



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. Biochimie, Biologie Moléculaire. UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI, 2015. Français. NNT : . tel-01304561v1

HAL Id: tel-01304561

<https://hal.science/tel-01304561v1>

Submitted on 19 Apr 2016 (v1), last revised 4 Mar 2019 (v2)

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
M. 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
M. Pascal DHULSTER, Pr, Université de Lille 1
M. Alain MUSELLI, Pr, Université de Corse
Mme Liliane BERTI, Pr, Université de Corse
M. 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 lipoxygénase impliquée dans la production de composés aromatisants (l'hexanal, le (Z)-hex-3-énal et le (E)-hex-2-énal). 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-énal. 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 Na₂SO₄, 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-énal 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 (HPL*wt*) 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 (HPL*del*) 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 HPL*wt* and HPL*del* 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 HPL*wt* and HPL*del* during five weeks storage at -80 ° C. Furthermore, the addition of chemical compounds such as KCl, NaCl, Na₂SO₄, 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

Avant Propos.....	1
Introduction bibliographique.....	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
Matériels et Méthodes	35
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 <i>E.coli</i>	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 <i>E.coli</i>	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'HPL _{wt} et l'HPL _{del}	42
8. Synthèse et analyse des produits de l'hydroperoxyde lyase	43
Résultats et Discussion	46
1. Etude préliminaires	47
1.1- Choix de l'échantillon d'ARN.....	47
1.2- Clonage de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive par RT-PCR et RACE-PCR	47
1.2.1- Clonage de l'extrémité 3' de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive	48
1.2.2- Clonage de l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour l'HPL d'olive	48

1.3-	Clonage de l'ADNc complet codant pour l'HPL d'olive et analyse de la séquence .	49
2.	Expression de l'HPL recombinante d'olive.....	53
3.	Purification des enzymes HPL _{wt} et HPL _{del}	56
4.	Caractérisation des HPL _{wt} et HPL _{del}	60
4.1-	Détermination des pH et températures optimum	60
4.2-	Détermination des paramètres cinétiques	62
5.	Production d'hexanal et de (Z)-hex-3-énal par l'action des HPL recombinantes d'olive	63
5.1-	Production d'hexanal par l'HPL _{wt} ou l'HPL _{del}	63
5.2-	Production de (Z)-hex-3-énal par l'HPL _{wt} et l'HPL _{del}	65
6.	Conservation de l'HPL _{wt} et de l'HPL _{del}	67
6.1-	Lyophilisation.....	67
6.2-	Réfrigération	68
7.	Effet de composés chimiques sur les activités de l'HPL _{wt} et de l'HPL _{del} .	70
7.1-	Effet de la concentration en sel.....	70
7.2-	Effet de la concentration en glycine et glycérol	72
7.3-	Paramètres cinétiques en présence des composés chimiques	74
7.4-	Inactivation	75
8.	Effet de composés chimiques sur la production d'aldéhydes en C6	78
8.1-	Production de (Z)-hex-3-énal par l'HPL _{wt} ou l'HPL _{del} en présence de glycine, de NaCl ou de Na ₂ SO ₄	78
8.2-	Production d'hexanal par l'HPL _{wt} ou l'HPL _{del} en présence de glycine, de NaCl ou de Na ₂ SO ₄	80
	Conclusion et Perspectives.....	82
	Références bibliographiques	86
	Annexes.....	96
	Communications.....	100

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 linolénique 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 <i>et al.</i> , 2005).	10
Figure 4: Représentation tridimensionnelle de l'AOS de guayule (d'après Li <i>et al.</i> 2008).	12
Figure 5: Représentation de l'hélice I (d'après Li <i>et al.</i> , 2008).	13
Figure 6: Site de liaison à l'hème (d'après Li <i>et al.</i> , 2008).	14
Figure 7: Site actif de l'AOS de guayule (d'après Li <i>et al.</i> , 2008).	15
Figure 8: Structure moléculaire de l'hème <i>b</i> 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 <i>et al.</i> , (2004)).	22
Figure 12: Mécanisme de défense des plantes contre les herbivores (d'après Matsui <i>et al.</i> , 2006).	25
Figure 13: Communication intra et inter-plante à la suite d'une attaque herbivore (d'après Arimura <i>et al.</i> , 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.	50

Figure 16: Arbre phylogénétique basé sur la séquence protéique des enzymes des différentes classes de CYP74.	52
Figure 17: Analyse de la répartition de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.	53
Figure 18: Analyse des essais de solubilisation de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.....	54
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.....	55
Figure 20: Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine au cobalt (Talon Superflow Metal Affinity).	57
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.	58
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).	60
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).	61
Figure 24: Etude de la conservation de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F).....	69
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).....	71
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).	73
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 Na2SO4 0,25M ou de NaCl 1M.	76

Table des tableaux

Tableau 1: Flaveurs attribuées aux différents composés volatils à six atomes de carbone formés par la voie de la lipoxygénase (d'après Gargouri <i>et al.</i> , 2008).....	28
Tableau 2: Tableau de purification de l'HPLwt et l'HPLdel.	59
Tableau 3 : Paramètres cinétiques des HPLwt et HPLdel recombinantes purifiées.....	62
Tableau 4: Production d'hexanal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOD..	63
Tableau 5: Production de (Z)-hex-3-énal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOD.	65
Tableau 6: Production de (Z)-hex-3-énal par l'HPLwt ou l'HPLdel à différentes températures.	66
Tableau 7 : Paramètres cinétiques de (A) l'HPLwt en présence et en absence de glycine 2,5% (w/v) et (B) l'HPLdel en presence ou en absence de Na ₂ SO ₄ 0,25M.	74
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 ₂ SO ₄ 0,25 M ou de NaCl 1M.....	77
Tableau 9: Production de (Z)-hex-3-énal par l'HPLwt en présence de glycine 2,5 % (w/v) ou de NaCl (0,5M) et par l'HPLdel en présence de Na ₂ SO ₄ 0,25M.	79
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 presence de Na ₂ SO ₄ 0,25M.	80

Liste des abréviations

13-HPOD	Acide 13-hydropéroxyoctadéca-9,11-diénoïque ou 13-hydroperoxyde d'acide linoléique
13-HPOT	Acide 13-hydropéroxyoctadéca-9,11,15-triénoïque ou 13-hydroperoxyde d'acide linolénique
α -DOX	α -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
HPL _{wt}	Hydroperoxyde lyase sauvage
HPL _{del}	Hydroperoxyde lyase délétée du peptide de transit chloroplastique
IPTG	Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside
LOX	Lipoxygénase
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
POX	Peroxygénase
SDS	Dodécyl Sulfate de Sodium

Avant Propos

La voie de la lipoxygénase (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-énal et le (E)-hex-2-énal) 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 lipoxygénase, 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-énal. 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 α -dioxygénase (α -DOX) soit par l'action d'une lipoxygénase (LOX) (Blée, 2002; Feussner Wasternack, 2002; Howe et Schillmiller, 2002).

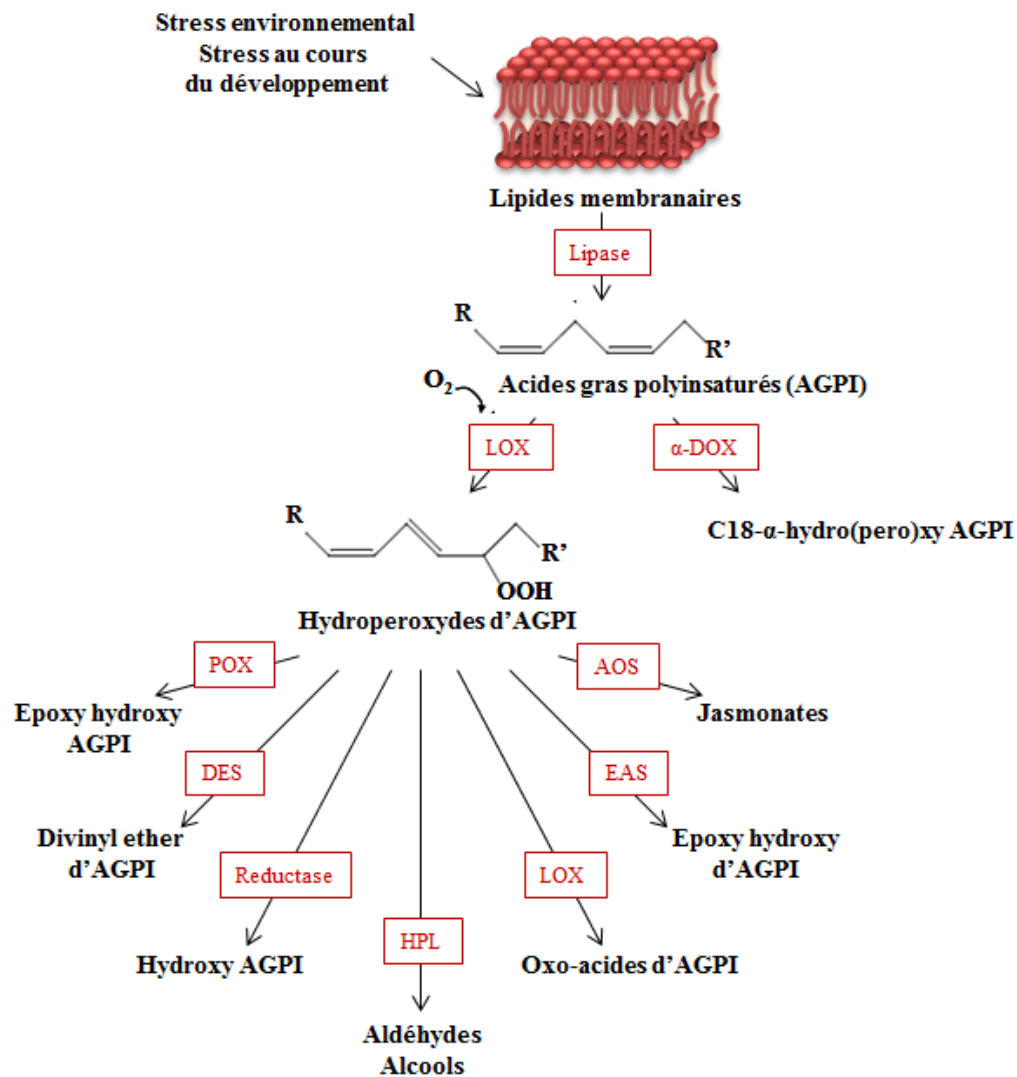


Figure 1: Voie de synthèse des oxylipines : la voie de la lipoxygénase (d'après Feussner et Wasternack (2002)).

LOX : lipoxygénase ; α-DOX : α-dioxygénase ; POX : peroxygénase ; DES : divinyl ether synthase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; EAS : époxy alcool synthase ; AOS : allène oxide 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-énal, le (E)-hex-2-énal et les aldéhydes en C9 comme le (Z)-non-3-énal, le (Z,Z)-non-3,6-adienal, produits par l'HPL, sont également impliqués dans la flaveur 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). Elle 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 héminique (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 linolénique 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).

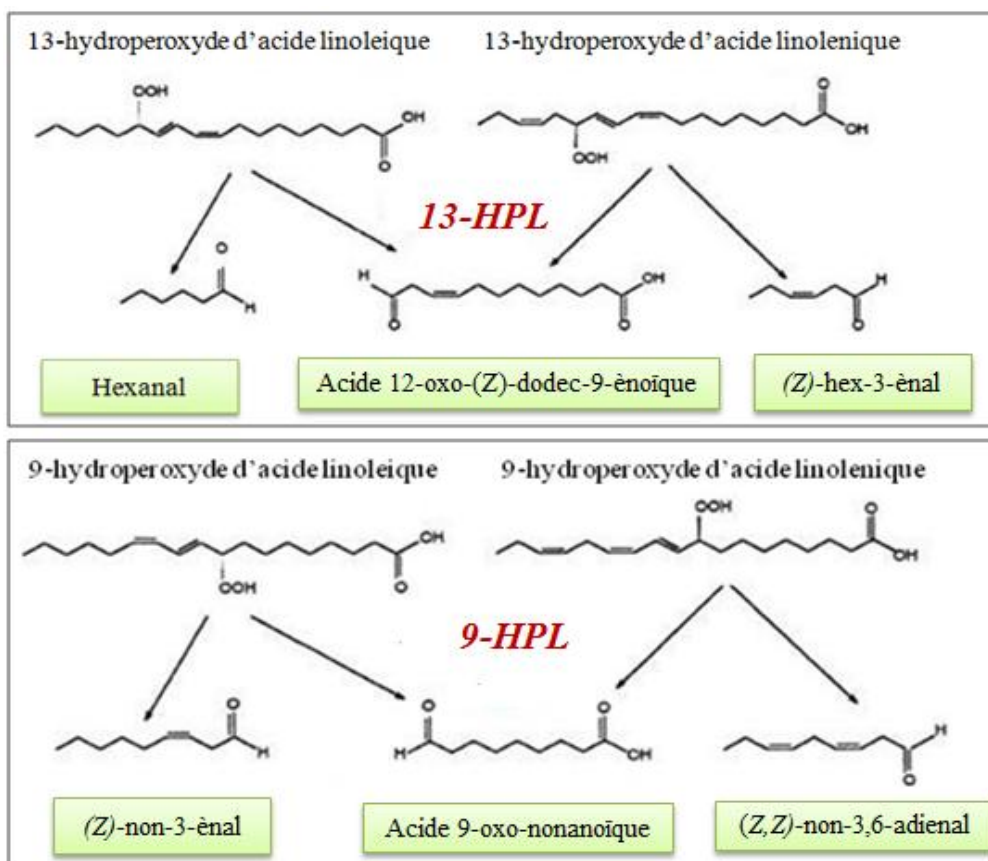


Figure 2: Dégradation des 9- et 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linolénique par l'hydroperoxyde lyase (d'après Martini et Iacazio, 1995 ; Fauconnier et Marlier, 1997).

