

LA GEMME : BIOSYNTHÈSE ET RECHERCHES POUR L'AVENIR

A. Marpeau*, A. Vidal*, C. Plomion**, Ph Gallusci***

*Laboratoire de Chimie des Substances Végétales-Institut du Pin, Université Bordeaux I, 351 avenue de la Libération, 33405 Talence, France.

** Station de recherches forestières -INRA-, B.P. 45, 33610 Cestas, France.

***Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement des Plantes, Université Bordeaux I, avenue des Facultés, 33405 Talence, France.

RÉSUMÉ

La composition de la gemme du Pin maritime est liée à des processus biosynthétiques et contrôlée par des processus génétiques. La biosynthèse des composés isopréniques comporte des étapes successives dépendantes de l'activité de deux groupes d'enzymes : les prényle transférases et les cyclases. La qualité de l'oléorésine est sous le contrôle de gènes codants dont l'expression régle l'activité de ces enzymes. La localisation des gènes à expression précoce sur une carte génomique est, pour le généticien améliorateur, un outil pour accélérer et améliorer la sélection : cette carte existe pour le Pin maritime.

Mots clés : Isoprénoides, prényle transférase, cyclases, FPP, oléorésine traumatique, carte génomique.

La gemme biosynthétisée par les Résineux est un produit naturel dont les composants (acides résiniques variés solubilisés par des hydrocarbures) appartiennent à la famille des ISOPRENOIDES. Cette famille regroupe plus de 22000 composés qui interviennent, en Biologie, dans les fonctions vitales des végétaux mais aussi des organismes animaux. Dans le domaine végétal, le métabolisme isoprénique est partie prenante dans la structure et le fonctionnement membranaire (phytostérol, quinones), dans la structure des pigments photosynthétiques (chaîne phytol des chlorophylles, caroténoïdes), dans la croissance et le développement cellulaire (phytohormones : gibbérélines, acide abscissique). Les composés isopréniques sont aussi très étudiés pour leur intervention dans les relations plante - insecte et plante-pathogène. Ils ont, en outre, un impact écologique en raison de leur capacité de volatilisation (écosystèmes forestiers, bioclimatologie des forêts de Conifères).

Du point de vue chimique, l'homogénéité de cette vaste famille repose sur l'unité isoprénique à cinq atomes de carbone qui, selon la règle de RUZICKA (1953), peut donner, par condensations successives toute la gamme des composés en C₁₀: monoterpènes, C₁₅: sesquiterpènes, C₂₀: diterpènes, C₃₀: stérols, C₄₀: caroténoïdes ou plus dans le cas de la synthèse des polyprénoïdes (caoutchouc).

Dans cet exposé seront successivement envisagés les voies, les sites anatomiques et le contrôle de la biosynthèse de l'oléorésine, chez les Conifères principalement. Quelques exemples de recherches actuellement en cours illustreront ensuite les perspectives de pouvoir agir, à plus ou moins long terme, sur la bioproduction de la gemme.

BIOSYNTHÈSE DES ISOPRÉNOÏDES

Les voies de biosynthèse

La molécule biologiquement active à la base de tous les terpénoïdes est le pyrophosphate d'isopentényle (IPP) à 5 atomes de carbone (Lynen *et al.*, 1959 ; Bloch *et al.*, 1959).

a) La voie traditionnelle de biosynthèse des isoprénoïdes fait dériver l'IPP de la forme active de l'acétate par des réactions complexes. En 1993, il a été proposé une autre origine métabolique pour l'IPP qui peut dériver du pyruvate et d'un triose phosphate (Rohmer *et al.*, 1993).

Faisant suite à la synthèse de l'IPP, l'isomérisation de cette molécule forme du pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP). Ces deux isomères en C₅ vont se condenser selon un mode tête-queue, pour donner une molécule acyclique en C₁₀: le pyrophosphate de géranyle (GPP), précurseur des monoterpènes (hydrocarbures et composés oxygénés).

L'addition d'un IPP sur le GPP forme le pyrophosphate de famésyle (FPP), précurseur acyclique direct des sesquiterpènes en C₁₅, et par dimérisation des triterpènes (stéroïdes en C₃₀).

La condensation d'un IPP sur le FPP donne naissance au pyrophosphate de géranylgeranyle (GGPP) qui est le précurseur en C₂₀ des diterpènes (acides résiniques), et par dimérisation celui des caroténoïdes en C₄₀.

