



**HAL**  
open science

# Utilisation de la 13-Hydroperoxyde lyase recombinante d'olive dans des procédés biocatalytiques de production de composés à note verte

Sabrina Jacopini

► **To cite this version:**

Sabrina Jacopini. Utilisation de la 13-Hydroperoxyde lyase recombinante d'olive dans des procédés biocatalytiques de production de composés à note verte. Sciences agricoles. Université Pascal Paoli, 2015. Français. NNT : 2015CORT0016 . tel-01304561v2

**HAL Id: tel-01304561**

**<https://hal.science/tel-01304561v2>**

Submitted on 4 Mar 2019

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

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



**UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI**  
**ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE**  
**UMR CNRS 6134 SPE**



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR EN ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES**  
**DE LA BIOLOGIE**

**Mention** : Biochimie et Biologie moléculaire

**Soutenue publiquement par**  
**SABRINA JACOPINI**

Le 10 Décembre 2015

---

**Utilisation de la 13-Hydroperoxyde lyase recombinante d'olive dans  
des procédés biocatalytiques de production de composés  
à note verte**

---

**Directeurs :**

Mme Liliane BERTI, Pr, Université de Corse  
Mr Jacques MAURY, MC, Université de Corse

**Rapporteurs :**

Mme Claudine MAYER, Pr, Université Paris Diderot  
Mme Florence HUSSON, MC-HDR, AgroSup Dijon

**Jury**

Mme Claudine MAYER, Pr, Université Paris Diderot  
Mme Florence HUSSON, MC-HDR, AgroSup Dijon  
Mr Pascal DHULSTER, Pr, Université de Lille 1  
Mr Alain MUSELLI, Pr, Université de Corse  
Mme Liliane BERTI, Pr, Université de Corse  
Mr Jacques MAURY, MC, Université de Corse

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Président  
Examineur  
Examineur

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Professeur Liliane Berti, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de m'avoir donné les moyens de réaliser ma thèse. Merci pour la qualité de son encadrement, ses conseils, sa patience, son soutien et sa gentillesse.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à mon co-directeur, le Docteur Jacques Maury, pour son appui scientifique, sa présence, son écoute et sa disponibilité. Je le remercie de m'avoir guidé, encouragé, conseillé tout au long de mes années universitaires. J'ai beaucoup appris à ses côtés.

Je tiens à remercier les membres de mon jury, le Professeur Claudine Mayer, le Docteur Florence Husson, le Professeur Pascal Dhulster et le Professeur Alain Muselli de me faire l'honneur de bien vouloir évaluer mon travail de thèse. Je tiens à remercier également le Professeur Alain Muselli pour l'expertise qu'il a su apporter et le partage de ses connaissances qui ont permis d'enrichir mon travail de recherche. Il a toujours manifesté un esprit bienveillant et jovial à mon égard.

Merci au Professeur Jean Costa pour ce travail de collaboration avec le laboratoire de Chimie des produits naturels. Je le remercie de m'avoir intégré et accueilli comme un membre de son équipe ainsi que pour les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes.

Toute ma gratitude au Docteur Virginie Brunini pour son implication dans mon travail de recherche ainsi que pour les nombreux conseils qu'elle a pu me donner. Je remercie également le Docteur Claude Gambotti pour les enseignements qu'elle m'a prodigué en master et de m'avoir suivi et encouragé tout au long de mon parcours. Merci pour leur sympathie grandissante au fil de ces années.

Un merci particulier à mon amie Magali Mariani d'avoir été à mes côtés, de m'avoir soutenu et aidé dans mon travail. Merci de m'avoir aidé à affronter les périples de la thèse. Merci également pour tous ces moments de complicité partagés ensemble qui ont rendu toutes ces années plus agréables, et dont certains resteront inoubliables!

Merci à Sophie Vincenti pour sa contribution à mes recherches effectuée lors de son stage.

Merci à Jimmy et Franck d'avoir pris le temps de m'initier à la CPG, pour leurs conseils pratiques et pour leur patience au cours de ces longues expérimentations. Le temps passé à leur côté a été une source de bonne humeur et une suite de bons moments partagés. Je les remercie encore tous deux ainsi que Julien et Greg pour cette grande complicité qui a animé nos journées de rires et de joie.

Je tiens à remercier Marianne, Elodie, Nelly et Antoine d'avoir été présents à chaque instant et pour leur soutien si précieux. La bonne ambiance et les amitiés nouées ont aussi rythmé ces dernières années de travail. Elodie, Nelly merci pour vos fabuleuses pâtisseries !

Michel, tu m'as épaulé, soutenu et poussé à aller toujours plus loin. Tu as été mon pilier. Merci d'avoir été présent durant ce chapitre de ma vie, tu m'accompagneras pour les suivants....

Merci à mes amies de toujours, Laetitia, Marie-Laure, Gabie, Anne-Antonella, Aurélie, Christi de m'avoir accompagné toutes ces années, d'avoir pris le temps de m'écouter et pour leur amitié inconditionnelle. Merci d'avoir été là à chaque épreuve aussi bien dans le travail que dans la vie quotidienne.

A ma famille, mes parents, qui m'ont toujours encouragé et qui m'ont permis d'en arriver là où j'en suis aujourd'hui. Merci pour leur confiance indéfectible et de m'avoir permis de croire en mes projets et de les réaliser.

## Résumé

L'hydroperoxyde lyase (HPL) est une enzyme de la voie de la lipoxigénase impliquée dans la production de composés aromatisants (l'hexanal, le (Z)-hex-3-èneal et le (E)-hex-2-èneal). Ces composés sont responsables de l'odeur fraîche de l'herbe coupée dite « note verte » et sont très utilisés par les industries cosmétiques et agroalimentaires. Afin de répondre à la demande croissante en molécules à note verte naturelles, des systèmes de production utilisant des enzymes recombinantes sont développés. Ainsi, l'ADNc codant pour une 13-HPL (HPLwt) d'olive a été cloné au laboratoire et a été exprimée chez E.coli. Dans le but d'améliorer la solubilité de l'enzyme, une HPL dépourvue de peptide de transit chloroplastique (HPLdel) a également été produite. Les deux enzymes ont été purifiées puis caractérisées biochimiquement. Les deux HPL recombinantes présentent une activité maximale à pH 7,5 et à 25°C et agissent plus efficacement sur le 13-hydroperoxyde d'acide linoléique. La biotransformation des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linolénique catalysée par l'HPLwt et l'HPLdel a permis d'obtenir des taux de conversion de 93 % et 68 % pour la production d'hexanal, et de 73 % et 45 % pour la production de (Z)-hex-3-èneal. Par ailleurs, l'étude de la stabilité des enzymes a montré que la présence de glycérol 10 % (v/v) permet la conservation de l'activité de l'HPLwt et de l'HPLdel durant cinq semaines de stockage à -80°C. De plus, l'ajout de composés chimiques tels que le KCl, le NaCl, le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la glycine et le glycérol permettent d'augmenter l'efficacité des deux enzymes et le taux de synthèse de l'hexanal et du (Z)-hex-3-èneal tout en diminuant la quantité d'enzyme nécessaire à leur production.

Mots clés : hydroperoxyde lyase ; molécules à note verte; arômes naturels; bioconversion.

## Abstract

The hydroperoxide lyase (HPL) derives from a metabolic pathway named lipoxygenase pathway widely represented in plants and involved in the production of flavoring compounds (hexanal, (Z)-hex-3-ènal and (E)-hex-2-ènal). These volatile compounds are responsible for the fresh odor of cut grass known as "green note" and have a particularly interest for flavor and food industries. In order to satisfy the growing demand for natural green note molecules, systems based on the use of recombinant enzymes are developed. Thus, a cDNA encoding for a 13-HPL (HPLwt) from olive fruit was isolated and expressed into E.coli. In order to improve the enzyme solubility, the HPL deleted of its chloroplast transit peptide (HPLdel) was then produced. Both enzymes were purified and characterized. They displayed an optimum pH at 7.5 and an optimum temperature at 25 °C and act more efficiently on 13-hydroperoxide of linolenic acid. The bioconversion of 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids by action of HPLwt and HPLdel allowed obtaining conversion yields of 93 % and 68 % for hexanal production, and 73 % and 45 % for (Z)-hex-3-ènal production. Moreover, the study of the stability of the enzymes showed that the presence of 10% glycerol (v/v) allow to maintain 100% of the activity of the HPLwt and HPLdel during five weeks storage at -80 ° C. Furthermore, the addition of chemical compounds such as KCl, NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glycine, and glycerol can increase the efficiency of both enzymes and improve the synthesis of hexanal and (Z)-hex-3-ènal by decreasing the amount of enzyme required to produce them.

Key words: Hydroperoxide lyase, green leaf volatiles, natural aroma, bioconversion.

## Table des matières

<b>Avant Propos</b> .....	1
<b>Introduction bibliographique</b> .....	3
1. Introduction .....	4
2. Les hydroperoxydes lyases .....	6
2.1- Diversité.....	6
2.2- Propriétés biochimiques des hydroperoxydes lyases.....	7
2.2.1- Nomenclature et spécificité de substrat.....	8
2.2.2- L'hydroperoxyde lyase : une enzyme de la famille des cytochromes P450.....	9
2.2.3- Localisation intracellulaire de l'HPL .....	11
2.3- Modélisation de la structure de l'hydroperoxyde lyase.....	11
2.4- Mode d'action.....	16
2.4.1- Clivage homolytique et hétérolytique .....	16
2.4.2- Mécanisme réactionnel.....	17
2.4.3- Inhibition de l'HPL par son substrat .....	20
2.5- Stabilité de l'HPL .....	20
2.6- Importance biologique de l'HPL .....	21
3. Les composés volatils à note verte. ....	21
3.1- Formation des composés volatils.....	21
3.2- Rôles Physiologiques.....	23
3.2.1- Effet sur les microorganismes .....	24
3.2.2- Effet sur les insectes.....	24
3.2.3- Effet sur les plantes .....	25
3.3- Rôle dans l'arôme .....	27



4. Production des molécules à note verte.....	28
4.1-Synthèse chimique.....	29
4.2- Procédés physiques .....	30
4.3- Procédés biocatalytiques .....	30
4.4- Développement de nouveaux procédés pour la production de molécules à note verte.	32
5. But du travail.....	34
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	<b>35</b>
1. Matériel végétal.....	36
2. Clonage de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive .....	36
2.1- Amplification de l'ADNc par RT-PCR.....	36
2.2- Amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc par RACE-PCR .....	37
2.3- Clonage des produits d'amplification .....	38
2.4- Clonage de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive pour l'expression chez E.coli .....	38
2.4.1- Clonage dans le vecteur pMOS-Blue .....	38
2.4.2- Clonage dans le vecteur d'expression pQE30.....	38
3. Expression de l'HPL recombinante d'olive chez E.coli .....	39
4. Mesure des activités enzymatiques de l'HPL recombinante .....	40
5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et immunoempreinte.....	41
6. Détermination de la concentration en protéines .....	42
7. Effets de composés chimiques sur l'activité de l'HPLwt et l'HPLdel .....	42
8. Synthèse et analyse des produits de l'hydroperoxyde lyase .....	43
<b>Résultats et Discussion</b> .....	<b>46</b>
1. Etude préliminaires .....	1
1.1- Choix de l'échantillon d'ARN.....	1
1.2- Clonage de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive par RT-PCR et RACE-PCR .....	1

1.2.1-	Clonage de l'extrémité 3' de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive .....	2
1.2.2-	Clonage de l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive .....	2
1.3-	Clonage de l'ADNc complet codant pour l'HPL d'olive et analyse de la séquence... 3	3
2.	Expression de l'HPL recombinante d'olive.....	7
3.	Purification des enzymes HPLwt et HPLdel.....	10
4.	Caractérisation des HPLwt et HPLdel .....	14
4.1-	Détermination des pH et températures optimum.....	14
4.2-	Détermination des paramètres cinétiques .....	16
5.	Production d'hexanal et de (Z)-hex-3-ènal par l'action des HPL recombinantes d'olive .....	17
5.1-	Production d'hexanal par l'HPLwt ou l'HPLdel .....	17
5.2-	Production de (Z)-hex-3-ènal par l'HPLwt et l'HPLdel.....	19
6.	Conservation de l'HPLwt et de l'HPLdel .....	21
6.1-	Lyophilisation.....	21
6.2-	Réfrigération.....	22
7.	Effet de composés chimiques sur les activités de l'HPLwt et de l'HPLdel .	24
7.1-	Effet de la concentration en sel.....	24
7.2-	Effet de la concentration en glycine et glycérol .....	26
7.3-	Paramètres cinétiques en présence des composés chimiques .....	28
7.4-	Inactivation .....	29
8.	Effet de composés chimiques sur la production d'aldéhydes en C6 .....	32
8.1-	Production de (Z)-hex-3-ènal par l'HPLwt ou l'HPLdel en présence de glycine, de NaCl ou de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	32
8.2-	Production d'hexanal par l'HPLwt ou l'HPLdel en présence de glycine, de NaCl ou de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	34
	<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>36</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>40</b>

**Annexes**..... 50

**Communications**..... 54

## Table des figures

Figure 1: Voie de synthèse des oxylipines : la voie de la lipoxygénase (d'après Feussner et Wasternack (2002)).	5
Figure 2: Dégradation des 9- et 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique par l'hydroperoxyde lyase (d'après Martini et Iacazio, 1995 ; Fauconnier et Marlier, 1997).	8
Figure 3: Domaines conservés A, B, C, D chez les différents membres de la famille des CYP74 (d'après Mita et al., 2005).	10
Figure 4: Représentation tridimensionnelle de l'AOS de guayule (d'après Li et al. 2008).	12
Figure 5: Représentation de l'hélice I (d'après Li et al., 2008).	13
Figure 6: Site de liaison à l'hème (d'après Li et al., 2008).	14
Figure 7: Site actif de l'AOS de guayule (d'après Li et al., 2008).	15
Figure 8: Structure moléculaire de l'hème b avec au centre de la porphyrine, l'atome de fer.	16
Figure 9: Clivages homolytique et hétérolytique d'hydroperoxyde d'acide gras.	17
Figure 10: Mécanisme réactionnel de l'HPL décrit par Grechkin et Hamberg (2004).	19
Figure 11: Formation des composés volatils responsables de l'arôme au cours de la voie de la lipoxygénase (d'après Angerosa et al., (2004)).	22
Figure 12: Mécanisme de défense des plantes contre les herbivores (d'après Matsui et al., 2006).	25
Figure 13: Communication intra et inter-plante à la suite d'une attaque herbivore (d'après Arimura et al., 2010).	26
Figure 14: Procédé de production biocatalytique de composés à note verte (d'après Gigot, 2011).	31
Figure 15: Séquence nucléotidique et peptidique de l'HPL d'olive de la variété Leccino.	4

Figure 16: Arbre phylogénétique basé sur la séquence protéique des enzymes des différentes classes de CYP74. ....	6
Figure 17: Analyse de la répartition de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte. ....	7
Figure 18: Analyse des essais de solubilisation de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.....	8
Figure 19: Analyse de la répartition de l'HPLwt et de l'HPLdel par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.....	9
Figure 20: Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine au cobalt (Talon Superflow Metal Affinity). ....	11
Figure 21: Analyse des étapes de purification de l'HPLwt (A et B) et l'HPLdel (C et D) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % et par immunoempreinte. ....	12
Figure 22: Influence du pH sur l'activité de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B) en présence de 13-HPOD (a) et de 13-HPOT (b). ....	14
Figure 23: Influence de la température sur l'activité de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B) en présence de 13-HPOD (a) et de 13-HPOT (b). ....	15
Figure 24: Etude de la conservation de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F).....	23
Figure 25: Effet de la concentration en sels sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F).....	25
Figure 26: Effet de la concentration en glycérol et en glycine sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A et C) et de l'HPLdel (B et D). ....	27
Figure 27: Inactivation de l'HPLwt (A) en présence de glycine 2,5% (v/v) ou de NaCl 0,5M et de l'HPLdel (B) en présence de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25M ou de NaCl 1M. ....	30

## Table des tableaux

Tableau 1: Flaveurs attribuées aux différents composés volatils à six atomes de carbone formés par la voie de la lipoxigénase (d'après Gargouri et al., 2008).....	28
Tableau 2: Tableau de purification de l'HPLwt et l'HPLdel. ....	13
Tableau 3 : Paramètres cinétiques des HPLwt et HPLdel recombinantes purifiées.....	16
Tableau 4: Production d'hexanal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOD..	17
Tableau 5: Production de (Z)-hex-3-ènal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOD.....	19
Tableau 6: Production de (Z)-hex-3-ènal par l'HPLwt ou l'HPLdel à différentes températures. ....	20
Tableau 7 : Paramètres cinétiques de (A) l'HPLwt en présence et en absence de glycine 2,5% (w/v) et (B) l'HPLdel en présence ou en absence de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25M. ....	28
Tableau 8: Inactivation de (A) l'HPLwt en présence de glycine 2,5% (w/v) ou de NaCl 0,5M et de (B) l'HPLdel en présence de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25 M ou de NaCl 1M.....	31
Tableau 9: Production de (Z)-hex-3-ènal par l'HPLwt en présence de glycine 2,5 % (w/v) ou de NaCl (0,5M) et par l'HPLdel en présence de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25M. ....	33
Tableau 10: Production d'hexanal par l'HPLwt en présence de glycine 2,5% (w/v) ou de NaCl (0,5M) et par l'HPLdel en présence de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25M. ....	34

## Liste des abréviations

13-HPOD	Acide 13-hydroperoxyoctadéca-9,11-diénoïque ou 13-hydroperoxyde d'acide linoléique
13-HPOT	Acide 13-hydroperoxyoctadéca-9,11,15-triénoïque ou 13-hydroperoxyde d'acide linoléique
$\alpha$ -DOX	$\alpha$ -dioxygénase
AAT	Alcool acétyl transférase
ADH	Alcool déshydrogénase
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AOS	Allène oxyde synthase
DES	Divinyl éther synthase
EAS	Epoxyde alcool synthase
HPL	Hydroperoxyde lyase
HPLwt	Hydroperoxyde lyase sauvage
HPLdel	Hydroperoxyde lyase délétée du peptide de transit chloroplastique
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside
LOX	Lipoxygénase
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
POX	Peroxygénase
SDS	Dodécyl Sulfate de Sodium

## Avant Propos

La voie de la lipoxigénase (LOX) est une voie métabolique très représentée chez les végétaux. Les composés issus de cette voie possèdent des rôles physiologiques variés (développement, sénescence, défense de la plante). Parmi ces composés, les aldéhydes (l'hexanal, le (Z)-hex-3-èneal et le (E)-hex-2-èneal) ont des propriétés antibactériennes et antifongiques et sont également responsables de l'odeur fraîche de l'herbe coupée dite "note verte". Leur biosynthèse résulte de l'oxydation des acides gras polyinsaturés en hydroperoxydes par la lipoxigénase, puis de leur clivage par l'hydroperoxyde lyase (HPL). Ces composés sont largement utilisés dans les parfums et en technologie alimentaire. Cependant leur présence en faible quantité dans les plantes limite leur extraction à partir de matière première végétale, et leur production par synthèse chimique est très polluante. De nos jours, des processus de bioproduction faisant intervenir les enzymes de la voie de la LOX sont développés. Des extraits végétaux (farines, broyats de feuilles, de pulpes, ...) étant utilisés comme source de LOX et d'HPL, de grandes quantités de matière végétale dont l'approvisionnement est soumis aux aléas climatiques et techniques sont nécessaires. De plus, les extraits végétaux contiennent de nombreuses enzymes, dont certaines agissent sur les mêmes substrats que la LOX et l'HPL, ce qui génère un mélange complexe de molécules et contribue à diminuer le rendement en molécules d'intérêt. Pour contourner ces inconvénients, l'utilisation d'enzymes recombinantes (LOX et HPL) pourrait constituer une alternative intéressante pour produire ces molécules de manière sélective et plus efficace, tout en permettant l'attribution du label naturel très recherché par le consommateur.

Nous nous sommes intéressés au second partenaire de la voie, l'hydroperoxyde lyase qui clive les hydroperoxydes d'acides gras en aldéhydes et oxo-acides. L'ADNc codant pour l'hydroperoxyde lyase (HPLwt) a été isolé au laboratoire à partir d'olives noires de la variété

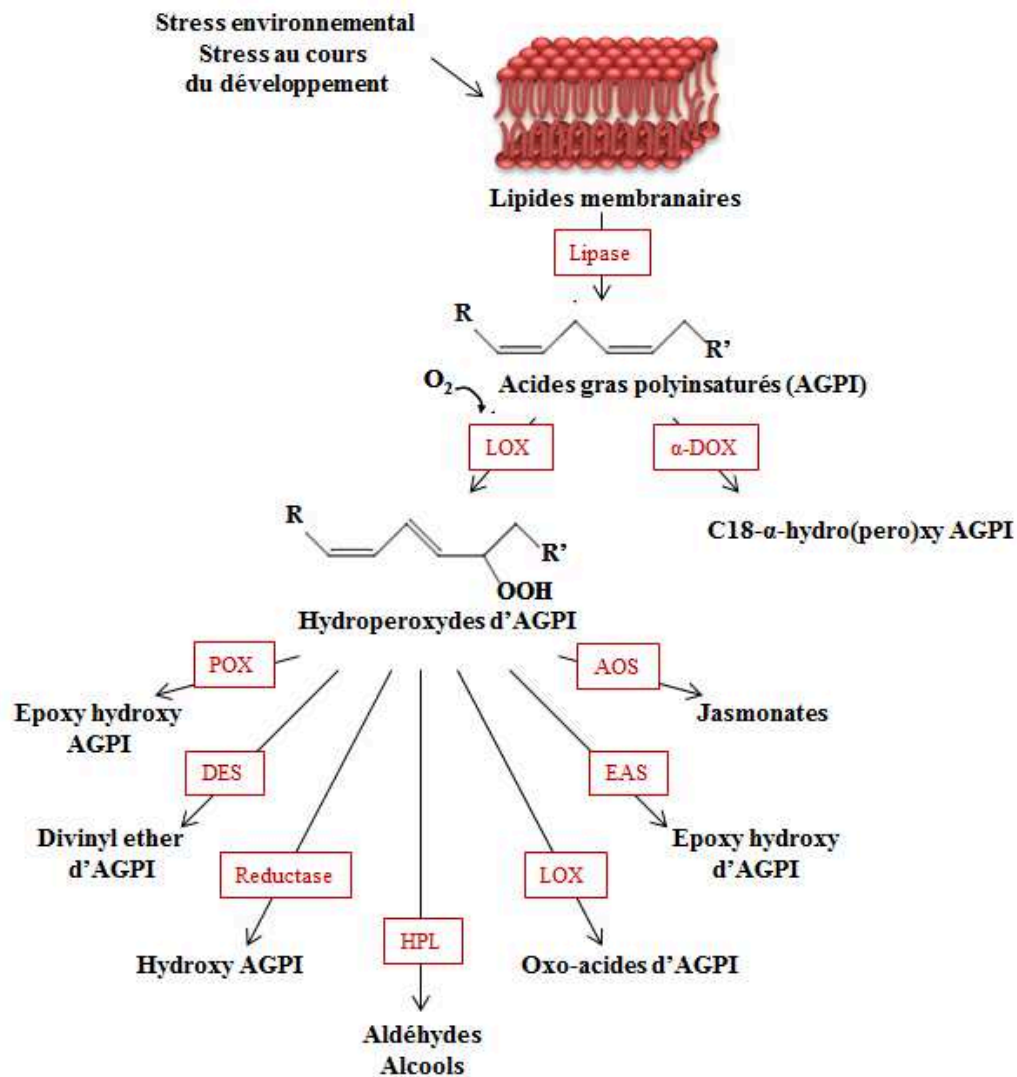


Leccino et a été exprimée chez E.coli. Comme l'HPLwt présentait des problèmes de solubilité, nous avons produit une HPL dépourvue de son peptide de transit chloroplastique (HPLdel). L'HPLwt et l'HPLdel ont été purifiées puis caractérisées biochimiquement (pH, température, paramètres cinétiques). Les deux enzymes ont également été utilisées comme catalyseurs pour la production d'hexanal et de (Z)-hex-3-ènal. Nous avons également étudié leur stabilité, déterminé les conditions de conservation, puis testé l'influence de composés chimiques sur l'activité des deux enzymes.

# **Introduction bibliographique**

## 1. Introduction

Au cours de leur croissance, les plantes sont confrontées à de nombreux facteurs abiotiques tels que la sécheresse, le stress mécanique, les radiations UV et les variations climatiques (Blée, 1998). De plus, elles sont constamment exposées à de multiples agents pathogènes tels que les insectes, les champignons et les bactéries. Pour résister aux agressions, elles sont capables de mettre en place d'une part des défenses constitutives (cuticule, composés toxiques, enzymes), et d'autre part d'induire des réponses qui permettent de limiter l'invasion, d'affaiblir ou encore de détruire l'agresseur (Blée, 1998 ; Heitz et al., 2002). Les réponses impliquent la reconnaissance directe ou indirecte de l'agent pathogène. La plante reçoit un stimulus qui déclenche l'émission de signaux qui vont induire l'activation de gènes codant pour des enzymes du métabolisme secondaire (Prost et al., 2005) qui catalysent la synthèse de composés de défense. Ces composés, appelés oxylipines, résultent soit de l'auto-oxydation d'acides gras polyinsaturés (Göbel et al., 2001), soit de leur dégradation par la voie de la lipoxygénase (Blée 1998 ; Grechkin, 1998 ; Feussner et al., 2001) (Figure 1). Les acides gras polyinsaturés proviennent de l'hydrolyse de triglycérides ou de phospholipides et de galactolipides membranaires par une lipase (Feussner et al., 2001). Les acides gras polyinsaturés libres peuvent être transformés en hydroperoxydes soit par l'action d'une  $\alpha$ -dioxigénase ( $\alpha$ -DOX) soit par l'action d'une lipoxygénase (LOX) (Blée, 2002; Feussner Wasternack, 2002; Howe et Schilmiller, 2002).



**Figure 1: Voie de synthèse des oxylipines : la voie de la lipoxygénase (d'après Feussner et Wasternack (2002)).**

LOX : lipoxygénase ;  $\alpha$ -DOX :  $\alpha$ -dioxygénase ; POX : peroxygénase ; DES : divinyl ether synthase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; EAS : époxy alcool synthase ; AOS : allène oxyde synthase ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

La conversion des hydroperoxydes en divers composés est ensuite catalysée par différentes enzymes : l'allène oxyde synthase (AOS), l'hydroperoxyde lyase (HPL), la divinyle ester synthase (DES), l'époxy alcool synthase (EAS), la peroxygénase (POX), l'alkyl hydroperoxyde réductase et la LOX (Howe et Schillmiller, 2002). Les produits résultant de cette cascade enzymatique, les époxy hydroxy d'AGPI, les divinyl ether d'AGPI, les hydroxy

*d'AGPI*, les aldéhydes, les oxo-acides d'AGPI et les jasmonates, constituent la famille des oxylipines (Blée, 2002 ; Howe et Schillmiller, 2002 ; Liavonchanka et Feussner, 2006).

Les oxylipines jouent différents rôles importants chez les plantes, d'une part, en tant que molécules de signalisation et d'autre part, en tant que composés de défense (Blée, 1998 ; Hassan et al., 2015). Les aldéhydes à 6 atomes de carbone (aldéhydes en C6) comme l'hexanal, le (Z)-hex-3-ènal, le (E)-hex-2-ènal et les aldéhydes en C9 comme le (Z)-non-3-ènal, le (Z,Z)-non-3,6-adienal, produits par l'HPL, sont également impliqués dans la saveur des fruits, des légumes et des plantes (Hatanaka et al., 1986 ; Gargouri et al., 2008 ; Gigot et al., 2010). Grâce à leurs propriétés aromatisantes et antibactériennes, ils sont très utilisés par les industries comme additifs alimentaires ou comme composants des formulations cosmétiques (Fukushige et al., 2005). Les industriels cherchent à développer des procédés toujours plus performants pour produire ces composés en grande quantité, notamment des procédés utilisant les enzymes de la voie de la lipoxygénase. Par son manque de stabilité et sa difficulté à être purifiée, l'HPL est considéré comme le composé limitant pour la production de ces composés (Gigot et al., 2010). Dès lors, de nombreuses études ont été réalisées sur l'HPL pour pouvoir l'utiliser dans des procédés de production de composés aromatisants (Tijet et al., 2001; Nemeth et al., 2004; Rabetafika et al., 2008).

## **2. Les hydroperoxydes lyases**

### **2.1- Diversité**

Les hydroperoxyde lyases sont présentes uniquement dans le règne végétal (Shibata et al., 1995 ; Delcarte et al., 2000). Elles sont principalement retrouvées chez les plantes supérieures ainsi que chez les champignons et les algues (Mu et al., 2012). L'enzyme est présente aussi bien dans des tissus photosynthétiques que non-photosynthétiques (Delcarte et al., 2000).

L'HPL est retrouvée chez les mono et les dicotylédones (Stumpe et Feussner, 2006), dans les feuilles (Fauconnier et al., 1997), les fruits, les plantules et les racines (Hatanaka et al., 1988). Tressl et Drawert (1973) ont signalé pour la première fois sa présence dans la banane et l'ont nommé « aldéhyde lyase ». Par la suite, Vick et al. (1976) ont retrouvé une activité lyase chez la pastèque et l'ont appelée hydroperoxyde lyase. L'enzyme a ensuite été mise en évidence dans de nombreuses espèces végétales : les feuilles de thé (Hatanaka et al., 1992), le tournesol (Itoh et Vick, 1999), les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Bate et al., 1998).

Depuis de nombreuses HPL ont été clonées et exprimées chez *E.coli* : l'HPL d'*Arabidopsis thaliana* (Bate et al., 1998), de goyave (Tijet et al., 2000), d'olive (Padilla et al., 2010) et de pomme de terre (Mu et al., 2012). Certaines HPL ont également été exprimées chez la levure *Pichia pastoris* et *Yarrowia lipolitica* comme l'HPL de tomate (Atwal et al., 2005) et de poivron vert (Bourel et al., 2004 ; Santiago-Gómez et al., 2010).

## **2.2- Propriétés biochimiques des hydroperoxydes lyases**

L'hydroperoxyde lyase est une protéine à atome de fer hémique (Shibata et al., 1995 ; Matsui et al., 1996 ; Delcarte et al., 2000). Chez les végétaux, l'enzyme est membranaire et possède une masse moléculaire comprise entre 170 et 200 kDa. Elle est composée de trois ou de quatre sous unités identiques d'environ 50 kDa (Delcarte et al., 2000 ; Noordermeer et al., 2001). L'HPL est stable dans une zone de pH comprise entre 5,5 et 8 et dans une gamme de température de 20°C à 35°C (Hornostaj et al., 2000 ; Mu et al., 2012). L'expression de l'HPL varie lors du développement de la plante et est maximale dans les premiers stades de développement (Bate et al., 1998 ; Zhu et al 2012).

Les substrats naturels des HPL sont les hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique générés par l'action préalable de la LOX sur les acides gras libres correspondants

(Shibata et al., 1995 ; Delcarte et al., 2000 ; Matsui, 2006). Cependant, il a été montré récemment que les HPL sont aussi capables d'agir sur les hydroperoxydes d'acides gras estérifiés générés par l'action directe d'une LOX sur des galactolipides (Nakashima et al., 2013).

### 2.2.1- Nomenclature et spécificité de substrat

La nomenclature des hydroperoxydes lyases est liée à la position de la fonction hydroperoxyde sur le substrat. De ce fait, on distingue les 9-hydroperoxydes lyases (9-HPL) et les 13-hydroperoxydes lyases (13-HPL) (Figure 2).

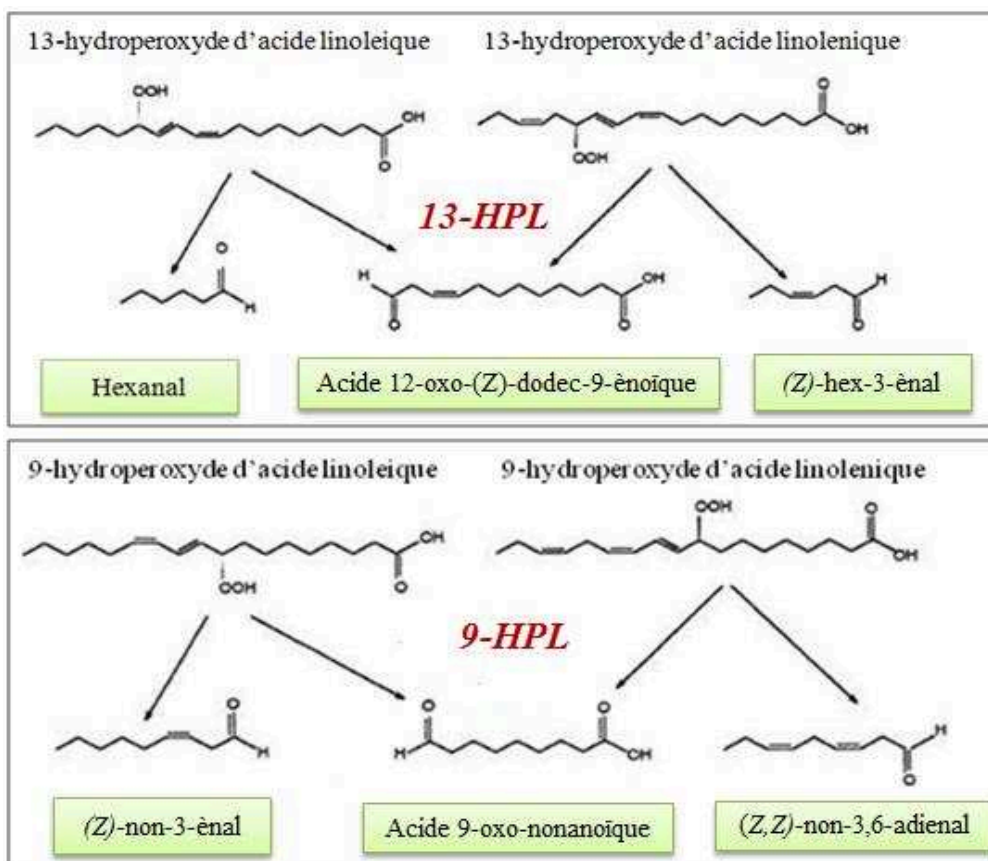


Figure 2: Dégradation des 9- et 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique par l'hydroperoxyde lyase (d'après Martini et Icazio, 1995 ; Fauconnier et Marlier, 1997).

Les hydroperoxydes lyases spécifiques des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique (13-HPL ; CYP74B) donneront des aldéhydes à six atomes de carbones ainsi qu'un acide 12-oxo-(Z)-dodec-9-énoïque (C12-oxo-acide). Cette activité a été retrouvée chez l'HPL de poivron vert (Matsui et al., 1996), de goyave (Tijet et al., 2000), de tomate (Suurmeijer et al., 2000), d'olive (Salas et al., 1999 ; Padilla et al., 2010) ou encore de pomme de terre (Mu et al., 2012).

Les hydroperoxydes lyases spécifiques des 9-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique (9-HPL ; CYP74C) vont former des aldéhydes à 9 atomes de carbones ainsi que l'acide 9-oxo-nonanoïque. Cette activité a été mise en évidence chez les poires (Gargouri et Legoy, 1998), le melon (Tijet et al., 2001) et l'amandier (Mita et al., 2005).

Il existe également des hydroperoxydes lyases qui agissent sur les 9-hydroperoxydes et sur les 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique (9/13-HPL ; CYP74C). Ces HPL à doubles spécificité ont été retrouvées dans le riz (Kuroda et al., 2005) et le concombre (Matsui et al., 2006).