Les hydroperoxydes lyases spécifiques des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linolénique (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 linolénique (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 linolénique (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 (monooxygénases) (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	LVFLAGENAYGGMKVLEP	KMSLLKSVVYEALRIEPPV	KDPKIFKDSEKFGIRFVGEEGEK	PTPENKQCPGKNLVVLIGRIMV
9-AOS tomate	FVFLAGENSYGGLKVFEF	KMELVKSVVYETLEMDPPV	KDSKVFKNAEEFNPIRFVGGGGEK	PSVNIKQCEKDLIVLMGRLLV
DES tabac	ILFLVGINMFAGLNAFEP	KMSLVESIVYETLRLP	RDPKIFDKPDIFIPRFMGE-GVK	PAPDNKQCAGKDLVHLLGRMLL
13-AOSA. thaliana	LLFATSENTWGGMKILFP	KMELTKSVVYECLRFEPVP	RDPKIFDRADEFVPERFVGEEGEK	PTVGNKQCAGKDFVLLVARLFV
13-HPLA. thaliana	LLFVLFGNAYGGFSVFIP	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'accension 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).

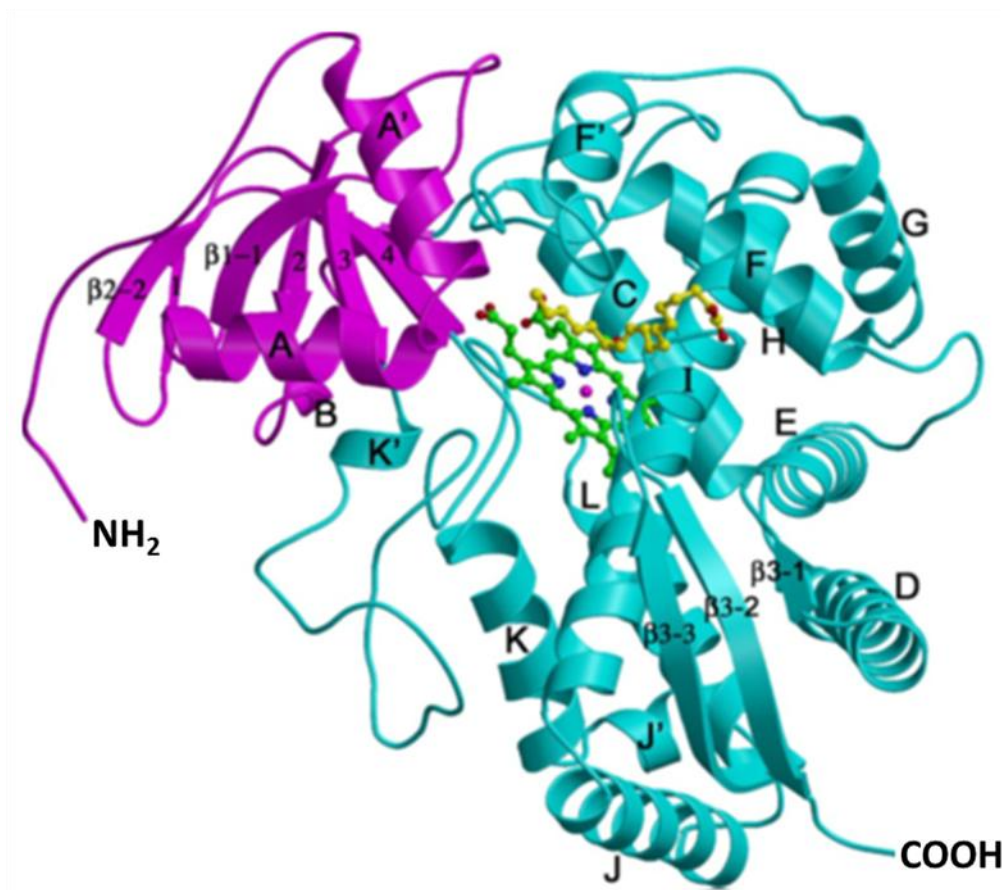


Figure 4: Représentation tridimensionnelle de l'AOS de guayule (d'après Li *et al.* 2008).

Les domaines α et β 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 α et un domaine riche en feuillet β . 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 (N₂₇₆-T₂₇₇-X-G₂₇₉-G₂₈₀-X) dans la partie centrale (Figure 5).

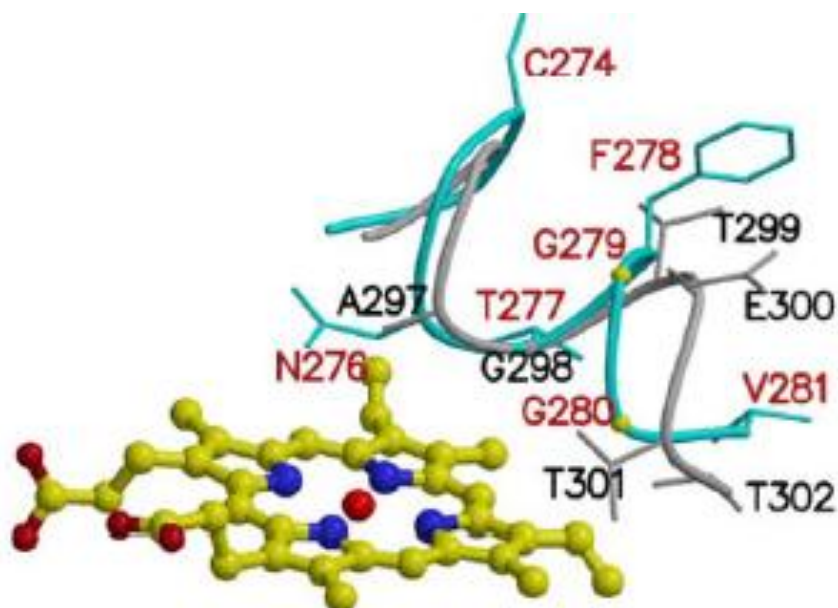


Figure 5: Représentation de l'hélice I (d'après Li *et al.*, 2008).

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).

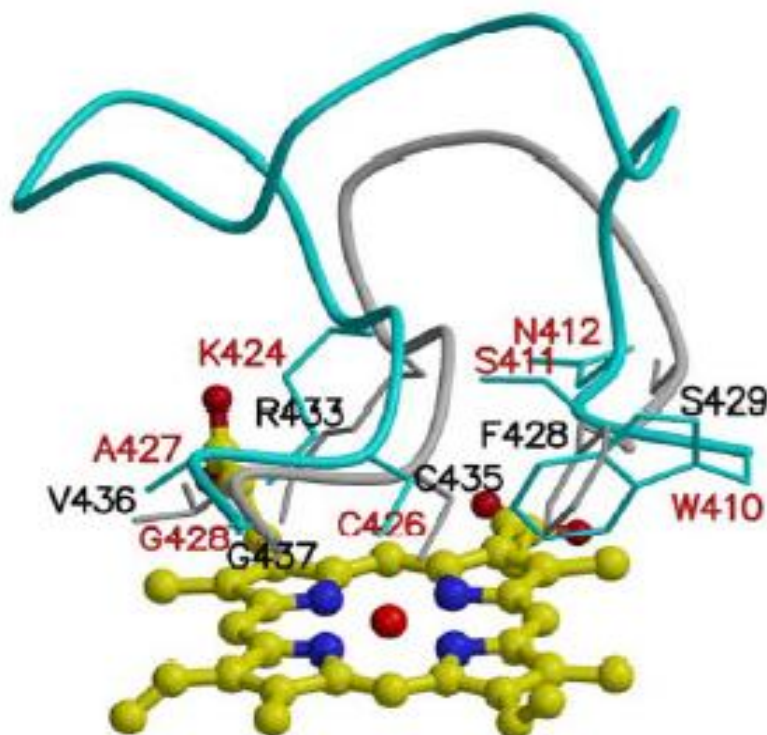


Figure 6: Site de liaison à l'hème (d'après Li et al., 2008).

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).

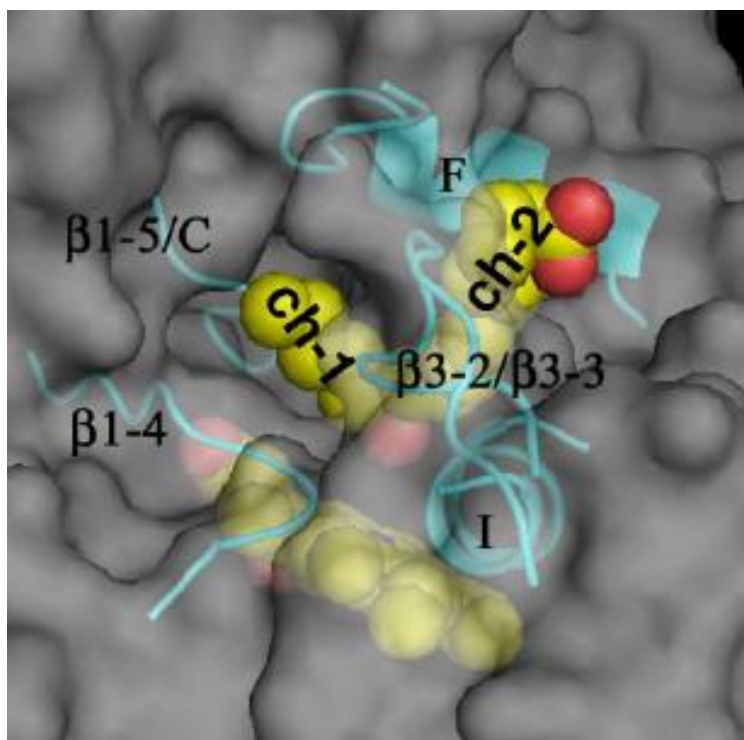


Figure 7: Site actif de l'AOS de guayule (d'après Li *et al.*, 2008).

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 héminique. 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).

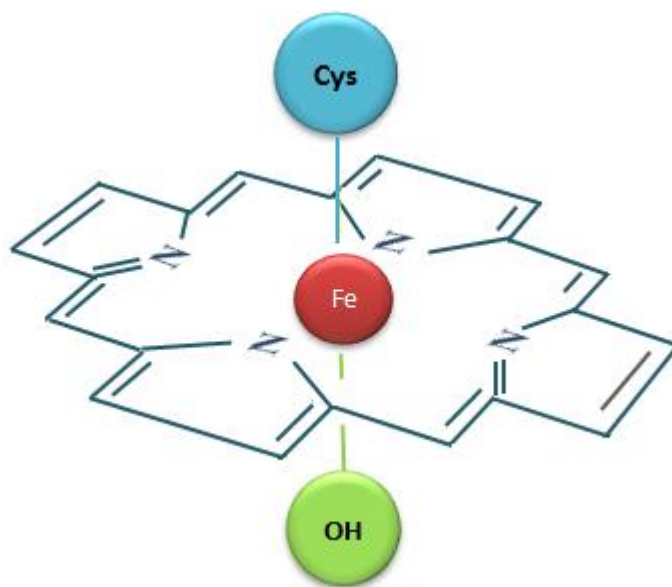


Figure 8: Structure moléculaire de l'hème *b* avec au centre de la porphyrine, l'atome de fer.

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).

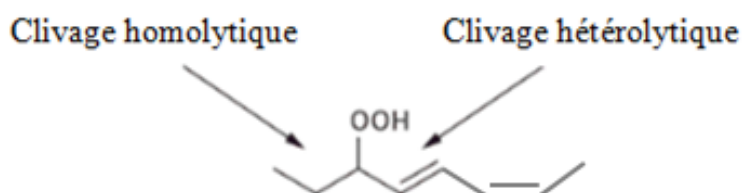


Figure 9: Clivages homolytique et hétérolytique d'hydroperoxyde d'acide gras.

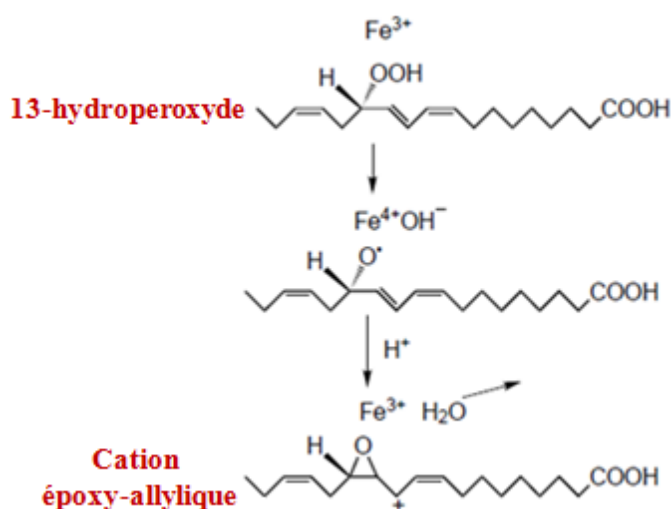
Par clivage homolytique, l'HPL coupe la liaison entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et le carbone porteur de la liaison aliphatique. La réaction donne un alcool (ou un hydrocarbure) et un oxo-acide (Gardner *et al.*, 1991). Ce type de clivage est généralement retrouvée chez les plantes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

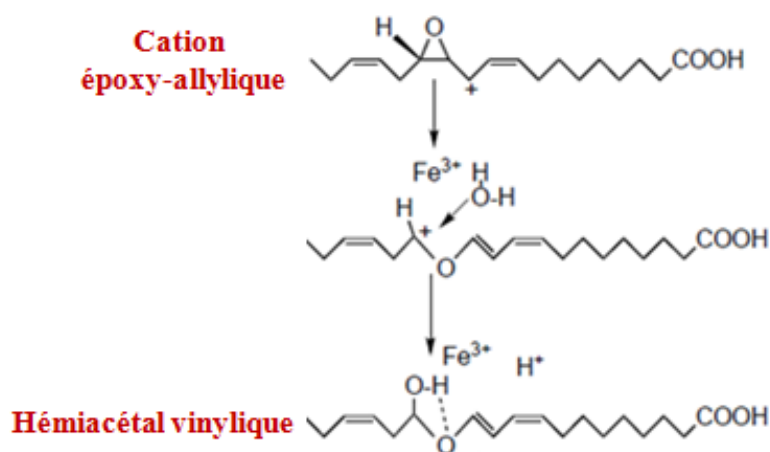
2.4.2- Mécanisme réactionnel

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

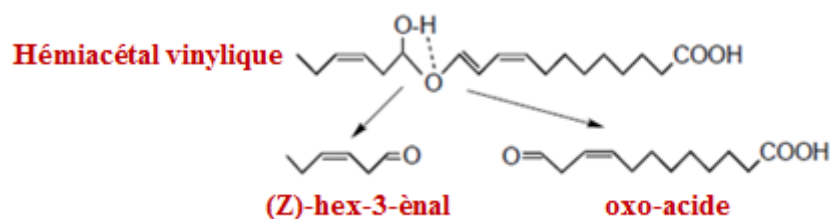
- La première étape consiste en la formation d'un complexe hydroxyde de fer par réarrangement à la suite du clivage de la liaison oxygène-oxygène de l'hydroperoxyde par l'enzyme. Ce complexe d'hydroxyde de fer ($\text{Fe}^{4+}\text{OH}^-$) capte un proton (H^+) en solution aqueuse, libérant une molécule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