L'élongation de la chaîne des précurseurs, dont aucun n'est cyclisé, est un processus catalytique nécessitant l'intervention d'enzymes qui réalisent la liaison intermoléculaire du précurseur et de l'IPP supplémentaire : les prényles transférases. Celles-ci sont nommées en fonction du produit formé : GPP synthase, FPP synthase, GGPP synthase. La première d'entre elles a été caractérisée (Chayet *et al.*, 1984) puis purifiée par Clastre en 1993 chez la Vigne. La GGPP synthase a été isolée et caractérisée dans plusieurs modèles végétaux (Poivron, Dogbo & Camara, 1987; Moutarde, Laferrière & Beyer, 1991). La FPP synthase, du fait de sa position clé du carrefour des voies de biosynthèse menant aux sesquiterpènes, stéroïdes et diterpènes, a été et est toujours très étudiée dans tous les règnes vivants. Les caractéristiques de cette enzyme sont bien connues et c'est la seule enzyme du métabolisme isoprénique qui ait été cristallisée à ce jour (Tarshis *et al.*, 1994).

b) A partir des précurseurs non cyclisés des diverses classes de terpénoïdes, la formation des produits terminaux peut se faire par déprotonation et/ou d'une façon plus complexe par des cyclisations dont les modalités ont été élucidées par Croteau et ses collaborateurs depuis 1984. Pour rendre compte du nombre extraordinairement élevé des composés isopréniques recensés, il faut rappeler l'existence d'une centaine de monoterpènes que ce soit sous forme d'hydrocarbures, de composés oxygénés : alcools, cétones, aldéhydes, lactones, esters, ou encore sous des formes glycosylées. Les milliers de sesquiterpènes actuellement connus présentent une centaine de squelettes carbonés différents ; ici encore s'exprime l'extraordinaire diversité structurale et fonctionnelle de ces molécules.

Les cyclases sont les enzymes responsables de la formation des liaisons carbone-carbone à l'intérieur des molécules isopréniques. On connaît leurs propriétés (affinité exclusive ou non vis à vis des précurseurs, caractéristiques de fonctionnement : pH, cofacteurs). Certaines cyclases ont été purifiées à homogénéité : la limonène cyclase (CIO) chez la Menthe (Alonso *et al.*, 1992), la β -sélinène cyclase (C15) chez le Calamondin (Belingeri *et al.*, 1992). Très peu de travaux ont été consacrés aux cyclases diterpéniques (purification partielle de l'abiétadiène synthase par Laprebande et

al., 1994)

Des hydrocarbures acycliques existent néanmoins et leur rôle de composés intermédiaires métabolisables a été prouvé, entre autres, pour le trans- β -ocimène, le myrcène et le trans- β -famésène (Gleizes et Coll., 1979, 1982, 1983, 1984). La trans- β -famésène synthase a été étudiée et partiellement purifiée (Salin et al., 1995).

d) Depuis le début des années 90, la majorité des travaux publiés sur les enzymes du métabolisme isoprénique s'intéressent au séquençage des protéines et des gènes correspondants. En 1996, Scolnik et Bartley recensent une trentaine d'ADN complémentaires clonés codant pour des enzymes du métabolisme terpénique.

La multiplicité des enzymes, les différentes modalités d'expression de leurs gènes dans les différents organes d'un même végétal ont pu être rapprochés des données ultrastructurales et structurales antérieurement acquises sur la sécrétion de l'oléorésine chez le Pin maritime.

SITES DE BIOSYNTHÈSE ET COMPOSITION DU SÉCRÉTÂT TERPÉNIQUE

a) Ultrastructure et compartimentation

Les expériences couplant dosages et marquages des produits synthétisés à des observations des ultrastructures des cellules sécrétrices de terpènes ont permis d'établir des relations entre biosynthèse et organites intracellulaires. L'immunocytolocalisation a ultérieurement confirmé cette compartimentation, caractéristique majeure de la biosynthèse des composés terpéniques.

Les plastes sont le site préférentiel de la synthèse des monoterpènes, des acides résiniques diterpéniques et des caroténoïdes (Gleizes *et al.*, 1983, 1987 ; Pauly *et al.*, 1986). Dans les cellules sécrétrices des canaux résinifères du Pin maritime, des leucoplastes particuliers sont entourés par le réticulum endoplasmique qui assure la synthèse des sesquiterpènes (Gleizes *et al.*, 1980) et participe à l'évacuation du secrétât vers la lumière du canal résinifère.