### **2.2.2- L'hydroperoxyde lyase : une enzyme de la famille des cytochromes P450.**

Les hydroperoxydes lyases appartiennent à la famille des cytochromes P450 (monoxygénases) (Delcarte et al. 2000, Salas et al. 2000, Noordermeer et al. 2001, Grechkin 2002) et plus particulièrement à la famille atypique CYP74 (Delcarte et al. 2000, Noordermeer et al. 2001, Feussner et Wasternack 2002, Grechkin 2002). La famille des CYP74 diffère des cytochromes P450 au niveau de son mécanisme réactionnel. En effet, les CYP74 ne nécessitent aucun cofacteur et ne possèdent qu'une faible affinité pour le CO (Song



et al., 1993 ; Howe et Schillmiller, 2002 ; Werck-Reichhart et al., 2002). La famille des CYP74 se divise en quatre sous-familles en fonction de leur identité de séquence et leur spécificité de substrat (Howe et Schillmiller, 2002) :

- les CYP74 A et B sont représentés respectivement par les AOS et les HPL spécifiques de 13-hydroperoxydes d'acides gras (13-AOS et 13-HPL).
- les CYP74 C qui regroupent les AOS et les HPL spécifiques des 9-hydroperoxydes d'acides gras (9-AOS et 9-HPL) et possédant à la fois une double spécificité envers les 9 et 13-hydroperoxydes d'acides gras (9/13-AOS ; 9/13-HPL).
- les CYP74 D qui comportent uniquement des DES exclusivement spécifiques des 9-hydroperoxydes d'acides gras (9-DES)

Des alignements de séquence peptidiques des différentes enzymes de la famille des CYP74 ont montré la présence de 4 domaines A, B, C, D, fortement conservés situés à l'extrémité C-terminale (Mita et al., 2005 ; Zhu et al., 2012) (Figure 3).

	DOMAINE A	DOMAINE B	DOMAINE C	DOMAINE D
9-HPLmelon	LVFLAGENAYCGMKVLRP	KMSLLKSVVYEALRIEPPV	KDPKIFKDSEKFGVGRFVGEEGEK	PTPENKQCPGKNLVVLIGRIMV
9-AOS tomate	FVFLAGENSYGGLKVFEP	KMELVKSVVYETLEMDPPV	KDSKVFKNAEEFNPIRFVGGGGEK	PSVNIKQCFEKDLIVLMGRLLV
DES tabac	ILFLVGINMFAGLNAFEP	KMSLVESIVYETLRLP	RDPKIFDKPDIPIPIRFMGE-GVK	PAPDNKQCAKDLVHLLGRMLL
13-AOSA. thaliana	LLEATSENTWGGMKILRP	KMELTKSVVYECLRFEPV	RDPKIFDRADEFVPERFVGEEGEK	PTVGNKQCAKDFVLLVARLFV
13-HPLA. thaliana	LLEVLFCNAYCGFSVFIP	EMELVKSVVYETLRFNPPV	RDANVFDEPEEFKPIRYVGETGSE	PSASNKQCAAKDIVILTASLLV

**Figure 3: Domaines conservés A, B, C, D chez les différents membres de la famille des CYP74 (d'après Mita et al., 2005).**

Les numéros d'accèsion des séquences utilisées sont les suivants : 9-HPL de melon (AF081955); 9-AOS de tomate (AF454634); DES de tabac (AF070976); 13-AOS d'Arabidopsis thaliana (Y12636); 13-HPL d'Arabidopsis thaliana (AF087932). Le résidu de cystéine conservé est marqué d'une étoile rouge.

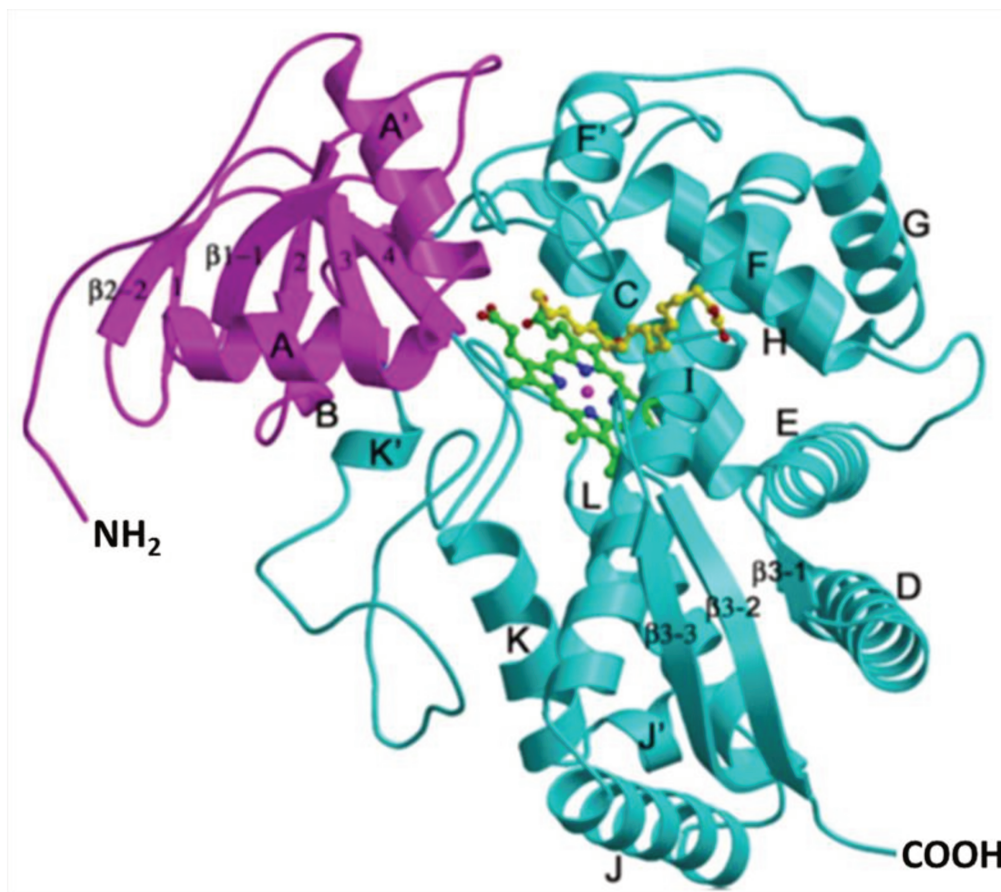
Le domaine D contient un résidu de cystéine très conservé qui serait impliqué dans le domaine catalytique de l'enzyme.

### **2.2.3- Localisation intracellulaire de l'HPL**

Dans les tissus verts, l'activité de l'HPL est souvent retrouvée dans les chloroplastes. Le rattachement de l'enzyme aux chloroplastes est dû à la présence d'un peptide de transit chloroplastique, caractéristique des enzymes de la sous famille des CYP74, situé dans la partie N-terminale de la séquence protéique (Song et al., 1993 ; Bate et al., 1998 ; Froelich et al., 2001 ; Stumpe et Feussner, 2006 ; Padilla et al., 2010). Dans les tissus non verts, les sites d'ancrage peuvent être la membrane de l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Delcarte et al., 2000). Cette localisation microsomale de l'enzyme est caractérisée par l'absence du peptide de transit chloroplastique (Noordermeer et al., 2001) comme chez l'HPL de melon (Tijet et al., 2001) ou de concombre (Matsui et al., 2000).

### **2.3- Modélisation de la structure de l'hydroperoxyde lyase**

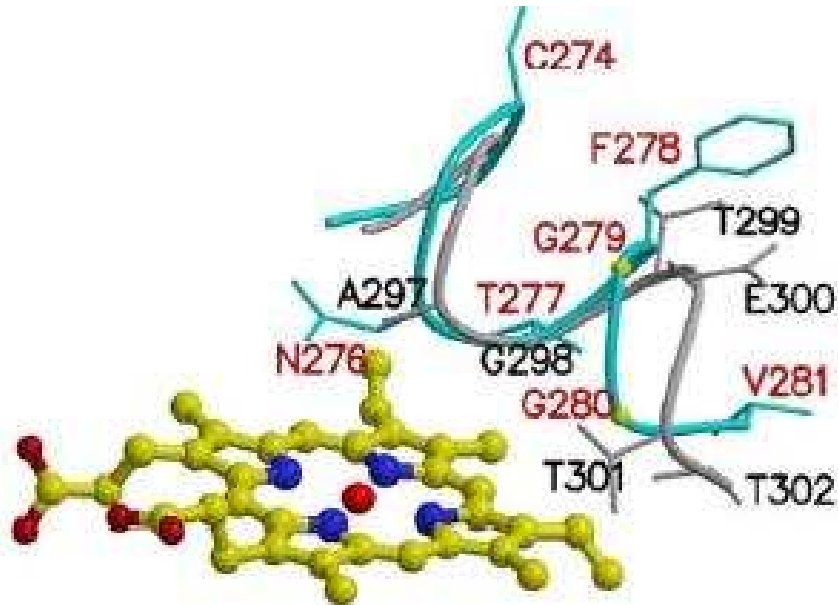
A ce jour, aucune structure cristalline d'hydroperoxyde lyase n'a été décrite dans la littérature. Toutefois, les alignements de séquence réalisés entre les différentes HPL et AOS ont montré un fort pourcentage d'identité de la séquence peptidique (entre 35 % et 56 % selon les HPL et les AOS) (Mita et al., 2005 ; Wan et al., 2013). De ce fait, les structures cristallines des AOS de guayule d'*Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2008 ; Lee et al., 2008) peuvent être utilisées comme modèle pour l'HPL (Figure 4).



**Figure 4: Représentation tridimensionnelle de l'AOS de guayule (d'après Li et al. 2008).**

*Les domaines  $\alpha$  et  $\beta$  sont représentés en bleu et en rose respectivement. L'hème et l'analogue du substrat (l'acide 13(S)-hydroxyoctadéca-9Z,11E-diénoïque, 13(S)-HODE) sont représentés en vert et jaune respectivement. La sphère rose, au centre de l'hème, désigne l'atome de fer.*

L'AOS contient un domaine principal riche en hélice  $\alpha$  et un domaine riche en feuillet  $\beta$ . Le groupe prosthétique de l'hème est situé entre les hélices I et L. L'AOS est caractérisée par une hélice I unique contenant une séquence en acides aminés spécifique (N<sub>276</sub>-T<sub>277</sub>-X-G<sub>279</sub>-G<sub>280</sub>-X) dans la partie centrale (Figure 5).

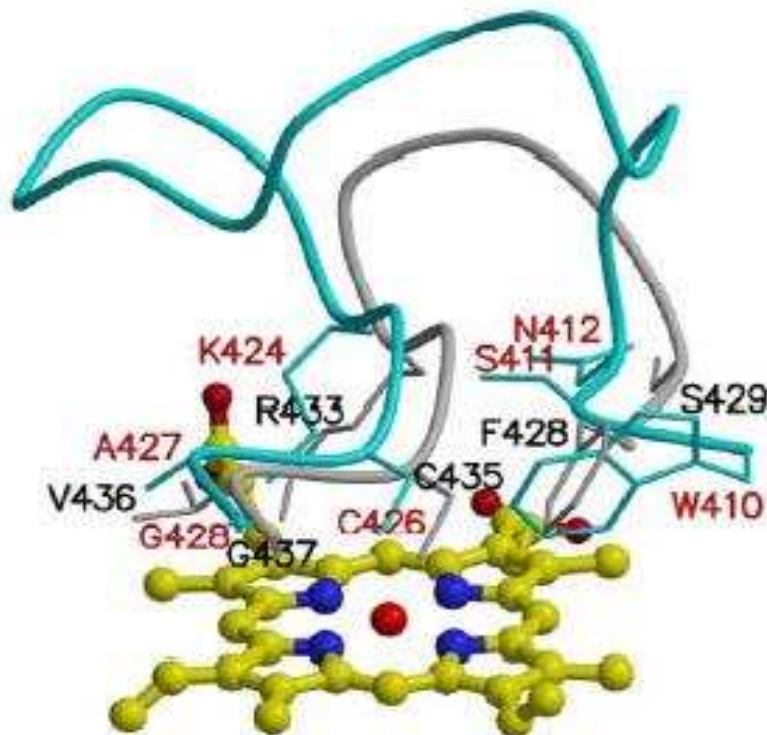


**Figure 5: Représentation de l'hélice I (d'après Li et al., 2008).**

*L'hélice I de l'AOS de guayule et du cytochrome P450 humain 2C9 est représentée en bleu et gris respectivement. L'hème est représenté en jaune et l'atome de fer, au centre, par une sphère rouge*

La thréonine (T277), la glycine (G280) et l'asparagine (N276) sont des résidus très conservés chez les AOS et les enzymes de la famille des CYP74. Des résidus adjacents de phénylalanine (F275) et de lysine (K282) sont également très conservés. La séquence F-N-T/S-X-G-G-X-K, est caractéristique des CYP74 et est impliquée dans la liaison à l'hème et dans la catalyse. De plus, le résidu d'asparagine (N276) qui est présent dans le site actif, est très proche de l'hème. Il joue un rôle important dans la catalyse. Le résidu de lysine (K282) est localisé dans le centre de l'hélice I, à l'entrée du site actif, et participe à la liaison et à la reconnaissance du substrat.

La boucle de liaison à l'hème est également une caractéristique structurale spécifique des AOS (Figure 6).

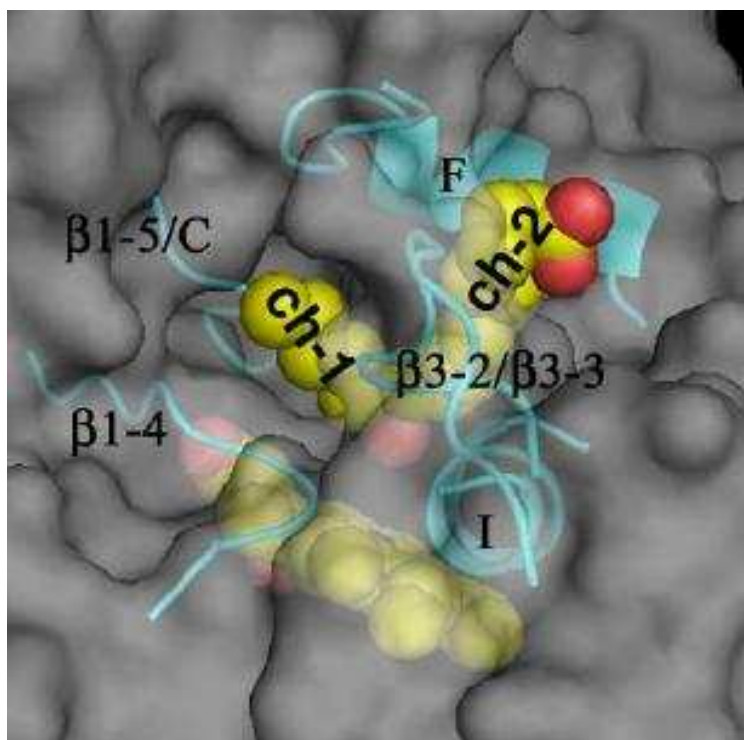


**Figure 6: Site de liaison à l'hème (d'après Li et al., 2008).**

La boucle de liaison à l'hème de l'AOS de guayule et du cytochrome P450 humain 2C9 est représentée en bleu et gris respectivement. L'hème est représenté en jaune et l'atome de fer, au centre, par une sphère rouge.

La partie C-terminale de la boucle contient des résidus de lysine (K424), de cystéine (C426) et de glycine conservés (K-X-C-X-G). Le résidu de cystéine (C426) est très conservé chez tous les cytochromes P450 et est impliqué dans la liaison de l'atome de fer. De plus, les résidus d'alanine (A427) et de glycine (G428) situés à l'extrémité C-terminal de la boucle et les résidus de sérine (S411) et de tryptophane (W410) situés dans la partie N-terminale de la boucle sont responsables des interactions hydrophobes avec l'hème.

La structure de l'AOS montre que la molécule de 13(S)-HODE est située dans une poche très étroite et profonde située sur le côté distal de l'hème (Figures 7).



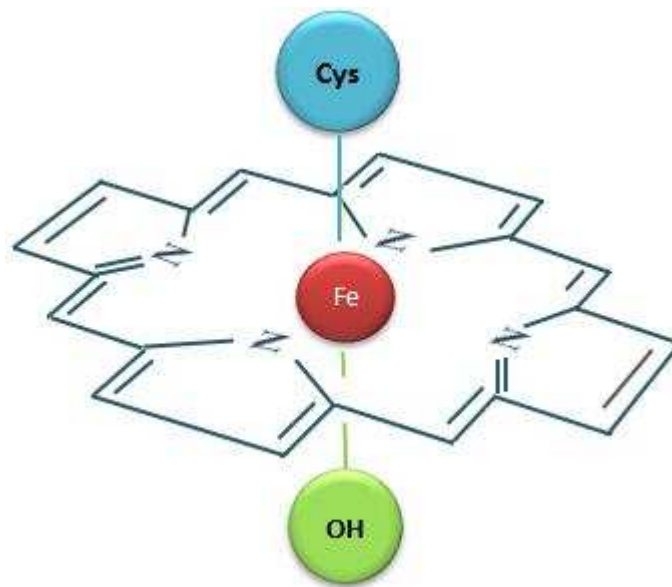
**Figure 7: Site actif de l'AOS de guayule (d'après Li et al., 2008).**

La surface accessible au *solvant* apparaît en gris. L'analogue du substrat (le 13(S)-HODE) et l'hème sont représentés par des sphères jaunes. Le 13(S)-HODE est situé au dessus de l'hème.

Cette poche de liaison au substrat est formé par les hélices F et I, par les boucles entre l'hélice C et  $\beta 1-5$ , entre les hélices F et F', entre l'hélice K et  $\beta 1-4$  et entre  $\beta 3-2$  et  $\beta 3-3$ , et est principalement composée de résidus hydrophobes tels que des phénylalanines (F92, F275 et F278). D'autre part, deux tunnels connectent le site actif à la surface : le tunnel 1 (ch-1) est situé entre les hélices F et I et le tunnel 2 (ch-2) entre l'hélice F et la chaîne  $\beta 1-4$  avec l'hélice A à l'entrée. Les boucles  $\beta 3-2/\beta 3-3$  et F/F' définissent les entrées permettant au substrat d'accéder au site actif grâce à ces deux tunnels. Le 13(S)-HODE est recourbé au niveau du C13 avec l'hydroxyle pointant vers le fer hémique. Le groupe carboxyle de l'analogue du substrat se trouve dans le tunnel 1 et le groupe méthyle dans le tunnel 2.

De façon générale, le site actif de l'hydroperoxyde lyase contient un hème prosthétique (Salas et al. 2000, Noordermeer et al. 2001) et plus particulièrement un hème b

(Delcarte et al. 2000, Noordermeer et al. 2001) ou protohème IX (protoporphyrine) (Noordermeer et al. 2001) (Figure 8).



**Figure 8: Structure moléculaire de l'hème b avec au centre de la porphyrine, l'atome de fer.**

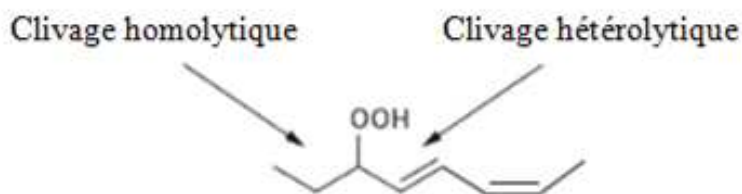
Le fer de l'hème est au centre de l'anneau de protoporphyrine, lié par les 4 atomes d'azote des noyaux pyrroles ainsi qu'au groupement OH d'une molécule d'eau et à l'anion thiolate d'un résidu de cystéine localisé à proximité de l'extrémité C-terminale de la protéine (Song et al., 1993 ; Matsui et al., 1996 ; Froelich et al., 2001). Ainsi, l'hème du site actif se trouve à l'intérieur de la protéine et n'est accessible que par un tunnel hydrophobe (Noordermeer et al. 2001).

## **2.4- Mode d'action**

### **2.4.1- Clivage homolytique et hétérolytique**

L'hydroperoxyde lyase est une enzyme qui clive les hydroperoxydes d'acides gras produits par action de la lipoxygénase sur les acides gras polyinsaturés. Les hydroperoxydes

d'acides gras doivent comporter un système diénique conjugué Z/E avec la double liaison adjacente au carbone portant la fonction hydroperoxyde (Noordermeer et al. 2001). L'HPL peut alors hydrolyser les hydroperoxydes de deux manières (Figure 9).



**Figure 9: Clivages homolytique et hétérolytique d'hydroperoxyde d'acide gras.**

Par clivage homolytique, l'HPL coupe la liaison entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et le carbone porteur de la liaison aliphatique. La réaction donne un alcool (ou un hydrocarbure) et un oxo-acide (Gardner et al., 1991). Ce type de clivage est généralement retrouvée chez les plantes inférieures comme les algues (Andrianarison et al., 1989) et les champignons (Wurzenberger et Grosch, 1984).

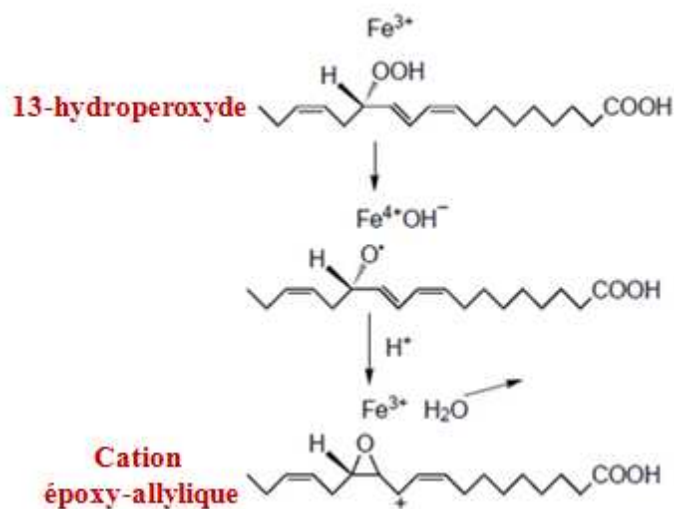
Chez les plantes supérieures, l'HPL transforme les hydroperoxydes par un clivage hétérolytique de la liaison située entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et le carbone impliqué dans la double liaison adjacente (Fauconnier et al., 1997 ; Gargouri et al., 2008) pour former un aldéhyde et un oxo-acide.

#### **2.4.2- Mécanisme réactionnel**

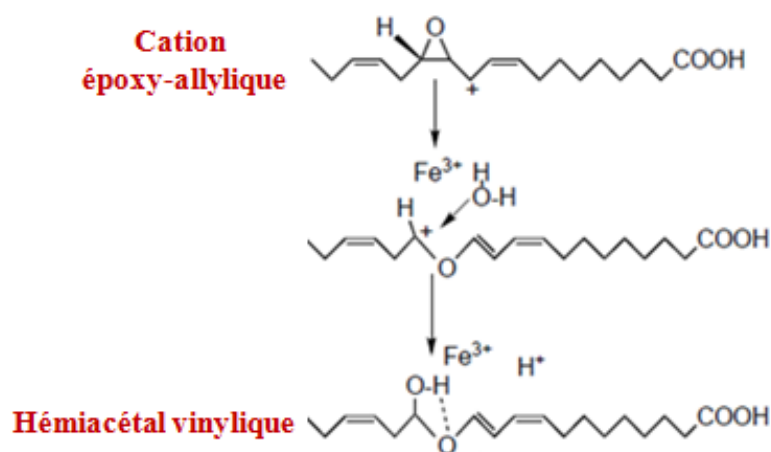
Noordermeer et al. (2001) ont proposé un mécanisme réactionnel de l'HPL se déroulant en trois étapes successives :



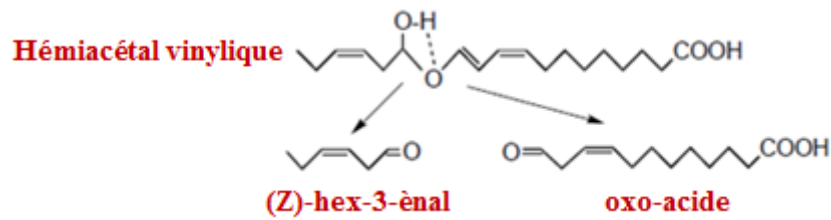
- La première étape consiste en la formation d'un complexe hydroxyde de fer par réarrangement à la suite du clivage de la liaison oxygène-oxygène de l'hydroperoxyde par l'enzyme. Ce complexe d'hydroxyde de fer ( $\text{Fe}^{4+}\text{OH}^-$ ) capte un proton ( $\text{H}^+$ ) en solution aqueuse, libérant une molécule d'eau. Ensuite un réarrangement électronique produit le cation époxy-allylique et entraîne la réduction de l'ion  $\text{Fe}^{4+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ .



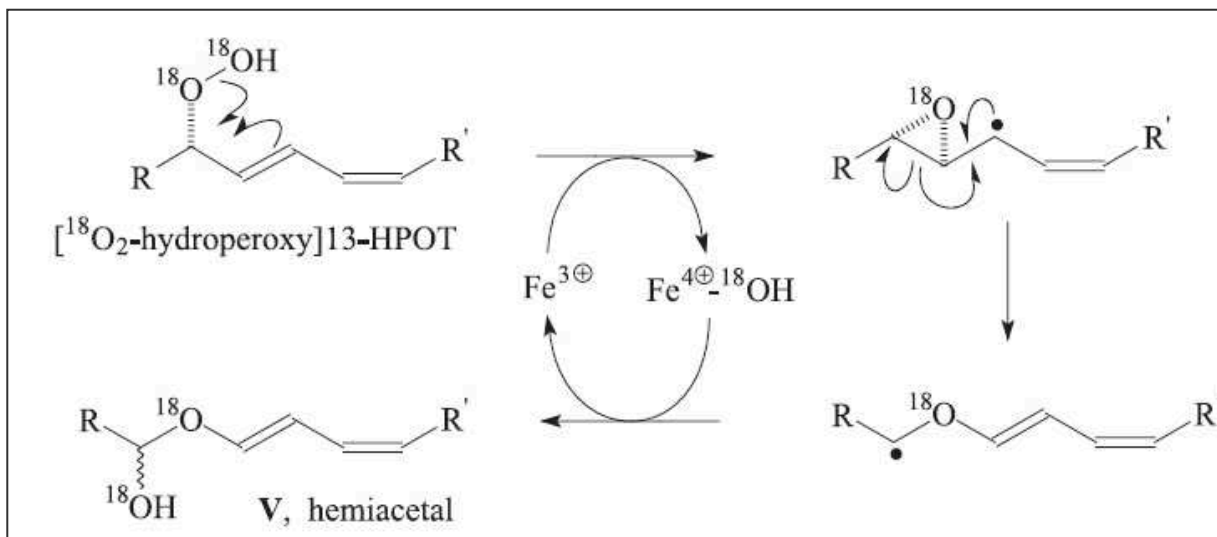
- Au cours de la seconde étape, le cation époxy-allylique subit l'attaque d'une molécule d'eau qui conduit à la formation d'un hémiacétal vinylique.



- Dans la dernière étape, l'hémiacétal vinylique est transformé en aldéhyde et en oxo-acide.



Cependant, des études réalisées par Grechkin et Hamberg (2004), avec de l'oxygène marqué [ $^{18}\text{O}_2$ ], ont remis en cause une partie de ce mécanisme (Figure 10).



**Figure 10: Mécanisme réactionnel de l'HPL décrit par Grechkin et Hamberg (2004).**

Grechkin et Hamberg (2004) ont montré que les deux atomes d'oxygène de l'hémiacétal vinylique proviennent de l'hydroperoxyde d'acide gras et non d'une molécule d'eau extérieure. D'autre part, ils ont montré que le véritable produit libéré du site actif de l'hydroperoxyde lyase serait l'hémiacétal vinylique qui se décomposerait spontanément pour former l'aldéhyde et l'oxo-acide.

### **2.4.3- Inhibition de l'HPL par son substrat**

L'HPL est inhibée irréversiblement par excès de substrat. Il s'agit d'une inhibition de type suicide qui est typique dans la famille des CYP74. Matsui et al. (1992) ont suggéré que les hydroperoxydes seraient reconnus spécifiquement par l'enzyme et seraient en partie transformés en espèces radicalaires qui vont détruire le groupement SH de la cystéine impliqué dans la liaison à l'hème situé dans le site réactionnel entraînant l'inhibition de l'enzyme.

### **2.5- Stabilité de l'HPL**

L'HPL n'est pas stable au cours du temps. Itoh et Vick (1999) ont observé que l'HPL de tournesol perd 50 % d'activité enzymatique après avoir été conservée 48 h à 4 °C. De même, l'HPL de tomate s'inactive après 24 h de stockage à 4 °C (Suurmeijer et al. 2000). D'autre part, l'enzyme supporte mal la congélation à -20°C (Long et al., 2010). Cependant, les détergents (Triton X-100, Tween 20), le glycérol (Salas et al., 2005 ; Long et al., 2010), le saccharose (Suurmeijer et al. 2000) ou le dithiothréitol (Hornostaj et al., 2000) peuvent être utilisés comme « cryoprotecteurs ». La lyophilisation est également utilisée comme moyen de conservation. La lyophilisation de l'HPL de menthe et de *Penicillium camemberti* en présence de KCl a permis de préserver l'activité enzymatique durant plusieurs semaines (Ben Akacha et al., 2010 ; Hall et al., 2008).

D'autre part, l'ajout de sels, de sucres ou de polyols serait un moyen efficace pour stabiliser l'enzyme et améliorer l'activité catalytique (Gianfreda et Scarfi, 1991 ; Koeduka et al., 2003). Koeduka et al., (2003) suggèrent que la présence de cations monovalents dans le milieu réactionnel, comme le KCl (2 M), le NaCl (1 M) ou le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M), permet d'augmenter l'activité spécifique de l'HPL d'orge recombinante purifiée. Ils constatent

notamment que la présence de KCl (2 M) augmente de plus de 5 fois l'activité de l'enzyme. Par ailleurs, la glycine semble être également un additif efficace qui augmente l'activité spécifique de l'HPL de feuilles de menthe de 2,5 fois par rapport à l'extrait enzymatique sans glycine (Ben Akacha et al., 2010). La présence de sels induirait un réarrangement spatial autour de l'hème dans le site actif de l'HPL (Koeduka et al., 2003).

## **2.6- Importance biologique de l'HPL**

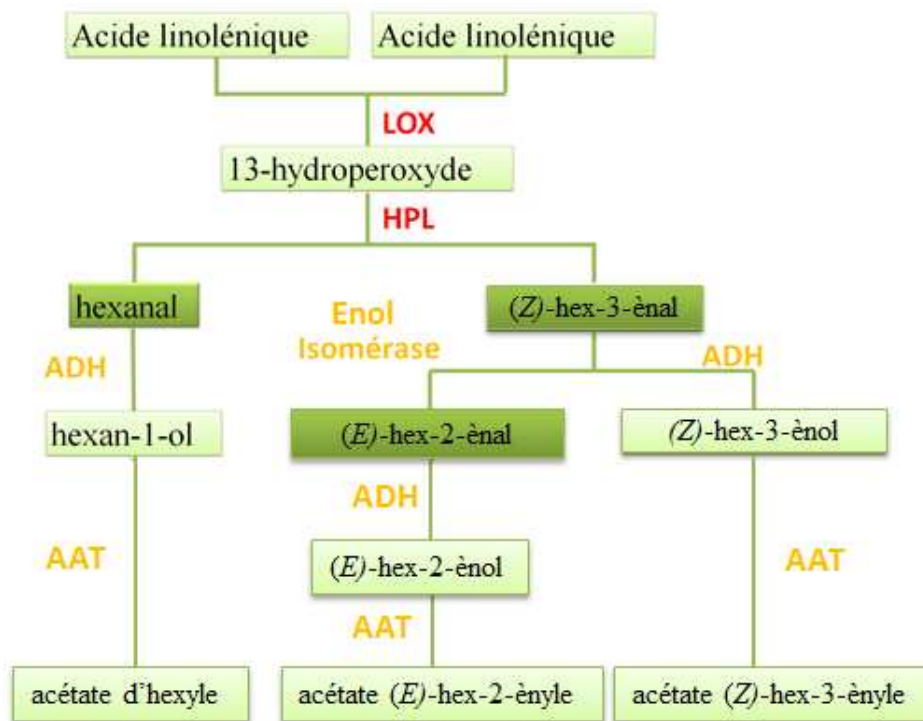
L'HPL est une enzyme indispensable pour le développement ainsi que pour le système de défense de la plante (Sekiya et al. 1983; Matsui et al. 1997). Cette importance biologique est liée aux aldéhydes et aux oxo-acides produits à la suite d'une blessure. L'acide 12-oxo-(Z)-dodéc-9-énoïque est un stimulateur de la croissance des plantes mais également le précurseur de l'acide traumatique, considéré comme une hormone de croissance qui amorce notamment la floraison de la plante (Grechkin et al., 1998). Les aldéhydes sont quant à eux impliqués dans des fonctions physiologiques différentes comme la signalisation et la défense de la plante.

## **3. Les composés volatils à note verte.**

### **3.1- Formation des composés volatils**

Les composés volatils sont principalement produits à partir d'acides gras polyinsaturés à 18 atomes de carbones (l'acide linoléique et l'acide linoléique) (Figure 11). Ces acides gras polyinsaturés sont d'abord libérés par l'action d'une lipase sur les galactolipides, les phospholipides mais également sur les mono- di- et triglycérides (Ishiguro et al., 2001). Les

lipoxygénases (LOX, EC 1.13.11.12) catalysent ensuite de façon régio- et stéréo-spécifique l'insertion de dioxygène (O<sub>2</sub>) sur le système bis-allylique 1,4-(Z,Z)-pentadiénique de l'acide gras polyinsaturé, pour générer l'hydroperoxyde diénique conjugué correspondant (Gardner, 1991 ; Fauconnier et Marlier, 1997). Selon l'atome de carbone de l'acide gras majoritairement oxygéné lors de la catalyse, il existe des LOX 13-spécifiques (13-LOX), des LOX 9-spécifiques (9-LOX) et des LOX à double spécificité (9/13-LOX et 13/9-LOX) générant un mélange de 9 et 13-hydroperoxydes (Gardner, 1991 ; Grechkin, 1998 ; Palmieri et al., 2009).



**Figure 11: Formation des composés volatils responsables de l'arôme au cours de la voie de la lipoxygénase (d'après Angerosa et al., (2004)).**

LOX : lipoxygénase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; ADH : alcool déshydrogénase ; AAT : alcool acétyl transférase.

Les composés à note verte sont ensuite formés par clivage des 13-hydroperoxydes par une 13-HPL pour donner un oxo-acide en C<sub>12</sub> et un aldéhyde en C<sub>6</sub>. La nature des aldéhydes varie en fonction du précurseur :

- La dégradation de l'acide linoléique par la 13-lipoxygénase puis par la 13-hydroperoxyde lyase conduit à la formation d'une molécule d'hexanal.
- La dégradation de l'acide linoléique par ces mêmes enzymes induit la formation de (Z)-hex-3-énal. Cette molécule, relativement instable, peut subir un réarrangement de son insaturation, soit spontanément soit par l'action enzymatique d'une isomérase, favorisant sa conversion en (E)-hex-2-énal plus stable (Gargouri et al., 2008).