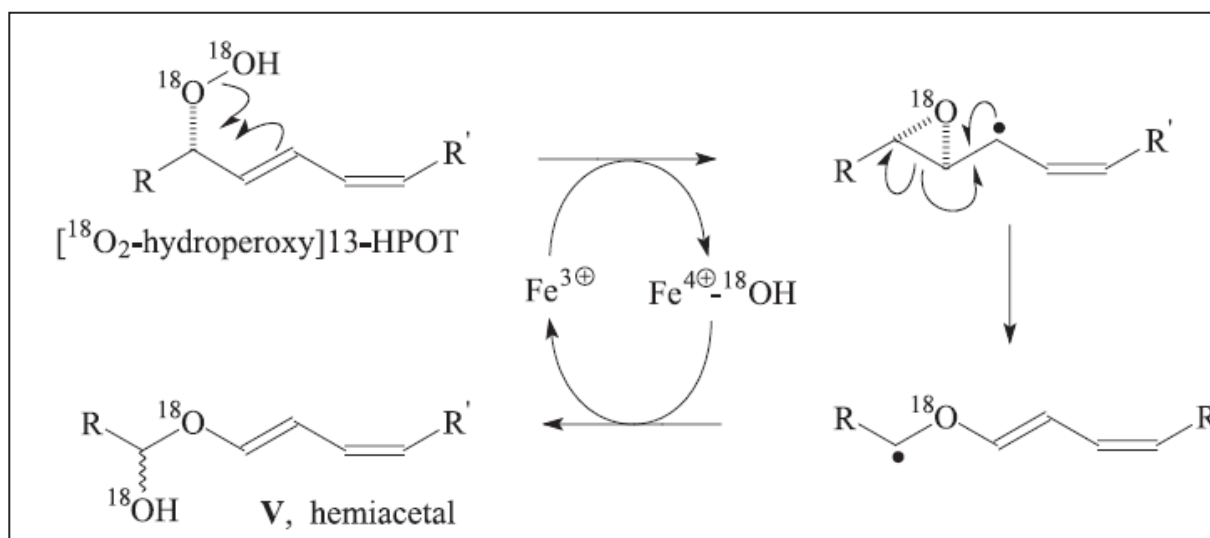


Figure 10: Mécanisme réactionnel de l'HPL décrit par Grechkin et Hamberg (2004).

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 Na₂SO₄ (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 linolénique) (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 (O₂) 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).

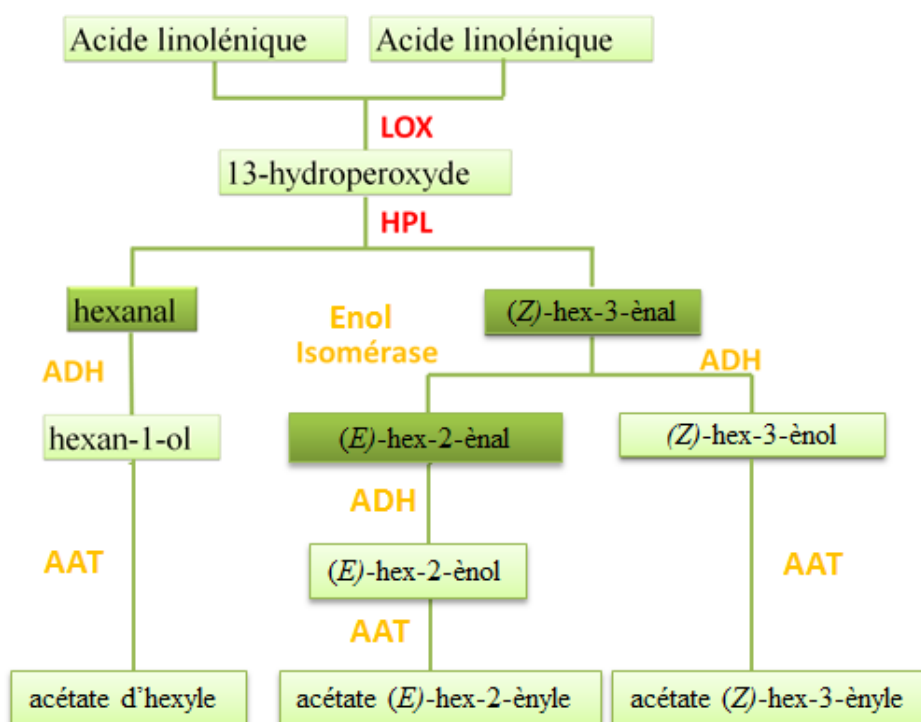


Figure 11: Formation des composés volatils responsables de l'arôme au cours de la voie de la lipoxigénase (d'après Angerosa *et al.*, (2004)).

LOX : lipoxigénase ; 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 C₁₂ et un aldéhyde en C₆. 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 linolénique 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-énal et le (*Z*)-hex-3-énal 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).

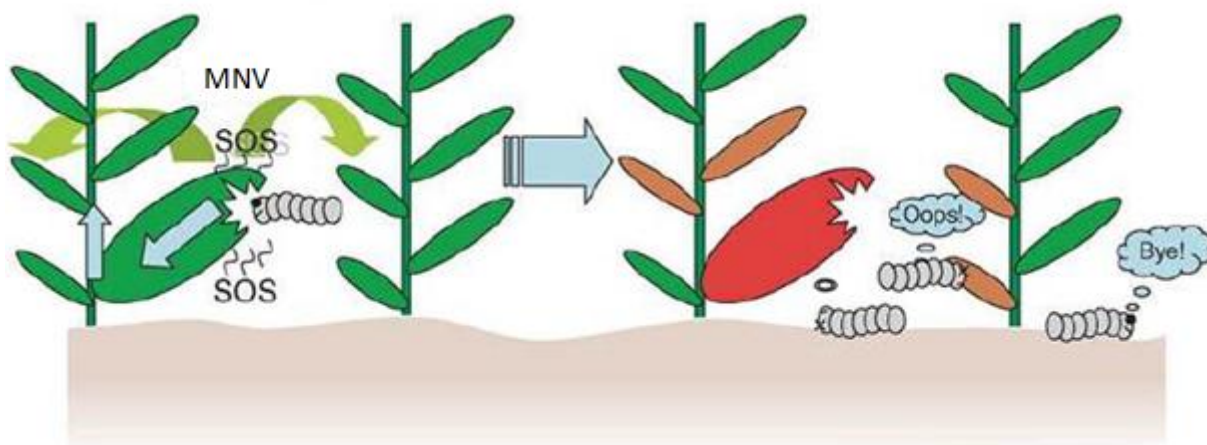


Figure 12: Mécanisme de défense des plantes contre les herbivores (d'après Matsui *et al.*, 2006). MNV : Molécules à notes verte.

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).

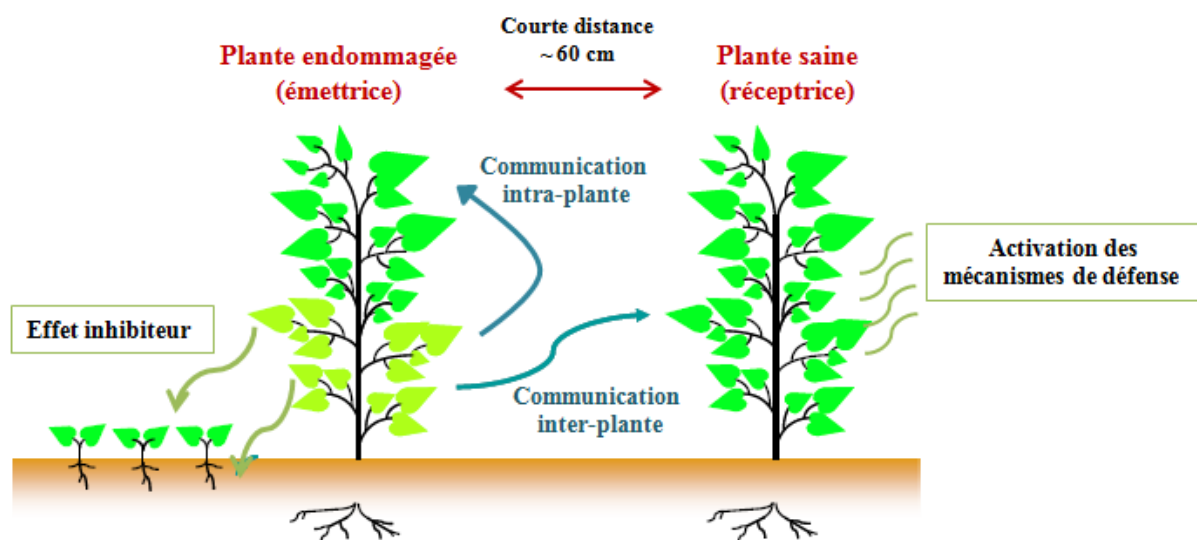


Figure 13: Communication intra et inter-plante à la suite d'une attaque herbivore (d'après Arimura *et al.*, 2010).

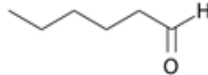
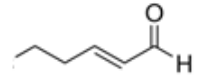
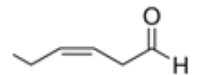
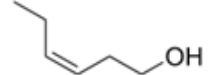
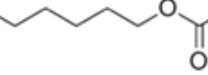
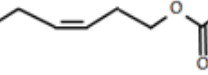
L'émission des composés volatils active d'une part les mécanismes de défense des feuilles non infectées de la plante réceptrice voisine et d'autre part inhibe la croissance et le développement des plantules à travers l'air et le sol (Arimura *et al.*, 2010). C'est par exemple le cas pour *Citrus jambhiri* 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 linolénique

Les molécules impliquées dans la note verte fraîche sont l'hexanal, le (*Z*)-hex-3-ènol, le (*E*)-hex-2-ènol 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 microbiologique 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).

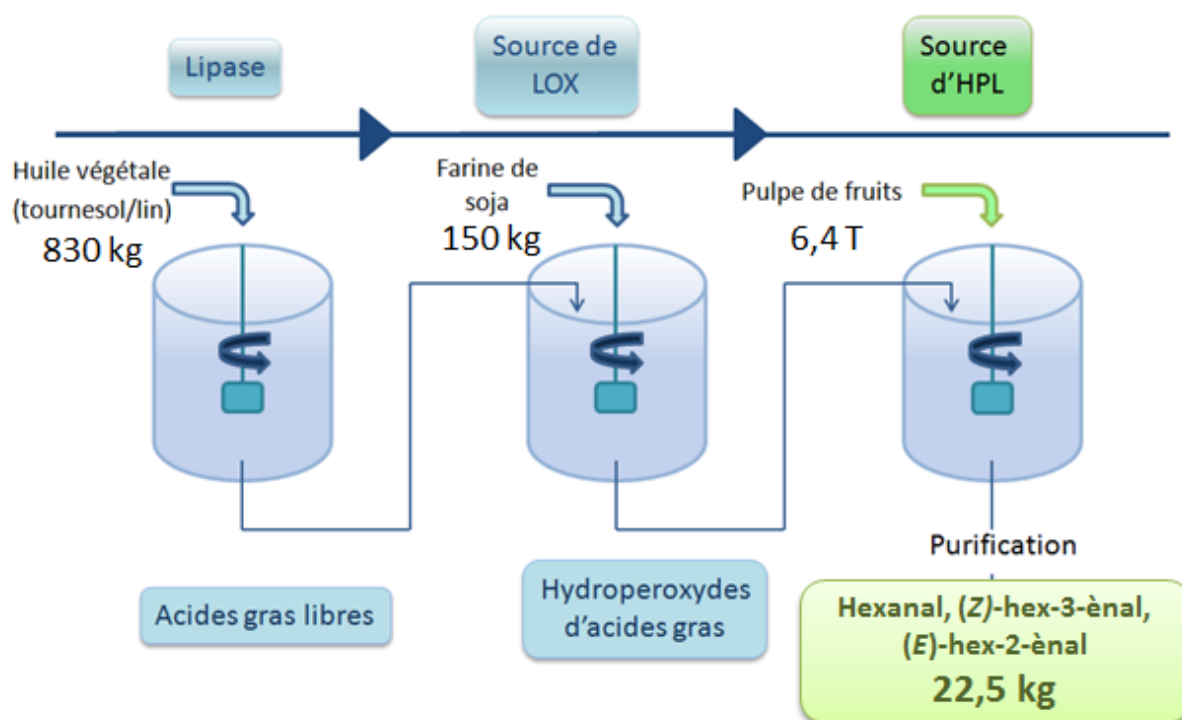


Figure 14: Procédé de production biocatalytique de composés à note verte (d'après Gigot, 2011).

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 linolénique. 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-énal et 5,9 mM du (*Z*)-hex-3-énal 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-énal et (*E*)-hex-2-énal) (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-ènal 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-ènal respectivement. L'HPL immobilisée permet de produire autant d'hexanal et de (*E*)-hex-2-ènal 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^{ème} 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-énal 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, Na₂SO₄, 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-énal).

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)₁₈, 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)₁₈V 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 2nd 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'-cgtagacccacagagaacpgtcagg 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'-accaccaaatacpgattgaatcc, HPLh: 5'-attcpggttctgttcagtcag et HPLi: 5'-tgacpgtctttgtataacttcttcpgc, puis, avec HPLj: 5'ttgcpgaacgtcacpggtca, HPLk: 5'-atattgtcccacatggag 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'-aaaatgacgggtccpgcctcc 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 séquençé.