Cette compartimentation ultrastructurale des voies de biosynthèse sert en partie de support à de nombreuses théories sur la localisation du métabolisme isoprénique et plus spécifiquement des sites de synthèse et d'utilisation de l'IPP. En partant de la théorie cytoplasmique de Kleinig en 1989, de la théorie plastidiale de Mc Caskill et Croteau, 1995, de celle de Heintz *et al.* En 1990, concernant les stades de développement, et de la voie de synthèse de l'IPP découverte par Rohmer *et al.* (1993) chez les Procaryotes, Chappell, en 1995, a proposé l'existence de plusieurs voies similaires en fonction de la classe des isoprénoïdes ; chaque voie peut être régulée de façon indépendante par des isoformes des enzymes impliquées. Ceci donne une idée de la complexité des recherches sur le métabolisme terpénique.

b) Organisation des canaux sécréteurs Les bourgeons apicaux, les tissus corticaux, le bois et les aiguilles des jeunes rameaux,

Les racines jeunes, (organes d'origine primaire) possèdent des systèmes sécréteurs organisés en canaux résinifères longitudinaux ; la résine qu'ils contiennent est sécrétée puis excrétée par les cellules vivantes qui les délimitent.

Au sein des tissus conducteurs secondaires (bois et liber) des parties plus anciennes de l'arbre : branches et racines âgées, tronc, coexistent deux systèmes de canaux sécréteurs à orientation verticale ou radiale. Les canaux verticaux n'établissent pas de connections anatomiques entre eux ; par contre, il existe des relations anatomiques fréquentes mais non obligatoires entre les canaux horizontaux et les canaux longitudinaux. Certains canaux radiaux assurent une continuité structurale entre

les canaux du liber et ceux du bois.

c) Modalités de la sécrétion et secrétât

Au tout début du développement des **aiguilles**, les cellules sécrétrices accomplissent un cycle de sécrétion précoce, unique et bref (deux semaines environ). Elles perdent ensuite définitivement leur capacité sécrétoire, ce qui se traduit par une désorganisation plus ou moins poussée de leur structure.

C'est dans la résine des aiguilles que l'on trouve le nombre maximum de terpènes exprimés dans des proportions variables: 10 hydrocarbures monoterpéniques, 16 sesquiterpènes, 3 diterpènes, 5 acides résiniques et jusqu'à 25% de composés oxygénés divers (esters de phénétyle, esters d'alcools monoterpéniques et sesquiterpéniques) (Pauly *et al.*, 1973).

Dans les autres organes, qu'ils soient d'origine primaire ou secondaire, la sécrétion s'accomplit aussi en un seul cycle sécrétoire précoce et de courte durée. Après le remplissage du canal résinifère par excrétion du secrétât, les cellules bordant les canaux ne se désorganisent pas, mais entrent dans une phase de repos caractérisée par la présence d'importantes quantités de réserves, lipidiques essentiellement. Cet état de repos est définitif en conditions normales, mais il peut être levé: les cellules sécrétrices peuvent être réactivées par une stimulation traumatique biotique (pathogène) ou abiotique (gemmage). Elles accomplissent alors un cycle sécrétoire dont les caractéristiques divergent par rapport au cycle initial par sa durée (jusqu'à plusieurs mois dans les tissus corticaux). L'oléorésine produite en condition traumatique peut différer qualitativement et quantitativement de l'oléorésine originelle, ce qui sous-entend une expression différente des gènes contrôlant la biosynthèse en conditions normales ou anormales (Marpeau *et al.*, 1989; Walter *et al.*, 1989).

La composition de l'oléorésine normalement présente dans les **tissus corticaux** des jeunes pousses est simplifiée par rapport à celle des aiguilles. 6 monoterpènes et 2 sesquiterpènes sont présents, à côté des diterpènes, à des teneurs supérieures à 10%.

Dans la gemme native du tronc on ne trouve plus que 2 hydrocarbures majoritaires: les pinènes, accompagnés du caryophyllène (sesquiterpène le mieux représenté). Cette fraction volatile (20 à 35%) voisine avec des acides résiniques majoritaires.

CONTRÔLE DE LA SÉCRÉTION

La composition terpénique est donc variable entre les tissus mais aussi en fonction du stade de développement de l'individu et de son origine géographique.