Les aldéhydes peuvent ensuite être réduits en alcools par l'alcool-déshydrogénase (ADH), puis transformés en esters par l'alcool acétyl transférase (AAT). L'action de l'ADH sur l'hexanal, le (Z)-hex-3-énal et le (E)-hex-2-énal va entraîner la formation d'hexan-1-ol, de (Z)-hex-3-énol et de (E)-hex-2-énol respectivement. L'action de l'AAT sur ces molécules entraînera la synthèse des esters correspondants, l'acétate d'hexyle, l'acétate de (Z)-hex-3-ényle et l'acétate de (E)-hex-2-ényle. La plupart des alcools et des esters formés dans la voie métabolique de la LOX jouent également un rôle important dans la fragrance des fruits et des végétaux. L'acétate de (Z)-hex-3-ényle est, quant à lui, souvent retrouvé en grande quantité chez les plantes pour son rôle important dans le phénomène de signalisation entre végétaux (Frost et al., 2008). Néanmoins son pouvoir aromatisant est faible le rendant moins intéressant d'un point de vue industriel (Gigot 2011).

### **3.2- Rôles Physiologiques**

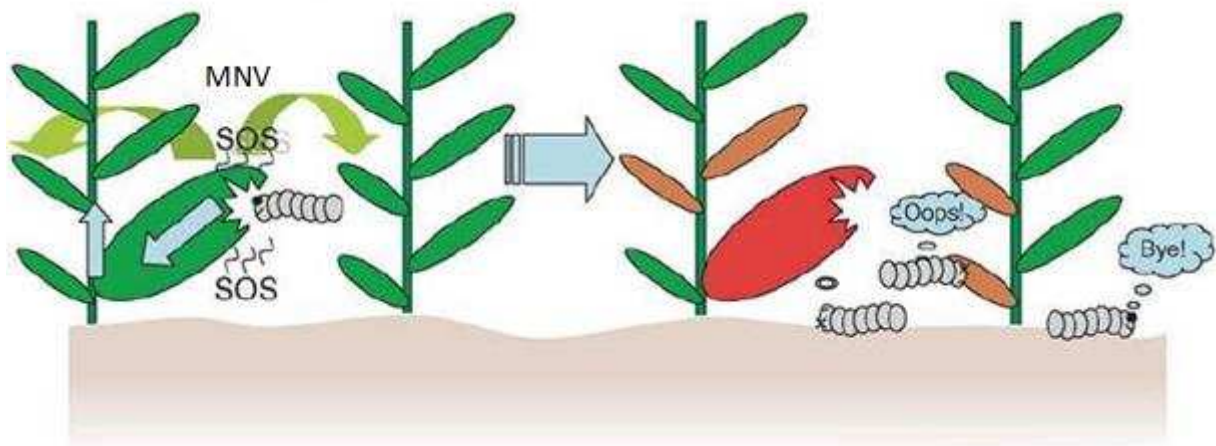
Les composés à note verte, synthétisés par la plante, remplissent deux fonctions physiologiques différentes : la signalisation et la défense. Libérés dans l'atmosphère par la plante à la suite d'une agression, ils sont reconnus par les microorganismes, les insectes, mais également les autres organismes végétaux proches et ils vont provoquer des réactions métaboliques ou comportementales spécifiques (Matsui et al., 2006).

### **3.2.1- Effet sur les microorganismes**

Les composés volatils à 6 atomes de carbones synthétisés naturellement par les végétaux, possèdent une importante activité antimicrobienne contre les bactéries (Inouye et al., 2001) et les champignons (Vaughn et al., 1993). Ce pouvoir bactéricide est dirigé à la fois contre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif, et est utilisé pour améliorer la conservation et la sécurité des aliments (Nakamura et Hatanaka, 2002 ; Lanciotti et al., 2004). Parmi les différents composés à note verte le (E)-hex-2-ène et le (Z)-hex-3-ène sont connus pour présenter une importante activité antimicrobienne (Croft et al., 1993 ; Kubo et al., 2004 ; Matsui et al., 2006). D'autre part, Croft et al. (1993) ont suggéré que la production rapide de grandes quantités de composés à note verte par certaines plantes à la suite d'une infection, serait létale pour les bactéries et qu'elle inhiberait la croissance des champignons.

### **3.2.2- Effet sur les insectes**

Les insectes sont capables de détecter les molécules à note verte produites par le végétal et seraient attirés par cette plante (Bruce et al., 2004) (Figure 12).



**Figure 12: Mécanisme de défense des plantes contre les herbivores (d'après Matsui et al., 2006).** MNV : Molécules à notes verte.

A la suite d'une attaque herbivore, les feuilles lésées activent la formation de composés volatils à note verte. L'émission d'une partie de ces composés va induire des réponses de défense chez la plante attaquée alors qu'une autre partie va s'étendre aux plantes voisines pour les prévenir et les protéger d'une éventuelle attaque. Certaines études montrent que la suppression de l'HPL dans les feuilles de tabac et chez les pommes de terre augmenterait l'invasion par les larves et les pucerons respectivement (Vancanneyt et al., 2001 ; Halitschke et al., 2004).

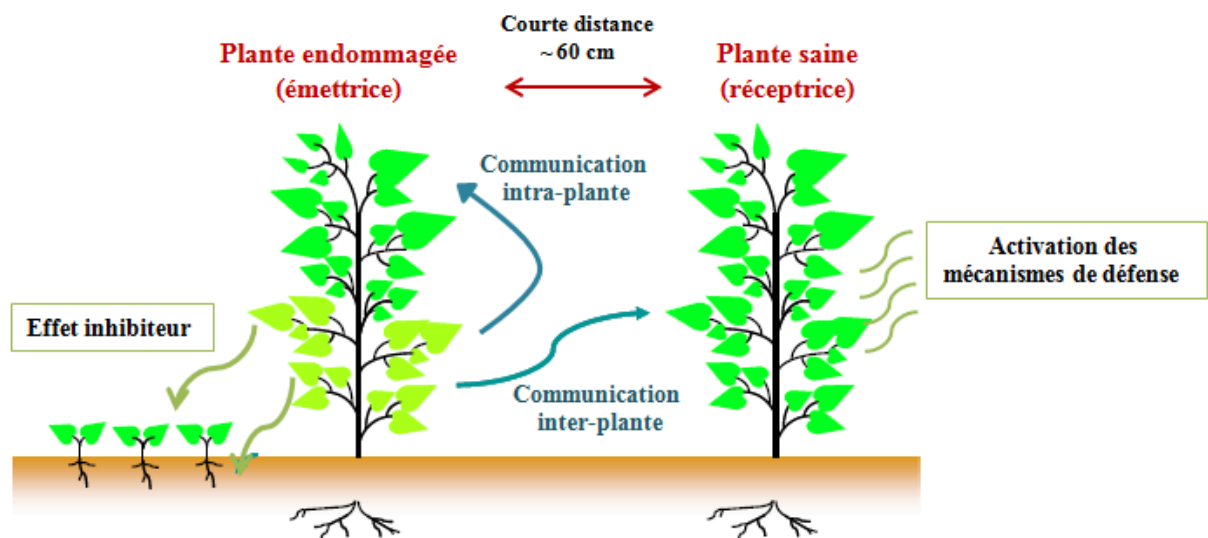
Les composés volatils peuvent également être impliqués dans des mécanismes de défense indirecte (Scala et al., 2013). Une fois attaquées par les insectes, les plantes vont synthétiser puis libérer ces composés dans l'atmosphère attirant les prédateurs naturels des herbivores dans le but de les chasser de la plante (Baldwin et al., 2002 ; Matsui et al., 2006).

### 3.2.3- Effet sur les plantes

Suite à un stress biotique ou abiotique, les composés volatils libérés dans l'atmosphère par les plantes vont agir comme des molécules signal qui permettent aux plantes de



communiquer entre elles. L'exposition des plantes à ces composés volatils va induire l'expression des gènes codant pour les enzymes de la voie de LOX (Arimura et al., 2000). Les plantes voisines seront alors capables d'activer leur système de défense afin de se protéger plus efficacement et plus rapidement lors d'une attaque par un agresseur (Ali et al., 2013). Les composés volatils émis par les feuilles infectées initient la communication intra-plante et inter-plante (Figure 13).



**Figure 13: Communication intra et inter-plante à la suite d'une attaque herbivore (d'après Arimura et al., 2010).**

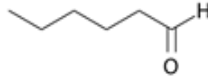
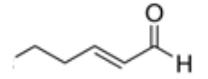
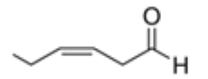


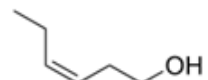
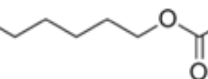
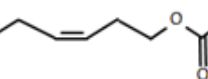
L'émission des composés volatils active d'une part les mécanismes de défense des feuilles non infectées de la plante réceptrice voisine et d'autre part inhibe la croissance et le développement des plantules à travers l'air et le sol (Arimura et al., 2010). C'est par exemple le cas pour *Citrus jambhiri* et *Arabidopsis thaliana*. Après un traitement préalable par des molécules à note verte, une amélioration de leur résistance contre les pathogènes fongiques, *Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea*, a été constatée (Gomi et al., 2003 ; Kishimoto et al., 2005). D'autre part, de faibles quantités de composés volatils sont suffisantes pour induire une réponse au sein de la plante la plus proche. La présence de récepteurs spécifiques facilite le

phénomène d'adsorption à travers la cuticule des feuilles ou les cellules membranaires (Baldwin et al., 2002 ; Matsui et al., 2006).

### **3.3- Rôle dans l'arôme**

Chez les végétaux supérieurs, les aldéhydes produits par l'HPL ainsi que leurs alcools et esters correspondants produits respectivement par l'ADH et l'AAT, sont responsables de l'arôme de nombreux fruits et légumes (Hatanaka et al., 1986 ; Gargouri et al., 2008) (Tableau 1). La composition du fruit en composés volatils est directement liée à l'activité de ces enzymes. Leur expression varie en fonction du stade de maturation du fruit, de la variété et du climat (Riley et al., 1996 ; Campeol et al. 2003, Angerosa et al. 2004, Leone et al., 2006).

**Tableau 1: Flaveurs attribuées aux différents composés volatils à six atomes de carbone formés par la voie de la lipoxygénase (d'après Gargouri et al., 2008).**

FONCTIONS	NOM DU COMPOSE	STRUCTURES	FLAVEURS
ALDEHYDES	Hexanal		Odeur grasse, verte, fruitée
	( <i>E</i> )-hex-2-ènal		Feuille verte, fruitée
	( <i>Z</i> )-hex-3-ènal		Feuilles vertes, pomme verte, herbe coupée
ALCOOLS	Hexanol		Odeur verte, huileuse
	( <i>E</i> )-hex-2-ènol		Vert tranchant, fruité
	( <i>Z</i> )-hex-3-ènol		Odeur verte, herbe fraîche
ESTERS	Acétate d'hexyle		Fruité, floral
	Acétate de ( <i>Z</i> )-hex-3-ènyle		Banane verte, feuilles vertes, floral

Composés formés à partir de l'acide linoléique
  Composés formés à partir de l'acide linoléinique

Les molécules impliquées dans la note verte fraîche sont l'hexanal, le (*Z*)-hex-3-ènal, le (*E*)-hex-2-ènal et le (*Z*)-hex-3-ènol. La plupart d'entre eux sont produits par synthèse chimique ou sont extraits à partir d'une source végétale.

#### 4. Production des molécules à note verte

Actuellement, du fait des coûts élevés des arômes naturels (entre 750 et 1000 dollars US/litre), les industries ont développé des méthodes de production de composés aromatisants

artificiels (Gigot, 2011). Ces composés représentent à eux seuls environ 50 % du marché actuel ce qui correspond environ à 500 tonnes de produits (Gigot, 2011). Cependant une méfiance des consommateurs vis-à-vis des produits chimiques et synthétiques est observée et ces derniers sont de plus en plus attirés par des composés d'origine « naturelle » (Gargouri et al., 2008 ; Gigot et al., 2010). La naturalité des arômes est soumise à de nombreuses réglementations, notamment le règlement Européen 1334/2008 qui est en vigueur depuis janvier 2011 et qui définit les appellations des arômes naturels : « une "substance aromatisante naturelle" est obtenue par des procédés physiques, enzymatiques ou microbiologiques appropriés, à partir de matières d'origine végétale, animale ou microbologique prises en l'état ou après leur transformation pour la consommation humaine par un ou plusieurs des procédés traditionnels de préparation des denrées alimentaires. Les substances aromatisantes naturelles correspondent aux substances qui sont naturellement présentes et ont été identifiées dans la nature ». Les composés produits par des procédés biotechnologiques répondent à cette définition et peuvent donc bénéficier de l'appellation « substances aromatisantes naturelles ».

En 2008, le marché mondial des composés à note verte a été estimé à 30 millions de dollars US dont 18 millions pour les composés à note verte bénéficiant de l'appellation « arômes naturels » (Schwab et al. 2008). Ces composés font donc l'objet d'une production industrielle qui peut être réalisée de plusieurs manières : production par synthèse chimique, production utilisant des procédés physiques ou des procédés biocatalytiques.

#### **4.1-Synthèse chimique**

La synthèse chimique reste encore aujourd'hui le moyen de production le plus utilisé. Ce procédé permet la production de grandes quantités de molécules (plusieurs centaines de tonnes par an) pures à 95%, que l'on appelle « identiques au naturel » et dont le prix de vente

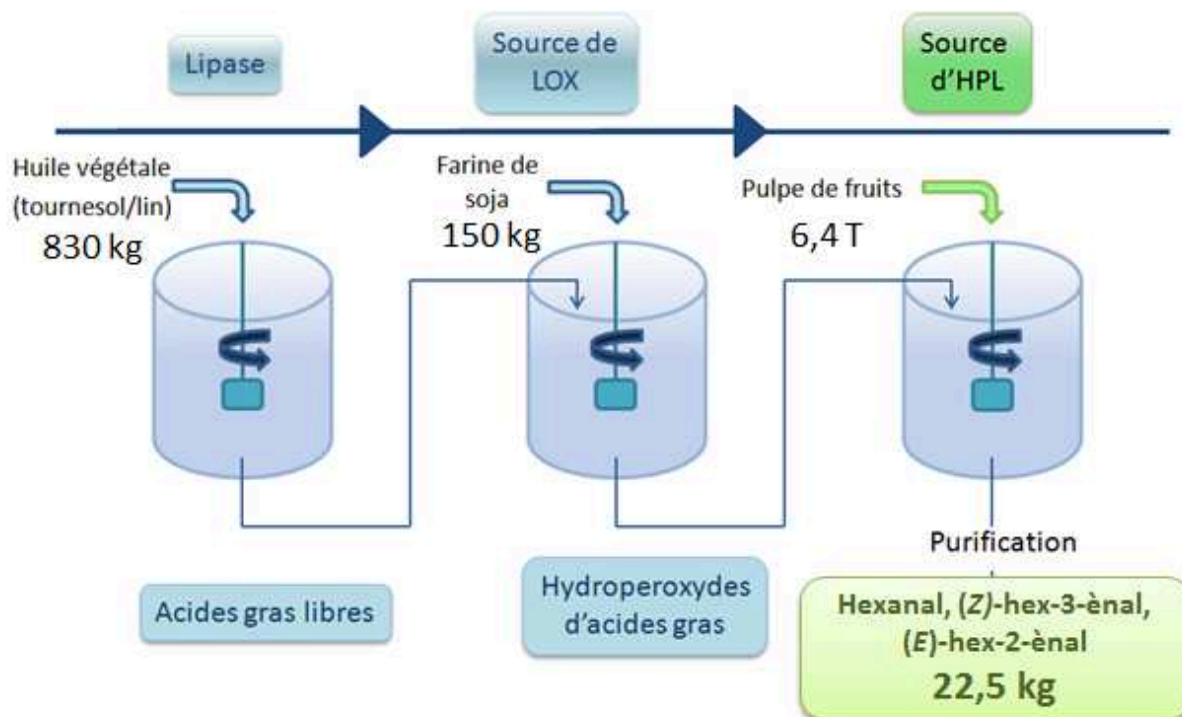
est estimé à 40 dollars US le litre (Gigot, 2011). Ce mode de production présente tout de même des inconvénients. Il nécessite l'utilisation de produits dérivant de la chimie du pétrole mais également de métaux lourds qui vont intervenir comme catalyseurs dans la réaction chimique (Gigot, 2011). Leur utilisation va rendre la méthode très polluante et les molécules produites ne pourront donc pas bénéficier d'un label « naturel ».

#### **4.2- Procédés physiques**

Les molécules d'intérêt peuvent être obtenues de manière naturelle, par extraction (extraction par solvant ou macération) à partir de matériel végétal brut. Cependant leur quantité dans la biomasse est trop faible pour permettre leur extraction à partir de celle-ci. Cette méthode va nécessiter plusieurs tonnes de matériel végétal pour n'obtenir que quelques litres d'extraits dans lesquels les composés volatils à note verte ne représenteront qu'un faible pourcentage de la composition totale. Ce procédé va générer une grande quantité de déchets, ce qui se traduira par un coût de production élevé.

#### **4.3- Procédés biocatalytiques**

Afin de répondre à la forte demande en molécules à note verte naturelles, des voies de production alternatives ont été développées. Il s'agit de procédés biotechnologiques basés sur l'utilisation des enzymes de la voie de la lipoxygénase pour produire les composés volatils désirés à partir de précurseurs lipidiques. Ces procédés permettent la bioconversion de grandes quantités d'huile végétale en molécules à note verte grâce à l'utilisation d'extraits végétaux comme source d'enzyme. Ainsi, l'utilisation de la catalyse enzymatique avec des substrats d'origine naturelle permet aux produits obtenus de bénéficier de l'appellation « molécules aromatisantes naturelles ». D'une manière générale, la synthèse biotechnologique reproduit *in vitro* la voie de la LOX qui va se dérouler en trois étapes successives (Figure 14).



**Figure 14: Procédé de production biocatalytique de composés à note verte (d'après Gigot, 2011).**

Les huiles végétales (lin ou de tournesol) sont utilisées dans la bio-production des molécules volatiles (Gargouri et al., 2008 ; Gigot, 2011) car elles sont enrichies en acides linoléique et/ou linoléique. Dans des conditions optimisées, des lipases commerciales (*Candida rugosa*) sont ajoutées à l'émulsion d'huile pour libérer les acides gras polyinsaturés. Puis des farines de soja riches en lipoxygénases sont ajoutées au mélange. Les lipoxygénases de soja vont transformer les acides gras libres en hydroperoxydes d'acide gras. Enfin, un extrait végétal brut riche en HPL, tel que des extraits de feuilles ou de pulpes de fruits broyées, est ajouté au mélange pour produire les composés volatils. Németh et al. (2004) ont produit 1,6 mM du (E)-hex-2-èneal et 5,9 mM du (Z)-hex-3-èneal en utilisant un extrait HPL de poivron vert ( $1,2 \text{ U.mL}^{-1}$ ) et 20 mM de 13-HPOT, ce qui correspond à un rendement de 37 %. Dans l'exemple de la figure 14, 6,4 tonnes de feuilles de betterave sont nécessaires pour produire 22,5 kg d'aldéhydes (hexanal, (Z)-hex-3-èneal et (E)-hex-2-èneal) (Gigot, 2011).

Cependant, les matières premières végétales (farines et extraits) contiennent des LOX et/ou HPL de différentes spécificités ainsi que diverses enzymes agissant sur les mêmes substrats (acides gras et hydroperoxydes d'acides gras), ce qui va d'une part générer des produits secondaires non désirés et, d'autre part, contribuer à diminuer le rendement de production en composés à note verte. De plus ce procédé utilise d'importantes quantités de matières premières végétales (Figure 14), ce qui va générer d'importantes quantités de déchets qu'il faudra ensuite traiter. Par ailleurs, l'approvisionnement en matières végétales est tributaire d'aléas environnementaux et techniques. De ce fait, les procédés utilisant des farines et des extraits végétaux comme source d'enzyme (LOX et HPL) ne sont pas forcément les mieux adaptés en terme de rendement de production de composés à note verte.

#### **4.4- Développement de nouveaux procédés pour la production de molécules à note verte.**

Pour améliorer la production de composés à note verte, de nouvelles stratégies utilisant des enzymes à la place de matières premières végétales ont été développées. Bien souvent des lipases commerciales ainsi que des LOX de soja commerciales sont utilisées. Cependant, à ce jour, il n'existe aucune HPL commerciale et de nombreuses études se sont dirigées vers la production d'HPL (Noordermeer et al., 2002 ; Gargouri et al., 2004 ; Gigot et al., 2012).

L'une des stratégies mise au point vise à utiliser des enzymes recombinantes. Cette méthode de production de protéines facilite la purification et permet d'obtenir des quantités de protéines recombinantes bien plus grandes que si elles avaient été purifiées à partir du matériel biologique d'origine. Plusieurs auteurs ont cloné l'HPL dans des systèmes d'expression bactérien (*E.coli*) (Matsui et al., 2000 ; Noordermeer et al., 2002 ; Mu et al., 2012 ; Zhu et al., 2012) ou chez la levure (*Pichia pastoris*, *Yarrowia Lipolitica*,

*Saccharomyces cerevisiae*) (Atwal et al., 2005 ; Bourel et al., 2004 ; Santiago-Gomez et al., 2009 ; Whitehead et al., 2001 ; Hauml et al., 2001). Noordermeer et al. (2002) ont cloné et exprimé la 13-HPL de luzerne chez *E.coli* et ont décrit un procédé de bioproduction d'aldéhydes en C6. La biotransformation des 13-HPOD et des 13-HPOT par l'action de la 13-HPL recombinante de luzerne a permis d'obtenir des taux de conversion de 50 % et 26 % respectivement. D'autre part l'expression de l'HPL chez *Yarrowia Lipolitica* (Bourel et al., 2004) a également été étudiée pour la production d'aldéhydes en C6. Bien que les rendements obtenus soient inférieurs à ceux reportés par Noordermeer et al. (2002), l'action de l'HPL exprimée chez les levures a tout de même permis de produire de l'hexanal et de (E)-hex-2-ène à des taux de conversion de 6,22 % et 1 % respectivement. Une autre stratégie (Huang et al., 2010) consiste à utiliser des vecteurs viraux possédant les gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans la voie de synthèse des composés à note verte. En effet, des vecteurs viraux contenant les gènes d'expression de la 13-LOX de soja et de la 13-HPL de pastèque ont été utilisés pour surexprimer ces gènes chez *Nicotiana benthamiana*. Cette méthode a permis de produire des quantités importantes d'hexanal (17 mg) en 30 minutes de réaction à partir de 50 mg d'acide linoléique ce qui correspond à un taux de conversion de 34 %. D'autres procédés utilisant une HPL immobilisée ont été mis au point par Liu et al. (2013). Ils ont montré que l'utilisation d'HPL immobilisée permet d'obtenir des taux de conversion de 56 % et 35 % pour l'hexanal et le (E)-hex-2-ène respectivement. L'HPL immobilisée permet de produire autant d'hexanal et de (E)-hex-2-ène que l'enzyme libre mais la quantité d'enzyme nécessaire à la réaction est diminuée de 66 %.

La production de composés volatils à note verte par un procédé biotechnologique représente donc une alternative séduisante qui mérite d'être explorée.



## 5. But du travail

Le laboratoire s'est intéressé à la production de molécules à note verte par l'utilisation des enzymes recombinantes dans le cadre d'un projet européen du 7<sup>ème</sup> PCRD : Eurotransbio BioSF « Biocatalyzed Synthesis of Fragrances » (ETB 2009-94). L'ADNc codant pour une HPL, appelée HPLwt, a donc été cloné à partir d'olives au stade noir (*Olea europaea* L., variété Leccino) et les conditions d'expression de l'enzyme chez *E.coli* ont été mises au point. Afin d'améliorer la solubilité de l'enzyme, la séquence d'adressage de l'HPL à la membrane des chloroplastes a été supprimée et l'enzyme dépourvue de ce peptide de transit a été désignée par HPLdel.

Pour utiliser une 13-HPL recombinante dans des procédés biocatalytiques de production d'aldéhydes en C6, nous avons dans un premier temps mis au point la méthode de purification des HPL recombinantes d'olive. Les propriétés biochimiques (pH, température, paramètres cinétiques) des deux enzymes ont également été déterminées et comparés. L'HPLwt et l'HPLdel ont ensuite été utilisées dans des procédés biocatalytiques pour lesquels nous avons optimisé les conditions de biotransformation du 13-HPOD et du 13-HPOT en hexanal et (Z)-hex-3-ènal respectivement, à l'échelle du laboratoire.

L'HPL étant une enzyme peu stable, nous avons recherché des alternatives susceptibles de préserver et d'améliorer l'activité enzymatique des HPL recombinantes purifiées. Différents modes de conservation ont été testés (la lyophilisation en absence ou en présence de lyoprotecteur, et la réfrigération en absence ou en présence de « cryoprotecteur ») puis l'influence de composés chimiques (KCl, NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glycérol, glycine) sur l'activité des enzymes a été évalué. Nous avons également testé l'effet de la présence dans le milieu réactionnel des composés chimiques sur la production d'aldéhydes en C6 (hexanal et (Z)-hex-3-ènal).

# **Matériels et Méthodes**

## **1. Matériel végétal**

L'étude a été réalisée sur des olives de la variété Leccino récoltées au stade noir (20 semaines après floraison) dans le verger de l'INRA-CIRAD de San Giuliano. Les olives ont été lavées à l'eau stérile, dénoyautées et broyées dans de l'azote liquide. La poudre obtenue a été stockée à -80°C jusqu'à son utilisation.

## **2. Clonage de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive**

### **2.1- Amplification de l'ADNc par RT-PCR**

Les ARN totaux ont été extraits selon le protocole décrit par Hernández et al. (2005). La transcription inverse a été réalisée à partir de 5 µg d'ARN totaux extraits d'olives Leccino au stade noir, d'un oligo(dT)<sub>18</sub>, et de la PowerScript reverse Transcriptase (Clontech) selon les instructions du fabricant.

Le premier brin des ADNc a été utilisé dans une réaction d'amplification d'ADN par PCR avec des oligonucléotides dégénérés (HPL 13-2: 5'-ggnttyaaycpgntwyggngg et HPL 13-3: 5'-gytncpgncpgrcaytgyttrtt), choisis à partir de séquences protéiques conservées de diverses HPL végétales. Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes : 94°C 5 min, 56°C 1 min, 72°C 40 s (1 cycle); 94°C 30 s, 53°C 1min, 72°C 40 s (15 cycles); 94°C 30 s, 50°C 1 min, 72°C 40 s (30 cycles), 72°C 7 min (1 cycle).

L'extrémité 3' a été amplifiée à partir des produits de la transcription inverse en utilisant un oligo(dT)<sub>18</sub>V et un oligonucléotide spécifique (HPL b: 5'gttcpgtgaattatctatact) déterminé à partir des séquences des clones obtenus précédemment. Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes : 94°C 5 min, 52°C 2 min, 72°C 3 min (1 cycle); 94°C 30 s, 49°C 30 s,

72°C 1 min (15 cycles), 94°C 30 s, 46°C 30 s, 72°C 1 min (15 cycles), 94°C 30 s, 42°C 30 s, 72°C 1 min (15 cycles), 72°C 7 min (1 cycle).

## **2.2- Amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc par RACE-PCR**

Le kit "3'/5' RACE 2<sup>nd</sup> generation" de Roche a été utilisé pour synthétiser le premier brin des ADNc à partir de 2 µg d'ARN totaux extraits d'olives Leccino récoltées au stade noir avec l'oligonucléotide spécifique HPLd: 5'-cgtagaccacagagaacpgtcagg en suivant les instructions du fabricant. Le premier brin des ADNc ainsi obtenu a été modifié par l'ajout à l'extrémité 3' de résidus dA. 5 µL du premier brin des ADNc allongé par la queue poly(dA) ont été utilisés comme matrice dans une réaction de PCR réalisée avec l'oligonucléotide spécifique HPLe: 5'-ttctacpgtcggcpggaattcpgc et l'oligonucléotide "oligo(dT)-anchor" fourni par le kit. Les conditions d'amplification par PCR sont les suivantes: 94°C 5 min, 43°C 2 min, 72°C 2 min (1 cycle); 94°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 40 s (10 cycles); 94°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 1 min (25 cycles); 72°C 7 min (1 cycle). 1 µL de ce premier produit d'amplification a servi de matrice pour une seconde réaction de PCR avec l'oligonucléotide spécifique HPLf: 5'-atccccgatcgtactcaagag et l'oligonucléotide « anchor » fourni par le kit. Les conditions de PCR sont les suivantes : 94°C 3 min (1 cycle); 94°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 2 min (35 cycles); 72°C 7 min (1 cycle). La procédure de la RACE PCR a été répétée deux fois avec les oligonucléotides spécifiques HPLg: 5'-accaccaaactcpgattgaatcc, HPLh: 5' attcpgttctgttcagtcag et HPLi: 5'-tgacpgtctttgtataacttcttcpgc, puis, avec HPLj: 5'ttgcpgaacgtcacpggtca, HPLk: 5'-atthtgtcccacatggag and HPLl: 5'-agtgaacttatgagtgcggtacca sous les mêmes conditions de PCR afin d'obtenir l'extrémité 5' de l'ADNc de l'HPL d'olive.

### **2.3- Clonage des produits d'amplification**

Les produits de RT-PCR et RACE-PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium, purifiés à l'aide du kit «GFX Gel Band purification» (GE Healthcare Life Sciences) et clonés dans le vecteur pCR2.1 TOPO (Invitrogen). Le séquençage a été réalisé par MWG Biotech (Allemagne).

### **2.4- Clonage de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive pour l'expression chez E.coli**

#### **2.4.1- Clonage dans le vecteur pMOS-Blue**

L'ADNc complet de l'HPL d'olive a été obtenu par RT-PCR à l'aide des oligonucléotides spécifiques Hplsens : 5'-aaaatgacgggttcpcgctcc et Hplantisens : 5'-tctcacttgacttctcaactg déduits à partir de la séquence de l'ADNc. L'amplification par PCR a été réalisée avec 1,25 unités de Pfu DNA polymérase (Promega) dans 50 µL de mélange réactionnel final contenant 1 µg d'ADNc et 1 µM de chacun des oligonucléotides. L'amplification a été réalisée en utilisant les conditions suivantes : 95°C 30s, 50°C 2 min, 72°C 4 min (1 cycle) ; 95°C 30s, 55°C 2 min, 72°C 4 min (30 cycles) 72°C 10 min (1 cycle). Le produit de PCR a été purifié et cloné dans le vecteur pMOS-Blue blunt-ended (GE Healthcare Life Sciences). L'insert du clone résultant appelé pMOS-HPL a été séquencé.

#### **2.4.2- Clonage dans le vecteur d'expression pQE30**

Une réaction PCR utilisant le pMOS-HPL comme matrice a été effectuée pour cloner les ADNc codant pour l'HPLwt (type sauvage) et l'HPLdel (sans le peptide de transit) dans le vecteur d'expression pQE-30 (Qiagen) qui permet l'insertion de six résidus histidine à

l'extrémité N-terminale de la protéine recombinante. Cette amplification a été réalisée à l'aide des oligonucléotides SphIHPLsens : 5'-acatcatcpgacgggtccpgcctccgt ou SphIHPLsens2 : 5'-acatcpgatcpgtctctcpgccctccpgcpgcatt et XmaIHPLantisens: 5'-tccccgggtcacttgacttctcaactg. Ces oligonucléotides contiennent les sites de restriction SphI et XmaI, ce qui permet d'introduire le site SphI en amont du codon d'initiation ATG et le site XmaI en aval du codon stop. La PCR réalisée avec l'oligonucléotide sens SphIHPLsens2 permet d'obtenir l'ADNc codant pour l'HPLdel qui correspond à l'HPL délétée de 21 acides aminés constituant le peptide de transit situé à l'extrémité N-terminale de la protéine. Après traitement par les enzymes SphI et XmaI, les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pQE-30 traité avec les mêmes enzymes. Les vecteurs recombinants (pQE30-HPLwt and pQE30-HPLdel) ont été séquencés et utilisés pour transformer les bactéries E. coli M15.

### **3. Expression de l'HPL recombinante d'olive chez E.coli**

Environ 400 mL de milieu TB (12 g.L<sup>-1</sup> de tryptone, 24 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 0,4 % glycérol, 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline, 25 µg.mL<sup>-1</sup> de kanamycine) ont étéensemencés par 24 mL d'une préculture d'E. coli (M15) transformée avec le plasmide pQE30-HPLwt ou pQE30-HPLdel (contenant l'ADNc codant pour l'HPL d'olive) puis incubés à 37°C jusqu'à atteindre une absorbance de 0,6 mesurée à 600 nm. La culture est incubée 48 heures à 15°C après ajout d'IPTG (0,5 mM) et d'acide δ-aminolevulinique (2,5 mM) puis centrifugée durant 30 minutes à 7000 g à 4°C. Le culot obtenu est remis en suspension dans 20 mL de tampon de lyse (50 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7 contenant 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> de lysozyme, 500 mM de NaCl et 0,1% de Triton X-100), puis conservé au moins une nuit à -80°C. Après décongélation, la lyse est poursuivie par l'ajout de 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> de DNaseI, 50 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1 mM de benzamidine, 1 mM PMSF et 1 % d'emulfoène. Après une incubation de 30 min sous agitation à 4°C suivie

d'une centrifugation à 12000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant de lyse (20 mL) est recueilli et le culot de lyse est remis en suspension dans 20 mL de tampon PBS (tampon phosphate à pH 7,3, contenant 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM de NaCl et 2,7 mM de KCl).

#### **4. Mesure des activités enzymatiques de l'HPL recombinante**

La mesure de l'activité enzymatique de l'hydroperoxyde lyase (HPL) nécessite la synthèse du substrat de l'enzyme (l'hydroperoxyde d'acide linoléique ou HPOD et l'hydroperoxyde d'acide linoléique ou HPOT) qui n'est pas disponible dans le commerce.

Le 13-HPOD et le 13-HPOT ont été synthétisés selon le protocole expérimental décrit par Vick en 1991 et adapté par Fauconnier (communication personnelle). Le mélange réactionnel (volume final de 30 mL) contient 70 mM de tampon borate de sodium à pH 9 en présence de 6,35 mM d'acide linoléique ou d'acide linoléique, 11 mM de NaOH et 30 unités de lipoxigénase de soja commerciale (SIGMA). La réaction, qui débute par addition de l'acide linoléique ou de l'acide linoléique se déroule pendant 30 min à 4°C sous oxygénation légère et est arrêtée par acidification (pH 3) par l'ajout d'acide chlorhydrique 1 M. Le mélange réactionnel est extrait à l'éther et le produit obtenu après évaporation du solvant est repris dans du méthanol.

La synthèse des hydroperoxydes est contrôlée par chromatographie sur couche mince dans le solvant heptane/éther diéthylique/acide acétique (55/45/1) et révélée par vaporisation du mélange acétate de cuivre saturé/acide phosphorique 80 %. La quantité d'hydroperoxyde formé est déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 234 nm et en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 25000 cm<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>.

Le principe de la méthode pour déterminer l'activité de l'HPL consiste à mesurer le clivage des hydroperoxydes en aldéhydes et en oxo-acides. Le mélange réactionnel (volume

final 1 mL) qui est incubé à température ambiante, contient 43  $\mu\text{M}$  d'hydroperoxydes, 50 mM de tampon phosphate à pH 7 et 10  $\mu\text{L}$  de l'extrait protéique. La réaction démarre par addition de 13-HPOD ou de 13-HPOT et est suivie par la variation de l'absorbance à 234 nm en fonction du temps, et est calculée en prenant pour coefficient d'extinction molaire de l'hydroperoxyde la valeur de  $25000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , correspondant aux diènes conjugués (Pérez et al., 1999). Une unité d'activité hydroperoxyde lyase est la quantité d'enzyme qui catalyse le clivage d'une micromole d'hydroperoxyde par minute.