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'HPL_{wt} (type sauvage) et l'HPL_{del} (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 *Sph*IHPLsens : 5'-acatcatcpgacgggtccpgcctccgt ou *Sph*IHPLsens2 : 5'-acatcpgatcpgtctctcpgccctccpgcpgcatt et *Xma*IHPLantisens: 5'-tccccccgggtcacttgacttctcaactg. Ces oligonucléotides contiennent les sites de restriction *Sph*I et *Xma*I, ce qui permet d'introduire le site *Sph*I en amont du codon d'initiation ATG et le site *Xma*I en aval du codon stop. La PCR réalisée avec l'oligonucléotide sens *Sph*IHPLsens2 permet d'obtenir l'ADNc codant pour l'HPL~~del~~ 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 *Sph*I et *Xma*I, les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pQE-30 traité avec les mêmes enzymes. Les vecteurs recombinants (pQE30-HPL_{wt} and pQE30-HPL~~del~~) 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⁻¹ de tryptone, 24 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 0,4 % glycérol, 0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄, 50 µg.mL⁻¹ d'ampicilline, 25 µg.mL⁻¹ de kanamycine) ont étéensemencés par 24 mL d'une préculture d'*E. coli* (M15) transformée avec le plasmide pQE30-HPL_{wt} ou pQE30-HPL~~del~~ (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⁻¹ 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⁻¹ de DNaseI, 50 mM de MgSO₄, 1 mM de benzamidine, 1 mM PMSF et 1 % d'emulgogène. 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_2HPO_4 , 1,47 mM de KH_2PO_4 , 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 linolénique 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 linolénique, 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 linolénique 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 $25000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

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 μM d'hydroperoxydes, 50 mM de tampon phosphate à pH 7 et 10 μL 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 μM et 114 μM de 13-HPOD et 16 μM et 134 μM de 13-HPOT pour l'HPL_{wt}, et 7 μM et 121 μM de 13-HPOD et 8 μM et 175 μM de 13-HPOT pour l'HPL_{del}.

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 BlueTM 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 H_2O_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⁻¹. 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⁻¹.M⁻¹.

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

L'influence de divers composés chimiques (KCl, NaCl, Na₂SO₄, 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 Na₂SO₄ 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 Na₂SO₄ 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'HPL $_{wt}$, en utilisant des concentrations comprises entre 11 μM et 104 μM de 13-HPOD et 8 μM et 124 μM de 13-HPOT
- en présence de 0,25 M de Na_2SO_4 pour l'HPL $_{del}$ en utilisant des concentrations comprises entre 7 μM et 89 μM de 13-HPOD et 8 μM et 252 μM de 13-HPOT

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

Les composés volatils, l'hexanal et le (Z)-hex-3-énal, 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 linolénique comme décrit précédemment. L'action de l'HPL $_{wt}$ ou de l'HPL $_{del}$ 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 μL 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 μ 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 μ 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-énal 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-énal) 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)₁₈V. 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).

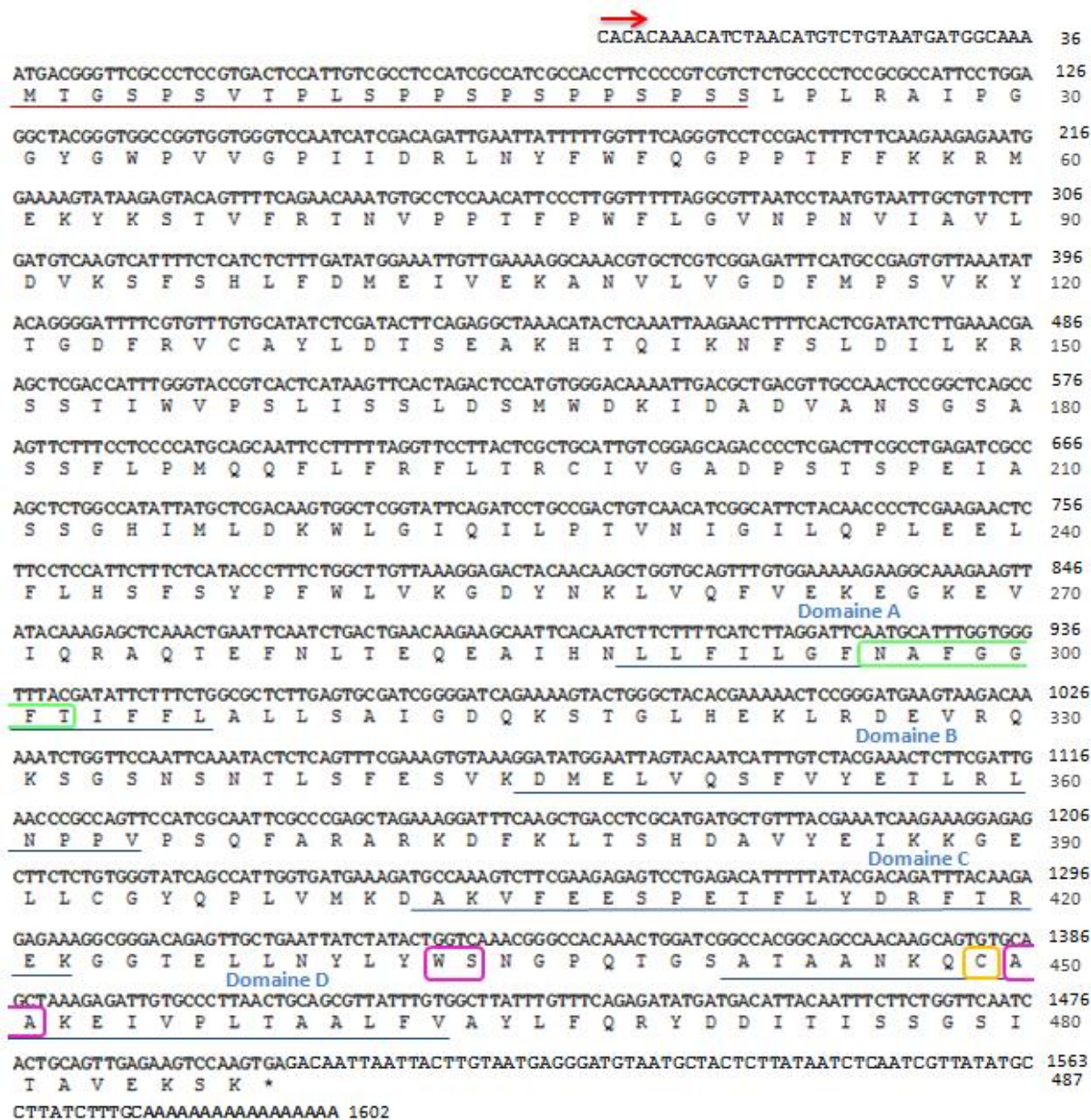


Figure 15: Séquence nucléotidique et peptidique de l'HPL d'olive de la variété Leccino.

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).

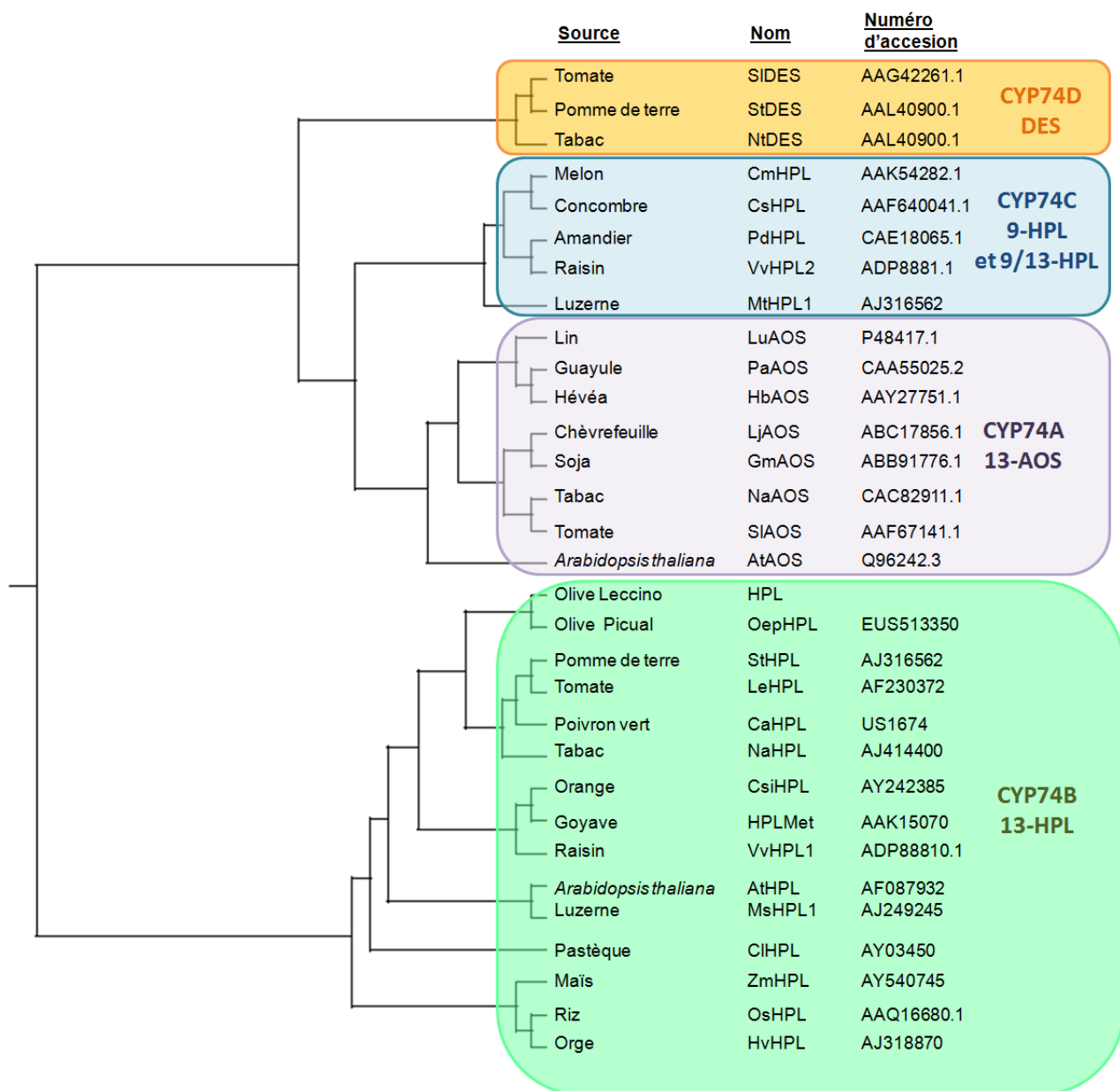


Figure 16: Arbre phylogénétique basé sur la séquence protéique des enzymes des différentes classes de CYP74.

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 δ -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).

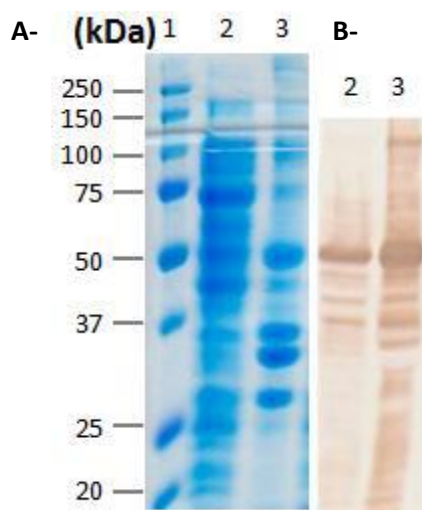


Figure 17: Analyse de la répartition de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.

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 $116,1 \mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$ pour le 13-HPOD et de $135,8 \mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$ 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).

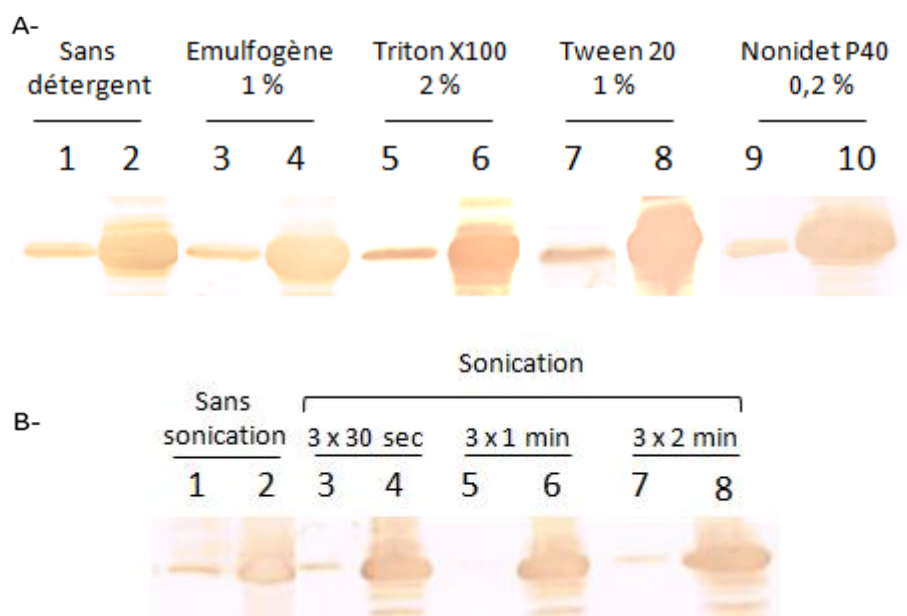


Figure 18: Analyse des essais de solubilisation de l'enzyme par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.

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 (HPL~~del~~). La répartition dans le surnageant et le culot de l'HPL~~del~~ et de l'HPL sauvage (HPLwt) a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoempreinte (Figure 19).