L'existence même de variabilité dans l'expression des terpènes à ces divers niveaux a amené les chercheurs à supposer que ces variations pourraient être d'origine génétique.

La présence ou l'absence totale de certains hydrocarbures dans la fraction volatile (Δ^3 carène, myrcène, longifolène, caryophyllène) suggère un mode d'hérédité simple de certains de ces constituants. En travaillant sélectivement sur un tissu où l'expression du profil terpénique est stabilisée (tissus corticaux de pousses ayant achevé leur croissance) et en analysant la descendance des parents dont les phénotypes et les génotypes étaient connus, on a pu observer que la ségrégation des caractères répondait bien aux lois de Mendel. Ce fut le cas pour le Δ^3 carène et pour le myrcène (Baradat *et al.*, 1972, 1975), le limonène (Marpeau *et al.*, 1982), le longifolène et le caryophyllène (Marpeau *et al.*, 1975). Les travaux de Zinkel en 1977 et ceux de Walter en 1988, montrent un contrôle génétique de la capacité des Pins à synthétiser les hydrocarbures et les acides résiniques.

Cette connaissance du mode d'hérédité des terpènes a permis de déboucher sur l'utilisation de ces constituants comme marqueurs biochimiques fiables dans le cadre d'une méthodologie stricte. Ils ont leur application dans les études chimiotaxinomiques, l'identification des provenances d'origine inconnue (contrôle variétal), dans l'étude des lois de croisement dans les vergers à graines et le marquage des sorties variétales qui en sont issues (Baradat et Marpeau, 1988).

Ces marqueurs pourraient permettre la sélection et l'obtention de variétés améliorées présentant des caractères économiquement intéressants (richesse en β pinène ou en substances de base permettant l'hémisynthèse de composés à forte valeur industrielle). Ils sont aussi un outil dans la recherche sur la résistance des Pins aux pathogènes.

RECHERCHES ACTUELLES ET PERSPECTIVES

Les trois exemples ci-dessous illustrent, de façon partielle, les recherches actuellement développées en Aquitaine par les équipes de l'INRA - Amélioration des Arbres Forestiers et celles des laboratoires de l'Université de Bordeaux 1 Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement des Plantes (BCMDP) et du Laboratoire de Chimie des Substances Végétales - Institut du Pin (LCSV-IP).

Dans le domaine de l'enzymologie, les biologistes moléculaires du BCMDP (Couлары et al., 1997) ont réussi à identifier et cloner les acides nucléiques complémentaires (ADNc), codant pour la FPP synthase : prényle transférase qui assure la synthèse du FPP, précurseur des sesquiterpènes et des stérols. Les séquences d'acides aminés déduites présentent des homologies (83, 80, et 50%) avec d'autres FPP synthases connues chez des plantes et des champignons. La FPP synthase est exprimée de façon différentielle au cours du développement et les résultats acquis suggèrent l'existence d'au moins deux gènes codants.

En utilisant un mutant de Levure, Karst a réussi à détourner l'utilisation du FPP non pas vers les stérols habituels mais, par un effet « feed-back » vers la synthèse de monoterpènes que la Levure ne produit pas en conditions normales

Etant donné la position stratégique du FPP au carrefour menant vers tous les terpènes de taille supérieure ou égale 15 atomes de carbone, mieux connaître les gènes codant pour les enzymes assurant sa synthèse pourrait peut-être permettre, à l'avenir, d'infléchir la biosynthèse dans une direction artificiellement programmée.

Nous nous intéressons, depuis plusieurs années, aux variations du métabolisme terpénique chez le Pin maritime en fonction de stress externes. Actuellement au LCSV-IP deux thèmes sont développés : les stress hydriques et mécaniques (blessures, vent).

Nous avons pu montrer que la formation de poches de résines dans le tronc des Pins est liée à des pressions climatiques telles que le vent ou l'immersion des racines, et qu'elle est sous le contrôle total ou partiel d'un messager : l'éthylène (hormone végétale gazeuse) (Marpeau *et al.*, résultats non publiés).