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide des équations de Michaelis-Menten en utilisant des concentrations comprises entre 7  $\mu\text{M}$  et 114  $\mu\text{M}$  de 13-HPOD et 16  $\mu\text{M}$  et 134  $\mu\text{M}$  de 13-HPOT pour l'HPLwt, et 7  $\mu\text{M}$  et 121  $\mu\text{M}$  de 13-HPOD et 8  $\mu\text{M}$  et 175  $\mu\text{M}$  de 13-HPOT pour l'HPLdel.

## **5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et immunoempreinte**

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS puis colorées au bleu de Coomassie (EZ Blue™ Gel Staining Reagent, Sigma) ou transférées sur membrane de nitrocellulose (Bio-rad). Les membranes sont saturées 30 min dans une solution de PBS contenant 5 % de lait écrémé ; puis sont incubées avec un anticorps anti-poly-histidine conjugué à la peroxidase (Sigma) dilué au 1/4000ème. La peroxidase est révélée en présence de 1,3 mM de 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Sigma) dans un tampon PBS contenant 0,01 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



## 6. Détermination de la concentration en protéines

La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (1976). La courbe étalon est réalisée avec une solution d'albumine sérique bovine à 2 mg.mL<sup>-1</sup>. La concentration de la solution d'HPL pure a été déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm et en prenant pour coefficient d'extinction molaire la valeur de 64960 cm<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>.

## 7. Effets de composés chimiques sur l'activité de l'HPLwt et l'HPLdel

L'influence de divers composés chimiques (KCl, NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glycine et glycérol) sur l'activité des deux enzymes a été évaluée. Différents milieux à concentrations de 0 à 2 M pour le KCl, le NaCl et le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de 0 à 20 % (w/v) pour la glycine et le glycérol dans 50 mM de phosphate à pH 7,5, ont été utilisés pour les mesures des activités enzymatiques. L'influence de la concentration de chaque composé sur l'activité des deux HPL a été quantifiée grâce à une analyse de variance. Cette dernière a été réalisée selon un modèle en randomisation totale à un facteur à l'aide du logiciel Statgraphics. Les moyennes de trois déterminations de l'activité spécifique pour chacun des paramètres ont été comparées à l'aide du test de Newman-Keuls.

Les cinétiques d'inactivation des activités des deux enzymes ont été déterminées à 25°C en présence de glycine 2,5 % (w/v) ou de NaCl 0,5 M pour l'HPLwt et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M ou de NaCl 1 M pour l'HPLdel à différents temps réactionnels (0; 5; 10 et 15 min). Les taux d'inactivation ont été estimés en calculant la constante d'inactivation de premier ordre ( $K_{\text{inactivation}}$ ). La constante d'inactivation ( $K_{\text{inactivation}}$ ) est calculée selon la formule :

$$\ln (A/A_0) = - K_{\text{inactivation}} / t \text{ (min)},$$

où  $A_0$  et  $A$  représentent l'activité spécifique de l'HPL ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) respectivement à  $t_0$  et à 5, 10 ou 15 minutes. Le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) est le temps au bout duquel l'enzyme perd la moitié de son activité enzymatique;

$$t_{1/2} = \ln(2) / K_{\text{inactivation}}$$

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide des équations de Michaelis-Menten :

- en présence de 2,5 % (w/v) de glycine pour l'HPLwt, en utilisant des concentrations comprises entre 11  $\mu\text{M}$  et 104  $\mu\text{M}$  de 13-HPOD et 8  $\mu\text{M}$  et 124  $\mu\text{M}$  de 13-HPOT

- en présence de 0,25 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pour l'HPLdel en utilisant des concentrations comprises entre 7  $\mu\text{M}$  et 89  $\mu\text{M}$  de 13-HPOD et 8  $\mu\text{M}$  et 252  $\mu\text{M}$  de 13-HPOT

## **8. Synthèse et analyse des produits de l'hydroperoxyde lyase**

Les composés volatils, l'hexanal et le (Z)-hex-3-ène, sont formés à partir du 13-HPOD et du 13-HPOT obtenus par l'action de la LOX de soja sur l'acide linoléique et l'acide linoléique comme décrit précédemment. L'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOD et le 13-HPOT a été évaluée en utilisant différentes concentrations en enzyme (0,25 ; 0,5 et 1  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et en substrat (2 ; 4 et 6 mM). La réaction a été réalisée dans 5 mL de tampon phosphate 50 mM à pH 7,5 incubé à 25 °C contenant le substrat à la concentration voulue. La réaction démarre par l'ajout de l'enzyme. Le mélange réactionnel est alors distribué dans des tubes sertis (volume final de 1 mL) et les réactions sont stoppées à différents temps (1; 5; 10; 15; 20 min) par acidification à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique 5 M. Les aldéhydes produits sont extraits par 3 x 200  $\mu\text{L}$  de dichlorométhane. Ils sont ensuite identifiés par CPG-SM et quantifiés par CPG-DIF en collaboration avec le laboratoire de chimie des produits naturels (UMR 6134 SPE).

Les analyses en CPG ont été réalisées en utilisant un appareil Clarus 600 CPG (Perkin Elmer) équipé d'un injecteur, d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF) et une colonne capillaire (60 m x 0,22 mm, diamètre interne 0,25  $\mu$ m) Rtx-Wax (polyéthylène glycol).

La température du four est programmée pour aller de 60 à 100 °C à 2°C/min et la durée d'analyse est de 20 min. L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 0,7 mL/min. La température de l'injecteur et du détecteur est de 280°C. Les injections sont faites en mode split avec un ratio de 1/80. Le passeur automatique a été utilisé pour injecter des volumes de 3,5  $\mu$ L.

L'identification des composés a été réalisée par CPG-SM en utilisant un AutoSystem XL (Perkin Elmer) couplé à un détecteur de masse quadripolaire avec la même colonne capillaire et les mêmes conditions d'opération que celles décrites pour la CPG-DIF.

Les analyses ont été effectuées en impact électronique utilisant une énergie d'ionisation à 70 eV et avec une température de la source de 150°C. Les spectres de masse ont été enregistrés dans une gamme de masse entre 35 et 350 uma (unité de masse atomique) durant un scan d'une seconde. Les aldéhydes en C6 ont été identifiés, d'une part par les indices de rétention du produit sur colonne polaire, et d'autre part par analyse en spectrométrie de masse par rapport à une banque de standards.

La quantification des aldéhydes en C6 a été réalisée par calibration de standards externes. Les courbes d'étalonnage ont été construites à partir des solutions d'hexanal et de (Z)-hex-3-ènal préparées dans du dichlorométhane à des concentrations différentes : 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 mM. Les analyses ont été réalisées en triplicat. Les intégrations ont été réalisées avec le logiciel Total Chrom (Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en mM. La méthode de quantification a été validée par le fort coefficient de corrélation ( $R^2=0.994$  pour l'hexanal et  $R^2=0.985$  pour le (Z)-hex-3-ènal) pour les courbes de calibration obtenues avec

les concentrations allant de 0,5 à 8 mM. De plus, l'écart type relatif est inférieur à 5 % confirmant la répétabilité de la méthode.

## **Résultats et Discussion**

# **1. Etudes préliminaires**

## **1.1- Choix de l'échantillon d'ARN**

Une étude préliminaire réalisée au laboratoire sur les olives de quatre variétés (Sabina, Ghjermana, Leccino et Arbequina) a montré que l'activité enzymatique de l'HPL varie au cours du développement des olives et que l'activité enzymatique maximale est mesurée dans les olives noires (20 semaines après floraison) de la variété Leccino. L'ARN de ces olives a donc été extrait pour synthétiser les ADNc.

## **1.2- Clonage de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive par RT-PCR et RACE-PCR**

Un alignement de séquences peptidiques à l'aide du programme ClustalW des HPL végétales présentes dans les banques de données Genbank et EMBL a été réalisé. Cet alignement a permis de mettre en évidence la présence de séquences conservées. Des oligonucléotides dégénérés ont donc été synthétisés (HPL13-2 et HPL13-3) à partir de séquences peptidiques conservées afin de cloner de l'HPL d'olive par RT-PCR. Les amorces dégénérées HPL13-2 et HPL13-3 ont été utilisées dans une réaction de PCR qui a permis d'obtenir un fragment d'environ 450 pb appelé produit de RT-PCR n°1 qui a été cloné dans le vecteur pCR2.1TOPO. La séquence nucléotidique du produit de RT-PCR n°1 montre 71 % de similitude avec l'HPL de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Ce fragment d'ADNc correspond bien à une partie de l'ADNc de l'HPL d'olive. A partir de la séquence nucléotidique de ce clone, nous avons choisi des oligonucléotides non dégénérés spécifiques : HPLb, HPLd, HPLe, HPLf (cf matériels et méthodes) pour poursuivre le clonage de l'HPL.

### **1.2.1- Clonage de l'extrémité 3' de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive**

Une nouvelle réaction de PCR a été réalisée sur les ADNc d'olives avec le couple d'oligonucléotides HPLb/oligonucléotide d(T)<sub>18</sub>V. Un fragment d'environ 250 pb a été obtenu et appelé produit de RT-PCR n°2. Sa séquence nucléotidique présente 68 % de similitude avec l'HPL de luzerne cultivée (*Medicago sativa*) ce qui confirme que le produit de RT-PCR n°2 correspond à l'extrémité 3' de l'ADNc de l'HPL d'olive.

### **1.2.2- Clonage de l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive**

Le clonage de l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive a été réalisé par trois expériences successives de RACE-PCR. Les fragments d'ADN obtenus ont été clonés dans le vecteur pCR2.1TOPO puis séquencés.

Nous avons choisi d'utiliser le produit de RT-PCR n°1 pour déduire les trois oligonucléotides non dégénérés (HPLd, HPLe, HPLf) nécessaires pour la réalisation de la première expérience de RACE-PCR. Un nouveau fragment de 161 pb que nous avons appelé produit de RACE-PCR n°1 a été obtenu. Sa séquence nucléotidique présente 73 % de similitude avec l'HPL du piment doux (*Capsicum annuum*).

Pour poursuivre le clonage de l'extrémité 5' manquante, nous avons choisi trois nouveaux oligonucléotides (HPLg, HPLh, HPLi) à partir du produit de RACE-PCR n°1. Une expérience de RACE-PCR a permis d'obtenir un fragment de 370 pb appelé produit de RACE-PCR n°2. Sa séquence nucléotidique 72 % de similitude avec l'HPL de thé (*Camellia sinensis*). Cependant, ce fragment ne correspond pas à l'extrémité 5' de l'ADNc.

Nous avons donc choisi trois nouveaux oligonucléotides (HPLj, HPLk, HPLl) à partir de la séquence du produit de RACE-PCR n°2. Une troisième expérience de RACE-PCR a permis d'obtenir un fragment d'ADN de 530 pb appelé produit de RACE-PCR n°3. Sa

séquence nucléotidique présente 73 % de similitude avec l'HPL de tabac (*Nicotiana tabacum*). Les résultats des alignements de séquences ont confirmé que l'extrémité du produit de RACE-PCR n°3 correspond à l'extrémité 5' de l'enzyme.

Les différents produits de RT-PCR et de RACE-PCR étant chevauchants, et leurs séquences chevauchantes présentant 100 % d'identité, nous avons associé les différentes séquences pour reconstituer la molécule d'ADNc codant pour l'HPL d'olive.

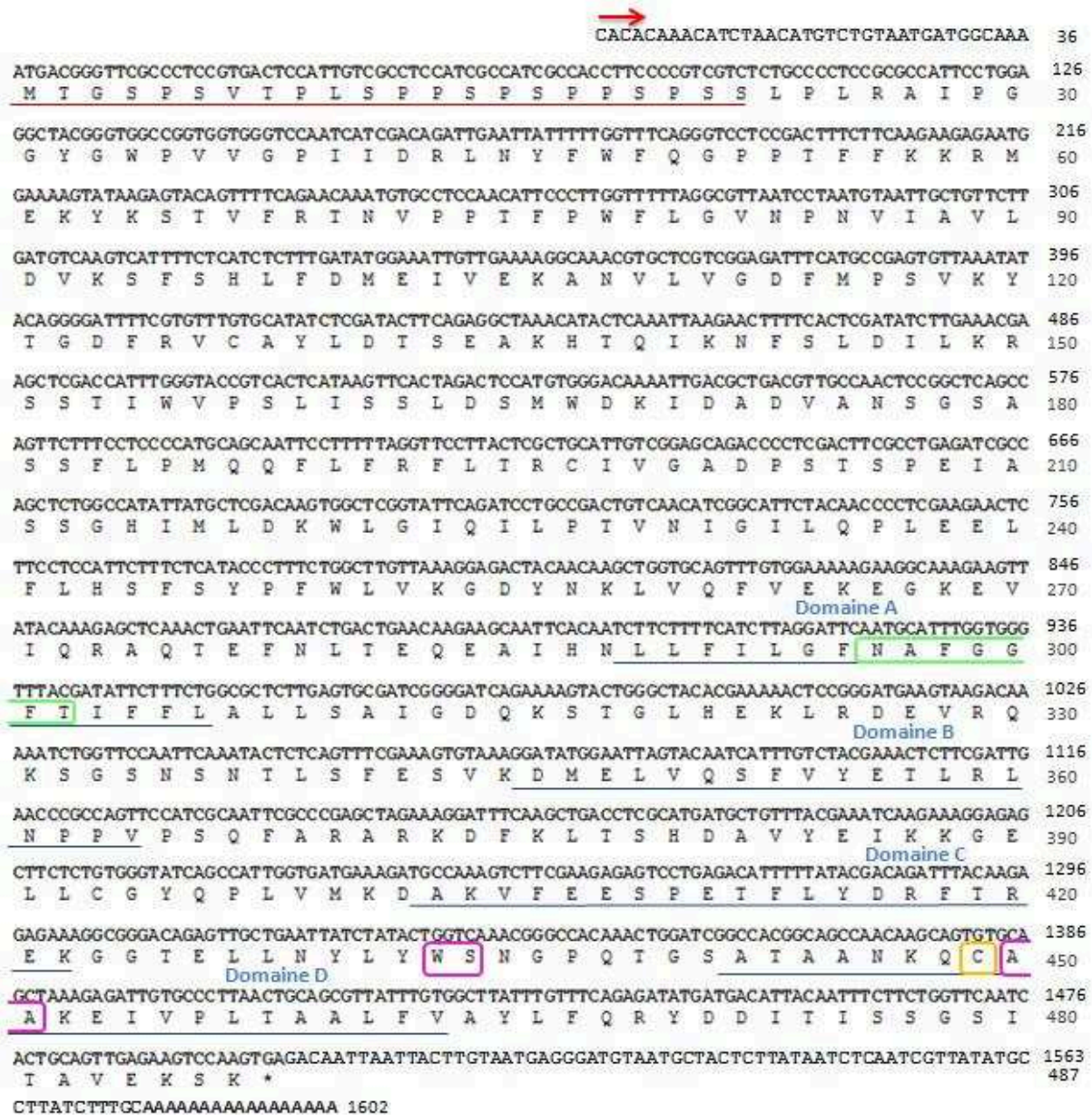
### **1.3- Clonage de l'ADNc complet codant pour l'HPL d'olive et analyse de la séquence**

Afin de cloner l'ADNc complet codant pour l'HPL d'olive, nous avons réalisé une nouvelle RT-PCR avec les oligonucléotides HPLsens et HPLantisens, choisis grâce à la séquence de l'ADNc reconstitué. De manière à encadrer la séquence codante de l'ADNc, les amorces ont été choisies de part et d'autre des codons d'initiation et stop. Nous avons obtenu trois clones tous identiques présentant la séquence complète de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive en une seule étape.

La séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive présente un cadre de lecture ouvert sur 1464 pb qui code pour une protéine de 487 acides aminés, avec une masse moléculaire de 50 kDa et un pHi de 6,88 (Figure 15). L'analyse de la séquence nucléotidique a montré 97 % de similitude entre la séquence de l'HPL d'olive de la variété Leccino et celle de l'HPL (*OepHPL*, numéro d'accèsion EU513350) clonée par Padilla et al. (2010) à partir d'olives de la variété Picual (Annexe 1). L'analyse de la séquence en acides aminés a montré 99,8 % de similitude entre les deux séquences, la séquence de l'HPL de la variété Picual possédant quatre résidus d'acides aminés supplémentaires (MMAK) à l'extrémité N-terminale



et une alanine en position 415 qui est remplacée par un résidu d'acide glutamique (en position 411) dans l'HPL d'olive de la variété Leccino (Annexe 2).



**Figure 15: Séquence nucléotidique et peptidique de l'HPL d'olive de la variété Leccino.**

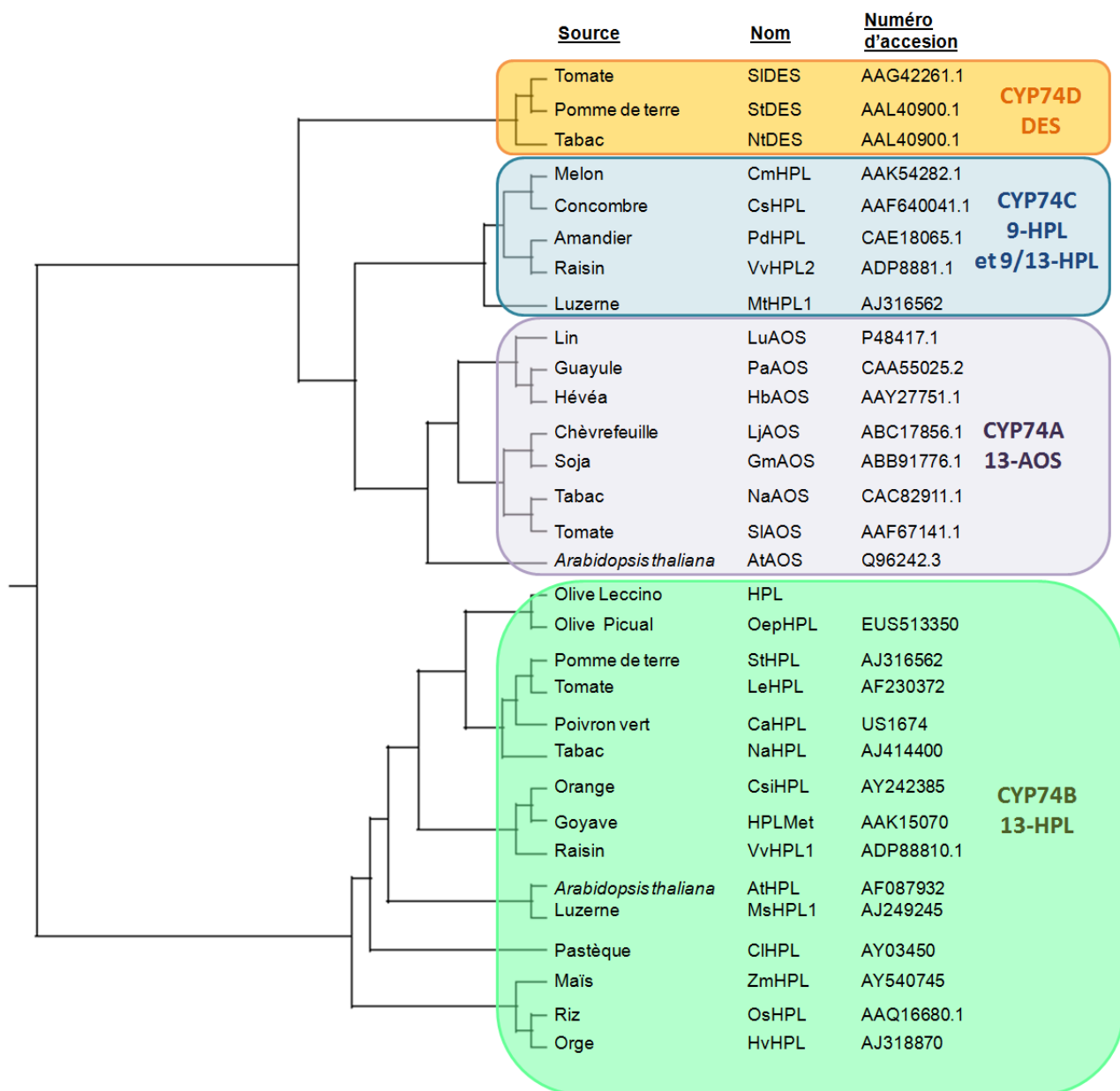
Les quatre domaines (A, B, C, D) très conservés chez les CYP74 à l'extrémité C-terminale sont soulignés en bleu. La cystéine conservée qui sert de ligand au fer de l'hème est encadrée en jaune. La séquence codant pour le peptide de transit chloroplastique en N-terminale est soulignée en rouge. L'hélice I dans le domaine A, contenant le résidu d'asparagine (N296) impliqué dans la catalyse, est encadrée en vert. Les résidus W432 et S433 ainsi que les résidus A450 et A451, situés à l'extrémité N-terminale et C-terminale de la boucle de liaison à l'hème et responsables des interactions hydrophobes avec l'hème, sont encadrés en rose.

L'HPL recombinante d'olive possède les quatre domaines conservés (A, B, C, D), à l'extrémité C-terminale, caractéristiques des CYP74 (Bate et al., 1998). Elle possède également tous les domaines conservés chez les CYP74 impliqués dans la catalyse :

- dans le domaine A, le motif NAFGGFT de l'hélice I qui joue un rôle important dans la catalyse avec notamment le résidu d'asparagine 296 qui est responsable du clivage de la liaison O-O de l'hydroperoxyde (Li et al., 2008 ; Lee et al., 2008 ; Schaller et al., 2009).
- dans le domaine D, qui contient le résidu de cystéine conservé impliqué dans la liaison avec le fer de l'hème.

L'HPL possède un peptide signal d'adressage chloroplastique à l'extrémité N-terminale caractéristique des CYP74B (Stumpe et Feussner, 2006). La présence de ce peptide suggère une localisation chloroplastique de l'enzyme (Bate et al., 1998; Froehlich et al., 2001).

Pour déterminer le placement évolutif de la séquence protéique de l'HPL recombinante d'olive, un arbre phylogénétique a été construit avec les séquences de CYP74 de différentes variétés de plante (Figure 16).



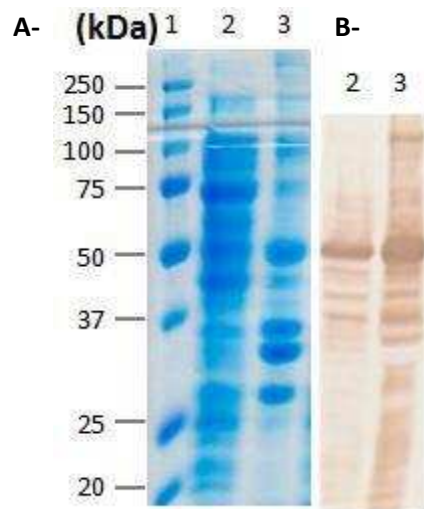
**Figure 16: Arbre phylogénétique basé sur la séquence protéique des enzymes des différentes classes de CYP74.**

Les AOS, HPL et DES de 31 variétés de plantes ont été divisées en quatre catégories : les CYP74A, les CYP74B, les CYP74C et les CYP74D. L'HPL d'olive de Leccino appartient à la sous-famille des CYP74B.

## 2. Expression de l'HPL recombinante d'olive

Nous avons choisi d'utiliser les conditions déjà mises au point au laboratoire pour l'expression de la LOX d'olive (Palmieri et al., 2009). La souche E.coli (M15) transformée avec le plasmide pQE30-HPL a donc été utilisée pour inoculer 400 mL de milieu de culture (milieu TB) incubé à 37 °C jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne une valeur de 0,6. L'expression de la protéine a été réalisée à 15 °C pendant 48 h après ajout de 0,5 mM d'IPTG et de 2,5 mM d'acide  $\delta$ -aminolévulinique, qui est un précurseur de l'hème. Nos conditions d'expression diffèrent de celles utilisées par Padilla et al. (2010) : l'OepHPL a été clonée dans le vecteur pET21d(+) puis exprimée dans la souche E.coli BL21(DE3) après induction par 1 mM d'IPTG à 25°C pendant 15h.

Après lyse bactérienne et centrifugation, la répartition de l'HPL recombinante a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoempreinte (Figure 17).



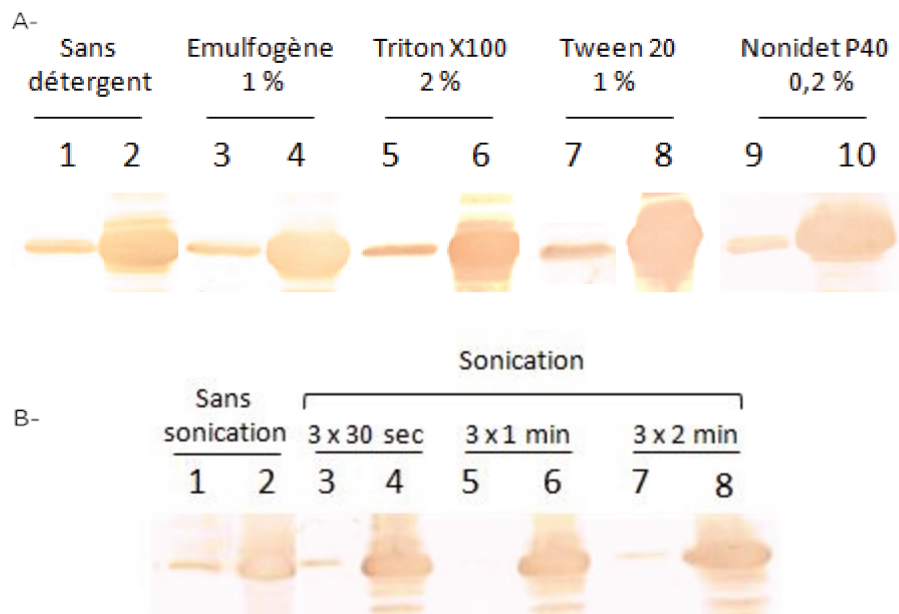
**Figure 17: Analyse de la répartition de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.**

Les protéines sont séparées par électrophorèse puis A : colorées au bleu de Coomassie (EZ Blue™ Gel Staining Reagent) ou B : transférées sur membrane de nitrocellulose et immunorévélées par un anticorps anti-polyhistidine. Piste 1 : Marqueur de masse moléculaire, Piste 2 : surnageant de lyse, Piste 3 : culot de lyse.

L'HPL se trouve à la fois dans le surnageant et le culot de lyse (Figure 19B pistes 2 et 3). Des activités enzymatiques de  $116,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le 13-HPOD et de  $135,8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le 13-HPOT ont été mesurées dans le surnageant, mais aucune activité enzymatique n'a pu être détectée dans le culot.

La grande quantité d'enzyme retrouvée dans le culot (Figure 19B piste 3) peut s'expliquer par le fait que l'enzyme pourrait être soit incluse dans des corps d'inclusion, soit rattachée aux membranes. L'HPL étant décrite comme étant une protéine membranaire (Delcarte et al., 2000 ; Gardner et al., 1991), nous avons décidé de réaliser des essais de solubilisation de l'HPL recombinante à partir des culots de lyse :

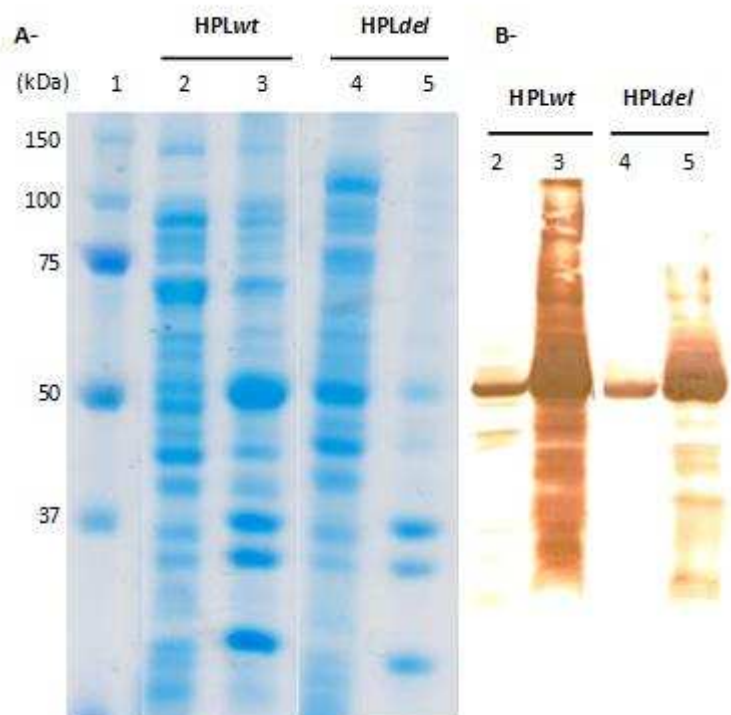
- par différents détergents : Emulfogène 1 %, Triton X100 2 %, Tween 20 1 %, Nonidet P40 0,2 % (Figure 18A).
- par sonication pendant différents temps : 3 fois 30 sec ; 3 fois 1 min ; 3 fois 2 min (Figure 18B).



**Figure 18: Analyse des essais de solubilisation de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.**

A- solubilisation par différents détergents, B- solubilisation par sonication. Les pistes impaires correspondent aux surnageants et les pistes paires correspondent aux culots.

Les différents essais de solubilisation se sont avérés peu efficaces puisque la majorité de l'enzyme reste dans le culot après centrifugation malgré la présence du détergent et les différents temps de sonication utilisés. La présence du peptide de transit chloroplastique, chez l'HPL d'olive, pourrait rendre plus difficile sa solubilisation. Nous avons décidé de supprimer cette séquence d'adressage de l'HPL à la membrane des chloroplastes (HPLdel). La répartition dans le surnageant et le culot de l'HPLdel et de l'HPL sauvage (HPLwt) a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoempreinte (Figure 19).



**Figure 19: Analyse de la répartition de l'HPLwt et de l'HPLdel par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.**

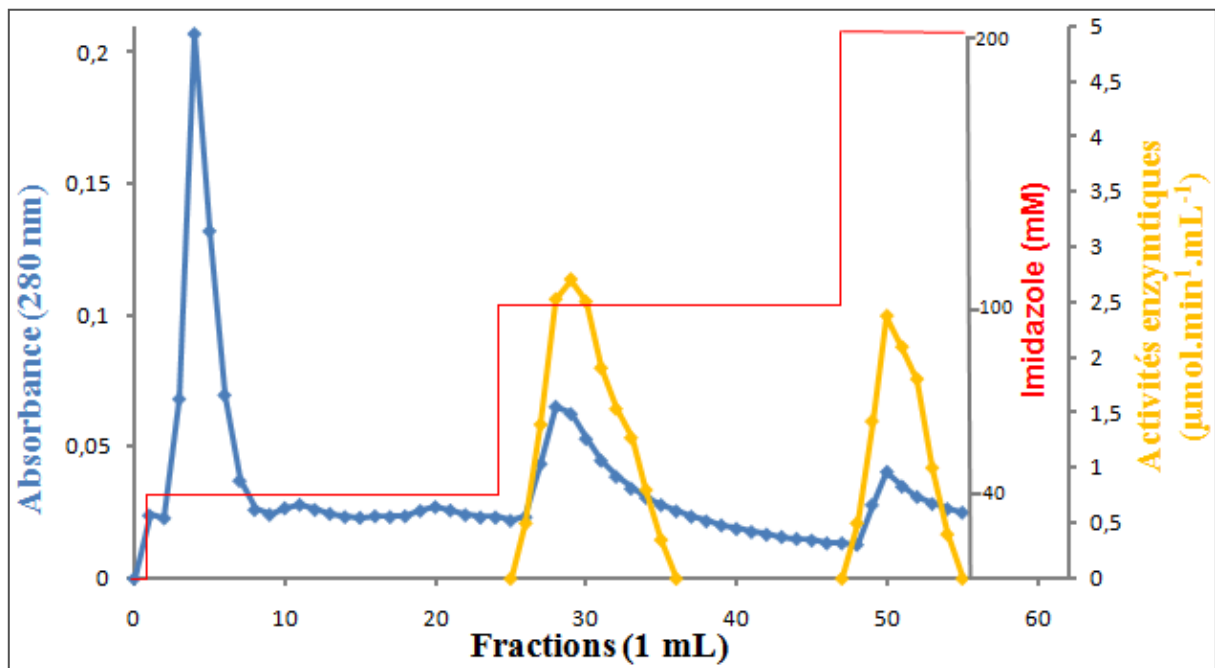
Les protéines sont séparées par électrophorèse puis A : colorées au bleu de Coomassie (EZ Blue™ Gel Staining Reagent) ou B : transférées sur membrane de nitrocellulose et immunorévéllées par un anticorps anti-polyhistidine. Piste 1 : Marqueur de masse moléculaire, Pistes 2 et 4 : surnageant de lyse, Pistes 3 et 5: culot de lyse.

L'absence du peptide de transit à l'extrémité N-terminale de l'HPLdel ne permet pas d'éviter une accumulation importante de l'enzyme dans le culot de lyse (Figure 19, piste 5).

En effet, le surnageant de lyse semble contenir une quantité d'enzyme plus faible que le surnageant de lyse de HPLwt (Figure 19 pistes 2 et 4). Ces résultats suggèrent que l'enzyme serait plutôt présente sous forme de corps d'inclusion. Nous avons choisi de produire les deux enzymes et de les purifier à partir des surnageants de lyse dans une première étape. Néanmoins, il serait intéressant de traiter les culots par l'urée afin d'essayer de solubiliser une plus grande quantité d'enzyme.

### **3. Purification des enzymes HPLwt et HPLdel**

Lors du clonage, nous avons choisi d'insérer une étiquette polyhistidine à l'extrémité N-terminale de l'HPL. Nous avons donc purifié les enzymes par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine contenant du cobalt (Talon Superflow Metal Affinity Clontech sur Äkta purifier, Fast Protein Liquid Chromatography GE) préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 50 mM pH 7, NaCl 300 mM. Nous avons choisi de réaliser l'élution grâce à trois paliers successifs d'imidazole (de 0 à 40 mM, de 40 à 100 mM puis de 100 à 200 mM) (Figure 20).