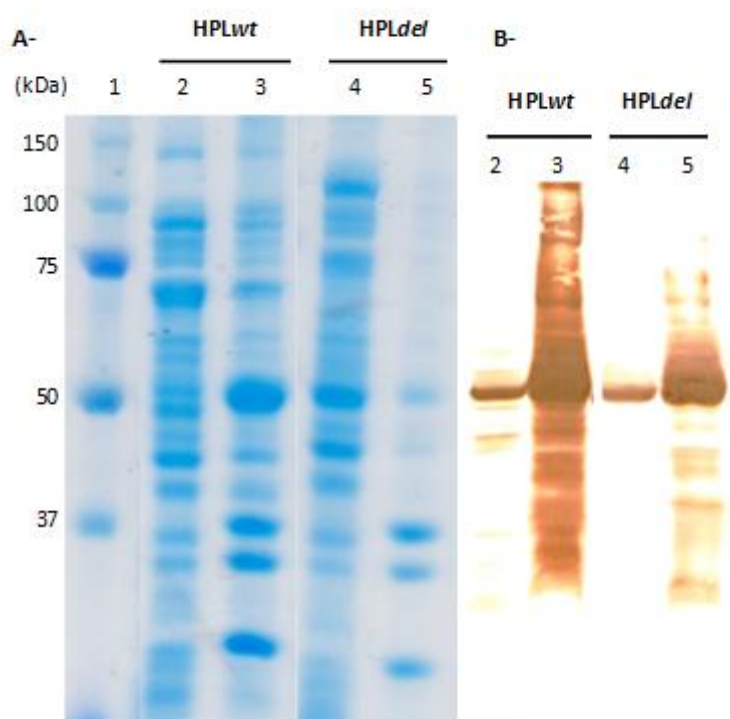


Figure 19: Analyse de la répartition de l'HPLwt et de l'HPL~~del~~ par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS et par immunoempreinte.

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'HPL~~del~~ 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).

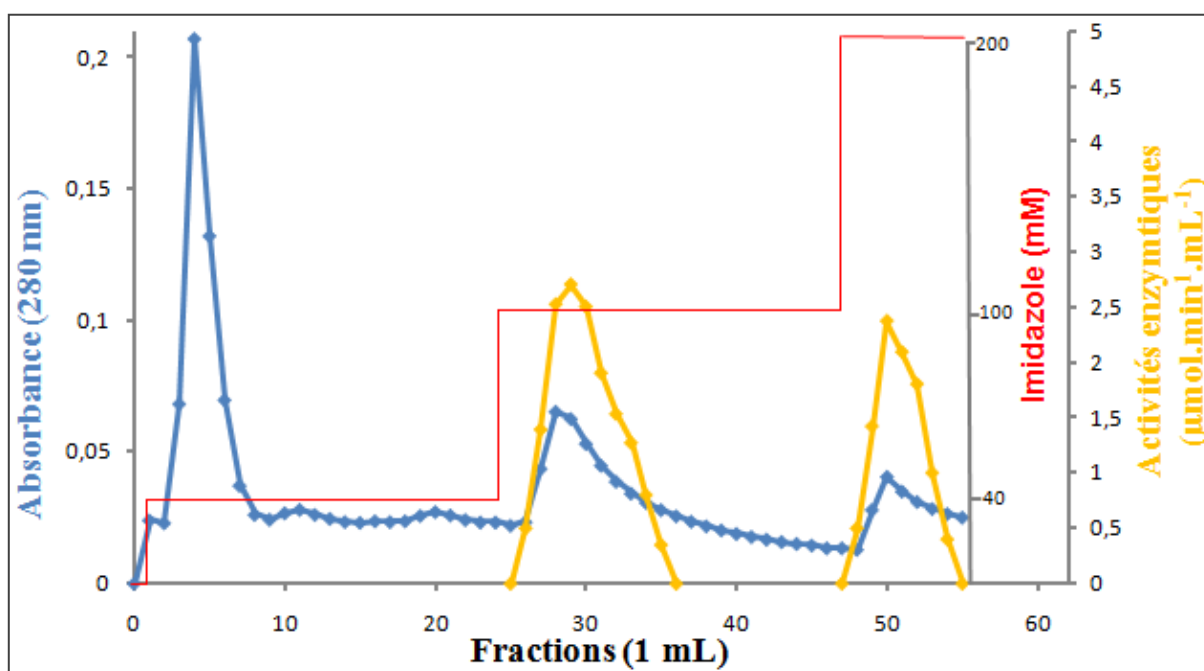


Figure 20: Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine au cobalt (Talon Superflow Metal Affinity).

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

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).

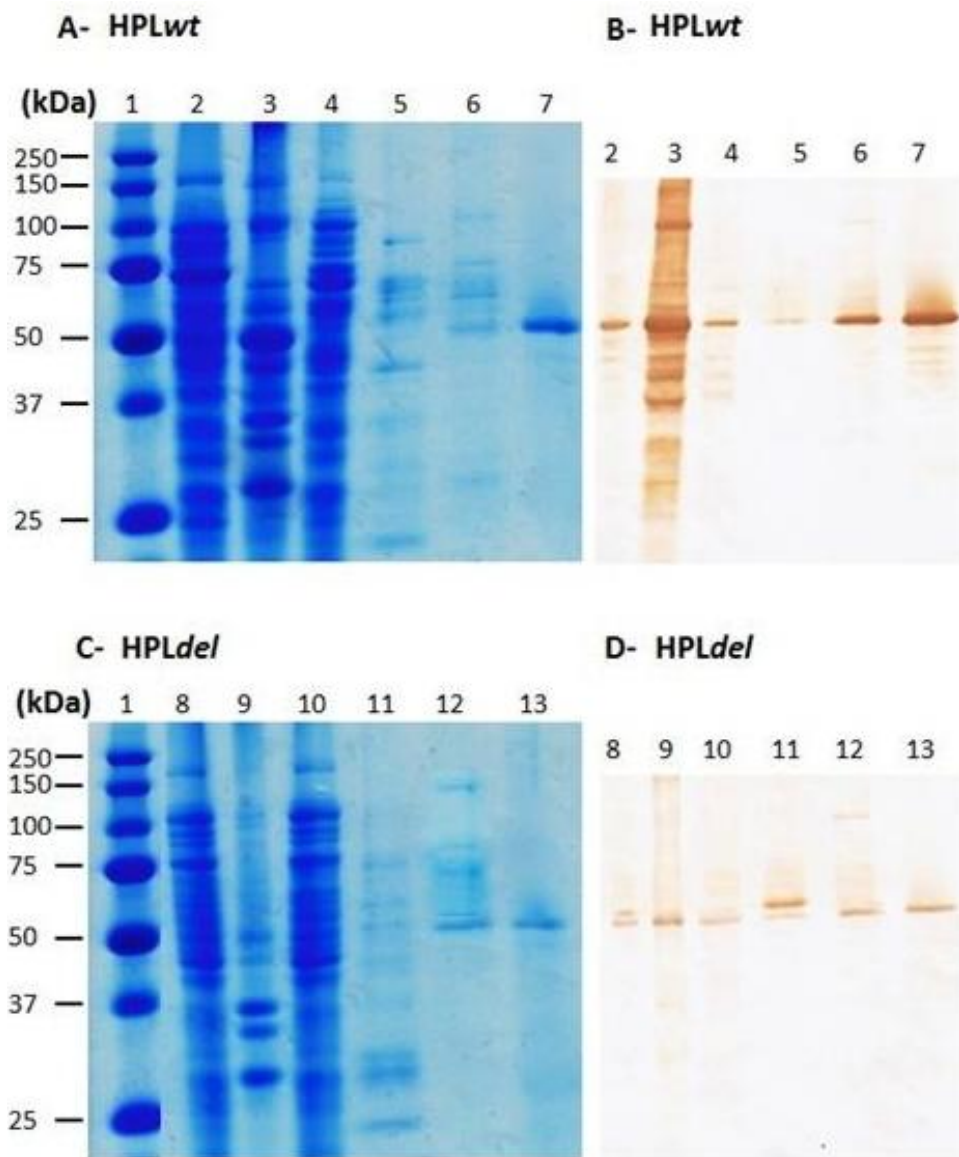


Figure 21: Analyse des étapes de purification de l'HPLwt (A et B) et l'HPLdel (C et D) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % et par immunoempreinte.

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 HPL~~del~~ semblent contenir une quantité d'enzyme plus faible que la fraction purifiée de HPL~~wt~~ (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'HPL~~wt~~ et l'HPL~~del~~.

		Protéines totales (mg)	Activité totale ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$)	Activité spécifique ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines)	Rendement (%)	Facteur de purification
HPLwt	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
HPLdel	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'HPL~~wt~~ d'activité spécifique de 120,6 $\pm$ 5,8 U.mg⁻¹ de protéines et 0,24 $\pm$ 0,03 mg d'HPL~~del~~ ayant une activité spécifique de 103,6 $\pm$ 12,1 U.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).

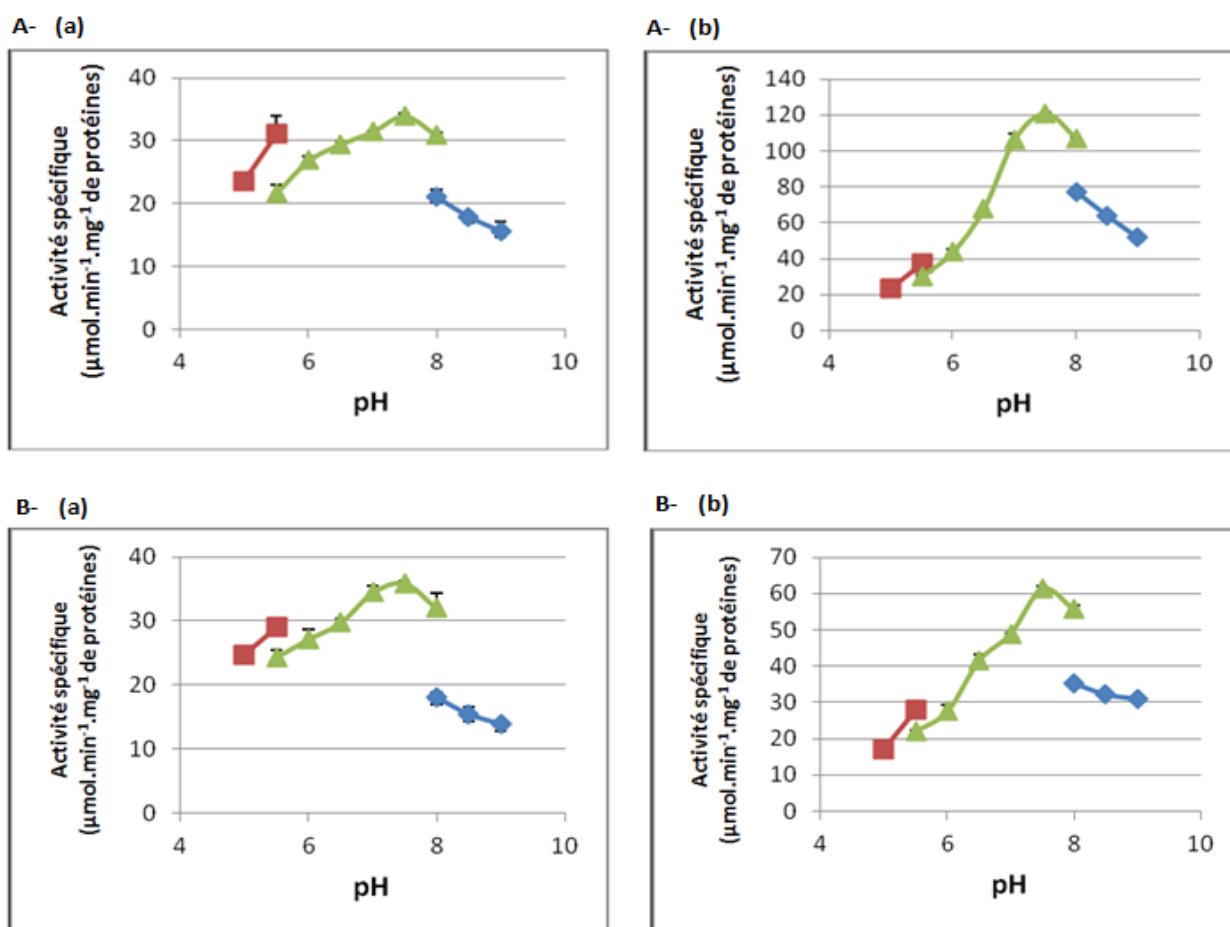


Figure 22: Influence du pH sur l'activité de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B) en présence de 13-HPOD (a) et de 13-HPOT (b).

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).

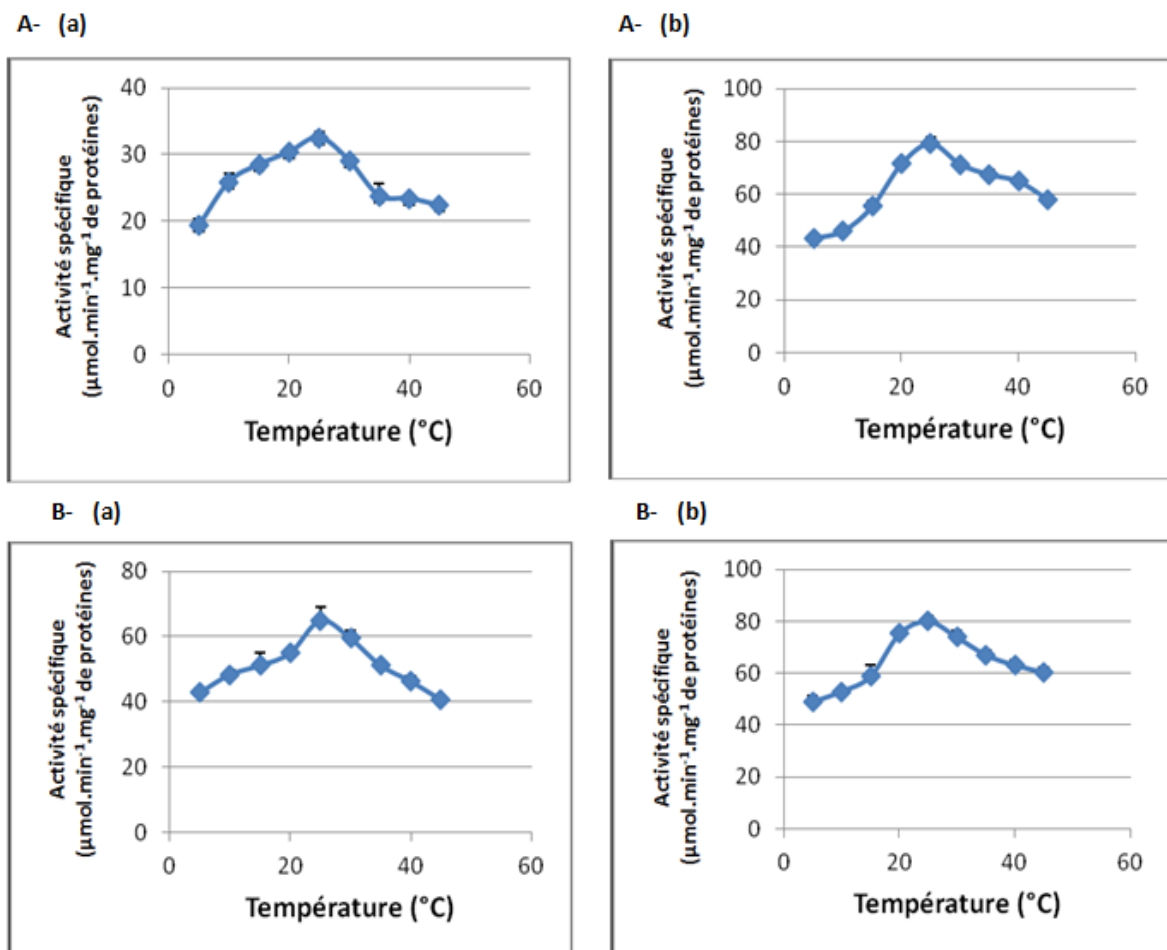


Figure 23: Influence de la température sur l'activité de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B) en présence de 13-HPOD (a) et de 13-HPOT (b).