L'étude de l'influence de stress hydriques progressifs sur de jeunes plants de Pins maritime a montré que le métabolisme monoterpénique est fortement perturbé pour des stress de force moyenne. Ceci peut s'avérer intéressant pour la récolte de produits à fort potentiel industriel comme le myrcène et le β -pinène. (Vidal A., 1995)

L'impact de traumatismes comme les blessures dues au gemmage, est depuis longtemps connu pour stimuler de façon générale le métabolisme terpénique. L'augmentation de la production de gomme par aspersion de la blessure avec des produits activants est un concept relativement récent. Grâce au développement d'un modèle expérimental, nous travaillons actuellement sur des marqueurs de l'intensité de

la réponse du Pin maritime à la blessure et aux activateurs utilisés dans le cadre du projet EUROGEM de relance de l'activité gemmière en France et au Portugal. Ces marqueurs nous permettent d'étudier sur des périodes de temps très brèves la réponse de l'arbre à la blessure et de préjuger de ses qualités de production. On peut envisager dans des expérimentations futures d'allier aux activateurs des bloquants spécifiques des étapes de la biosynthèse.

Les généticiens impliqués dans les programmes d'amélioration des arbres forestiers sont confrontés à une contrainte majeure : l'évaluation tardive des caractères de sélection. La localisation sur le génome des gènes qui contrôlent la variation naturelle du caractère-cible permet le raccourcissement des cycles de sélection. La cartographie complète du génome du Pin maritime existe, (Plomion *et al.*, 1995). Elle a été réalisée avec des marqueurs protéiques et RAPD (amplification des acides nucléiques polymorphes) sur une descendance F2 d'hybrides de Pins maritimes corses x landais. Plomion *et al.*, en 1996, ont localisé sur la carte génomique le locus contrôlant la synthèse du Δ^3 -carène. Ce caractère cible est intéressant car il a une expression précoce et totale dès le stade plantule. L'approche quantitative (analyse des teneurs absolues) a conforté les résultats de l'approche qualitative (analyse de la ségrégation pour les caractères de richesse et de pauvreté en Δ^3 -carène des individus F2) : le gène majeur qui contrôle la synthèse de ce monoterpène se trouve sur le groupe de liaisons n°5 (chromosome 5).

Pour un généticien de l'Amélioration, posséder une carte où est placé le maximum de caractères à expression précoce permet de sélectionner très tôt les individus pour des caractères d'intérêt agronomique (forme, productivité) et de les utiliser en tant que meilleurs géniteurs. L'amélioration de l'efficacité de la sélection peut aussi passer par la transformation génétique qui vise à fabriquer des organismes qui n'existent pas dans la nature mais qui répondent à une attente des utilisateurs et, dans ce cas il appartient à la Commission ad hoc de la C.E.E. d'évaluer l'opportunité du caractère-cible que l'on veut introduire par transgénèse.

BIBLIOGRAPHIE

Alonso W.R., Rajaonarivony J.M., Gershenzon J., Croteau R., 1992b. Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of Peppermint (*Mentha x piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*). J. Biol. Chem., 267: 7582-7587.

Baradat P., Bernard-Dagan C., Fillon C., Marpeau A., Pauly G., 1972. Les terpènes du Pin maritime. II: Hérité de la teneur en myrcène. Ann. Sci. Forest. 32(1) : 29-54.

Baradat P., Bernard-Dagan C., Pauly G., Zimmermann-Fillon C., 1972. Les terpènes du Pin maritime. III: Hérité de la teneur en monoterpènes. Ann. Sci. Forest. 29(3) : 307-334.

Belingheri L., Cartayrade A., Pauly G., Gleizes M., 1992. Partial purification and properties of the sesquiterpene P-selinene cyclase from *Citrofortunella mitis* fruits. Plant Science, 84 : 129-136.

Block K., Chaykins S., Phillips A.H., De Waard A., 1959. Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenyl pyrophosphate. J. Biol. Chem., 234 : 2595-2604.

Chayet L., Rojas M.C., Cori O., Bunton C.A., McKenzie C., 1984. Complexes of bivalent cations with neryl and geranyl pyrophosphate : their role in terpenoid biosynthesis. Bioorganic Chemistry, 12 : 329-338.

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

Dogbo O., Camara B., 1987. Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 920 : 140-148.

Gleizes M., 1979. Biosynthèse et localisation cellulaire des hydrocarbures terpéniques dans le Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.). Thèse doctorat d'état, Université Bordeaux I.

Gleizes M., Carde J.P., Pauly G., Bernard-Dagan C., 1980. *In vivo* formation of sesquiterpenes hydrocarbons in the endoplasmic réticulum of pine. *Plant Science Letters*, 20 : 79-90.

Gleizes M., Marpeau A., Pauly G., Bernard-Dagan C., 1982. Rôle of acyclic compounds in monoterpenes in *Pinus pinaster*. *Phytochemistry*, 21 : 2641-2644.