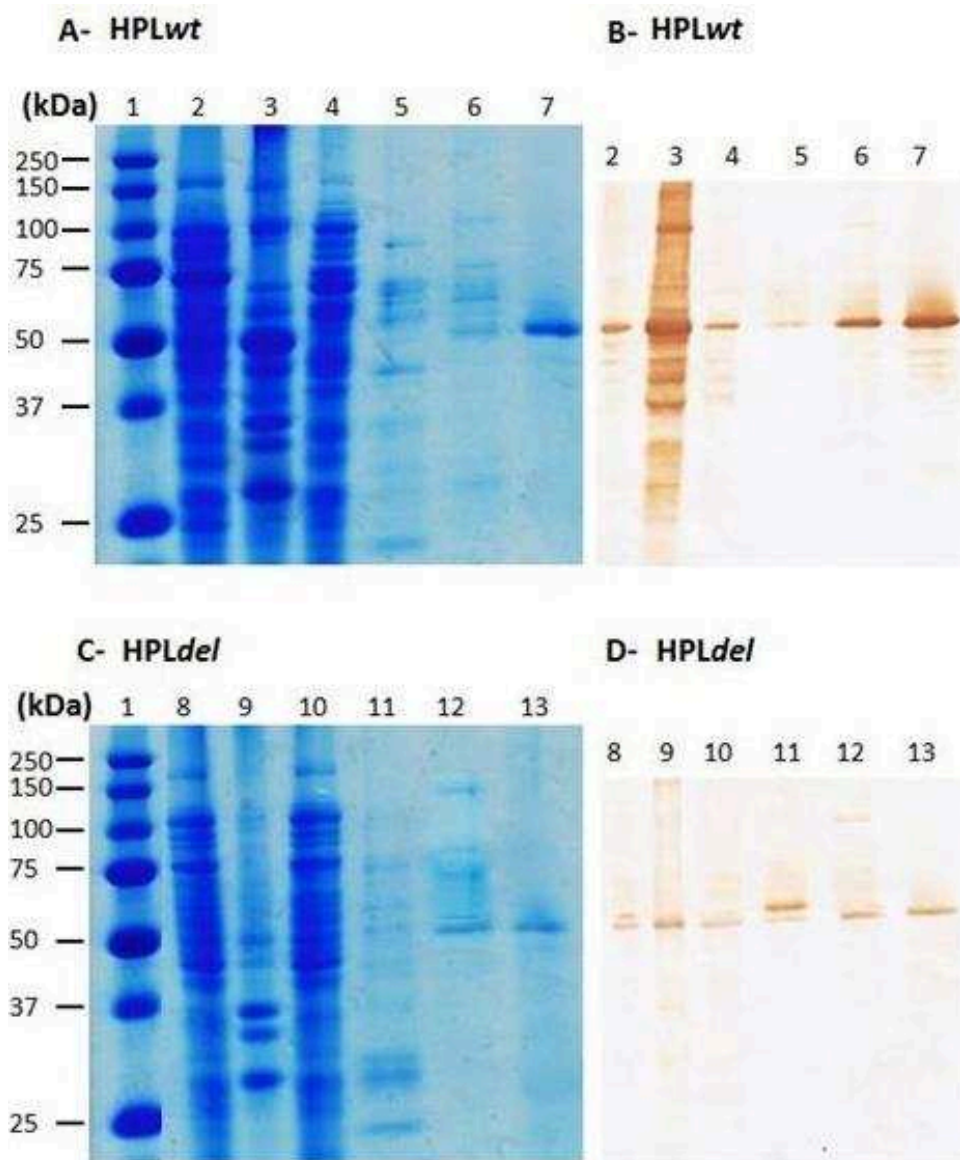


**Figure 20: Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine au cobalt (Talon Superflow Metal Affinity).**

Le surnageant de lyse (20 mL) est chargé sur colonne de résine au cobalt ( $h = 1,2$  cm,  $D = 1,1$  cm). Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par trois paliers d'imidazole (40 mM, 100 mM et 200 mM) à un débit de  $1,25$  mL.min<sup>-1</sup>.

L'activité enzymatique de l'HPL est détectée dans les fractions éluées à 100 mM et 200 mM d'imidazole. Les fractions présentant une activité HPL ont été rassemblées en deux pools (élution 100 mM et 200 mM) puis analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte (Figure 21).





**Figure 21: Analyse des étapes de purification de l'HPLwt (A et B) et l'HPLdel (C et D) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % et par immunoempreinte.**

Les protéines ont été séparées par électrophorèse puis A et C : colorées au bleu de Coomassie (EZ Blue™ Gel Staining Reagen) ou B et D : transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-polyhistidine.

1 : Marqueur de masse moléculaire. Les pistes 2 à 7 correspondent à l'HPLwt, et les pistes 8 à 13 correspondent à l'HPLdel. 2 et 8 : surnageant de lyse ; 3 et 9 : culot de lyse ; 4 et 10 : fraction non retenue sur la colonne ; 5 et 11 : fractions éluées à 40mM d'imidazole; 6 et 12 : fractions éluées à 100mM d'imidazole; 7 et 13 : fractions éluées à 200mM d'imidazole.

Nous confirmons que les fractions éluées à 100 et 200 mM d'imidazole contiennent l'HPL recombinante puisque nous observons une bande à environ 50 kDa révélée par

l'anticorps anti-polyhistidine, correspondant à la masse moléculaire de l'enzyme. Nous constatons également que les enzymes sont pures dans les fractions éluées à 200 mM d'imidazole puisqu'aucune autre bande n'est visible après coloration des protéines par l' "EZ Blue Gel Staining Reagent" (Figure 21, pistes 7 et 13). En comparant les résultats obtenus avec les deux HPL recombinantes, il apparaît que la fraction purifiée de HPLdel semblent contenir une quantité d'enzyme plus faible que la fraction purifiée de HPLwt (Figure 21 pistes 7 et 13).

Le tableau 2 résume les purifications des deux HPL recombinantes d'olive.

**Tableau 2: Tableau de purification de l'HPLwt et l'HPLdel.**

		<b>Protéines totales (mg)</b>	<b>Activité totale (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Activité spécifique (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}</math> de protéines)</b>	<b>Rendement (%)</b>	<b>Facteur de purification</b>
<b>HPLwt</b>	Extrait brut Surnageant de lyse	446,3 $\pm$ 0,28	135,8 $\pm$ 1,41	0,34 $\pm$ 0,13	100	1
	Elution à 200mM d'imidazole	0,46 $\pm$ 0,14	54,15 $\pm$ 19,8	120,6 $\pm$ 5,8	39,9	354,7
<b>HPLdel</b>	Extrait brut Surnageant de lyse	196 $\pm$ 31,73	138,9 $\pm$ 3,05	0,74 $\pm$ 0,13	100	1
	Elution à 200mM d'imidazole	0,24 $\pm$ 0,03	24,1 $\pm$ 7,6	103,6 $\pm$ 12,1	17,35	140

Les activités enzymatiques ont été mesurées en utilisant le 13-HPOT comme substrat. Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$  DS.

A partir de 400 mL de culture, nous avons purifié 0,46  $\pm$  0,14 mg d'HPLwt d'activité spécifique de 120,6  $\pm$  5,8 U. $\text{mg}^{-1}$  de protéines et 0,24  $\pm$  0,03 mg d'HPLdel ayant une activité spécifique de 103,6  $\pm$  12,1 U. $\text{mg}^{-1}$  de protéines. La délétion du peptide de transit

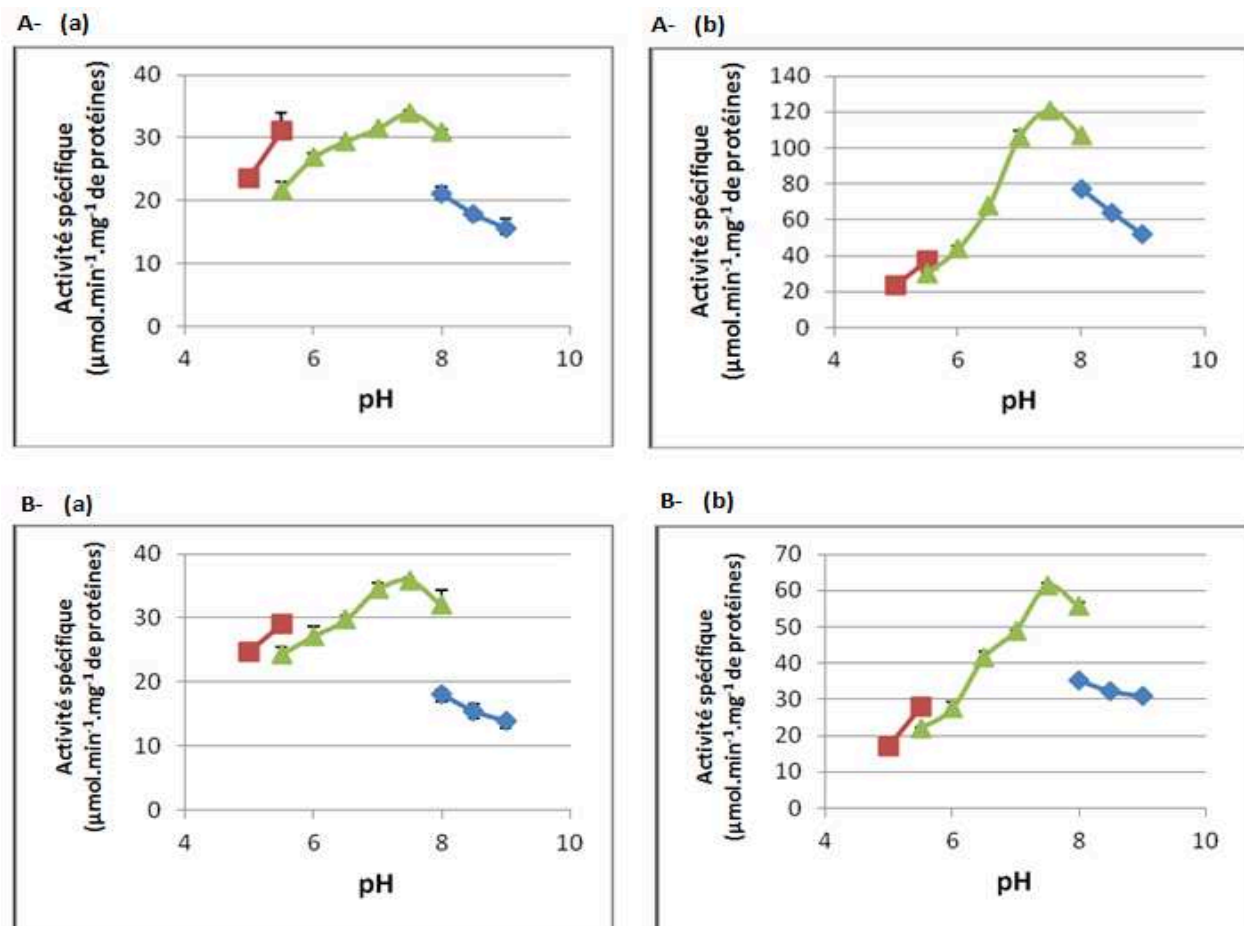
chloroplastique n'a pas permis d'augmenter la quantité d'enzyme purifiée. De plus l'HPLdel présente une activité spécifique plus faible que celles de l'HPLwt (diminution de 14,1 %).

## 4. Caractérisation des HPLwt et HPLdel

### 4.1- Détermination des pH et températures optimum

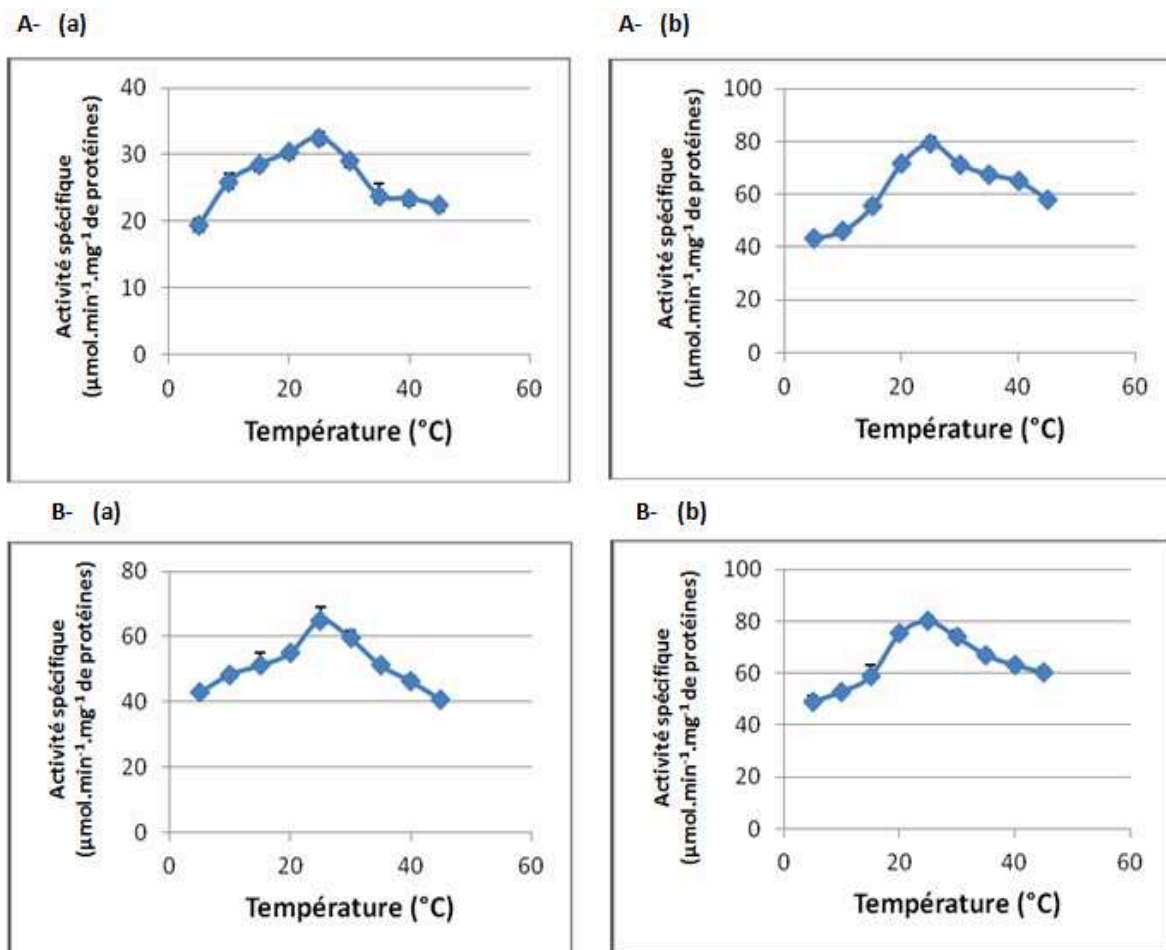
Le pH et la température optimum des deux enzymes ont été déterminés en utilisant les

13-HPOD et 13-HPOT comme substrats (Figure 22 et 23).



**Figure 22: Influence du pH sur l'activité de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B) en présence de 13-HPOD (a) et de 13-HPOT (b).**

Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations  $\pm$  DS. Les tampons utilisés sont le tampon acétate de sodium 50 mM pour les zones de pH de 5 à 5,5 (en rouge) ; le tampon phosphate de sodium 50 mM pour les zones de pH de 5,5 à 8 (en vert) et le tampon borate de sodium 50 mM pour les zones de pH de 8 à 9 (en bleu).



**Figure 23: Influence de la température sur l'activité de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B) en présence de 13-HPOD (a) et de 13-HPOT (b).**

Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations  $\pm$  DS.

Les deux enzymes présentent un pH et une température optimum de 7,5 et 25 °C quel que soit le substrat utilisé. Elles sont également actives dans une gamme de pH comprise entre 7 et 8 (au moins 80 % de l'activité maximale est conservée).

Des propriétés similaires ont été décrites pour l'HPL purifiée de pulpes d'olives (Salas et al., 1999), l'HPL partiellement purifiée de feuilles d'oliviers (Ben Akacha et al., 2009), l'HPL de thé (Matsui et al., 1991), l'HPL de pomme de terre (Mu et al., 2012) et l'HPL de poivron vert (Shibata et al., 1995). En revanche, Padilla et al. (2010) ont signalé un pH optimum compris entre 8 et 9 et une température optimale de 45 °C pour l'HPL recombinante d'olive de la variété Picual (OepHPL).

#### 4.2- Détermination des paramètres cinétiques

Nous avons déterminé les paramètres cinétiques des deux HPL pour le 13-HPOD et pour le 13-HPOT (Tableau 3).

**Tableau 3 : Paramètres cinétiques des HPLwt et HPLdel recombinantes purifiées.**

HPL	Substrats	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vm ( $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ )	kcat ( $\text{s}^{-1}$ )	kcat/Km ( $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ )
HPLwt	13-HPOD	$43,10 \pm 4,46$	$0,48 \pm 0,06$	$26,38 \pm 3,01$	0,62
	13-HPOT	$152,75 \pm 10,36$	$10,35 \pm 0,68$	$564,95 \pm 36,89$	3,71
HPLdel	13-HPOD	$43,22 \pm 7,87$	$0,34 \pm 0,01$	$17,89 \pm 0,53$	0,43
	13-HPOT	$173,85 \pm 27,70$	$7,65 \pm 0,07$	$402,62 \pm 3,66$	2,36

Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$  DS.

Les deux enzymes présentent un Km plus faible pour le 13-HPOD ( $43,10 \mu\text{M}$  pour HPLwt et  $43,22 \mu\text{M}$  pour HPLdel, respectivement) que pour le 13-HPOT ( $152,75 \mu\text{M}$  et  $173,85 \mu\text{M}$  pour HPLwt et HPLdel respectivement) mais un kcat plus grand pour le 13-HPOT ( $564,95 \text{ s}^{-1}$  pour l'HPLwt et  $402,62 \text{ s}^{-1}$  pour l'HPLdel) que pour le 13-HPOD ( $28,38 \text{ s}^{-1}$  pour l'HPLwt et  $17,89 \text{ s}^{-1}$  pour l'HPLdel). L'efficacité catalytique (kcat/Km) des deux HPL est plus importante pour le 13-HPOT que pour le 13-HPOD. En outre, l'HPLwt agit plus efficacement sur le 13-HPOT et le 13-HPOD que l'HPLdel ( $3,71 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  et  $2,36 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  pour le 13-HPOT et  $0,62 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  et  $0,43 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  pour le 13-HPOD).

L'HPL d'olive de la variété Picual agit également plus efficacement sur le 13-HPOT que sur le 13-HPOD (Padilla et al., 2010). Toutefois la comparaison des kcat/Km de l'HPLwt, de l'HPLdel et de l'HPL d'olive de la variété Picual ( $0,348 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  pour le 13-HPOT et  $0,159 \text{ s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  pour le 13-HPOD, valeurs calculées à partir des données de Padilla et al. (2010)), montre que l'HPLwt et l'HPLdel agissent 10,66 fois et 6,78 fois plus efficacement

sur le 13-HPOT et 3,9 fois et 2,7 fois plus efficacement sur le 13-HPOD que l'HPL d'olive de la variété Picual.

## 5. Production d'hexanal et de (Z)-hex-3-ène par l'action des HPL recombinantes d'olive

Les enzymes HPLwt et HPLdel ont été testées comme catalyseurs pour la production d'hexanal et de (Z)-hex-3-ène à partir du 13-HPOD et du 13-HPOT.

### 5.1- Production d'hexanal par l'HPLwt ou l'HPLdel

L'influence de la concentration en enzyme et en substrat sur la production d'aldéhydes a été étudiée en utilisant l'HPLwt et le 13-HPOD (Tableau 4).

**Tableau 4: Production d'hexanal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOD.**

HPL recombinantes (U.mL <sup>-1</sup> )	13-HPOD (mM)	Hexanal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
<b>HPLwt</b>				
0,25	4	2,51 ± 0,03	63	20
	6	3,68 ± 0,16	61	20
0,5	2	1,60 ± 0,17	80	5
	4	3,33 ± 0,17	83	15
	6	5,02 ± 0,05	84	15
<b>1</b>	4	2,86 ± 0,01	71,5	5
	<b>6</b>	<b>5,61 ± 0,48</b>	<b>93,5</b>	<b>10</b>
<b>HPLdel</b>				
0.5	4	2,74 ± 0,10	68,5	10
	6	3,35 ± 0,14	56	20
1	6	3,93 ± 0,15	65,5	20

Les réactions ont été réalisées avec différentes concentrations de 13-HPOD dans 1 mL de milieu réactionnel (tampon phosphate 50 mM, pH 7,5, incubé à 25 °C) durant un temps de réaction optimum pour chaque quantité d'enzyme. Après extraction, l'hexanal produit a été identifié et quantifié par CPG-SM et CPG-DIF. Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations ± DS.

Les résultats montrent que des concentrations croissantes d'hexanal ont été obtenues en utilisant des concentrations croissantes de 13-HPOD. Des résultats similaires ont été reportés par Márczy et al. (2002) et Gargouri et al. (2004). Toutefois, ces auteurs observent une diminution des taux de conversion lorsque des concentrations croissantes de substrat sont utilisées avec une concentration constante en enzyme, alors que dans nos expériences, le taux de conversion reste stable ou augmente. Ceci suggère que l'HPLwt d'olive n'est pas ou est peu inhibée par le 13-HPOD. Les résultats montrent également que les concentrations en HPLwt influent sur les concentrations d'hexanal obtenues. En effet, la plus forte concentration d'hexanal a été obtenue en présence d'1 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLwt et 6 mM de 13-HPOD, alors qu'une concentration de 0,25 U.mL<sup>-1</sup> d'enzyme semble insuffisante pour transformer 4 ou 6 mM de 13-HPOD (rendement de 60 % seulement obtenu après 20 min de réaction). Les conditions optimales ont permis de produire 5,61 ± 0,48 mM d'hexanal, ce qui correspond à un taux de conversion de 93,5 %.

Lorsque l'HPLwt est remplacée par l'HPLdel, les concentrations d'hexanal obtenues sont toujours plus faibles (Tableau 4). Cependant, un taux de conversion de 65,5 % correspondant à une concentration de 3,93 ± 0,15 mM d'hexanal a été obtenu avec 1 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLdel et 6 mM de 13-HPOD.

Nous avons obtenu de meilleurs taux de conversion lors de la production d'hexanal par rapport à ceux indiqués dans la littérature : de 25 à 86 % lorsque des extraits de plantes sont utilisés comme source d'HPL (Gargouri et al., 2004 ; Márczy et al., (2002) ; Rabetafika et al., 2008), ou 65 % quand l'HPL recombinante de luzerne est utilisée comme catalyseur (Noordermeer et al., 2002).

## 5.2- Production de (Z)-hex-3-ènal par l'HPLwt et l'HPLdel

La production de (Z)-hex-3-ènal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOT a été étudiée (Tableau 5).

**Tableau 5: Production de (Z)-hex-3-ènal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOT.**

HPL recombinante (U.mL <sup>-1</sup> )	13-HPOT (mM)	(Z)-hex-3-ènal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
<b>HPLwt</b>				
0,25	4	0,87 ± 0,04	22	5
	6	0,90 ± 0,15	15	10
0,5	2	0,77 ± 0,002	38,5	20
	4	1,45 ± 0,18	36	10
	6	2,26 ± 0,02	38	5
1	4	0,75 ± 0,02	19	5
	6	2,18 ± 0,14	36	15
<b>HPLdel</b>				
0.25	4	0,49 ± 0,03	12	20
0.5	4	1,12 ± 0,02	28	20
	6	1,19 ± 0,23	19,8	10

Les réactions ont été réalisées avec différentes concentrations de 13-HPOT dans 1 mL de volume réactionnel (tampon phosphate 50 mM, pH 7,5, incubé à 25 °C) durant un temps réactionnel optimum pour chaque concentration en enzyme. Après extraction, le (Z)-hex-3-ènal a été identifié et quantifié par CPG-SM et CPG-DIF. Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations ± DS.

Les analyses en CPG-DIF ont montré que seul le (Z)-hex-3-ènal est produit au cours de la réaction enzymatique. Comme le (E)-hex-2-ènal n'a jamais été détecté, dans nos conditions expérimentales, aucune isomérisation du (Z)-hex-3-ènal en (E)-hex-2-ènal ne s'est produite. Les conditions optimales de production du (Z)-hex-3-ènal ont été obtenues avec 0,5 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLwt et 6 mM de 13-HPOT. Elles ont permis de produire 2,26 ± 0,02 mM de



(Z)-hex-3-ène, ce qui correspond à un taux de conversion de 38 %. L'HPLdel, utilisée à la place de l'HPLwt, n'a pas produit de plus grande quantité de (Z)-hex-3-ène (Tableau 5).

Les données montrent également que les quantités de (Z)-hex-3-ène produites sont toujours plus faibles que les quantités d'hexanal produites (Tableaux 4 et 5), alors que l'HPLwt et l'HPLdel agissent plus efficacement sur le 13-HPOT que sur le 13-HPOD (Tableau 3). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'effet inhibiteur exercé par le 13-HPOT à de fortes concentrations sur les HPL (Matsui et al., 1992). Une autre explication pourrait provenir de la forte volatilité du (Z)-hex-3-ène à 25 °C. Pour tester cette hypothèse, nous avons reproduit l'expérience avec 0,5 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLwt et 6 mM de 13-HPOT puis avec 0,5 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLdel et 4 mM de substrat à 10°C et 15°C pour limiter la perte du (Z)-hex-3-ène (Tableau 6).

**Tableau 6: Production de (Z)-hex-3-ène par l'HPLwt ou l'HPLdel à différentes températures.**

HPL recombinantes	Températures	(Z)-hex-3-ène (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
<b>HPLwt</b>	10 °C	4,39 ± 0,38	73	15
	15°C	2,86 ± 0,13	48	15
	25°C	2,26 ± 0,02	38	5
<b>HPLdel</b>	10°C	1,80 ± 0,05	45	15
	15°C	1,74 ± 0,18	43	20
	25°C	1,12 ± 0,02	28	20

Les réactions ont été réalisées avec 0,5 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLwt et 6 mM de 13-HPOT ou avec 0,5 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLdel et 4 mM de substrat à 10°C, 15°C et 25°C dans 1 mL de volume réactionnel (tampon phosphate 50 mM, pH 7,5) durant un temps réactionnel optimum pour chaque concentration en enzyme. Après extraction, le (Z)-hex-3-ène a été identifié et quantifié par CPG-SM et CPG-DIF. Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations ± DS.

Les résultats montrent un effet de la température sur la quantité de (Z)-hex-3-ènal produite. Dans les conditions optimales (0,5 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLwt, 6 mM de 13-HPOT, 10°C), 4,39 mM de (Z)-hex-3-ènal ont été produites, ce qui correspond à un taux de conversion de 73 %. Les taux de conversion obtenus à 25°C sont probablement dus à la volatilité du (Z)-hex-3-ènal au cours de la réaction. Les taux de 73 et 45 % obtenus avec l'HPLwt et l'HPLdel, sont de meilleurs taux de conversion par rapport à ceux signalés dans la littérature : 37 à 50 % lorsque des extraits de plantes sont utilisés comme source d'enzyme (Ben Akacha et Gargouri, 2009; Németh et al., 2004) et 43 % avec l'HPL recombinante de luzerne (Noordermeer et al., 2002). De plus, la conversion de 13-HPOT en C6-aldéhydes conduit souvent à un mélange de (Z)-hex-3-ènal et de (E)-hex-2-ènal (Ben Akacha et Gargouri, 2009; Gigot et al., 2012; Németh et al., 2004), qui résulte d'une isomérisation du (Z)-hex-3-ènal en (E)-hex-2-ènal probablement due à l'action d'une 3Z:2E-enal isomerase présente dans les extraits de plantes ou à la chaleur (Ben Akacha et Gargouri, 2009; Németh et al., 2004).

## **6. Conservation de l'HPLwt et de l'HPLdel**

Afin de conserver l'activité enzymatique de l'HPLwt et de l'HPLdel dans le temps, nous avons testé différentes conditions de conservation, telles que la lyophilisation (en absence et en présence de lyoprotecteur) et la réfrigération (en absence et en présence de composés « cryoprotecteurs »).

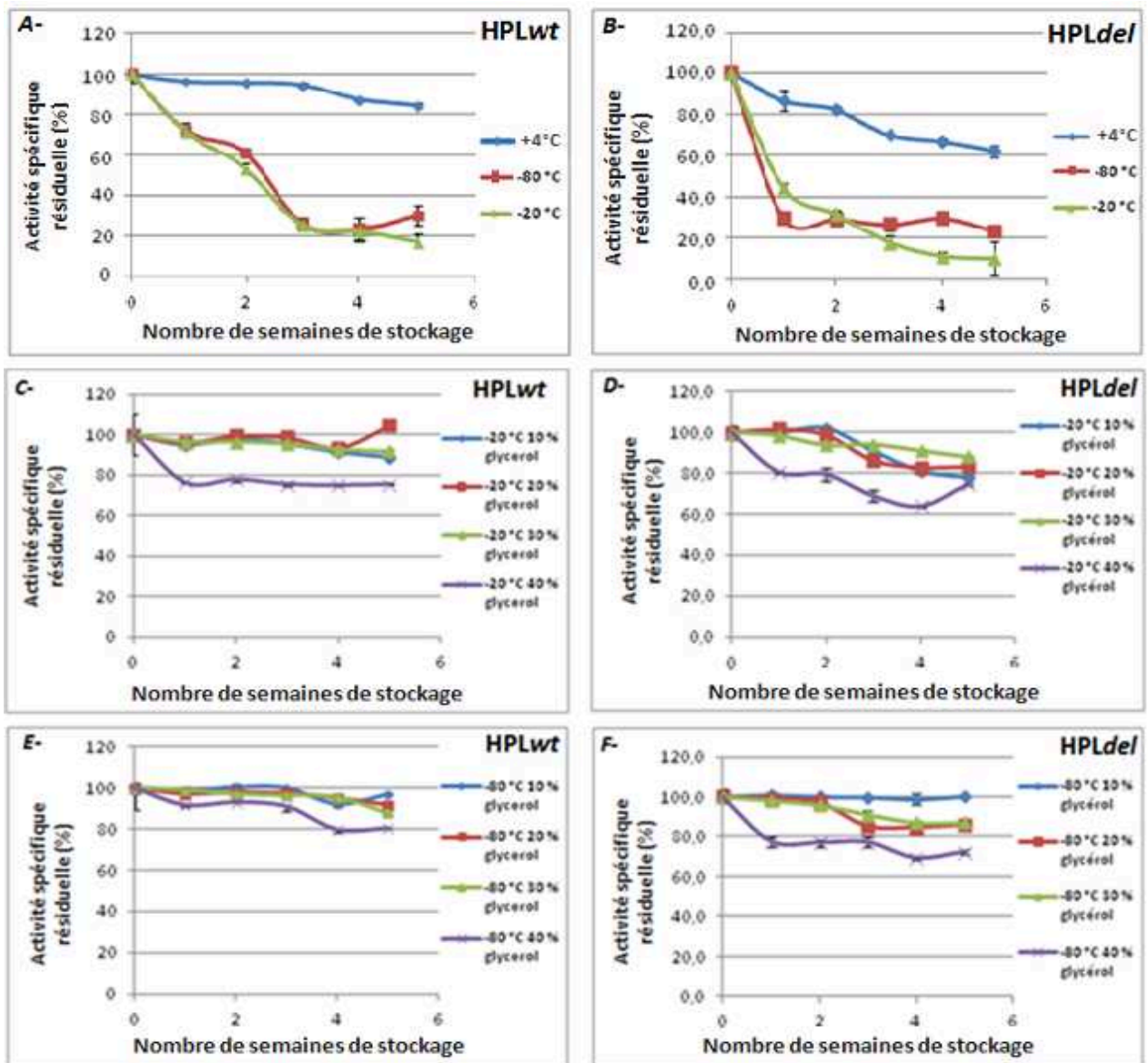
### **6.1- Lyophilisation**

Après dialyse contre du tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 % (w/v), des essais de lyophilisation ont été pratiqués en absence ou en présence de KCl, utilisé comme lyoprotecteur, à différentes concentrations (2,5 %, 5 % et 10 % w/v). Les produits lyophilisés ont ensuite été réhydratés par du tampon phosphate 50 mM à pH 7,5 mais aucune activité

enzymatique n'a été détectée. Cette perte d'activité pourrait être due à une dégradation de l'HPL lors de l'étape de congélation précédant la lyophilisation, et/ou au processus de lyophilisation lui-même. En effet, l'HPL supporte mal les températures négatives (Gigot et al., 2010). Bien que Ben Akacha et al. (2010) aient montré un effet lyoprotecteur et cryoprotecteur du KCl sur un extrait d'HPL de feuille de menthe lyophilisé, les essais de lyophilisation de l'HPLwt et de l'HPLdel en absence et en présence de KCl n'ont pas permis de préserver l'activité enzymatique. De ce fait, la lyophilisation n'a pas été retenue.

## **6.2- Réfrigération**

Nous avons testé différentes températures de conservation (+4 °C; -20 °C; -80 °C) des deux HPL purifiées sur une période de 5 semaines en absence et en présence de glycérol (10; 20; 30; 40 % v/v) pour les températures de -20°C et -80 °C. L'activité HPL a été mesurée chaque semaine pendant 5 semaines (Figure 24).



**Figure 24: Etude de la conservation de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F).** L'activité spécifique résiduelle (%) est calculée en effectuant le rapport de l'activité spécifique ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) à un temps donné, sur l'activité spécifique à  $t_0$ .

L'activité enzymatique de l'HPLwt et de l'HPLdel est mieux préservée à  $+4^\circ\text{C}$  qu'à  $-20^\circ\text{C}$  et  $-80^\circ\text{C}$  en absence de glycérol (Figure 24 A et B). Les deux enzymes semblent être sensibles à la congélation. De plus, nous constatons que l'activité enzymatique de l'HPLwt est plus stable au cours du temps par rapport à l'activité enzymatique de l'HPLdel à  $+4^\circ\text{C}$ . En effet, 95 et 84 % de l'activité enzymatique de l'HPLwt sont retrouvés après respectivement 3 et 5 semaines de conservation à  $+4^\circ\text{C}$ , alors que seulement 70 et 62 % de l'activité enzymatique de l'HPLdel sont conservés.

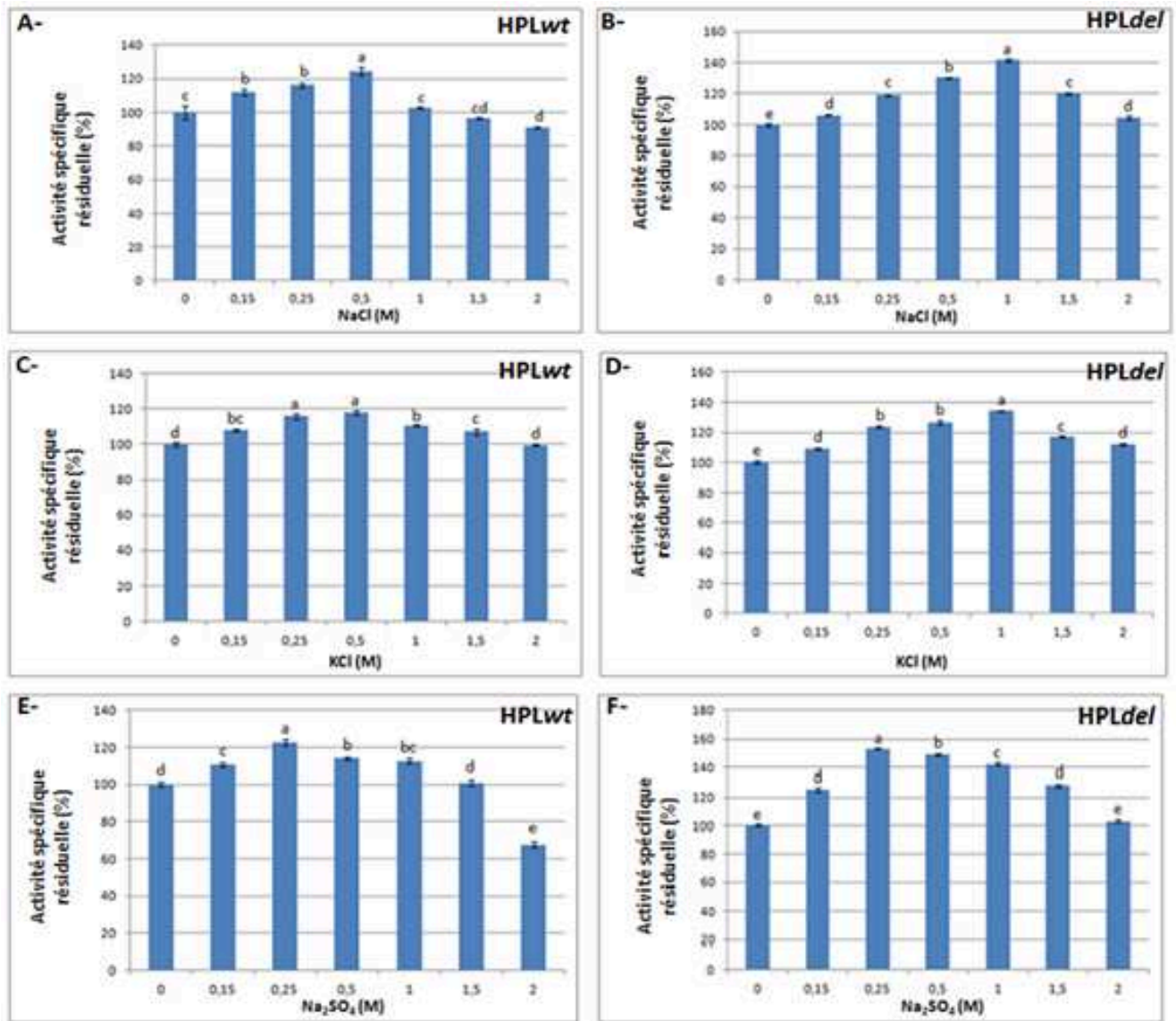
En revanche, en présence de glycérol, l'activité enzymatique de l'HPLwt et de l'HPLdel est conservée pendant le stockage à -20 °C et -80 °C (Figure 24 C, D, E et F). En effet, 90 à 100 % de l'activité enzymatique de l'HPLwt est conservée durant 5 semaines lorsque l'enzyme est stockée à -20°C ou à -80 °C en présence de 10 %, 20 % ou 30 % de glycérol (Figures 24 C et E), et 80 à 100 % de l'activité de l'HPLdel est préservée dans les mêmes conditions (Figures 24 D et F). Nous avons choisi de conserver les enzymes, l'HPLwt et l'HPLdel, à une température de -80°C en présence de 10 % de glycérol. Des résultats similaires ont été signalés par Long et al. (2010) pour la conservation de l'activité enzymatique de l'HPL purifiée à partir des feuilles d'*Armanthus tricolor*. De plus, Suurmeijer et al. (2000) ont signalé que la présence de 10 % de glycérol (v/v) a permis la préservation de l'activité enzymatique de l'HPL pure de tomate lors du stockage à -20°C durant 20 jours par rapport à un témoin sans glycérol.