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 HPL_{wt} et HPL_{del} recombinantes purifiées.

HPL	Substrats	K _m (μM)	V _m (nmol.s ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ .μM ⁻¹)
HPL_{wt}	13-HPOD	43,10 ± 4,46	0,48 ± 0,06	26,38 ± 3,01	0,62
	13-HPOT	152,75 ± 10,36	10,35 ± 0,68	564,95 ± 36,89	3,71
HPL_{del}	13-HPOD	43,22 ± 7,87	0,34 ± 0,01	17,89 ± 0,53	0,43
	13-HPOT	173,85 ± 27,70	7,65 ± 0,07	402,62 ± 3,66	2,36

Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations ± DS.

Les deux enzymes présentent un K_m plus faible pour le 13-HPOD (43,10 μM pour HPL_{wt} et 43,22 μM pour HPL_{del}, respectivement) que pour le 13-HPOT (152,75 μM et 173,85 μM pour HPL_{wt} et HPL_{del} respectivement) mais un k_{cat} plus grand pour le 13-HPOT (564,95 s⁻¹ pour l'HPL_{wt} et 402,62 s⁻¹ pour l'HPL_{del}) que pour le 13-HPOD (28,38 s⁻¹ pour l'HPL_{wt} et 17,89 s⁻¹ pour l'HPL_{del}). L'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) des deux HPL est plus importante pour le 13-HPOT que pour le 13-HPOD. En outre, l'HPL_{wt} agit plus efficacement sur le 13-HPOT et le 13-HPOD que l'HPL_{del} (3,71 s⁻¹.μM⁻¹ et 2,36 s⁻¹.μM⁻¹ pour le 13-HPOT et 0,62 s⁻¹.μM⁻¹ et 0,43 s⁻¹.μM⁻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 k_{cat}/K_m de l'HPL_{wt}, de l'HPL_{del} et de l'HPL d'olive de la variété Picual (0,348 s⁻¹.μM⁻¹ pour le 13-HPOT et 0,159 s⁻¹.μM⁻¹ pour le 13-HPOD, valeurs calculées à partir des données de Padilla *et al.* (2010)), montre que l'HPL_{wt} et l'HPL_{del} 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-énal 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-énal 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 ⁻¹)	13-HPOD (mM)	Hexanal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
HPLwt				
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
HPLdel				
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⁻¹ d'HPLwt et 6 mM de 13-HPOD, alors qu'une concentration de 0,25 U.mL⁻¹ 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 $5,61 \pm 0,48$ 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 $3,93 \pm 0,15$ mM d'hexanal a été obtenu avec 1 U.mL⁻¹ 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-énal par l'HPLwt et l'HPLdel

La production de (Z)-hex-3-énal 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-énal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOT.

HPL recombinante (U.mL ⁻¹)	13-HPOT (mM)	(Z)-hex-3-énal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
HPLwt				
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
HPLdel				
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 reactions 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-énal 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-énal est produit au cours de la réaction enzymatique. Comme le (E)-hex-2-énal n'a jamais été détecté, dans nos conditions expérimentales, aucune isomérisation du (Z)-hex-3-énal en (E)-hex-2-énal ne s'est produite. Les conditions optimales de production du (Z)-hex-3-énal ont été obtenues avec 0,5 U.mL⁻¹ d'HPLwt et 6 mM de 13-HPOT. Elles ont permis de produire 2,26 ± 0,02 mM de

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

Les données montrent également que les quantités de (Z)-hex-3-énal produites sont toujours plus faibles que les quantités d'hexanal produites (Tableaux 4 et 5), alors que l'HPL~~wt~~ et l'HPL~~del~~ 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-énal à 25 °C. Pour tester cette hypothèse, nous avons reproduit l'expérience avec 0,5 U.mL⁻¹ d'HPL~~wt~~ et 6 mM de 13-HPOT puis avec 0,5 U.mL⁻¹ d'HPL~~del~~ et 4 mM de substrat à 10°C et 15°C pour limiter la perte du (Z)-hex-3-énal (Tableau 6).

Tableau 6: Production de (Z)-hex-3-énal par l'HPL~~wt~~ ou l'HPL~~del~~ à différentes températures.

HPL recombinantes	Températures	(Z)-hex-3-énal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
HPLwt	10 °C	4,39 ± 0,38	73	15
	15°C	2,86 ± 0,13	48	15
	25°C	2,26 ± 0,02	38	5
HPLdel	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⁻¹ d'HPL~~wt~~ et 6 mM de 13-HPOT ou avec 0,5 U.mL⁻¹ d'HPL~~del~~ 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-énal 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-énal produite. Dans les conditions optimales (0,5 U.mL⁻¹ d'HPLwt, 6 mM de 13-HPOT, 10°C), 4,39 mM de (Z)-hex-3-énal 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-énal 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-énal et de (E)-hex-2-énal (Ben Akacha et Gargouri, 2009; Gigot *et al.*, 2012; Németh *et al.*, 2004), qui résulte d'une isomérisation du (Z)-hex-3-énal en (E)-hex-2-énal 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'HPL_{wt} et de l'HPL_{del} 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).

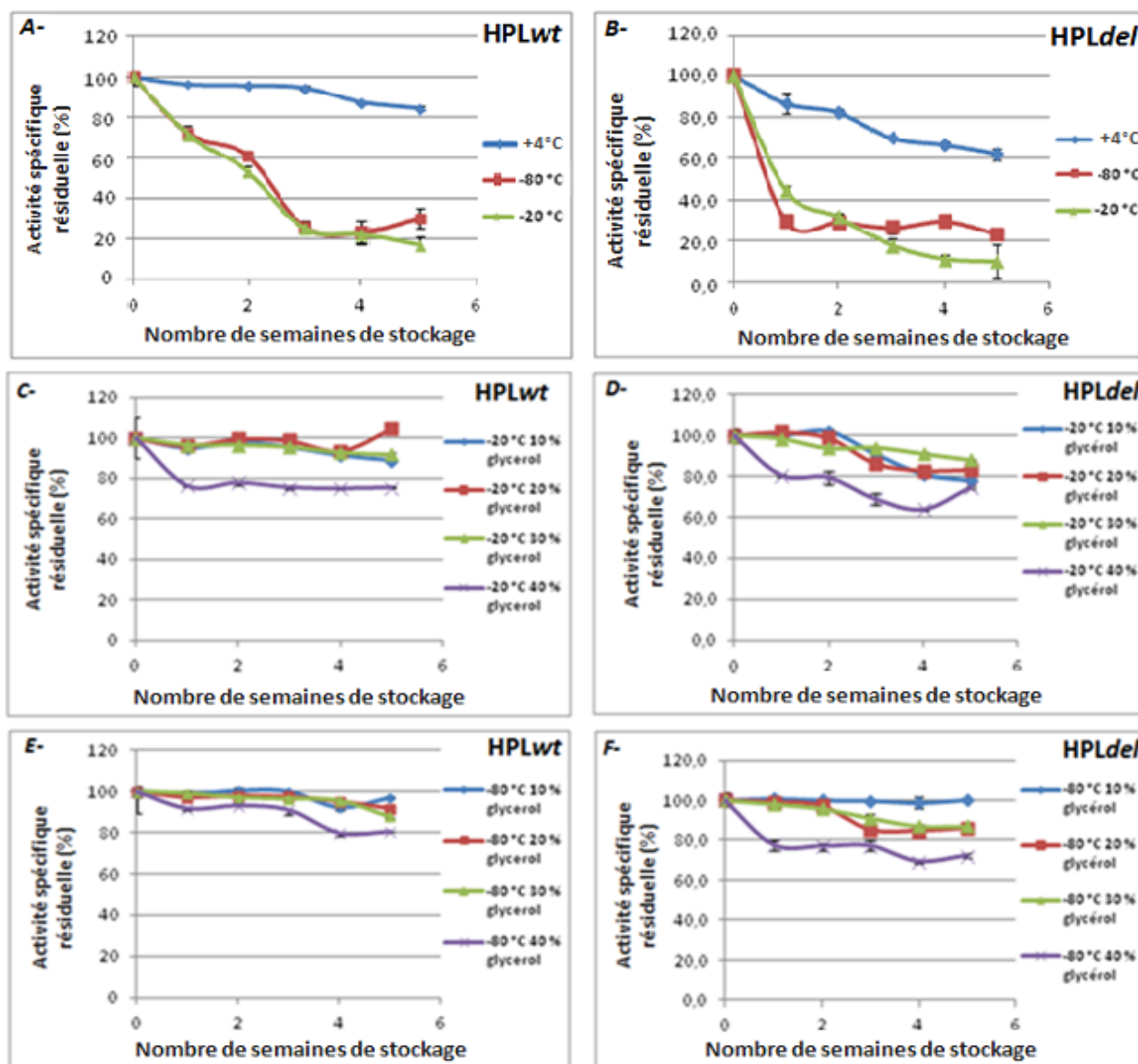


Figure 24: Etude de la conservation de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F). L'activité spécifique résiduelle (%) est calculée en effectuant le rapport de l'activité spécifique ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines) à un temps donné, sur l'activité spécifique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

L'activité enzymatique de l'HPLwt et de l'HPLdel est mieux préservée à +4°C qu'à -20°C et -80°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°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°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, Na₂SO₄, 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, Na₂SO₄) 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).

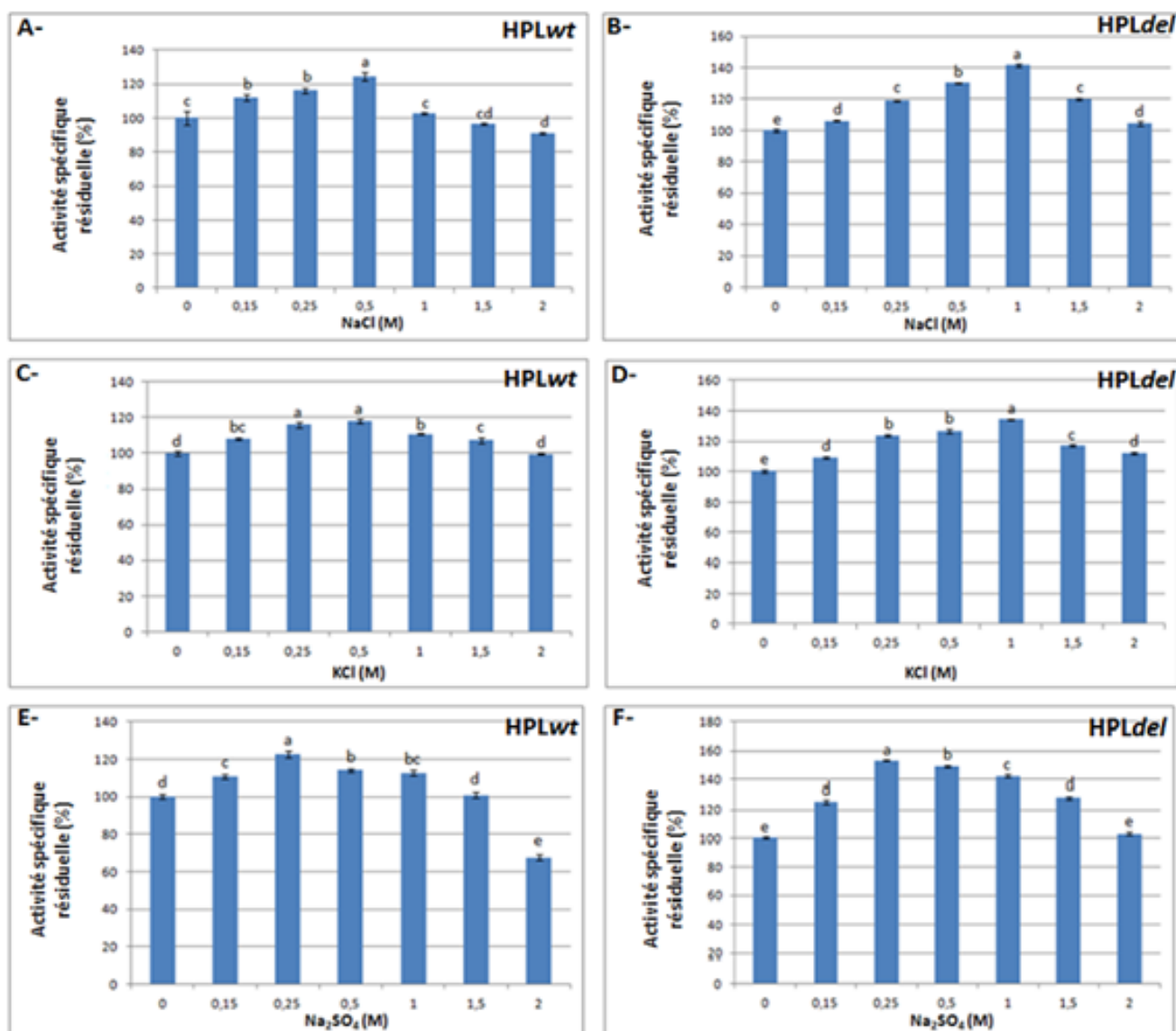


Figure 25: Effet de la concentration en sels sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F).

