrophosphate intermediate in the enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to borneol. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, **184**, 77-86.
- 50 - Croteau (R.), Hooper (C.L.), Felton (M.) - Biosynthesis of monoterpenes. Partial purification and characterization of a bicyclic monoterpene dehydrogenase from sage (*Salvia officinalis*). - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, **188**, 182-193.
- 51 - Cane (D.E.), Saito (A.), Croteau (R.), Shaskus (J.), Felton (M.) - Enzymatic cyclization of geranyl pyrophosphate to bornyl pyrophosphate. Role of the pyrophosphate moiety. - *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 5831-5833.
- 52 - Croteau (R.), Satterwhite (D.M.) - Biosynthesis of monoterpenes. Stereochemical implications of acyclic and monocyclic olefin formation by (+)- and (-)-pinene cyclases from sage - *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 15309-15315.

- 53 - Croteau (R.) - Monoterpene biosynthesis. Cyclization of geranyl pyrophosphate to (+)-sabinene. - *ACS Symp. Ser.*, 1992, **490**, 8-20.

ABSTRACT

Monoterpene Biogenesis III - Monoterpene synthases

The geranyl diphosphate (GPP) is the physiological universal precursor of monoterpenes. It is cyclized from its allylic tertiary isomer, the (-)-3*R* or (+)-3*S* linalyl diphosphate according to the enzyme stereospecificity. The monoterpene synthases produce from GPP a variety of monoterpenes. The reactions catalysed by these enzymes are regiospecific with a moderate degree of enantioselectivity. The glandular trichomes of Lamiaceae have constituted a good departure material for the purification of these enzymes. The purification of (4*S*)-limonene synthase, the first to be sequenced, has led up to the antibody production, that could be used in immunocytology for a possible subcellular localization.

Key-words: geranyl diphosphate, linalyl diphosphate, monoterpene synthases, enantioselectivity.