## **7. Effet de composés chimiques sur les activités de l'HPLwt et de l'HPLdel**

Nous avons testé l'effet de composés chimiques (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glycine et glycérol) sur l'HPLwt et l'HPLdel purifiées. En effet, l'addition de composés chimiques à l'enzyme pure peut provoquer des modifications de l'interaction entre la protéine et le solvant aqueux induisant des changements de conformation de la protéine. Ces changements peuvent avoir des effets sur la stabilité et l'activité de l'enzyme. Les deux HPL étant plus efficaces sur le 13-HPOT, les activités enzymatiques ont été mesurées uniquement sur ce substrat.

### **7.1- Effet de la concentration en sel**

L'effet de sels (NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à différentes concentrations (0 ; 0,15 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 M) sur l'activité spécifique des deux HPL recombinantes a été étudié (Figure 25).



**Figure 25: Effet de la concentration en sels sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F).**

L'activité spécifique résiduelle (%) est calculée en effectuant le rapport de l'activité spécifique ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) en présence de sels sur l'activité spécifique en absence de sels. Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$  DS. Les barres surmontées d'une lettre différente sont significativement différentes au seuil de 0,1%.

Une augmentation significative de l'activité spécifique de l'HPLwt est observée en présence de NaCl pour des concentrations allant de 0,15 à 0,5 M, de KCl pour des concentrations allant de 0,15 à 1,5 M, et de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour des concentrations allant de 0,15 M à 1 M, par rapport aux témoins sans sels (Figure 25 A, C, E). L'activité spécifique maximale est obtenue en présence de 0,5 M NaCl (augmentation de 24,5 % par rapport au témoin sans sel).

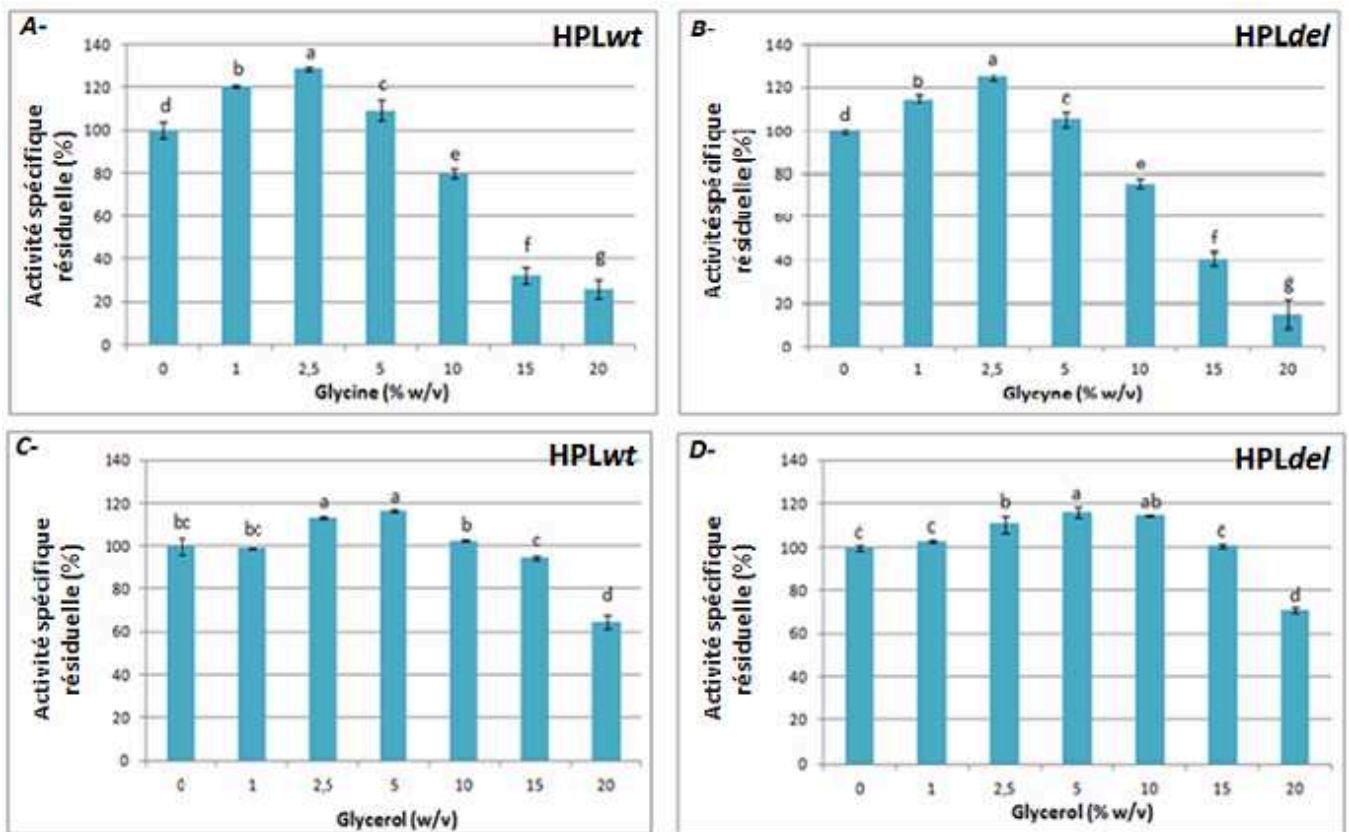
Les résultats obtenus concernant l'HPLdel montrent qu'à la différence de ceux obtenus pour l'HPLwt, toutes les concentrations en sels testées (à l'exception du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M) augmentent significativement l'activité de l'HPLdel par rapport à celle du témoin (Figure 25 B, D, E). L'activité spécifique maximale est obtenue en présence de 0,25 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (augmentation de 53,2 % par rapport au témoin sans sel).

L'influence des sels sur l'activité enzymatique pourrait être dû à l'effet bien connu des sels sur les protéines en solution (Arakawa et Timasheff, 1982; Collins, 2004; Ruckenstein et Shulgin, 2006). En effet, à faible concentration les sels augmentent la solubilité des protéines en milieu aqueux (effet « salting in ») alors qu'à forte concentration, ils entraînent une diminution de la solubilisation des protéines en milieu aqueux (effet « salting-out »).

Des résultats similaires ont été obtenus par Mu et al. (2012) avec l'HPL recombinante de pomme de terre (augmentation de 25 % de l'activité en présence de 1 M NaCl ou KCl) et par Koeduka et al. (2003) avec l'HPL recombinante d'orge (augmentation de l'activité proportionnelle à l'augmentation de la concentration en KCl jusqu'à 2 M). Koeduka et al. (2003) suggèrent également que les sels produisent un réarrangement dans l'espace à proximité de l'hème dans le site actif, modifiant ainsi la conformation de l'enzyme.

## **7.2- Effet de la concentration en glycine et glycérol**

L'effet de la glycine et du glycérol à différentes concentrations (0 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20% w/v) a également été testé sur l'activité des deux HPL (Figure 26).



**Figure 26: Effet de la concentration en glycérol et en glycine sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A et C) et de l'HPLdel (B et D).**

L'activité spécifique résiduelle (%), est calculée en effectuant le rapport de l'activité spécifique ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) en présence de glycine ou de glycérol sur l'activité spécifique en absence de ces deux composés chimiques. Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations  $\pm$  DS. Les barres surmontées d'une lettre différente sont significativement différentes au seuil de 0,1%.

Une augmentation significative de l'activité enzymatique des deux enzymes est observée en présence de glycine à des concentrations comprises entre 1 % et 5 % (w/v) (Figure 26 A et B). Les activités spécifiques maximales de l'HPLwt (augmentation de 23,7 %) et de l'HPLdel (augmentation de 25,1 %) ont été obtenues en présence de 2,5 % (w/v) de glycine dans le milieu réactionnel.

En présence de 5 % (w/v) glycérol, l'activité spécifique est augmentée de 16,4 % pour l'HPLwt (Figure 26C) et de 15,9 % pour l'HPLdel (Figure 26D). Pour des concentrations supérieures à 10 % en glycérol pour l'HPLwt et à 15 % pour l'HPLdel, l'activité spécifique



est significativement diminuée. Ben Akacha et al., (2010) ont signalé que l'addition de glycine (20 % w/v) augmente l'activité spécifique de l'HPL de menthe de 2,8 fois alors que l'ajout de glycérol (3 % w/v) réduit l'activité spécifique de 10 %.

### 7.3- Paramètres cinétiques en présence des composés chimiques

Les paramètres cinétiques de l'HPLwt (Tableau 7A) et de l'HPLdel (Tableau 7B) ont été déterminés en présence du composé chimique (respectivement glycine 2,5% (w/v) et Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25M) pour lequel la plus forte augmentation de l'activité spécifique est observée (Tableau 7).

**Tableau 7 : Paramètres cinétiques de (A) l'HPLwt en présence et en absence de glycine 2,5% (w/v) et (B) l'HPLdel en présence ou en absence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25M.**

**A-**

Substrats		Km (μM)	Vm (nmol.s <sup>-1</sup> )	kcat (s <sup>-1</sup> )	kcat/Km (s <sup>-1</sup> /μM <sup>-1</sup> )
<b>13-HPOD</b>	Témoin*	43,10 ± 4,46	0,48 ± 0,06	26,38 ± 3,01	0,62
	Essai* + glycine 2,5%	64,41 ± 1,70	0,78 ± 0,03	42,37 ± 1,75	0,65
<b>13-HPOT</b>	Témoin*	152,75 ± 10,36	10,35 ± 0,68	564,95 ± 36,89	3,71
	Essai* + glycine 2,5%	138,28 ± 7,48	10,86 ± 0,2	587,40 ± 11,98	4,25

\*Les témoins ont été déterminés avec du tampon phosphate 50 mM pH 7,5.

**B-**

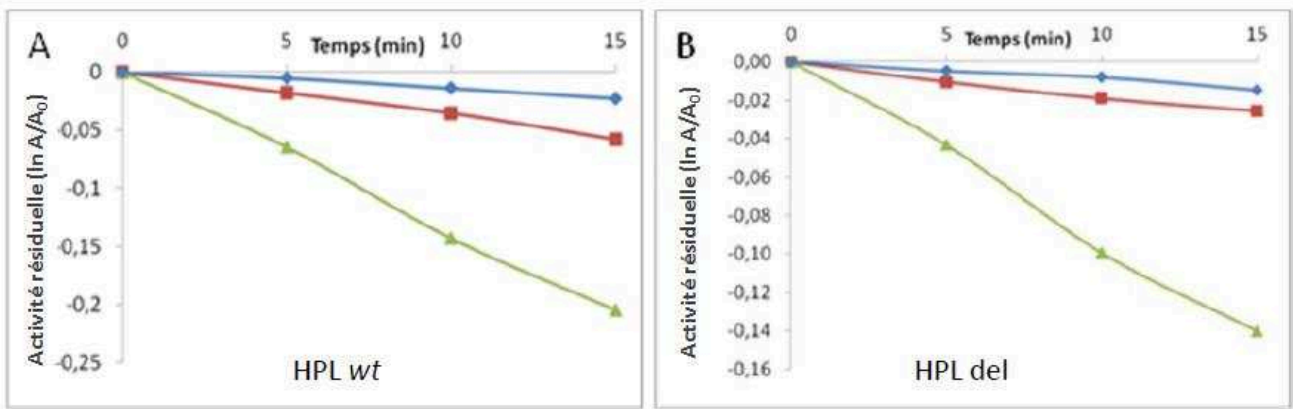
Substrats		Km (μM)	Vm (nmol.s <sup>-1</sup> )	kcat (s <sup>-1</sup> )	kcat/Km (s <sup>-1</sup> /μM <sup>-1</sup> )
<b>13-HPOD</b>	Témoin*	43,22 ± 7,87	0,34 ± 0,01	17,89 ± 0,53	0,43
	Essai* + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25M	61,28 ± 8,27	0,89 ± 0,03	46,83 ± 1,37	0,76
<b>13-HPOT</b>	Témoin*	173,85 ± 27,70	7,65 ± 0,07	402,62 ± 3,66	2,36
	Essai* + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,25M	243,15 ± 41,02	16,03 ± 0,58	843,26 ± 31,31	3,47

\*Les témoins ont été déterminés avec du tampon phosphate 50 mM pH 7,5.

Les deux enzymes ont un  $k_{cat}$  plus élevé pour le 13-HPOD et le 13-HPOT en présence de glycine pour l'HPLwt et de  $Na_2SO_4$  pour l'HPLdel par rapport aux contrôles : une augmentation de 1,83 fois pour le 13-HPOD et de 1,04 fois pour le 13-HPOT est obtenue pour l'HPLwt en présence de glycine (Tableau 7A), et une augmentation de 2,62 fois pour le 13-HPOD et de 2,1 fois pour le 13-HPOT est obtenue pour l'HPLdel en présence de  $Na_2SO_4$  (Tableau 7B). De plus, l'efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_m$ ) de l'HPLwt est augmentée de 22 % pour le 13-HPOD et de 15,5 % pour le 13-HPOT en présence de glycine (2,5 %) et celle de l'HPLdel est augmentée de 85 % pour le 13-HPOD et de 50 % pour le 13-HPOT en présence de  $Na_2SO_4$  (0,25 M). Des résultats similaires ont été reportés par Koeduka et al. (2003) qui ont montré qu'en présence de KCl, l'HPL d'orge catalyse le clivage du substrat 3,4 fois plus rapidement qu'en absence de KCl.

#### **7.4- Inactivation**

Nous avons étudié l'effet des composés chimiques sur l'inactivation des deux HPL. Nous avons déterminé les cinétiques d'inactivation de l'HPLwt en absence et en présence de glycine (2,5%) ou de NaCl (0,5M), et de l'HPLdel en absence et en présence de  $Na_2SO_4$  (0,25M) ou de NaCl (1M) (Figure 27).



**Figure 27: Inactivation de l'HPLwt (A) en présence de glycine 2,5 % (v/v) ou de NaCl 0,5 M et de l'HPLdel (B) en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M ou de NaCl 1 M.**

A : l'inactivation de l'HPLwt est évaluée à 25°C dans du tampon phosphate 50mM à pH 7,5 en absence de composé chimique ajouté (—●—) ainsi qu'en présence de NaCl 0,5M (—■—) ou de glycine 2,5% (v/v) (—▲—).

B : l'inactivation de l'HPLdel est évaluée à 25°C dans du tampon phosphate 50mM à pH 7,5 en absence de composé chimique ajouté (—●—) ainsi qu'en présence de NaCl 1M (—■—) ou de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25M (—▲—).

*A<sub>0</sub> et A représentent l'activité spécifique de l'HPL (μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines) respectivement à t=0 min et t=5 ou 10 ou 15 min.*

Nous observons que la glycine (2,5%) et le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M) sont les composés chimiques qui ont le plus d'effet sur l'inactivation de l'HPLwt et l'HPLdel respectivement.

A partir des graphes de la figure 26, la constante d'inactivation et le temps de demi-vie des deux HPL en absence et en présence de composés chimiques ont été calculés (Tableau 8).

**Tableau 8: Inactivation de (A) l'HPLwt en présence de glycine 2,5 % (w/v) ou de NaCl 0,5 M et de (B) l'HPLdel en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M ou de NaCl 1 M.**

<b>A-</b>			
<b>HPLwt</b>	<b>Contrôle*</b>	<b>Contrôle* + glycine 2,5 % (w/v)</b>	<b>Contrôle*+ NaCl 0,5 M</b>
<b>K<sub>inactivation</sub><sup>a</sup></b>	0,0013 (±0,0002)	0,0136 (±0,0007)	0,0054 (±0,0019)
<b>t<sub>1/2</sub><sup>b</sup> (h)</b>	8,8816	0,8486	2,1384
<b>B-</b>			
<b>HPLdel</b>	<b>Contrôle*</b>	<b>Contrôle* + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M</b>	<b>Contrôle*+ NaCl 1 M</b>
<b>K<sub>inactivation</sub><sup>a</sup></b>	0,0009 (±0,0001)	0,0093 (±0,0006)	0,0019 (±0,0002)
<b>t<sub>1/2</sub><sup>b</sup> (h)</b>	12,8301	1,2421	6,1130

\*Le contrôle représente le tampon phosphate 50mM pH 7,5.

<sup>a</sup> La constante d'inactivation ( $K_{inactivation}$ ) est calculée selon la formule :

$$\ln(A/A_0) = -K_{inactivation} / t \text{ (min)}$$

où  $A_0$  et  $A$  représentent l'activité spécifique de l'HPL ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) respectivement à  $t=0$  min et  $t=5$  ou  $10$  ou  $15$  min.

<sup>b</sup> Le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) est le nombre d'heures au bout desquelles 50% de l'activité est retrouvée

$$t_{1/2} = \ln(2) / K_{inactivation}$$

Les résultats représentent la moyenne de 3 déterminations  $\pm$  DS.

Le temps de demi-vie de l'HPLwt diminue de 8,8h à 0,84h (50min) en présence de glycine (2,5%) et à 2,1h en présence de NaCl (0,5M). Le temps de demi-vie de l'HPLdel est également diminué en présence de sels puisqu'il passe de 12,8h à 1,2h en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M) et à 6,1h en présence de NaCl (1M).

Toutefois, la diminution de l'activité spécifique des deux HPL au cours du temps en présence des différents composés chimiques est minime au vu de l'augmentation de l'activité spécifique qu'ils engendrent. Par exemple, le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M) entraîne une perte d'activité spécifique de l'HPLdel de 4% au bout de 5min, alors qu'il permet une hausse de 53,2% de l'activité à  $t_0$ . De même la présence de glycine (2,5% w/v) augmente de 28,7% l'activité de

l'HPLwt à t0, alors que la perte est seulement de 6% au bout de 5 min d'incubation avec ce composé.

Ainsi, l'ajout des composés chimiques dans le milieu réactionnel pourrait permettre de diminuer la quantité d'enzyme utilisée lors de la synthèse des aldéhydes à note verte.

## **8. Effet de composés chimiques sur la production d'aldéhydes en C6**

Nous avons testé l'effet des composés chimiques dans le milieu réactionnel sur la production d'aldéhydes en C6 ((Z)-hex-3-èneal et hexanal).

### **8.1- Production de (Z)-hex-3-èneal par l'HPLwt ou l'HPLdel en présence de glycine, de NaCl ou de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.**

La production de (Z)-hex-3-èneal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOT en présence de glycine (2,5%), NaCl (0,5M) ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M) a été évaluée (Tableau 9).

**Tableau 9: Production de (Z)-hex-3-ènal par l'HPLwt en présence de glycine 2,5 % (w/v) ou de NaCl (0,5 M) et par l'HPLdel en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M.**

	HPL recombinantes (U.mL <sup>-1</sup> )	13-HPOT (mM)	(Z)-hex-3- ènal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
<b>HPLwt</b>					
<b>Témoin</b>	0,5	4	4,39 ± 0,38	73	10
<b>+ Glycine (2,5 %)</b>	0,5	4	2,02 ± 0,68	50	5
<b>+ NaCl (0,5 M)</b>	0,5	4	1,83 ± 0,51	46	5
<b>HPLdel</b>					
<b>Témoin</b>	0,5	4	1,80 ± 0,05	45	15
<b>+ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M)</b>	0,5	4	1,9 ± 0,87	47	10

Les réactions ont été réalisées avec différentes concentrations de 13-HPOT dans 1 mL de milieu réactionnel (tampon phosphate 50 mM, pH 7,5, incubé à 10 °C) durant un temps de réaction optimum pour chaque quantité d'enzyme. Après extraction le (Z)-hex-3-ènal produit a été identifié par CPG-SM et CPG-DIF. Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations ± DS.

L'ajout de glycine dans le milieu réactionnel permet de produire 2,02 ± 0,68 mM de (Z)-hex-3-ènal, ce qui correspond à un taux de conversion de 50 %. Ce taux est plus faible que celui obtenu sans glycine (73 %). Toutefois, une quantité non négligeable de (E)-hex-2-ènal a été détectée dans le milieu réactionnel. La glycine pourrait favoriser l'isomérisation du (Z)-hex-3-ènal en (E)-hex-2-ènal. La quantité de (Z)-hex-3-ènal sommée à celle du (E)-hex-2-ènal est de 2,56 mM ce qui correspond à un taux de conversion de 64 %. Nous avons ensuite testé l'ajout de NaCl (0,5 M) dans le milieu réactionnel. Cette condition expérimentale n'a pas permis l'isomérisation du (Z)-hex-3-ènal en (E)-hex-2-ènal. Cependant la quantité de (Z)-hex-3-ènal obtenue (1,83 ± 0,51 mM) est plus faible que celle obtenue avec le témoin et correspond à un taux de conversion de 46 %.

La biotransformation de 4 µmol de 13-HPOT par 0,5 U.mL<sup>-1</sup> d'HPLdel en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a permis de produire 1,9 ± 0,87 mM de (Z)-hex-3-ènal, correspondant à un taux de

conversion de 47 %. Dans ces conditions, une quantité de (Z)-hex-3-ène équivalente à celle produite lors de l'expérience témoin est obtenue mais en utilisant deux fois moins d'enzyme.

La présence de glycine, de NaCl ou de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans le milieu réactionnel n'a pas permis d'améliorer la production de (Z)-hex-3-ène.

## 8.2- Production d'hexanal par l'HPLwt ou l'HPLdel en présence de glycine, de NaCl ou de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Bien que l'effet des composés chimiques sur l'activité des deux enzymes n'ait été étudié que sur le 13-HPOT, nous avons testé l'influence de la glycine (2,5%), du NaCl (0,5M) et du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25M) sur la production d'hexanal (Tableau 10).

**Tableau 10: Production d'hexanal par l'HPLwt en présence de glycine 2,5 % (w/v) ou de NaCl (0,5 M) et par l'HPLdel en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M.**

	HPL recombinantes (U.mL <sup>-1</sup> )	13-HPOT (mM)	Hexanal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
<b>HPLwt</b>					
<b>Témoin</b>	0,5	6	5,02 ± 0,05	84	15
<b>+ Glycine (2,5 %)</b>	0,5	6	5,2 ± 0,57	87	20
<b>+ NaCl (0,5 M)</b>	<b>0,5</b>	<b>6</b>	<b>5,67 ± 0,38</b>	<b>94</b>	<b>10</b>
<b>HPLdel</b>					
<b>Témoin</b>	0,5	4	2,74 ± 0,10	68,5	10
<b>+ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,25 M)</b>	0,5	4	3,06 ± 0,26	77	15

Les réactions ont été réalisées avec différentes concentrations de 13-HPOT dans 1 mL de milieu réactionnel (tampon phosphate 50 mM, pH 7,5, incubé à 25 °C) durant un temps de réaction optimum pour chaque quantité d'enzyme. Après extraction l'hexanal produit a été identifié par CPG-SM et CPG-DIF. Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations ± DS.

La réaction en présence de glycine ou de NaCl a été réalisée avec  $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$  d'HPLwt et  $6 \text{ mM}$  de 13-HPOD. Dans ces conditions  $5,2 \pm 0,57 \text{ mM}$  et  $5,67 \pm 0,38 \text{ mM}$  d'hexanal ont été formés en présence de glycine (2,5 %) et de NaCl (0,5 M) respectivement, correspondant à des taux de conversion respectifs de 87 % et 94 %. Une augmentation du taux de production d'hexanal de 1,04 fois et de 1,13 fois en présence de glycine ou de NaCl a été obtenue par rapport au contrôle. Quand nous utilisons  $6 \text{ mM}$  de 13-HPOD et  $1 \text{ U.mL}^{-1}$  d'HPLwt sans composés chimiques (tableau 4), la quantité maximale d'hexanal produite est de  $5,61 \pm 0,48 \text{ mM}$ , correspondant à un taux de conversion de 93,5 %. La présence de NaCl permet d'obtenir un taux équivalent de conversion tout en diminuant la quantité d'enzyme utilisée de moitié.

L'utilisation de  $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$  d'HPLdel et de  $4 \text{ mM}$  de 13-HPOD en présence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a permis d'augmenter le taux de conversion par rapport au témoin (Tableau 10). Toutefois ce taux (77 %) reste plus faible que celui obtenu avec l'HPLwt (94 %).



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Dans le but d'utiliser des enzymes recombinantes dans des procédés de production de molécules à note verte, nous avons cloné une 13-HPL à partir d'olives de la variété Leccino et nous l'avons exprimé chez E.coli. L'analyse de la répartition de l'enzyme a montré qu'une quantité plus importante d'enzyme est retrouvée dans le culot de lyse. Afin d'essayer d'améliorer la solubilisation de l'enzyme, nous avons supprimé la séquence d'adressage de l'HPLwt à la membrane des chloroplastes et produit une nouvelle enzyme, l'HPLdel. Les deux enzymes ont été purifiées et caractérisées biochimiquement. Elles présentent une activité maximale à pH 7,5 et à 25°C et agissent plus efficacement sur le 13-HPOT. Nous avons ensuite utilisé l'HPLwt et l'HPLdel pour la biotransformation des 13-HPOD et 13-HPOT en hexanal et (Z)-hex-3-èneal respectivement. Les conditions de biosynthèse ont été optimisées à l'échelle du laboratoire. L'HPLwt et l'HPLdel se sont avérées être des catalyseurs efficaces puisque leur action a permis d'atteindre des taux de conversion respectifs de 93,5 % et 68 % pour la production d'hexanal, et de 73 % et 45 % pour la production de (Z)-hex-3-èneal. Par ailleurs, l'étude de la stabilité des enzymes a montré que la présence de glycérol 10% (v/v) permet la conservation de l'activité de l'HPLwt et de l'HPLdel durant cinq semaines de stockage à -80°C. Grâce à ce moyen de conservation, l'HPL pourra être utilisée pour la production de molécules à note verte, plusieurs semaines après sa purification ce qui n'était pas le cas actuellement. De plus, l'ajout de composés chimiques tels que le KCl, le NaCl, le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la glycine et le glycérol permet d'augmenter l'efficacité des deux enzymes. Toutefois, seule l'addition de NaCl 0,5 M dans le milieu réactionnel de l'HPLwt s'avère être intéressante puisqu'elle permet d'obtenir un taux de production d'hexanal de 94% en nécessitant deux fois moins d'enzyme.

Afin d'envisager l'utilisation de l'HPL recombinante d'olive dans un processus industriel de biotransformation, nous allons dans un premier temps réaliser, au laboratoire,

une production à plus grande échelle à l'aide d'un fermenteur. L'adaptation des conditions réactionnelles sur des plus grandes quantités, nous permettra ensuite d'intégrer l'HPL recombinante d'olive dans un processus de biocatalyse complet faisant intervenir une lipase commerciale et une lipoxygénase commerciale. Pour proposer le processus le mieux adapté et le plus performant, différentes conditions de biotransformations seront testées : composition du milieu réactionnel, température, pH, durée des réactions enzymatiques... Nous allons également étudier l'utilisation simultanée, en combinaison ou séquentielle des différentes enzymes, ainsi que différentes méthodes de récupération des aldéhydes en C6 (extraction liquide-liquide en utilisant différents solvants permettant de conserver l'appellation « molécules aromatisants naturelles », entraînement par un flux gazeux puis piégeage des molécules sur un réfrigérant ou encore par distillation).

Il est indispensable de purifier au préalable une quantité plus importante d'HPL recombinante. Les résultats obtenus ont montré que la plus grande quantité d'HPL produite est incorporée dans les corps d'inclusion. Nous allons dans un premier temps essayer de récupérer l'enzyme présente dans les corps d'inclusion en réalisant différents traitements à l'urée. S'il nous est impossible d'obtenir l'enzyme active après extraction par l'urée, nous essaierons d'améliorer les conditions d'expression afin de récupérer plus d'enzyme dans le surnageant de lyse. Différentes températures de culture pré- et post-induction par l'IPTG seront testées en combinaison avec différentes durées de culture et différentes concentrations d'inducteur. Nous envisageons également de tester un système d'expression bactérien différent, tel que le système d'expression T7 combinant les vecteurs pET et différentes souches E.coli (la souche ArcticExpress DE3, la souche BL21 Star DE3, la souche C41 DE3, la souche JM109 DE3 et la souche Rosetta DE3). L'optimisation de la production de l'HPL recombinante permettra d'obtenir de plus grandes quantités d'enzyme, et d'envisager son utilisation dans un processus industriel de biotransformation. L'immobilisation de l'enzyme

sur un support insoluble (gel de polyacrylamide, billes acryliques activées à l'oxirane, billes d'alginate de calcium, ou encore hydrogels hybrides composés de chitosan et de biopolymères) pourrait également être envisagée, ce qui permettrait une ré-utilisation de l'enzyme.

## Références bibliographiques

**Ali M., Sugimoto K., Ramadan A., Arimura G.,** (2013) Memory of plant communications for priming anti-herbivore responses. *Sci rep.*, 3, 1872-1872.

**Andrianarison RH., Beneytout JL., Tixier M.,** (1989) An Enzymatic Conversion of Lipoxygenase Products by a Hydroperoxide Lyase in Blue-Green Algae (*Oscillatoria* sp.). *Plant Physiol.*, 91, 1280-1287.

**Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Espoto S., Montedoro G.,** (2004) Volatile compounds in virgin olive oil : occurrence and their relationship with the quality. *J chromatogr A*, 1054 (1-2), 17-21.

**Arakawa T., Timasheff SN.,** (1982) Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry.*, 21, 6545-6552.

**Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Boland W., Takabayashi J.,** (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature.*, 406, 512-515.

**Arimura G., Shiojiri K., Karban R.,** (2010) Acquired immunity to herbivory and allelopathy caused by airborne plant emissions. *Phytochemistry.*, 71 (14-15), 1642-1649.

**Atwal AS., Bisakowski B., Richard S., Robert N., Lee B.,** (2005) Cloning and secretion of tomato hydroperoxide lyase in *Pichia pastoris*. *Process Biochem.*, 40, 95-102.

**Baldwin IT., Kessler A., Halitschke R.,** (2002) Volatile signaling in plant–plant–herbivore interactions: what is real?. *Curr Opin Plant Biol.*, 5, 351-354.

**Bate NJ., Sivasankar S., Moxon C., Riley JMC., Thompson JE., Rothstein SJ.,** (1998) Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol.*, 117(4), 1393–1400.

**Ben Akacha N., Gargouri M.,** (2009) Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide-lyase from olive leaves and alcohol-dehydrogenase from yeast in liquid/gas reactor. *Process Biochem.*, 44, 1122-1127.

- Ben Akacha N., Karboune S., Gargouri M., Kermasha S.,** (2010) Activation and stabilization of the hydroperoxide lyase enzymatic extract from mint leaves (*Mentha spicata*) using selected chemical additives. *Appl Biochem Biotechnol.*, 160, 901-911.
- Blée E.,** (2002) Impact of phyto-oxylinins in plant defense. *Trends in Plant Science.*, 7 (7), 315-321.
- Blée E.,** (1998) Phytooxylinins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res.*, 37 (1), 33-72.
- Bourel G., Nicaud JM., Nthangeni B., Santiago-Gómez P., Belin JM., Husson F.,** (2004) Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehydes. *Enzyme Microb Tech.*, 35, 293-299.
- Bradford MM.,** (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254.
- Bruce TJA., Wadhams LJ., Woodcock CM.,** (2004) Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.*, 10 (6), 1360-1385.
- Campeol E., Flamini G., Cioni PL., Morelli I.,** (2003) Volatile fractions from three cultivars of *Olea europaea* L. collected in two different seasons. *J Agric Food Chem.*, 51, 1994-1999.
- Collins KD.,** (2004) Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods.*, 34, 300–311.
- Croft KPC., Juttner F., Slusarenko AJ.,** (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol.*, 101, 13-24.
- Delcarte J., Fauconnier ML., Hoyaux P., Jacques P., Thonart P., Marlier M.,** (2000) L'hydroperoxyde lyase. *Biotechnol Agron Soc Environ.*, 4 (3), 157-167.
- Fauconnier ML., Marlier M.,** (1997) Fatty acid hydroperoxides pathways in plants. A review. *Grasas y Aceites.*, 48 (1), 30-37.
- Fauconnier ML., Perez AG., Sanz C., Marlier M.,** (1997) Purification and characterization of tomato leaf (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hydroperoxyde lyase. *J Agric Food Chem.*, 45 (11), 4232–4236.
- Feussner I., Kühn H., Wasternack C.,** (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.*, 6, 268-273.
- Feussner I., Wasternack C.,** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol.*, 53, 275-297.