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 Na₂SO₄ 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'HPL~~del~~ montrent qu'à la différence de ceux obtenus pour l'HPL~~wt~~, toutes les concentrations en sels testées (à l'exception du Na₂SO₄ 2 M) augmentent significativement l'activité de l'HPL~~del~~ par rapport à celle du témoin (Figure 25 B, D, E). L'activité spécifique maximale est obtenue en présence de 0,25 M de Na₂SO₄ (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).

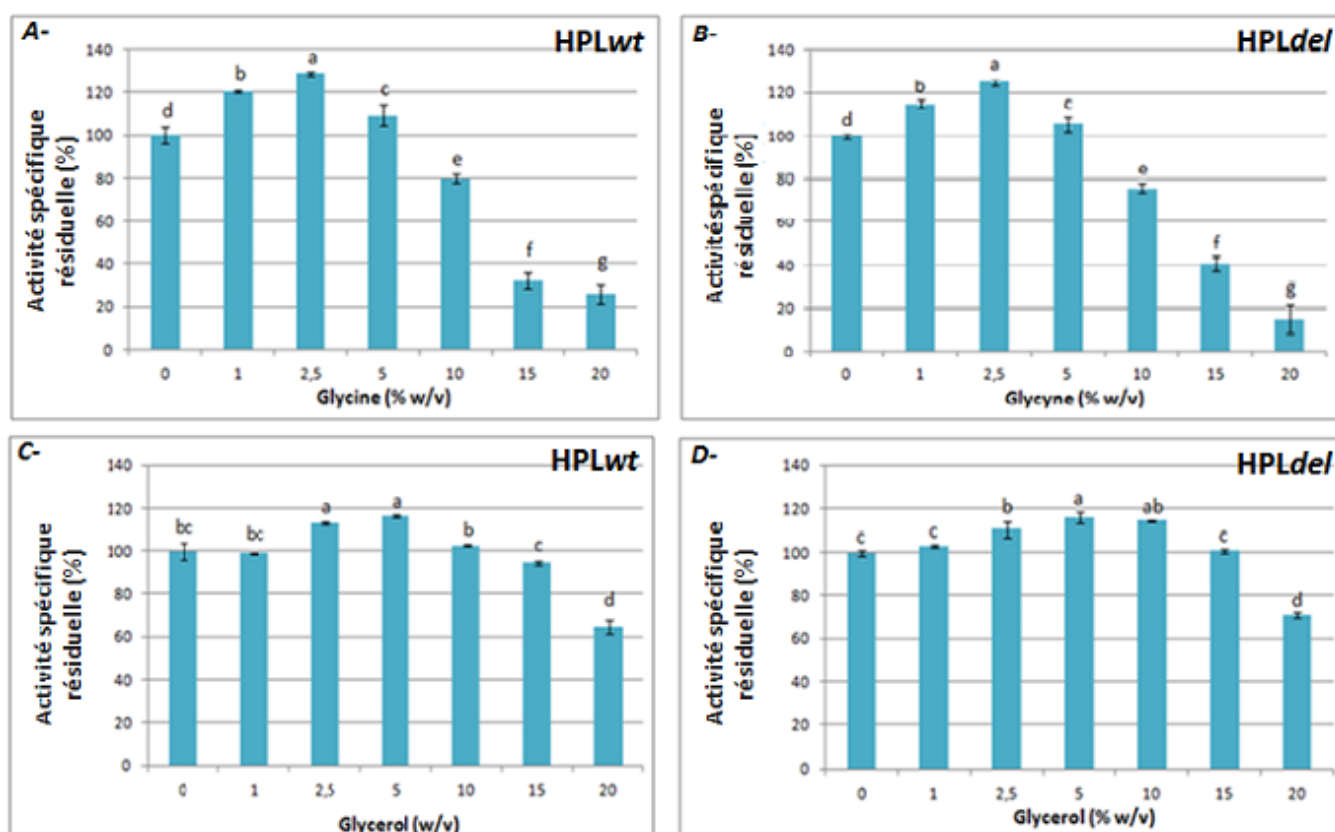


Figure 26: Effet de la concentration en glycérol et en glycine sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A et C) et de l'HPLdel (B et D).

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 Na₂SO₄ 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 Na₂SO₄ 0,25M.

A-

Substrats		Km (μM)	Vm (nmol.s ⁻¹)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (s ⁻¹ /μM ⁻¹)
13-HPOD	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
13-HPOT	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 ⁻¹)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (s ⁻¹ /μM ⁻¹)
13-HPOD	Témoin*	43,22 ± 7,87	0,34 ± 0,01	17,89 ± 0,53	0,43
	Essai* + Na ₂ SO ₄ 0,25M	61,28 ± 8,27	0,89 ± 0,03	46,83 ± 1,37	0,76
13-HPOT	Témoin*	173,85 ± 27,70	7,65 ± 0,07	402,62 ± 3,66	2,36
	Essai* + Na ₂ SO ₄ 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).

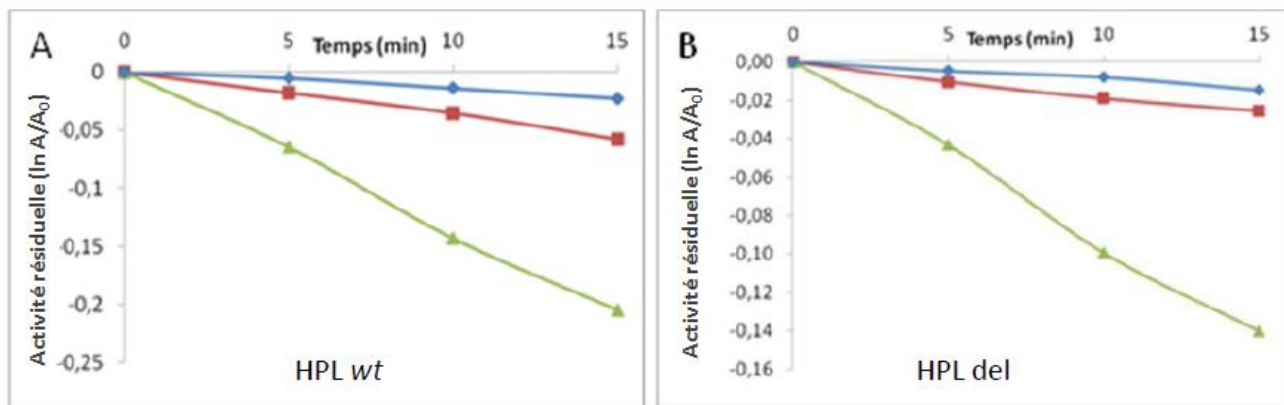


Figure 27: Inactivation de l'HPLwt (A) en présence de glycine 2,5 % (v/v) ou de NaCl 0,5 M et de l'HPLdel (B) en présence de Na₂SO₄ 0,25 M ou de NaCl 1 M.

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 Na₂SO₄ 0,25M (—▲—).

A₀ et A représentent l'activité spécifique de l'HPL (μmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines) respectivement à t=0 min et t=5 ou 10 ou 15 min.

Nous observons que la glycine (2,5%) et le Na₂SO₄ (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 Na₂SO₄ 0,25 M ou de NaCl 1 M.

A-			
HPLwt	Contrôle*	Contrôle* + glycine 2,5 % (w/v)	Contrôle*+ NaCl 0,5 M
K_{inactivation}^a	0,0013 (±0,0002)	0,0136 (±0,0007)	0,0054 (±0,0019)
t_{1/2}^b (h)	8,8816	0,8486	2,1384
B-			
HPLdel	Contrôle*	Contrôle* + Na₂SO₄ 0,25 M	Contrôle*+ NaCl 1 M
K_{inactivation}^a	0,0009 (±0,0001)	0,0093 (±0,0006)	0,0019 (±0,0002)
t_{1/2}^b (h)	12,8301	1,2421	6,1130

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

^a 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.

^b 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 Na₂SO₄ (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 Na₂SO₄ (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-énal et hexanal).

8.1- Production de (Z)-hex-3-énal par l'HPLwt ou l'HPLdel en présence de glycine, de NaCl ou de Na₂SO₄.

La production de (Z)-hex-3-énal par l'action de l'HPLwt ou de l'HPLdel sur le 13-HPOT en présence de glycine (2,5%), NaCl (0,5M) ou Na₂SO₄ (0,25M) a été évaluée (Tableau 9).

Tableau 9: Production de (Z)-hex-3-énal par l'HPLwt en présence de glycine 2,5 % (w/v) ou de NaCl (0,5 M) et par l'HPLdel en présence de Na₂SO₄ 0,25 M.

	HPL recombinantes (U.mL ⁻¹)	13-HPOT (mM)	(Z)-hex-3-énal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
HPLwt					
Témoin	0,5	4	4,39 ± 0,38	73	10
+ Glycine (2,5 %)	0,5	4	2,02 ± 0,68	50	5
+ NaCl (0,5 M)	0,5	4	1,83 ± 0,51	46	5
HPLdel					
Témoin	0,5	4	1,80 ± 0,05	45	15
+ Na₂SO₄ (0,25 M)	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-énal 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-énal, 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-énal a été détectée dans le milieu réactionnel. La glycine pourrait favoriser l'isomérisation du (Z)-hex-3-énal en (E)-hex-2-énal. La quantité de (Z)-hex-3-énal sommée à celle du (E)-hex-2-énal 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-énal en (E)-hex-2-énal. Cependant la quantité de (Z)-hex-3-énal 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⁻¹ d'HPLdel en présence de Na₂SO₄ a permis de produire 1,9 ± 0,87 mM de (Z)-hex-3-énal, correspondant à un taux de

conversion de 47 %. Dans ces conditions, une quantité de (Z)-hex-3-énal 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 Na₂SO₄ dans le milieu réactionnel n'a pas permis d'améliorer la production de (Z)-hex-3-énal.

8.2- Production d'hexanal par l'HPLwt ou l'HPLdel en présence de glycine, de NaCl ou de Na₂SO₄.

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 Na₂SO₄ (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 Na₂SO₄ 0,25 M.

	HPL recombinantes (U.mL ⁻¹)	13-HPOT (mM)	Hexanal (mM)	Taux de conversion (%)	Temps réactionnel optimum (min)
HPLwt					
Témoin	0,5	6	5,02 ± 0,05	84	15
+ Glycine (2,5 %)	0,5	6	5,2 ± 0,57	87	20
+ NaCl (0,5 M)	0,5	6	5,67 ± 0,38	94	10
HPLdel					
Témoin	0,5	4	2,74 ± 0,10	68,5	10
+ Na₂SO₄ (0,25 M)	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 U.mL⁻¹ d'HPLwt et 6 mM de 13-HPOD. Dans ces conditions 5,2 ± 0,57 mM et 5,67 ± 0,38 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 mM de 13-HPOD et 1 U.mL⁻¹ d'HPLwt sans composés chimiques (tableau 4), la quantité maximale d'hexanal produite est de 5,61 ± 0,48 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 U.mL⁻¹ d'HPLdel et de 4 mM de 13-HPOD en présence de Na₂SO₄ 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-énal 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-énal. 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 Na₂SO₄, 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*, 105 4 (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) Phytooxylipins 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. *Biotechnol 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., Wathélet 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., Wathélet 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) Oxylin 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 oxylin 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., Kajiwarra T., Matsui K., (1988) Concentration of hydroperoxide lyase activities in root of cucumber seedlings. *J Biosci.*, 43c, 308-310.

Hatanaka A., Kajiwarra T., Matsui K., Kitamura A., (1992) Expression of Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase Activities in Tomato Fruits. *J Biosci.*, 47c, 369 -374.

Hatanaka A., Kajiwarra 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., Kajiwar 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 proprieties 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., Háger-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., Olías R., Olías 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., Wathelet 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., Kajiware 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., Kajiware 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	CATCTAATCAT	GTCTGTAATG	ATGGCAAAAA-	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	AGAAGTTTTC	ACTCGATATC	TTGAAACGAA	GCTCGACCAT	475
HPL OliveLeccino	ACTCAAATTA	AGAAGTTTTC	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	ATTGTGCGAG	CAGACCCCTC	625
HPL OliveLeccino	CAATTCCTTT	TTAGGTTTCT	TACTCGCTGC	ATTGTGCGAG	CAGACCCCTC	649
HPL OlivePicual	GACTTCGCTT	GAGATCGCCA	GCTCTGGCCA	TATTATGCTC	GACAAGTGGC	675
HPL OliveLeccino	GACTTCGCTT	GAGATCGCCA	GCTCTGGCCA	TATTATGCTC	GACAAGTGGC	699
HPL OlivePicual	TCGGTATTCA	GATCCTGCCG	ACTGTCAACA	TCGGCATTCT	ACAACCCCTC	725
HPL OliveLeccino	TCGGTATTCA	GATCCTGCCG	ACTGTCAACA	TCGGCATTCT	ACAACCCCTC	749
HPL OlivePicual	GAAGAACTCT	TCCTCCATT	TTTCTCATAC	CCTTTCTGGC	TTGTTAAAGG	775
HPL OliveLeccino	GAAGAACTCT	TCCTCCATT	TTTCTCATAC	CCTTTCTGGC	TTGTTAAAGG	799
HPL OlivePicual	AGACTACAAC	AAGCTGGTGC	AGTTTGTGGA	AAAAGAAGGC	AAAGAAGTTA	825
HPL OliveLeccino	AGACTACAAC	AAGCTGGTGC	AGTTTGTGGA	AAAAGAAGGC	AAAGAAGTTA	849
HPL OlivePicual	TACAAAGAGC	TCAAAGTGAA	TTCAATCTGA	CTGAACAAGA	AGCAATTCAC	875
HPL OliveLeccino	TACAAAGAGC	TCAAAGTGAA	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	TTCGCCCAG	1125
HPL OliveLeccino	CTACGAAACT	CTTCGATTGA	ACCCGCCAGT	TCCATCGCAA	TTCGCCCAG	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	CAAACTGGAT	CGGCCACGGC	AGCCAACAAG	CAGTGTGCAG	CTAAAGAGAT	1375
HPL OliveLeccino	CAAACTGGAT	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	AGTGTTCAC	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)	MMARMTGSPS	VTPLSPPSPS	PPSPSSLPLR	AIPGGYGWPV	VGPIIDRLNY	50
HPL Olive Leccino (AA)	----MTGSPS	VTPLSPPSPS	PPSPSSLPLR	AIPGGYGWPV	VGPIIDRLNY	46
HPL Olive picual (AA)	FWFQGPPTFF	KKRMEKYKST	VFRTNVPPTF	PWFLGVNPNV	IAVL DVKSFS	100
HPL Olive Leccino (AA)	FWFQGPPTFF	KKRMEKYKST	VFRTNVPPTF	PWFLGVNPNV	IAVL DVKSFS	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)	ILKRSSTIWV	PSLISSLD SM	WDKIDADV AN	SGSASSFLPM	QQFLFRFLTR	200
HPL Olive Leccino (AA)	ILKRSSTIWV	PSLISSLD SM	WDKIDADV AN	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	EFNLTEQEAI	HNLLFILGFN	300
HPL Olive Leccino (AA)	YPFWLVKGDY	NKLVQFVEKE	GKEVIQRAQT	EFNLTEQEAI	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 : Alignement 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 (lipoxigénase 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^a, Magali Mariani^a, Virginie Brunini-Bronzini de Caraffa^a, Claude Gambotti^a, Sophie Vincenti^a, Jean-Marie Desjobert^b, Alain Muselli^b, Jean Costa^b, Liliane Berti^a, Jacques Maury^a *