Gleizes M., Pauly G., Bernard-Dagan C., Belingheri L., 1983a. Conditions of monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in Pinus and Citrus species. *Biochem. Soc. Transactions*, :590.

Gleizes M., Pauly G., Carde J.P., Marpeau A., Bernard-Dagan C., 1983b. Monoterpene hydrocarbon biosynthesis by isolated leucoplasts of *Citrofortunella mitis*. *Planta*, 159 : 373-381.

Gleizes M., Marpeau A., Pauly G., Bernard-Dagan C., 1984. Sesquiterpene biosynthesis in maritime pine needles. *Phytochemistry*, 23 : 1257-1259.

Gleizes M., Camara B., Walter J., 1987. Some characteristics of terpenoid biosynthesis by leucoplasts of *Citrofortunella mitis*. *Planta*, 170: 138-140.

Heintze A., Gorchach J., Leuschner C., Hoppe P., Hagelstein P., Schuize-Siebert D., Schultz G., 1990. Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. *Plant Physiol.*, 93 : 1121-1127.

Kleinig H., 1989. The role of plastid in isoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40 39-59.

Laferrière A., Beyer P., 1991. Purification of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Sinapsis alba* etioplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1077 : 167-172.

Laprebande B., 1994. Isolement et purification d'une enzyme diterpénique : l'abiétadiène synthase de *Pinus pinaster* Ait. DEA Biologie-Santé Bordeaux I.

Lynen F., Agranoff R.W., Eggerer H., Henning U., Moslein E.M., 1959. γ - γ dimethyl-allyl-pyrophosphat und geranyl-pyrophosphat, biologische vorstufen des squalenes. Zur Biosynthese der Terpene, VI *Angew. Chem.* 71 657-684.

Marpeau A., Baradat P., et Bernard-Dagan C., 1975. Les terpènes du Pin maritime: IV. Hérité de la teneur en deux sesquiterpènes: le longifolène et le caryophyllène. *Ann. Sci. Forest.* 32(4) : 185-203.

Marpeau A., Baradat P., et Bernard-Dagan C., 1982. Les terpènes du Pin maritime: V. Hérité de la teneur en limonène. *Ann. Sci. Forest.* 40(2):197-216.

Marpeau A., Walter J., Launay J., Charon J., Baradat P., Gleizes M., 1989. Effects of wounding on the terpene content of twigs of maritime pine . II. Changes in the volatile terpene hydrocarbon composition. *Trees*, 4 : 220-226.

Mc Caskill D., Croteau R., 1995. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta*, 197 : 49-56. Pauly G., Gleizes M., Bernard-Dagan C., 1973. Identification des constituants de l'essence des aiguilles de *Pinus pinaster* Ait.. *Phytochemistry*, 12 : 1395-1398.

Pauly G., Belingheri L., Marpeau A., Gleizes M., 1986. Monoterpene formation by leucoplasts of *Citrofortunella mais* and *Citrus unshiu*. Steps and conditions of biosynthesis. *Plant Cell Reports*, 5 : 19-22. Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H., 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria : a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.*, 295 : 517-524. Ruzicka L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9 : 357-396. Salin F., Pauly G., Charon J., Gleizes M., 1995. Purification and characterization of trans-p-farnesene synthase from maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) needles. *J. Plant Physiol.*, 146 : 203 -209.

Scolnik P.A., Bartley G.E., 1996. Two more members of an *Arabidopsis* geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene family (GenBank U44876 and U44877) (PGR96-104). *Plant Physiol.*, 110 : 1435. Tarshis L.C., Yan M., Poulter C.D., Sacchettini J.C., 1994. Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry*, 33 : 10871-10877.

Walter J., 1988. Les acides résiniques et les hydrocarbures diterpéniques du Pin maritime *Pinus pinaster* Ait. Identification et biosynthèse et isolement de systèmes enzymatiques. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Bordeaux I.

Walter J., Charon J., Marpeau A., Launay J., 1989. Effects of wounding on the terpene content of twigs of maritime pine. I. Changes in the concentration of diterpene resin acids and ultrastructural modifications of the resin duct epithelial cells following injury. *Trees*, 4 : 210-219.

Zinkel D.F., 1977. Pine resin acids as chemotaxonomic and genetic indicators. T.A.P.P.I., Conference Papers Madison, 20-20 Juin 1977.