- Froehlich JE., Itoh A., Howe GA.,** (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol.*, 125, 306-317.
- Frost CJ., Mescher MC., Dervinis C., Davis JM., Carlson JE., De Moraes CM.,** (2008) Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. *New Phytologist.*, 180 (3), 722-734.
- Fukushige H., Hildebrand DF.,** (2005) Watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase greatly increases C6 aldehyde formation in transgenic leaves. *J Agric Food Chem.*, 53 (6), 2046-2051.
- Gardner HW., Weisleder D., Plattner RD.,** (1991) Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, *glycine max.* *Plant physiol.*, 97 (3), 1059-1072.
- Gargouri M., Ben Akacha N., Kotti F., Ben Rejeb I.,** (2008) Lipoxygenase pathway: valorization of plant oils and aroma biosynthesis. *Biotechno Agron Soc Environ.*, 12 (2), 185-202.
- Gargouri M., Drouet P., Legoy MD.,** (2004) Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids. *J biotechnol.*, 111, 59–65.
- Gargouri M., Legoy MD.,** (1998) Biosynthesis and analysis of 3Z-nonenal. *Biotechnol lett.*, 20 (1), 23-26.
- Gianfreda L., Scarfi MR.,** (1991) Enzyme stabilization: state of the art. *Mol Cell Biochem.*, 100, 97–128.
- Gigot C.,** (2011) Thèse de Doctorat, Développement d'un procédé biotechnologique de production de molécules à note verte à partir de feuilles de betteraves, Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech.
- Gigot C., Ongena M., Fauconnier ML., Muhovski Y., Wathlet JP., Du Jardin P., Thonart P.,** (2012) Optimization and scaling up of a biotechnological synthesis of natural green leaf volatiles using *Beta vulgaris* hydroperoxide lyase. *Process Biochem.*, 47, 2547-2551.
- Gigot C., Ongenna M., Fauconnier ML., Wathlet JP., Du Jardin P., Thonart P.,** (2010) The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnol Agron Soc Environ.*, 14 (3), 451-460.
- Göbel C., Feussner I., Schmidt A., Scheel D., Sanchez-Serrano J., Hamberg M.,** (2001) Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem.*, 276, 6267-6273.

- Gomi K., Yamasaki Y., Yamamoto H., Akimitsu K.,** (2003) Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6- volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in Citrus. *J Plant Physiol.*, 160, 1219–1231.
- Grechkin A.,** (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res.*, 37, 317-352.
- Grechkin AN.,** (2002) Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. *Prost Ag Oth Lipid M.*, (2002) 68–69, 457–470.
- Grechkin AN., Hamberg M.,** (2004) The “heterolytic hydroperoxide lyase” is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochim Biophys Acta.*, 1636, 47-58.
- Halitschke R., Ziegler J., Keinanen M., Baldwin IT.,** (2004) Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in *Nicotiana attenuata*. *Plant J.*, 40, 35-46.
- Hall CE., Karboune S., Florence H., Kermasha S.,** (2008) Stabilization of an enzymatic extract from *Penicillium camemberti* containing lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities. *Proc Biochem.*, 43, 258-264.
- Hassan MN., Zainal Z., Ismail I.,** (2015) Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol J.*, 1-13.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Matsui K.,** (1988) Concentration of hydroperoxide lyase activities in root of cucumber seedlings. *J Biosci.*, 43c, 308-310.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Matsui K., Kitamura A.,** (1992) Expression of Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase Activities in Tomato Fruits. *J Biosci.*, 47c, 369 -374.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Sekiya J.,** (1986) Fatty acid hydroperoxide lyase in plant tissues. Volatiles aldehyde formation from linoleic and linolenic acid. *Biogenesis of Aromas, ACS Symposium Series.*, 317 (13), 167-175.
- Hauml UA., Silke N., Lerch K., Muheim A.,** (2001) Hydroperoxide lyase, US Patent No. 6238898.
- Heitz T., Dhondt S., Gouzerh G., Geoffroy P., Legrand M.,** (2002) Des dérivés d'acides gras dans la résistance des plantes aux attaques microbiennes : à la recherche d'acyl hydrolases impliquées dans la synthèse des oxylipines. *OCL Journal.*, 9 (1), 37-42.
- Hernández ML., Mancha M., Martínez-Rivas JM.,** (2005) Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive. *Phytochem.*, 66, 1417-1426.



**Hornostaj AR., Robinson DS.,** (2000) Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds. *Food chem.*, 71 (2), 241-247.

**Howe GA., Schillmiller AL.,** (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Curr Opin Plant Biol.*, 5, 230-236.

**Huang FC., Studart-Witkowski C., Schwab W.,** (2010) Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana benthamiana* using a viral vector system. *Plant Biotechnol J.*, 8, 783-795.

**Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H.,** (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother.*, 47, 565-573.

**Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K.,** (2001) The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 13, 2191–2209.

**Itoh A., Vick BA.,** (1999) The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower. *Biochim Biophys Acta.*, 1436, 531-540.

**Koeduka T., Stumpe M., Matsui K., Kajiwara T., Feussner I.,** (2003) Kinetics of barley FA hydroperoxide lyase are modulated by salts and detergents. *Lipids.*, 38 (11), 1167-1172.

**Kubo I., Fujita K., Kubo A., Nihei K., Ogura T.,** (2004) Antibacterial Activity of Coriander Volatile Compounds against *Salmonella choleraesuis*. *J Agric Food Chem.*, 52 (11), 3329–3332

**Kishimoto K., Matsui K., Ozawa R., Takabayashi J.,** (2005) Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 46, 1093-1102.

**Kuroda H., Oshima T., Kaneda H., Takashio M.,** (2005) Identification and functional analyses of two cDNAs that encode fatty acid 9-/13-hydroperoxide lyase (CYP74C) in rice, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 69 (8), 1545-1554.

**Lanciotti R., Gianotti A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni ME., Gardini F.,** (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci Tech.*, 15, 201–208.

**Lee DS., Nioche P., Hamberg M., Raman CS.,** (2008) Structural insights into the evolutionary paths of oxylin biosynthetic enzymes. *Nature.*, 455, 363–368.

**Leone A., Bleve-Zacheo T., Gerardi C., Melillo MT., Leo L., Zacheo G.,** (2006) Lipoxygenase involvement in ripening strawberry. *J Agric Food Chem.*, 54, 6835-6844.

**Li L., Chang Z., Pan Z., Fu ZQ., Wang X.,** (2008) Modes of heme binding and substrate access for cytochrome P450 CYP74A revealed by crystal structures of allene oxide synthase. *P Natl Acad Sci USA.*, 105 (37), 13883–13888.

**Liavonchanka A., Feussner I.,** (2006) Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol.*, 163, 348-357.

**Liu Q., Hua Y., Kong X., Zhang C., Chen Y.,** (2013) Covalent immobilization of hydroperoxide lyase on chitosan hybrid hydrogels and production of C6 aldehydes by immobilized enzyme. *J Mol Cat B: Enzym.*, 95, 89- 98.

**Long Z., Kong X., Zhang C., Hua Y.,** (2010) Stability of hydroperoxide lyase activity from *Amaranthus tricolor* (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves: influence of selected additives. *J Sci Food Agric.*, 90, 729-734.

**Marczy JS., Németh AS., Samu Z., Hager-Veress A., Szajani B.,** (2002) Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxid lyase enzymes. *Biotechnol Lett.*, 24, 1673-1675.

**Martini D., Iacazio G.,** (1995). «Les lipoxygénases et les voies métaboliques associées». *Oléagineux Corps gras Lipides.*, 2 (5), 374-385.

**Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A.,** (1992) Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide. *J Agric Food Chem.*, 40 (2), 175–178.

**Matsui K., Minami A., Hornung E., Shibata H., Kishimoto K., Ahnert V., Kindl H., Kajiwara T., Feussner I.,** (2006) Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochem.*, 67, 649-657.

**Matsui K., Miyahara C., Wilkinson J., Hiatt B., Knauf V., Kajiwara T.,** (2000) Fatty hydroperoxide lyase in tomato fruits : cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *E.coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 64, 1189-1196.

**Matsui K., Shibata Y., Tateba H., Hatanaka A., and Kajiwara T.,** (1997) Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Biosci Biotech Biochem.*, 61, 199-201.

**Matsui K., Shibutani M., Hase T., Kajiwara, T.,** (1996) Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett.*, 394, 21-24.

**Matsui K., Toyota H., Kajiwara T., Kakuno T., Hatanaka A.,** (1991) Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves. *Phytochemistry.*, 30, 2109-2113.

**Mita G., Quarta A., Fasano P., De Paolis A., Di Sansebastian GP., Perrotta C., Iannacone R., Belfield E., Hughes R., Tsesmetzis N., Casey R., Santino A.,** (2005) Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies. *J Exp Bot.*, 56, (419), 2321–2333.

**Mu W., Xue Q., Jiang B., Hua Y.,** (2012) Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of *Solanum tuberosum* hydroperoxide lyase. *Eur Food Res Technol.*, 234, 723-731.

**Nakamura S., Hatanaka A.,** (2002) Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Agric Food Chem.*, 50, 7639-7644.

**Nakashima A., Von Reuss SH., Tasaka H., Nomura M., Mochizuki S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Boland W., Takabayashi J., Matsui K.,** (2013) Traumatins- and Dinortraumatins-containing Galactolipids in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.*, 288 (36), 26078–26088.

**Németh ÁS., Márczy JS., Samu Z., Hágger-Veress Á., Szajáni B.,** (2004) Biocatalytic production of 2 (E)-hexenal from hydrolysed linseed oil. *Enzyme Microb Tech.*, 34, 667-672.

**Noordermeer MA., Van der Goot W., Van Kooji AJ., Veldsink JW., Veldink GA., Vliegthart JFG.,** (2002) Development of a biocatalytic process for the production of C6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase. *J Agri Food Chem.*, 50, 4270-4274.

**Noordermeer MA., Veldink GA., Vliegthart JFG.,** (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chem Bio Chem.*, 2, 494-504.

**Padilla MN., Hernández L., Pérez AG., Sanz C., Martínez-Rivas JM.,** (2010) Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. *J Agri Food Chem.*, 58, 5649-5657.

**Palmieri-Thiers C., Canaan S., Brunini V., Lorenzi V., Tomi F., Desseyn JL., Garscha U., OliwEH., Berti L., Maury J.,** (2009) A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochim Biophys Acta.*, 1791, 339-346.

**Pérez AG., Sanz C., Olias R., Olias JM.,** (1999) LOX and HPL activities in ripening strawberry fruits. *J Agric Food Chem.*, 47, 249-253.

**Prost I., Dhondt S., Rothe G., Vicente J., Rodriguez MJ., Kift N., Carbonne F., Griffiths G., Esquerre-Tugaye MT., Rosahl S., Castresana C., Hamberg M., Fournier J.,** (2005) Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiol.*, 139, 1902-1913.

**Rabetafika HN., Gigot CD., Fauconnier ML., Ongena M., Destain J., Du Jardin P., Wathélet JP., Thonart P.,** (2008) Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnol Lett.*, 30, 1115-1119.

**Riley JCM., Willemot C., Thomson JE.,** (1996) Lipoxygenase and hydroperoxide lyase Activities en Ripening tomato Fruits. *Postharvest Biol Tec.*, 7, 97-107.

**Ruckenstein E., Shulgin IL.,** (2006) Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions. *Adv Colloid Interfac.*, 123–126 , 97–103.

**Salas JJ., Sanchez C., Garcia-Gonzalez DL., Aparicio R.,** (2005) Impact of the Suppression of Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase on the Quality of the Green Odor in Green Leaves. *J Agric Food Chem.*, 53, 1648-1655.

**Salas JJ., Sanchez J.,** (1999) Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europea*) fruits. *Plant Sci.*, 143, 19-26.

**Salas JJ., Sanchez J., Ramli US., Manaf AM., Williams M., Harwood JL.,** (2000) Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Prog Lipid Res.*, 39, 151-180.

**Santiago-Gómez MP., Kermash S., Nicaud JM., Belin JM., Husson F.,** (2010) Predicted secondary structure of hydroperoxide lyase from green bell pepper cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Catal B-Enzym.*, 65, 63–67.

**Santiago-Gómez MP., Thanh HT., De Coninck J., Cachon R., Kermasha S., Belin JM., Gervais P., Husson F.,** (2009) Modeling hexanal production in oxido-reducing conditions by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.*, 44, 1013–1018.

**Scala A., Allmann S., Mirabella R., Haring MA., Schuurink RC.,** (2013) Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *Int J Mol Sci.*, 14, 17781-17811.

**Schaller A., Stintzi A.,** (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry.*, 70, 1532–1538.

**Schwab W., Davidovich-Rikanati R., Lewinsohn E.,** (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.*, 54, 712-732.

**Sekiya J., Tanigawa S., Kajiwara T., Hatanaka A.,** (1983) Distribution of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in the leaves of various plant species. *Phytochemistry.*, 23, 2439-2443.

**Shibata Y., Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A.,** (1995) Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 207 (1), 438-443.

**Song WC., Funk CD., Brash AR.,** (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90, 8519-8523.

**Stumpe M., Feussner I.,** (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem Rev.*, 5, 347-357.

**Suurmeijer CNSP., Pérez-Gilabert M., Van Unen DJ., Van der Hijden HTWM., Veldink GA., Vliegthart JFG.,** (2000) Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase. *Phytochem.*, 53, 177-185.

**Tijet N., Schneider C., Muller BL., Brash AR.,** (2001) Biogenesis of Volatile Aldehydes from Fatty Acid Hydroperoxides: Molecular Cloning of a Hydroperoxide Lyase (CYP74C) with Specificity for both the 9- and 13-Hydroperoxides of Linoleic and Linolenic Acids. *Arch Biochem Biophys.*, 386 (2), 281-289.

**Tijet N., Waspi U., Gaskin DJH., Hunziker P., Muller BL., Vulfson EN., Slusarenko A., Brash AR., Whitehead IM.,** (2000) Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*). *Lipids.*, 35 (7), 709–720.

**Tressl R., Drawert F.,** (1973) Biogenesis of Banana Volatiles. *J Agric Food Chem.*, 21, 560–565.

**Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P., Sanchez-Serrano JJ.,** (2001) Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 98, 8139-8144.

**Vaughn SF., Spencer GF., Shasha BS.,** (1993) Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. *J Food Sci.*, 58, 793-706.

**Vick B.A.,** (1991) A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids.*, 26, 315-320.

**Vick BA., Zimmerman DC.,** (1976) Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase in Germinating Watermelon Seedlings. *Plant Physiol.*, 57, 780–788.

**Wan XH., Chen SX., Wang CY., Zhang RR., Cheng SQ., Meng HW., Shen XQ.,** (2013) Isolation, Expression, and Characterization of a Hydroperoxide Lyase Gene from Cucumber. *Int J Mol Sci.*, 14, 22082-22101.

**Werck-Reichhart D., Bak S., Paquette S.,** (2002) Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book*, Am Soc Plant Biol., doi: 10.1199/tab.0028.

**Whitehead IM., Slusarenko AJ., Waspi U., Gaskin DJH., Brash AR., Tijet N.,** (2001) Guava (*Psidium guajava*) 13-hydroperoxide lyase and uses thereof. W.O. Patent No. 99/58648.

**Wurzenberger M., Grosch W.,** (1984) The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushroom (*Psalliota bispora*). *Biochim Biophys Acta.*, 794, 25–30.

**Zhu BQ., Xu XQ., Wu YW., Duan CQ., Pan QH.,** (2012) Isolation and characterization of two hydroperoxide lyase genes from grape berries. *Mol Biol Rep.*, 39, 7443–7455.

# **Annexes**

HPL OlivePicual	-----	-----	-----TAATG	ATGGCAAAAA	TGACGGGTTC	25
HPL OliveLeccino	AACACACAAA	CATCTAACAT	GTCTGTAATG	ATGGCAAAA-	TGACGGGTTC	49
HPL OlivePicual)	GCCCTCCGTG	ACTCCATTGT	CGCCTCCATC	GCCATCGCCA	CCTTCCCCGT	75
HPL OliveLeccino	GCCCTCCGTG	ACTCCATTGT	CGCCTCCATC	GCCATCGCCA	CCTTCCCCGT	99
HPL OlivePicual	CGTCTCTGCC	CCTCCGCGCC	ATTCTGGAG	GCTACGGGTG	GCCGGTGGTG	125
HPL OliveLeccino	CGTCTCTGCC	CCTCCGCGCC	ATTCTGGAG	GCTACGGGTG	GCCGGTGGTG	149
HPL OlivePicual	GGTCCAATCA	TCGACAGATT	GAATTATTTT	TGGTTTCAGG	GTCTCCGAC	175
HPL OliveLeccino	GGTCCAATCA	TCGACAGATT	GAATTATTTT	TGGTTTCAGG	GTCTCCGAC	199
HPL OlivePicual	TTTCTTCAAG	AAGAGAATGG	AAAAGTATAA	GAGTACAGTT	TTCAGAACAA	225
HPL OliveLeccino	TTTCTTCAAG	AAGAGAATGG	AAAAGTATAA	GAGTACAGTT	TTCAGAACGA	249
HPL OlivePicual	ATGTGCCTCC	AACATTCCCT	TGGTTTTTAG	GAGTTAATCC	TAATGTAATT	275
HPL OliveLeccino	ATGTGCCTCC	AACATTCCCT	TGGTTTTTAG	GCGTTAATCC	TAATGTAATT	299
HPL OlivePicual	GCTGTTCTTG	ATGTCAAGTC	ATTTTCTCAT	CTCTTTGATA	TGGAAATTGT	325
HPL OliveLeccino	GCTGTTCTTG	ATGTCAAGTC	ATTTTCTCAT	CTCTTTGATA	TGGAAATTGT	349
HPL OlivePicual	TGAAAAGGCA	AACGTGCTCG	TCGGAGATT	CATGCCGAGT	GTAAATATA	375
HPL OliveLeccino	TGAAAAGGCA	AACGTGCTCG	TCGGAGATT	CATGCCGAGT	GTAAATATA	399
HPL OlivePicual	CAGGGGATTT	TCGTGTTTGT	GCATATCTCG	ATACTTCAGA	GGCTAAACAT	425
HPL OliveLeccino	CAGGGGATTT	TCGTGTTTGT	GCATATCTCG	ATACTTCAGA	GGCTAAACAT	449
HPL OlivePicual	ACTCAAATTA	AGAACTTTTC	ACTCGATATC	TTGAAACGAA	GCTCGACCAT	475
HPL OliveLeccino	ACTCAAATTA	AGAACTTTTC	ACTCGATATC	TTGAAACGAA	GCTCGACCAT	499
HPL OlivePicual	TTGGGTACCG	TCACTCATAA	GTTCACTAGA	CTCCATGTGG	GACAAAATTG	525
HPL OliveLeccino	TTGGGTACCG	TCACTCATAA	GTTCACTAGA	CTCCATGTGG	GACAAAATTG	549
HPL OlivePicual	ACGCTGACGT	TGCCAACTCC	GGCTCAGCCA	GTTCTTTTCT	CCCCATGCAG	575
HPL OliveLeccino	ACGCTGACGT	TGCCAACTCC	GGCTCAGCCA	GTTCTTTTCT	CCTCATGCAG	599
HPL OlivePicual	CAATTCCTTT	TTAGGTTTCT	TACTCGCTGC	ATTGTCCGAG	CAGACCCCTC	625
HPL OliveLeccino	CAATTCCTTT	TTAGGTTTCT	TACTCGCTGC	ATTGTCCGAG	CAGACCCCTC	649
HPL OlivePicual	GACTTCGCC	GAGATCGCCA	GCTCTGGCCA	TATTATGCTC	GACAAGTGGC	675
HPL OliveLeccino	GACTTCGCC	GAGATCGCCA	GCTCTGGCCA	TATTATGCTC	GACAAGTGGC	699
HPL OlivePicual	TCGGTATTCA	GATCCTGCCG	ACTGTCAACA	TCGGCATTCT	ACAACCCCTC	725
HPL OliveLeccino	TCGGTATTCA	GATCCTGCCG	ACTGTCAACA	TCGGCATTCT	ACAACCCCTC	749
HPL OlivePicual	GAAGAACTCT	TCCTCCATTC	TTTCTCATA	CCTTTCTGGC	TTGTTAAAGG	775
HPL OliveLeccino	GAAGAACTCT	TCCTCCATTC	TTTCTCATA	CCTTTCTGGC	TTGTTAAAGG	799
HPL OlivePicual	AGACTACAAC	AAGCTGGTGC	AGTTTGTGGA	AAAAGAAGGC	AAAGAAGTTA	825
HPL OliveLeccino	AGACTACAAC	AAGCTGGTGC	AGTTTGTGGA	AAAAGAAGGC	AAAGAAGTTA	849
HPL OlivePicual	TACAAAGAGC	TCAAAGTAA	TTCAATCTGA	CTGAACAAGA	AGCAATTCAC	875
HPL OliveLeccino	TACAAAGAGC	TCAAAGTAA	TTCAATCTGA	CTGAACAAGA	AGCAATTCAC	899
HPL OlivePicual	AATCTTCTTT	TCATCTTAGG	ATTCAATGCA	TTTGGTGGGT	TTACGATATT	925
HPL OliveLeccino	AATCTTCTTT	TCATCTTAGG	ATTCAATGCA	TTTGGTGGGT	TTACGATATT	949
HPL OlivePicual	CTTTCTGGCG	CTCTTGAGTG	CGATCGGGGA	TCAGAAAAGT	ACTGGGCTAC	975
HPL OliveLeccino	CTTTCTGGCG	CTCTTGAGTG	CGATCGGGGA	TCAGAAAAGT	ACTGGGCTAC	999



HPL OlivePicual	ACGAAAAACT	CCGGGATGAA	GTAAGACAAA	AATCTGGTTC	CAATTCAAAT	1025
HPL OliveLeccino	ACGAAAAACT	CCGGGATGAA	GTAAGACAAA	AATCTGGTTC	CAATTCAAAT	1049
HPL OlivePicual	ACTCTCAGTT	TCGAAAGTGT	AAAGGATATG	GAATTAGTAC	AATCATTTGT	1075
HPL OliveLeccino	ACTCTCAGTT	TCGAAAGTGT	AAAGGATATG	GAATTAGTAC	AATCATTTGT	1099
HPL OlivePicual	CTACGAAACT	CTTCGATTGA	ACCCGCCAGT	TCCATCGCAA	TTCGCCCGAG	1125
HPL OliveLeccino	CTACGAAACT	CTTCGATTGA	ACCCGCCAGT	TCCATCGCAA	TTCGCCCGAG	1149
HPL OlivePicual	CTAGAAAGGA	TTTCAAGCTG	ACCTCGCATG	ATGCTGTTTA	CGAAATCAAG	1175
HPL OliveLeccino	CTAGAAAGGA	TTTCAAGCTG	ACCTCGCATG	ATGCTGTTTA	CGAAATCAAG	1199
HPL OlivePicual	AAAGGAGAGC	TTCTCTGTGG	GTATCAGCCA	TTGGTGATGA	AAGATGCCAA	1225
HPL OliveLeccino	AAAGGAGAGC	TTCTCTGTGG	GTATCAGCCA	TTGGTGATGA	AAGATGCCAA	1249
HPL OlivePicual	AGTCTTCGAA	GAGAGTCCTG	CGACATTTTT	ATACGACAGA	TTTACAAGAG	1275
HPL OliveLeccino	AGTCTTCGAA	GAGAGTCCTG	AGACATTTTT	ATACGACAGA	TTTACAAGAG	1299
HPL OlivePicual	AGAAAGGCGG	GACAGAGTTG	CTGAATTATC	TATACTGGTC	AAACGGGCCA	1325
HPL OliveLeccino	AGAAAGGCGG	GACAGAGTTG	CTGAATTATC	TATACTGGTC	AAACGGGCCA	1349
HPL OlivePicual	CAAACCTGGAT	CGGCCACGGC	AGCCAACAAG	CAGTGTGCAG	CTAAAGAGAT	1375
HPL OliveLeccino	CAAACCTGGAT	CGGCCACGGC	GGCCAACAAG	CAGTGTGCAG	CTAAAGAGAT	1399
HPL OlivePicual	TGTGCCCTTA	ACTGCAGCGT	TATTTGTGGC	TTATTTGTTT	CAGAGATATG	1425
HPL OliveLeccino	TGTGCCCTTA	ACTGCAGCGT	TATTTGTGGC	TTATTTGTTT	CAGAGATATG	1449
HPL OlivePicual	ATGACATTAC	AATTTCTTCT	GGTTCAATCA	CTGCAGTTGA	GAAGTCCAAG	1475
HPL OliveLeccino	ATGACATTAC	AATTTCTTCT	GGTTCAATCA	CTGCAGTTGA	GAAGTCCAAG	1499
HPL OlivePicual	TGAGACAATT	AATTACTTGT	AATGAAGGAT	GTAATGCTAC	TCTTATAATC	1525
HPL OliveLeccino	TGAGACAATT	AATTACTTGT	AATGAGGGAT	GTAATGCTAC	TCTTATAATC	1549
HPL OlivePicual	TCAATCGTTA	TATGCCTTAT	CTTTGCACAA	AGTGTTCCAA	GTTTCGGCCTA	1575
HPL OliveLeccino	TCAATCGTTA	TATGCCTTAT	CTTTGCAAAA	AAAAAAAAAA	AAA-----	1592
HPL OlivePicual	GTTGCTTGAA	TTTTGTGCAA	ATAATAATCG	AAGGAGCGTG	ACATTCTTTA	1625
HPL OliveLeccino	-----	-----	-----	-----	-----	1592
HPL OlivePicual	AAAAAAAAAA	AAAAAA	1641			
HPL OliveLeccino	-----	-----	1592			

**Annexe 1: Alignement des séquences nucléotidiques de l'HPL d'olive de la variété Picual (OepHPL) (Padilla et al., 2010) et de l'HPL d'olive de la variété Leccino.**

HPL Olive picual (AA)	MMAKMTGSPS	VTPLSPPSPS	PPSPSSLPLR	AIPGGYGWPEV	VGPIIDRLNY	50
HPL Olive Leccino (AA)	----MTGSPS	VTPLSPPSPS	PPSPSSLPLR	AIPGGYGWPEV	VGPIIDRLNY	46
HPL Olive picual (AA)	FWFQGPPTFF	KKRMEKYKST	VFRTNVPPTF	PWFLGVNPNV	IAVLDVKSFS	100
HPL Olive Leccino (AA)	FWFQGPPTFF	KKRMEKYKST	VFRTNVPPTF	PWFLGVNPNV	IAVLDVKSFS	96
HPL Olive picual (AA)	HLFDMEIVEK	ANVLVGDFMP	SVKYTGDFRV	CAYLDTSEAK	HTQIKNFSLD	150
HPL Olive Leccino (AA)	HLFDMEIVEK	ANVLVGDFMP	SVKYTGDFRV	CAYLDTSEAK	HTQIKNFSLD	146
HPL Olive picual (AA)	ILKRSSTIIV	PSLISSLDSM	WDKIDADVAN	SGSASSFLPM	QQFLFRFLTR	200
HPL Olive Leccino (AA)	ILKRSSTIIV	PSLISSLDSM	WDKIDADVAN	SGSASSFLPM	QQFLFRFLTR	196
HPL Olive picual (AA)	CIVGADPSTS	PEIASSGHIM	LDKWLGIQIL	PTVNIGILQP	LEELFLHSFS	250
HPL Olive Leccino (AA)	CIVGADPSTS	PEIASSGHIM	LDKWLGIQIL	PTVNIGILQP	LEELFLHSFS	246
HPL Olive picual (AA)	YPFWLVKGDY	NKLVQFVEKE	GKEVIQRAQT	EFNLTEQEI	HNLLFILGFN	300
HPL Olive Leccino (AA)	YPFWLVKGDY	NKLVQFVEKE	GKEVIQRAQT	EFNLTEQEI	HNLLFILGFN	296
HPL Olive picual (AA)	AFGGFTIFFL	ALLSAIGDQK	STGLHEKLRD	EVRQKSGSNS	NTLSFESVKD	350
HPL Olive Leccino (AA)	AFGGFTIFFL	ALLSAIGDQK	STGLHEKLRD	EVRQKSGSNS	NTLSFESVKD	346
HPL Olive picual (AA)	MELVQSFVYE	TLRLNPPVPS	QFARARKDFK	LTSHDAVYEI	KKGELLCGYQ	400
HPL Olive Leccino (AA)	MELVQSFVYE	TLRLNPPVPS	QFARARKDFK	LTSHDAVYEI	KKGELLCGYQ	396
HPL Olive picual (AA)	PLVMKDAKVF	EESPAFLYD	RFTREKGGTE	LLNYLYWSNG	PQTGSATAAN	450
HPL Olive Leccino (AA)	PLVMKDAKVF	EESPETFLYD	RFTREKGGTE	LLNYLYWSNG	PQTGSATAAN	446
HPL Olive picual (AA)	KQCAAKEIVP	LTAALFVAYL	FQRYDDITIS	SGSITAVEKS	K 491	
HPL Olive Leccino (AA)	KQCAAKEIVP	LTAALFVAYL	FQRYDDITIS	SGSITAVEKS	K 487	

**Annexe 2 : Aligement des séquences protéiques de l'HPL d'olive de la variété Picual (OepHPL) (Padilla et al., 2010) et de l'HPL d'olive de la variété Leccino.**

## Communications

### **- Communications par affiche :**

- Jacopini S, Mariani M, Vincenti S, Brunini V, Gambotti C, Muselli A, Desjobert JM, Costa J, Tomi F, Paquet P, Maury J, Berti L. 2015. Utilisation de la 13-Hydroperoxyde Lyase recombinante d'olive dans des procédés biocatalytiques de production de composés à note verte- Tribune des chercheurs- Bastia.

- Jacopini S, Mariani M, Vincenti S, Brunini-Bronzini de Caraffa V, Gambotti C, Muselli A, Desjobert JM, Costa J, Maury J, Berti L. 2014. Utilisation de la 13-Hydroperoxyde Lyase recombinante d'olive dans des procédés de production biocatalytiques de composés à note verte- Paris, ADEBIOTECH, " Enzymes and Industries ".

- Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Desjobert JM., Muselli A., Costa J., Maury J., Berti L. 2014. Utilisation de l'hydroperoxyde lyase recombinante pour la production naturelle de composés volatils aromatisants. Journée des doctorants - Université de Corse.

- Jacopini S., Vincenti S., Brunini-Bronzini V., Gambotti C., Maury J., Berti L. 2013. Purification et caractérisation de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive pour la production de composés aromatiques. Journée des doctorants - Université de Corse.

- Jacopini S., Alberti JC., Brunini-Bronzini V., Gambotti C., Maury J., Berti L. 2012. Utilisation d'enzymes recombinantes (lipoxygénase et hydroperoxyde lyase) pour la production de composés aromatisants. Journée des doctorants - Université de Corse.

.

### **- Communications orales :**

- Jacopini S, Mariani M, Vincenti S, Brunini-Bronzini de Caraffa V, Gambotti C, Muselli A, Desjobert JM, Costa J, Maury J, Berti L. 2014. Utilisation de la 13-Hydroperoxyde Lyase recombinante d'olive dans des procédés de production biocatalytiques de composés à note verte- Paris, ADEBIOTECH, " Enzymes and Industries ".

- Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Desjobert JM., Muselli A., Costa J., Maury J., Berti L. 2014. Production de composés aromatisants naturels par biocatalyse. Journée des doctorants - Université de Corse.

### **- Publications :**

- Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Desjobert JM., Muselli A., Costa J., Berti L., Maury J. 2015. Olive recombinant hydroperoxide lyase, an efficient biocatalyst for synthesis of green leaf volatiles. (soumise)

- Jacopini S., Vincenti S., Brunini-Bronzini V., Gambotti C., Maury J., Berti L. 2015. Activation and stabilization of the recombinant olive 13-Hydroperoxide Lyase using selected chemical additives. (en préparation)

## **Olive recombinant hydroperoxide lyase, an efficient biocatalyst for synthesis of green leaf volatiles**

Sabrina Jacopini<sup>a</sup>, Magali Mariani<sup>a</sup>, Virginie Brunini-Bronzini de Caraffa<sup>a</sup>, Claude Gambotti<sup>a</sup>, Sophie Vincenti<sup>a</sup>, Jean-Marie Desjobert<sup>b</sup>, Alain Muselli<sup>b</sup>, Jean Costa<sup>b</sup>, Liliane Berti<sup>a</sup>, Jacques Maury<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Corse, CNRS UMR6134 SPE, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Végétales, campus Grimaldi, BP52, 20250 Corte, France

<sup>b</sup> Université de Corse, CNRS UMR6134 SPE, Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, campus Grimaldi, BP52, 20250 Corte, France

### **\* Corresponding author**

J. Maury, Université de Corse, CNRS UMR6134, campus Grimaldi, BP52, 20250 Corte, France. Fax: +33 495 610 551. Tel: +33 495 450 069

E-mail address: [maury@univ-corse.fr](mailto:maury@univ-corse.fr)

Abbreviations: HPOD: hydroperoxyoctadecadienoic acid; HPOT: hydroperoxyoctadecatrienoic acid; IPTG: isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; LOX: lipoxygenase; HPL: hydroperoxide lyase; GLVs: Green leaf volatils

## Abstract

Volatile aldehydes (hexanal, 3Z-hexenal and 2E-hexenal), responsible for the freshly and grassy odor known as "green note", are naturally produced through the lipoxygenase pathway, and present a great interest for flavor industry. To fulfill the high demand in natural C6-aldehydes, aroma industry is constantly searching new sources of efficient hydroperoxide lyase (HPL) for use in biocatalytic processes. In this study, olive recombinant HPLs were expressed into *Escherichia coli* (M15), and used in an optimized biocatalytic process to produce C6-aldehydes. Firstly, a cDNA encoding for HPL (HPLwt) from black olive was isolated, and in order to improve the enzyme solubility, the HPL deleted of its chloroplast transit peptide (HPLdel) was produced. Both enzymes were expressed into *E. coli*, purified and characterized. The bioconversion of 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids using HPLwt allowed producing 5.61 mM of hexanal and 4.39 mM of 3Z-hexenal, corresponding to high conversion yields of 93.5% and 73%, respectively. No side products were formed and none isomerization of 3Z-hexenal in 2E-hexenal occurred. Using HPLdel instead of HPLwt failed to obtain greater quantities of hexanal or 3Z-hexenal. Results show that olive recombinant HPLwt is a particularly effective catalyst for use in bioconversion processes to natural production of C6-aldehydes.

**Key words:** Hydroperoxide Lyase, C6-aldehydes, Green note, bioconversion, hexanal, 3Z-hexenal.

## Introduction

Green leaf volatils (GLVs) are molecules composed especially of C6-aldehydes such as hexanal, 3Z-hexenal and 2E-hexenal. They are synthesized by higher plants in response to biotic and abiotic stresses and act as defense mechanisms against insect or fungal pathogens attacks (11, 14, 19, 13, 10). GLVs are naturally produced through a metabolic pathway of the C18-polyunsaturated fatty acids named the lipoxygenase pathway. First, the lipoxygenase (LOX) catalyzes the oxygenation of linoleic and linolenic acids to form corresponding fatty acid hydroperoxides which are then cleaved by hydroperoxide lyase (HPL) to generate short-chain aldehydes and oxoacids (20). According to their specificity, HPLs can act on the 9- or 13-hydroperoxide of linoleic and linolenic acids (HPOD and HPOT) and catalyze the cleavage of these hydroperoxides into C6- or C9-aldehydes and the C12- or C9- oxoacids, respectively (11). HPLs are described to be heminic enzymes, classified in the cytochrome P450 family and more particularly in the two subfamilies CYP74B (13-HPL) and CYP74C (9-HPL and 9/13-HPL) (21).

GLVs are the main contributors to the characteristic odor of plants known under the name of "green note" (11, 10). It follows an economic interest and they are *widely* used by various industries to improve food quality by restoring the fresh and fruity green odor or to add a touch of freshness to fragrances (29). The volatile molecules are therefore subject to industrial production which can be done in different ways. They can be chemically synthesized, directly extracted from plant or produced by biocatalytic processes. Today consumers have a strong preference for natural compounds; so chemical synthesis from derived petroleum is not favored. Moreover, as the amount of these volatile molecules naturally present in plant tissues is very low, their extraction from raw material is difficult and expensive, and thereby, is rarely carried out. Therefore the use of enzymes of LOX pathway to produce natural volatile compounds in a large scale is appeared economically interesting and biocatalytic processes were developed. In such processes, plant extracts were used as enzyme source. If soybean flour was generally used as LOX source, numerous plant extracts (green bell pepper, mint leaves, green leaves from sugar beet) were tested as HPL sources (Németh *et al.*,

2004, (7), (27). However, HPL activity is variable from plant to another plant, is very unstable in plant extracts and, in addition, crude extracts contain other enzymes using fatty acid hydroperoxides as substrates, which generate side products. In overcoming these disadvantages, flavor industry is constantly searching new sources of efficient HPL. In this context, recombinant HPLs carefully selected could be an interesting alternative. Moreover, this enzyme source shows some advantages: its production is independent of environmental conditions, harvesting period and plant heterogeneity, its purification is generally easier and therefore, its use in biocatalytic processes in the form of purified enzymes could allow a selective production of the volatile compounds.

In this study, we isolated a cDNA encoding for HPL, named HPL*w*t (wild type), from black olive fruits (*Olea europaea* L., Leccino variety), in order to use the olive recombinant 13-HPL in a biocatalytic process producing C6-aldehydes. Olive fruits were chosen because the involvement of enzymes of LOX pathway in the biosynthesis of flavor compounds of virgin olive oil was well established (25), the C6-aldehyde compounds are the main components (about 80%) of this flavor (22, 1, 16) suggesting the presence of efficient enzymes of the LOX pathway in these fruits. In order to solubilize large amounts of recombinant enzyme, the N-terminal transit peptide was *deleted* and the new enzyme was designated as HPL*d*el (*deleted* transit peptid). Both enzymes (HPL*w*t and HPL*d*el) were expressed into *Escherichia coli* (M15), purified in one-step by affinity chromatography, and their catalytic efficiencies were determined and compared. Then, HPL*w*t and HPL*d*el were tested in biocatalytic processes, and we have optimized the biotransformation conditions of 13-HPOD and 13-HPOT into hexanal and 3Z-hexenal, respectively, to achieve the highest yields.

## Materials and Methods

### Chemical compounds

Chemical compounds (antibiotics,  $\delta$ -aminolevulinic acid, sodium phosphate mono and dibasic, benzamidine, linoleic and linolenic acids, hexanal (98%), 3Z-hexenal (50% in triacetin),



MgSO<sub>4</sub>, Triton X-100, IPTG) were purchased from Sigma Aldrich Chemical (Saint-Quentin Fallavier, France) as well as, bovin serum albumin (BSA), soybean LOX, DNase I, and lysozyme.

## Plant material

Black olives (*Olea europaea* L., Leccino variety) were randomly picked up at 20 weeks after flowering (WAF) from the experimental field of the INRA-CIRAD (Corsica, France). The olives were stoned; the pulp was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until used.

## RNA extraction and reverse transcription PCR analysis

Total RNA was extracted from olive pulp as described by Hernández *et al.* (12). Reverse transcription was performed using up to 5 µg of total RNA extracted from mature olives (20 WAF, black stage), oligo(dT)<sub>18</sub> primer and the PowerScript reverse transcriptase (Clontech) according to the manufacturer's instructions. The first strand cDNA was used as template in PCR experiments with degenerated primers (HPL 13-2: 5'-ggnttyaaycpgntwyggngg, HPL 13-3: 5'-gyttncpgncpgrcaytgyttrtt) designed from conserved amino acid sequences of known plant HPLs and, oligo(dT)<sub>18</sub>V and specific primer (HPL b: 5'gttcpgtgaattatctatact) designed during the present study. The PCR conditions were as follows: 94 °C 5 min, 56 °C 1 min, 72 °C 40 s (1 cycle); 94 °C 30 s, 53 °C 1min, 72 °C 40 s (15 cycles); 94 °C 30 s, 50°C 1 min, 72 °C 40 s (30 cycles), 72 °C 7 min (1 cycle) with the HPL 13-2 and HPL 13-3 primers and 94 °C 5 min, 52°C 2 min, 72 °C 3 min (1 cycle); 94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 1 min (15 cycles), 94 °C 30 s, 46 °C 30 s, 72 °C 1 min (15 cycles), 94 °C 30 s, 42 °C 30 s, 72 °C 1 min (15 cycles), 72 °C 7 min (1 cycle), with the oligo(dT)<sub>18</sub>V and HPL b primers.

## 5' Rapid amplification of cDNA ends (RACE) procedures

The 3'/5' RACE 2<sup>nd</sup> Generation kit (Roche) was used to synthesize first-strand cDNA from total RNA (2 µg) of mature olives (20 WAF, black stage) with the specific primer HPLd: 5'-cgtagaccacagagaacpgtcagg in accordance with the manufacturer's instructions. Five microliters of poly(dA)-tailed first-strand cDNA were used as template in PCR reaction with a nested specific primer HPLe: 5'-ttctacpgtcggcpggaattcpgc and the oligo(dT)-anchor primer. The PCR conditions were as follows: 94 °C 5 min, 43 °C 2 min, 72 °C 2 min (1 cycle); 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 40 s (10 cycles); 94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min (25 cycles); 72 °C 7 min (1 cycle). A 1 µL sample of the primary amplification product was further amplified by a second PCR reaction with the nested specific primer HPLf: 5'-atccccgatcgtactcaagag and the PCR anchor primer. The PCR conditions were as follows: 94 °C 3 min (1 cycle); 94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min (35 cycles); 72 °C 7 min (1 cycle).

The RACE procedure was repeated twice with the specific primers HPLg: 5'-accaccaaactcpgattgaatcc, HPLh: 5' attcpgttctgttcagtcag and HPLi: 5'-tgacpgtctttgtataacttcttccpgc, then, with HPLj: 5'ttgcpgaacgtcacpggtca, HPLk: 5'-atthtgtcccatggag and HPLl: 5'-agtgaacttatgagtgacggtacca, under the same PCR conditions.

## Cloning of amplification products

Reverse transcription PCR (RT-PCR) and RACE-PCR products were separated by electrophoresis, stained with ethidium bromide, excised and purified with the GFX Gel Band purification kit (Amersham) and cloned into pCR2.1 TOPO (Invitrogen) vector.

## DNA sequencing

Sequencing was performed by GATC Biotech AG (Germany).

## Cloning of olive HPL cDNA for expression in *E. coli*

Full-length HPL cDNA was obtained by RT-PCR using the specific primers Hplfor: 5'-aaaatgacgggttccpgcctcc and Hplrev: 5'-tctcacttgacttctcaactg designed on the basis of the HPL cDNA sequence. PCR was performed with 1.25 units of *Pfu* DNA polymerase (Promega) in a 50  $\mu$ L reaction mix containing 1  $\mu$ g of cDNA template and 1  $\mu$ M of each primer. The amplification was performed using the following conditions: 95 °C 2 min (1 cycle); 95 °C 20 s, 53 °C 20 s, 72 °C 2 min (40 cycles); and 72 °C 5 min (1 cycle).

The PCR product was purified and cloned into the pMOS-Blue blunt ended vector (Amersham). The insert of the resulting clone, termed pMOS-HPL, was sequenced on both strands. A PCR strategy using pMOS-HPL as template was used to clone the olive HPL*wt* and HPL*del* cDNAs into the pQE-30 expression vector (Qiagen), introducing a N-terminal His tag. The *Sph*IHPLfor: 5'-acatcpgatcpgacgggttccpgcctccgt or the *Sph*IHPLfor2: 5'-acatcpgatcpgtctctcpgccctccatt and *Xma*IHPLrev: 5'-tccccgggtcacttgacttctcaactg, specific primers containing an unique *Sph*I or *Xma*I restriction site were used to introduce a *Sph*I site upstream of the ATG start codon and a *Xma*I site at the 3' end. The PCR using *Sph*IHPLfor2 as forward primer allows obtaining HPL*del* cDNA encoding a HPL *deleted* of the 21 amino acids corresponding to the N-terminal transit peptid. The PCR products were cloned in the *Sph*I-*Xma*I oriented direction into pQE-30 vectors. The recombinant constructs (pQE30-HPL*wt* and pQE30-HPL*del*) were used to transform M15 *E. coli* cells. Parts of plasmids were sequenced to confirm the correct frame.

## Expression and purification of recombinant HPL

Four hundred milliliters of culture TB medium (24 g.L<sup>-1</sup> yeast extract; 12 g.L<sup>-1</sup> tryptone, 0.4% v/v glycerol; 0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) were incubated with 24 mL of the overnight culture of the M15 *E. Coli* transformed with pQE30-HPL*wt* or pQE30-HPL*del* and incubated at 37 °C until the cell

density had increased to  $A_{600}$  0.6 to 0.8. The culture was incubated 48 hours at 15 °C after addition of IPTG (0.5 mM) and  $\delta$ -aminolevulinic acid (2.5 mM) then centrifuged 30 min at 7,000xg at 4 °C. The pellet was resuspended in 20 mL of lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing 0.25 mg.mL<sup>-1</sup> lysozyme, 500 mM NaCl and 0.1% Triton X-100), and freezed at -80 °C. After thawing, the lysis was continued by addition of 0.01 mg.mL<sup>-1</sup> DNaseI, 50 mM MgSO<sub>4</sub> and 1 mM benzamidine then the solution was incubated 30 min at 4 °C. After centrifugation at 12,000xg for 30 min at 4 °C, the supernatant (soluble protein fraction) was collected.

Purification of recombinant HPL was performed by affinity chromatography on Äkta purifier (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography). The soluble protein fraction (19 mL) was loaded onto Cobalt TALON Superflow Metal Affinity (Clontech) column (1 mL bed volume) pre-equilibrated with buffer A (50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing 300 mM NaCl). Most of the *E.coli* proteins elute in the flow through, and once the  $A_{280}$  of the effluent returned to baseline, one wash (corresponding to about 10 column volumes) was performed with 40 mM imidazole in buffer A, to elute the unspecifically bounded proteins. Then, the His-tagged olive HPL was eluted with 100 mM and 200 mM imidazole in buffer A. Fractions showing HPL activity and containing pure protein on SDS-PAGE were pooled and dialysed against 50 mM sodium phosphate buffer pH 7. The protein sample was used immediately in the different processes.

### Enzymatic assay

Substrates of HPL (13-hydroperoxides of linoleic or linolenic acids) were prepared as described by Vick (31) with adaptations. The reaction mixture (30 mL final volume) containing 70 mM sodium borate buffer pH 9 with 6.35 mM linoleic or linolenic acid, 11 mM NaOH and 30 units of commercial soybean LOX (Sigma) was stirred during 30 min at 4 °C under oxygen bubbling. The reaction was stopped by acidification (pH 3) with 1 M HCl. Hydroperoxides were extracted with 3×30 mL of diethyl ether and washed with 2×30 mL of water. The synthesis of hydroperoxides was checked

by TLC in solvent heptan/ diethyl ether/ acetic acid (55/45/1) and revealed by copper acetate/ phosphoric acid (50/50). The identification of products was performed by  $^{13}\text{C}$ -NMR (15). The concentration of hydroperoxide solutions was determined by measuring of absorbance at 234 nm using the extinction coefficient of  $\epsilon = 25,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

HPL activity was determined at 25 °C by continuously monitoring the decrease of absorbance at 234 nm corresponding to the cleavage of conjugated dienic system of hydroperoxide by the enzyme. The standard assay mixture consisted in 1 mL of 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 and the appropriate amount of enzyme extract (5-10  $\mu\text{L}$ ). Reactions were started by addition of 43  $\mu\text{M}$  hydroperoxide. One unit of HPL activity is defined as the amount of enzyme that converts 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per minute at 25 °C.

Kinetics parameters were determined from Michaelis-Menten plot over a range of substrate concentrations between 7  $\mu\text{M}$  and 114  $\mu\text{M}$  HPOD and 16  $\mu\text{M}$  and 134  $\mu\text{M}$  HPOT for HPL $_{wt}$ , and 7  $\mu\text{M}$  and 121  $\mu\text{M}$  HPOD and 8  $\mu\text{M}$  and 175  $\mu\text{M}$  HPOT for HPL $_{del}$ .

### Protein analysis

Protein concentration was determined spectroscopically for the pure recombinants HPL $_{wt}$  and HPL $_{del}$  using an  $A_{280}$  extinction coefficient ( $\epsilon$ ) that was calculated from the tyrosine and tryptophan content (5, 9) of the deduced amino acid sequence. Protein concentration in other samples was determined by the Bradford method using bovine serum albumine as standard (4).

SDS-PAGE was performed in 12% Tris-glycine gel in the presence of 2% SDS under reducing conditions. Proteins were stained with EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma) or transferred onto nitrocellulose (Bio-rad) and immune-revealed using the monoclonal peroxidase-conjugated anti-His antibody (Sigma).

## C6-aldehydes production

The C6 volatile compounds were produced from 13-HPOD and 13-HPOT obtained by the action of soybean lipoxygenase on the linoleic or linolenic acids as previously described. The action of HPLwt and HPLdel on 13-HPOD and 13-HPOT were evaluated, using different amounts of enzyme (0.25; 0.5 and 1 U.mL<sup>-1</sup>) and substrate (2; 4 and 6 mM). The standard reaction was performed in 5 mL of 50 mM phosphate buffer pH 7.5 incubated at 25 °C, containing the selected amount of substrate (HPOD or HPOT). The reaction started by addition of the enzyme. The mixture was distributed in closed tubings (1 mL total volume) and reactions were stopped at different times (1; 5; 10; 15; 20 min) by acidification (pH 2) with 5 M HCl. Aldehydes produced were extracted by 3x200 µL of dichloromethane.

## Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) and GC-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis

Volatile green notes were quantified by GC-FID and identified by GC-MS. GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus (Walton, MA, USA) equipped with a single injector, a single flame ionization detector (FID) and a single fused-silica capillary column (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm) with Rtx-Wax (polyethylene glycol) stationary phase. Oven temperature program was 60 to 100 °C at 2 °C/min and the experiment time was 20 min. Hydrogen was used as carrier gas with flow rate: 0.7 mL/min. Injector and detector temperatures were held at 280 °C. Split injection was conducted with a ratio split of 1:80. Automatic sampler was used for injection volumes of 3.5 µL. GC-MS analyses were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole detector, directly coupled to a Perkin Elmer AutoSystem XL (Walton, MA, USA) equipped with the same capillary column and operating under the same GC conditions as described above. Electronic-impact source temperature was 150 °C; ions were produced using energy ionization of 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35-350 uma during a scan time 1 s.

Identification of C-6 aldehydes was achieved by matching calculated retention indices (RIs) on apolar column and mass spectra with those of authentic standards. Quantification was performed using external standard calibration. Calibration curves were built from solutions of hexanal and 3Z-hexenal prepared in dichloromethane at 9 concentrations: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mM. Experiments were carried out in triplicate. The integrations were performed with Turbo Chrom software (Perkin Elmer, Walton, MA, USA). The results were expressed as mM. Quantification method was validated by higher correlation coefficients ( $R^2=0.994$  for hexanal and  $R^2=0.985$  for 3Z-hexenal) for the calibration curves obtained with a concentration level ranging from 0.5 to 8 mM. In addition, the relative standard deviation inferior to 5% confirm the linearity of the method.

## Results and discussion

### Cloning, expression and purification of recombinant enzymes

Full-length HPL cDNA was isolated by a combined strategy using RT-PCR and RACE-PCR on total RNA extracted from black olives harvested at 20 weeks after flowering (WAF). The olive 13-HPL cDNA sequence contains an open reading frame of 1461 bp encoding a presumptive translation product of 487 amino acid residues. Fasta analysis of the deduced amino acid sequence revealed 100% identity with *OepHPL* sequence (26). The enzyme contains a N-terminal transit peptide characteristic of CYP74B enzymes (30), suggesting its targeting and insertion to the chloroplast envelope (2, 6). This transit peptide could allow insertion of the recombinant enzyme in the membrane during expression in *E. coli*, thereby reducing the amount of enzyme recovered in the soluble protein fraction. Also, we *deleted* the sequence encoding the transit peptide (the enzyme was designated as HPL*del*) in order to recover larger amount of enzyme in the soluble protein fraction.

Both enzymes, HPL*wt* and HPL*del*, were expressed in *E. coli* (M15). Expression was induced by 0.5 mM IPTG, in presence of 2.5 mM  $\delta$ -aminolevulinic acid as heme precursor, and was performed

at 15 °C during 48 h. Recombinant enzymes were purified by affinity chromatography using Cobalt chelated column (Clontech). Purified HPLwt and HPLdel appeared as a unique band at 50 kDa in both Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE and immunoblot, in good agreement with the predicted molecular mass of one subunit of HPL (Fig. 1). It appears that the *deletion* of N-terminal peptide does not avoid an important accumulation of enzyme in lysis pellet. Indeed, the soluble protein fraction obtained from the cell lysis and the purified fraction of HPLdel appear to contain a lower amount of enzyme than the soluble protein and purified fraction of the HPLwt (Fig. 1). From 0.4 L of culture medium, we have purified  $0.502 \pm 0.002$  mg of HPLwt with a specific activity of  $71.15 \pm 0.18$  U.mg<sup>-1</sup> proteins on 13-HPOT and  $16.98 \pm 2.38$  U.mg<sup>-1</sup> proteins on 13-HPOD. From the same volume of culture medium, we have purified  $0.28 \pm 0.02$  mg of HPLdel with specific activities of  $56.89 \pm 4.50$  U.mg<sup>-1</sup> proteins on 13-HPOT and  $7.91 \pm 2.00$  U.mg<sup>-1</sup> proteins on 13-HPOD. The *deletion* of the N-terminal transit peptide has not increased the amount of purified enzyme, and in addition, the enzyme obtained has lower specific activities (decrease of about 20% and 53% for 13-HPOT and 13-HPOD, respectively) than the wild-type enzyme.

Optimum pH and optimum temperature were determined using 13-HPOD and 13-HPOT as substrates. Both enzymes displayed an optimum pH at 7.5 and an optimum temperature at 25 °C. Enzymatic activity was stable in a range of pH 6.5 to 8 (about 80% of the specific activity was preserved). Similar results were previously obtained on olive HPL by Salas *et al.* (28). Ben Akacha *et al.* (3) showed that olive HPL is active in a range of pH between 6 to 8 with an optimal pH at 6.5 and an optimal production of C6 compounds performed at 20°C, whereas Padilla *et al.* (26) reported the maximal activity of *OepHPL* at pH range between 8 to 9 and at 45 °C.

Kinetic parameters were investigated using 13-HPOD and 13-HPOT as substrates (Table 1). No activity was observed toward 9-HPOD or 9-HPOT. Both enzymes showed a lower Km for 13-HPOD ( $43.10$  μM and  $43.22$  μM for HPLwt and HPLdel, respectively) than for 13-HPOT ( $152.75$  μM and  $173.85$  μM for HPLwt and HPLdel, respectively) suggesting a preference for 13-HPOD rather than 13-HPOT. However, HPLwt and HPLdel showed a 21.4-fold and 22.5-fold increase of the turnover



(564.95 s<sup>-1</sup> vs 26.38 s<sup>-1</sup> and 402.62 s<sup>-1</sup> vs 17.89 s<sup>-1</sup>) for 13-HPOT, respectively. These results lead to a catalytic efficiency (kcat/Km) of both HPLs significantly higher for 13-HPOT than for 13-HPOD (6-fold and 5.5-fold increase for HPLwt and HPLdel, respectively), in good agreement with results reported by Padilla *et al.* (26). Moreover, HPLwt seems to act more effectively on 13-HPOT and 13-HPOD than HPLdel (3.71 s<sup>-1</sup>.μM<sup>-1</sup> vs 2.36 s<sup>-1</sup>.μM<sup>-1</sup> for 13-HPOT and 0.62 s<sup>-1</sup>.μM<sup>-1</sup> vs 0.43 s<sup>-1</sup>.μM<sup>-1</sup> for 13-HPOD).

#### C6-aldehyde production assays with recombinant olive hydroperoxide lyase

The enzymes HPLwt and HPLdel were assayed as catalyst for the production of hexanal or 3Z-hexenal from 13-HPOD or 13-HPOT respectively. The effect of substrate and enzyme concentrations on the cleavage reaction was firstly investigated by using HPLwt and 13-HPOD (Table 2). Data showed that increasing concentrations of hexanal were achieved using increasing HPOD concentrations. The molar conversion rates remained stable or increased when increasing substrate concentrations were used with constant value of enzyme concentration. Moreover, data showed that hexanal concentrations were influenced by HPLwt concentrations. Indeed, the highest concentration of hexanal was achieved with 1 U.mL<sup>-1</sup> HPLwt and 6 mM of 13-HPOD, while the 0.25 U.mL<sup>-1</sup> enzyme concentration seems insufficient to transform 4 or 6 mM of 13-HPOD (about 60% only of yield achieved in 20 min of reaction). The optimal conditions have produced 5.61 ± 0.48 mM of hexanal, corresponding to a molar conversion rate of 93.5%. When HPLwt was substituted by HPLdel, the hexanal concentrations were always smaller (Table 2). However, 3.93 ± 0.15 mM of hexanal were produced with 1 U.mL<sup>-1</sup> HPLdel and 6 mM of 13-HPOD, corresponding to a molar conversion rate of 65.5%. These results may be regarded as good results since the yields reported in the literature range from 25 to 86% (7, 27, 17) when plant extracts are used as a source of HPL, or 65% when alfalfa recombinant HPL is used as catalyst (24).

The production of 3Z-hexenal from 13-HPOT by the action of HPLwt or HPLdel was investigated in a same way that production of hexanal from 13-HPOD (Table 3). In all experiments

performed 3Z-hexenal was the sole compound detected; 2E-hexenal was never detected, suggesting that, in the conditions used none isomerization of 3Z-hexenal in 2E-hexenal occurred. The optimal conditions for 3Z-hexenal production were obtained with 0.5 U.mL<sup>-1</sup> HPLwt and 6 mM of 13-HPOT, and have allowed to reach an amount of 2.26 ± 0.02 mM of 3Z-hexenal corresponding to a molar conversion rate of 38%. Using HPLdel instead of HPLwt failed to obtain greater quantities of 3Z-hexenal (Table 3). The data showed that the amounts of 3Z-hexenal were always lower than the amounts of hexenal (Tables 2 and 3), leading to molar conversion rates lower, whereas HPLwt acts more effectively on the 13-HPOT than on the 13-HPOD. A possible explanation of this phenomenon can be given by the inhibitory effect exerted by the 13-HPOT present at high concentration (18). Another explanation may be provided by the high volatility of 3Z-hexenal to 25 °C. To test this hypothesis, we performed again the experiment with 0.5 U.mL<sup>-1</sup> HPLwt and 6mM of 13-HPOT at 10 °C to minimize evaporation and thus the loss of 3Z-hexenal. Under these conditions, 4.39 ± 0.38 mM of 3Z-hexenal were produced, corresponding to a molar conversion rate of 73%. Yields of 38% and 73% can be considered as good values since studies conducted to produce the C6-aldehydes (3Z-hexenal and 2E-hexenal, both in combination) from 13-HPOT, and using HPL plant extracts as catalyst have reported yields ranging from 37 to 50% (23, 3), and a study using a recombinant HPL reported a yield of 43% (24). Conversion of 13-HPOT in C6-aldehydes, using HPL plant extracts, often leads to a mixture of 3Z-hexenal and 2E-hexenal (23, 3, 8). Indeed, 3Z-hexenal produced by HPL-catalyzed cleavage of 13-HPOT can be, in part, isomerized to 2E-hexenal by the action of 3Z:2E-enal isomerases present in plant extracts and by heating (23, 3). Here, we reported a process using an olive recombinant HPL at a low reaction temperature (10 °C) which allowed to produce exclusively 3Z-hexenal with a good yield value (73%). Obtaining of pure and sufficiently stable 3Z-hexenal is interesting and allows to consider its use as an intermediate in a longer reaction sequence, as in the production of 3Z-hexenol.

## Conclusion

The objective of the work presented was to evaluate the use of olive recombinant HPLs as catalyst for synthesis of GLVs. Olive recombinant HPLwt behaves as a good candidate as it allowed to achieve yields up to 93% and 73% for the hexanal and 3Z-hexenal productions respectively. It should be noted that the latter is free to isomerization in 2E-hexenal. It will be interesting to include the olive recombinant HPLwt in a full biocatalytic process using lipase and lipoxygenase, then to optimize scale-up conditions for an industrial purpose.

## Acknowledgements

This work has been supported by the “Collectivité Territoriale de Corse” and the Commission of European Communities, EuroTrans-Bio 2009-94, “Biocatalyzed synthesis of fragrances”.

## References

1. Angerosa, F., Basti, C. and Vito, R. (1999) Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *J Agr Food Chem*, **47**, 836-839.
2. Bate, N. J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J. M. C., Thompson, J. E. and Rothstein, S. J. (1998) Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol*, **117**, 1393-1400.
3. Ben Akacha, N. and Gargouri, M. (2009) Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide-lyase from olive leaves and alcohol-dehydrogenase from yeast in liquid/gas reactor. *Process Biochem*, **44**, 1122-1127.
4. Bradford, M. 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.
5. Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**, 1948-1954.
6. Froehlich, J. E., Itoh, A. and Howe, G. A. (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol*, **125**, 306-317.
7. Gargouri, M., Drouet, P. and Legoy, M.-D. (2004) Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves: Volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids. *J Biotechnol*, **111**, 59-65.
8. Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.-L., Muhovski, Y., Wathelet, J.-P., du Jardin, P. and Thonart, P. (2012) Optimization and scaling up of a biotechnological synthesis of natural green leaf volatiles using *Beta vulgaris* hydroperoxide lyase. *Process Biochem*, **47**, 2547-2551.
9. Gill, S. C. and Von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, **182**, 319-326.
10. Hassan, M. N., Zainal, Z. and Ismail, I. (2015) Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol J.*, **13**, 727-739.
11. Hatanaka, A. (1993) The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, **34**, 1201-1218.

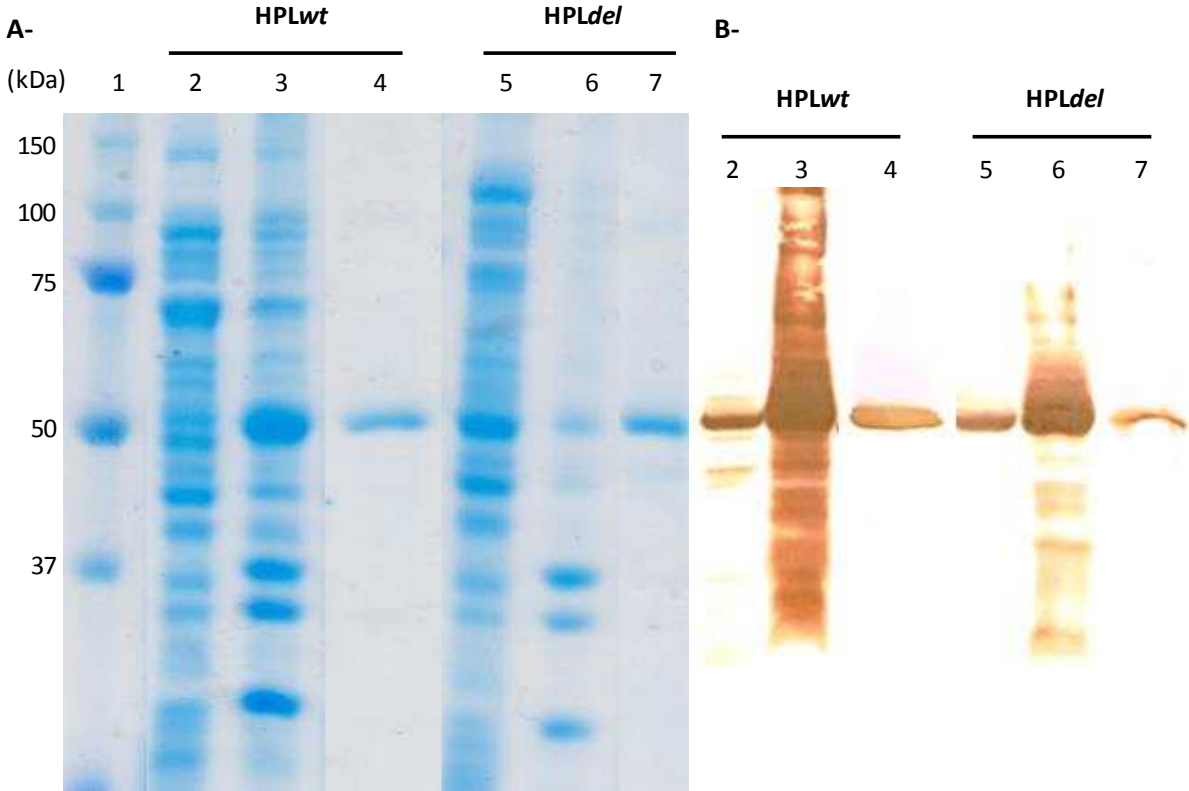
12. Hernandez, M. L., Mancha, M. and Martinez-Rivas, J. M. (2005) Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive. *Phytochemistry*, **66**, 1417-1426.
13. Ibdah, M., Lavid, N., Lewinson, E., Amit, A. and Dror, N. (2010) Green routes to green notes. *CHEMICAL ENGINEERING*, **20**.
14. Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. and Takabayashi, J. (2006) ETR1-, JAR1- and PAD2-dependent signaling pathways are involved in C6-aldehyde-induced defense responses of *Arabidopsis*. *Plant Sci*, **171**, 415-423.
15. Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J. and Berti, L. (2006) Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol Bioch*, **44**, 450-454.
16. Luaces, P., Pérez, A. G. and Sanz, C. (2003) Role of olive seed in the biogenesis of virgin olive oil aroma. *J Agr Food Chem*, **51**, 4741-4745.
17. Marczy, J. S., Németh, A. S., Samu, Z., Hager-Veress, A. and Szajani, B. (2002) Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxid lyase enzymes. *Biotechnol Lett*, **24**, 1673-1675.
18. Matsui, K., Kajiwara, T. and Hatanaka, A. (1992) Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide. *J Agr Food Chem*, **40**, 175-178.
19. Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T. and Feussner, I. (2006) Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, **67**, 649-657.
20. Matsui, K., Shibata, Y., Tateba, H., Hatanaka, A. and Kajiwara, T. (1997) Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Biosci, Biotech, Bioch*, **61**, 199-201.
21. Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T. and Kajiwara, T. (1996) Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett*, **394**, 21-24.
22. Morales, M. T., Aparicio, R. and Rios, J. J. (1994) Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J Chromatogr A*, **668**, 455-462.
23. Németh, Á. S., Márczy, J. S., Samu, Z., Hágér-Veress, Á. and Szajáni, B. (2004) Biocatalytic production of 2 (E)-hexenal from hydrolysed linseed oil. *Enzyme Microb Tech*, **34**, 667-672.
24. Noordermeer, M. A., van der Goot, W., van Kooij, A. J., Veldsink, J. W., Veldink, G. A. and Vliegthart, J. F. G. (2002) Development of a biocatalytic process for the production of C6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase. *J Agr Food Chem*, **50**, 4270-4274.
25. Olias, J. M., Perez, A. G., Rios, J. J. and Sanz, L. C. (1993) Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the "green" odor notes. *J Agr Food Chem*, **41**, 2368-2373.
26. Padilla, M. N., Hernandez, M. L., Pérez, A. G., Sanz, C. and Martinez-Rivas, J. M. (2010) Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. *J Agr Food Chem*, **58**, 5649-5657.
27. Rabetafika, H. N., Gigot, C. d., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Destain, J., Du Jardin, P., Wathelet, J.-P. and Thonart, P. (2008) Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnol Lett*, **30**, 1115-1119.
28. Salas, J. J. and Sanchez, J. (1999) Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Sci*, **143**, 19-26.
29. Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. and Lewinsohn, E. (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J*, **54**, 712-732.
30. Stumpe, M. and Feussner, I. (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Rev*, **5**, 347-357.
31. Vick, B. A. (1991) A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids*, **26**, 315-320.

#### LEGEND OF FIGURE:

**Figure 1.** SDS-PAGE (12% acrylamide) analysis of olive recombinant HPLwt and HPLdel. The proteins were separated by electrophoresis then (A) stained by EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma) or (B) blotted and probed with the specific monoclonal peroxidase conjugated anti-His antibody.

Lane 1: molecular mass standard. The lanes 2 to 4 and 5 to 7 relate to HPLwt and HPLdel, respectively. Lane 2 and 5: Soluble extract; Lane 3 and 6: Lysis pellet; Lane 4 and 7: purified pooled fractions containing HPLwt or HPLdel.

Figure 1.



**Table 1. Kinetic parameters of purified recombinant olive HPLwt and HPLdel**

HPL	Substrates	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vm ( $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ )	kcat ( $\text{s}^{-1}$ )	kcat/Km ( $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ )
<b>HPLwt</b>	13-HPOD	43.10 $\pm$ 4.46	0.48 $\pm$ 0.06	26.38 $\pm$ 3.01	0.62
	13-HPOT	152.75 $\pm$ 10.36	10.35 $\pm$ 0.68	564.95 $\pm$ 36.89	3.71
<b>HPLdel</b>	13-HPOD	43.22 $\pm$ 7.87	0.34 $\pm$ 0.01	17.89 $\pm$ 0.53	0.43
	13-HPOT	173.85 $\pm$ 27.70	7.65 $\pm$ 0.07	402.62 $\pm$ 3.66	2.36

Values represent the mean of three independent replicates  $\pm$  standard deviation.

**Table 2. Production of hexanal from 13-HPOD using HPLwt or HPLdel**

Recombinant HPL (U.mL <sup>-1</sup> )	13-HPOD (mM)	Hexanal (mM)	Molar conversion rate (%)	Optimum reaction time (min)
<b>HPLwt</b>				
0.25	4	2.51 ± 0.03	63	20
	6	3.68 ± 0.16	61	20
0.5	2	1.60 ± 0.17	80	5
	4	3.33 ± 0.17	83	15
	6	5.02 ± 0.05	84	15
1	4	2.86 ± 0.01	71.5	5
	6	5.61 ± 0.48	93.5	10
<b>HPLdel</b>				
0.5	4	2.74 ± 0.10	68.5	10
	6	3.35 ± 0.14	56	20
1	6	3.93 ± 0.15	65.5	20

Reactions were performed with various concentrations of 13-HPOD in 1 mL of reaction mixture (phosphate buffer 50 mM, pH 7.5, incubated at 25 °C) during an optimum reaction time for each enzyme amount. After extraction, hexanal were identified and quantified by GC-MS and GC-FID.

Values represent the mean of two independent replicates ± standard deviation



**Table 3. Production of 3Z-hexenal from 13-HPOT using HPLwt or HPLdel**

Recombinant HPL (U.mL <sup>-1</sup> )	13-HPOT (mM)	3Z-hexenal (mM)	Molar conversion rate (%)	Optimum reaction time (min)
<b>HPLwt</b>				
0.25	4	0.87 ± 0.04	22	5
	6	0.90 ± 0.15	15	10
0.5	2	0.77 ± 0.002	38.5	20
	4	1.45 ± 0.18	36	10
	6	2.26 ± 0.02	38	5
1	4	0.75 ± 0.02	19	5
	6	2.18 ± 0.14	36	15
<b>HPLdel</b>				
0.25	4	0.49 ± 0.03	12	20
0.5	4	1.12 ± 0.02	28	20
	6	1.19 ± 0.23	19.8	10

Reactions were performed with various concentrations of 13-HPOT in 1 mL of reaction mixture (phosphate buffer 50 mM, pH 7.5, incubated at 25 °C) during an optimum reaction time for each enzyme amount. After extraction, 3Z-hexenal were identified and quantified by GC-MS and GC-FID. Values represent the mean of two independent replicates ± standard deviation.