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

^b 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

Abbreviations: HPOD: hydroperoxyoctadecadienoic acid; HPOT: hydroperoxyoctadecatrienoic acid; IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; LOX: lipoxygenase; HPL: hydroperoxide lyase; GLVs: Green leaf volatiles

Abstract

Volatile C6-aldehydes are the main contributors to the characteristic odor of plants known as "green note" and are widely used by flavor industry. Biotechnological processes were developed to fulfill the high demand in C6-aldehydes in natural flavourants and odourants. Recombinant hydroperoxide lyases (HPLs) constitute an interesting alternative to overcome drawbacks arising from use of HPL from plant extracts. Thus, olive recombinant 13-HPL was assayed as biocatalysts to produce C6-aldehydes. Firstly, a cDNA encoding for olive HPL of Leccino variety was isolated and cloned in pQE-30 expression vector. In order to improve the enzyme solubility, its chloroplast transit peptide was deleted. Both enzymes (HPL *wild type* and HPL *deleted*) were expressed into *Escherichia coli* strain M15, purified, characterized and then used for bioconversion of 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. Aldehydes produced were extracted, then identified and quantified using gas chromatography and mass spectrometry. Recombinant HPL_{wt} 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. Using HPL_{del} instead of HPL_{wt} failed to obtain greater quantities of hexanal or 3Z-hexenal. No undesirable products were formed and none isomerization of 3Z-hexenal in 2E-hexenal occurred. The olive recombinant HPL_{wt} appears to be a promising efficient biocatalyst for production of C6-aldehydes.

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

Introduction

Green leaf volatiles (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 defence mechanisms against insect or fungal pathogens attacks [1-5]. 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 [6]. According to their specificity, HPLs can act on the 9- or 13-hydroperoxides 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 [1]. 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) [7]. Genes encoding HPL have been cloned and characterized in several kinds of plants, such as alfalfa, tomato, green bell pepper, olive and cucumber [8-12]. Most HPLs are membrane bound: some of them in plants such as *Arabidopsis* and olive contain a chloroplast transit peptide in their N-terminal ends, whereas other HPLs in plants such as melon do not have a chloroplast transit peptide and are suggested to be localized in the microsomes [13-15, 11]. Although the structural details of plant HPLs remain poorly understood, recent studies have highlighted the structural aspects of HPLs in plants [16, 10]. The circular dichroism analysis of green bell pepper HPL solubilized in dodecyl maltoside demonstrated that the protein secondary structure in dodecyl maltoside consists of 13% α -helix, 32% β -sheet, 21% turn and 31% random coil [16].

GLVs are the main contributors to the characteristic odor of plants known under the name of “green note” [1, 5]. 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 [17]. As consumers’ demand for natural flavourants and odourants has increased in recent years, due to health and safety concerns, many biotechnological processes based on the LOX pathway were developed. 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 [18-20]. However, HPL activity is very unstable in plant extracts, is variable from plant to another plant, and, in addition, crude extracts contain other enzymes generating undesirable products. To overcome these drawbacks, the search for new sources of efficient HPL and strategies is critical. The use of recombinant HPLs carefully selected constitute an interesting alternative because their production is independent of environmental conditions, harvesting period and plant heterogeneity, their purification is generally easier and therefore, their use in the form of purified enzymes could allow the selective production of volatile compounds. The advancement of knowledge has led to development of new biocatalytic processes based on the use of recombinant HPLs for the production of these natural volatile compounds [5]: recently, efficient biocatalytic processes using recombinant sugar beet HPL [21], yeast *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing soybean LOX2 and watermelon HPL [22], leaf extract of *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated with a viral vector system allowing overexpression of a soybean 13-LOX and a watermelon 13-HPL [23] were reported.

In this study, we isolated a cDNA encoding for a 13-HPL, named HPLwt (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 [24], the C6-aldehyde compounds are the main components (about 80%) of this flavor [25-27] suggesting the presence of efficient enzymes of the LOX pathway in these fruits. HPLwt displays an N-terminal transit peptide suggesting its targeting and insertion to the chloroplast envelope [13, 28]. This transit peptide could allow insertion of the recombinant enzyme in the membrane or in inclusion bodies during expression in *Escherichia coli*, thereby reducing the amount of enzyme recovered in the soluble protein fraction. Also, we decided to suppress the sequence encoding the transit peptide using a PCR based method. The new enzyme was designated as HPLdel (deleted transit peptide). Both enzymes (HPLwt and HPLdel) were expressed into *E. coli* (M15),

purified in one-step by affinity chromatography, and their catalytic efficiencies were determined and compared. Then, HPLwt and HPLdel 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, δ -aminolevulinic acid, sodium phosphate mono and dibasic, benzamidine, linoleic and linolenic acids, hexanal (98%), 3Z-hexenal (50% in triacetin), MgSO₄, Triton X-100, IPTG), bovin serum albumin (BSA), soybean LOX, DNase I, and lysozyme were purchased from Sigma Aldrich Chemical (Saint-Quentin Fallavier, France). All chemicals were commercial products of analytical grade or molecular biological grade.

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. [29]. Reverse transcription was performed using up to 5 μg of total RNA extracted from mature olives (20 WAF, black stage), oligo(dT)₁₈ 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'-ggnttyaaygcntwyggngg, HPL 13-3: 5'-gytngcngcraaytgytrtt) designed from conserved amino acid sequences of known plant 13-HPLs and, oligo(dT)₁₈V and

specific primer of olive 13-HPL (HPL b: 5'gttgctgaattatctatact) 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)₁₈V and HPL b primers.

5' Rapid amplification of cDNA ends (RACE) procedures

The 3'/5' RACE 2nd 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'-cgtagaccacagagaagctcagg 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'-ttctagctcgggcgaattgcc 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'-accaccaaagtcattgaatcc, HPLh: 5' attgcttctgttcagtcag and HPLi: 5'-tgagctctttgtataacttctttgcc, then, with HPLj: 5'ttggcaacgtcagcgta, HPLk: 5'-atthtgtcccatggag and HPLl: 5'-agtgaacttatgagtacgggtacca, 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'-aaaatgacgggttcgcctcc and Hplrev: 5'-tctcacttggaacttctcaactg designed on the basis of the HPL cDNA sequence. PCR was performed with 1.25 units of *Pfu* DNA polymerase (Promega) in a 50 µL reaction mix containing 1 µg of cDNA template and 1 µM 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'-acatgcatgcacgggttcgcctccgt or the *Sph*IHPLfor2: 5'-acatgcatgctctctgccctccgcgcatt and *Xma*IHPLrev: 5'-tccccccgggtcacttggaacttctcaactg, 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 peptide. 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⁻¹ yeast extract; 12 g.L⁻¹ tryptone, 0.4% v/v glycerol; 0.17 M KH₂PO₄; 0.72 M K₂HPO₄) were incubated with 24 mL of the overnight culture of the M15 *E. Coli* transformed with pQE30-HPLwt or pQE30-HPLdel and incubated at 37 °C until the cell density had increased to A₆₀₀ 0.6 to 0.8. The culture was incubated 48 hours at 15 °C after addition of IPTG (0.5 mM) and δ -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⁻¹ 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⁻¹ DNaseI, 50 mM MgSO₄ 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 A₂₈₀ 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 [30] with adaptations. The reaction mixture (30 mL final volume) containing 70 mM

sodium borate buffer pH 9 with 6.35 mM linoleic or linolenic acids, 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 ¹³C-NMR [31]. 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 μL). Reactions were started by addition of 43 μM hydroperoxide. One unit of HPL activity is defined as the amount of enzyme that converts 1 μmol of substrate per minute at 25 °C.

Kinetic parameters were determined from Michaelis-Menten plot over a range of substrate concentrations between 7 μM and 114 μM HPOD and 16 μM and 134 μM HPOT for HPLwt, and 7 μM and 121 μM HPOD and 8 μM and 175 μM HPOT for HPLdel.

The optimal pH for the enzymatic activity (HPLwt and HPLdel) was investigated using the following buffer (50 mM) solutions: sodium acetate (pH 4-5.5), sodium phosphate (pH 5.5-8), and sodium borate (pH 8-10). The reaction assay was monitored by the decrease of absorbance at 234 nm under standard conditions. The optimal temperature for the enzymatic activity (HPLwt and HPLdel) was determined over a temperature range of 5 to 60 °C in increments of 5 °C using the standard assay conditions.

Protein analysis

Protein concentration was determined spectrophotometrically for the pure recombinant HPLwt and HPLdel using an A_{280} extinction coefficient (ϵ) that was calculated from the tyrosine and tryptophan content [32-33] of the deduced amino acid sequence. Protein concentration in other samples was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard [34].

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⁻¹) 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 μ L 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 μ m) 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 μ L. 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 of the Leccino variety 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, which corresponds to a calculated molecular mass of 50 kDa and a pI of 6.9. Fasta analysis of the deduced amino acid sequence revealed 99.8% identity with the olive HPL sequence (*OepHPL*) of the Picual variety [11], suggesting that the two deduced amino acid sequences of the olive HPLs in the Leccino and Picual varieties are encoded by the same gene. Olive HPL of the Leccino variety lacks the four amino acid residues (MMAK) in N-terminal position and has a glutamic acid residue at position 411, which is replaced by an alanine residue (at position 415) in olive HPL of the Picual variety [11].

The enzyme (HPLwt) contains a N-terminal transit peptide characteristic of CYP74B enzymes [15], suggesting its targeting and insertion to the chloroplast envelope [13, 28]. 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 HPLdel) in order to recover larger amount of enzyme in the soluble protein fraction.

Both enzymes, HPLwt and HPLdel, were expressed in *E. coli* (M15). Expression was induced by 0.5 mM IPTG, in presence of 2.5 mM δ -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 ± 0.002 mg of HPLwt with specific activities of 71.15 ± 0.18 U.mg⁻¹ proteins on 13-HPOT and 16.98 ± 2.38 U.mg⁻¹ proteins on 13-HPOD. From the same volume of culture medium, we have purified 0.28 ± 0.02 mg of HPLdel with specific activities of 56.89 ± 4.50 U.mg⁻¹ proteins on 13-HPOT and 7.91 ± 2.00 U.mg⁻¹ 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). Salas and Sanchez [35] have previously reported a broad pH spectrum of HPL activity in olive, showing the highest activity at pH 6.0. Ben Akacha et al. [36] 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. [11] 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 K_m for 13-HPOD (43.10 μM and 43.22 μM for HPL*wt* and HPL*del*, respectively) than for 13-HPOT (152.75 μM and 173.85 μM for HPL*wt* and HPL*del*, respectively) suggesting a preference for 13-HPOD rather than 13-HPOT. However, HPL*wt* and HPL*del* showed a 21.4-fold and 22.5-fold increase of the turnover (564.95 s^{-1} vs 26.38 s^{-1} and 402.62 s^{-1} vs 17.89 s^{-1}) for 13-HPOT, respectively. These results lead to a catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of both HPLs significantly higher for 13-HPOT than for 13-HPOD (6-fold and 5.5-fold increase for HPL*wt* and HPL*del*, respectively), in good agreement with results reported by Padilla et al. [11]. Moreover, HPL*wt* seems to act more effectively on 13-HPOT and 13-HPOD than HPL*del* (3.71 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ vs 2.36 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ for 13-HPOT and 0.62 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ vs 0.43 $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ for 13-HPOD).

C6-aldehyde production assays with recombinant olive hydroperoxide lyases

The enzymes HPL*wt* and HPL*del* 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⁻¹ HPLwt and 6 mM of 13-HPOD, while the 0.25 U.mL⁻¹ 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⁻¹ 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% [19-20, 37] when plant extracts are used as a source of HPL, or 65% when alfalfa recombinant HPL is used as catalyst [38].

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⁻¹ 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 hexanal (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 [39]. 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^{-1} HPLwt and 6mM of 13-HPOT at 10°C to minimize evaporation and thus the loss of 3Z-hexenal. Under these conditions, $4.39 \pm 0.38 \text{ mM}$ 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% [18-19, 36], and studies using a recombinant HPL reported yields of 43% [38] and about 65% [21]. Conversion of 13-HPOT in C6-aldehydes, using HPL plant extracts, often leads to a mixture of 3Z-hexenal and 2E-hexenal [18, 36, 21]. 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 [18, 36]. 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 hexenal 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. Hatanaka, A. (1993) The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, **34**, 1201-1218.
2. Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. & Takabayashi, J. (2006) ETR1-, JAR1- and PAD2-dependent signaling pathways are involved in C6-aldehyde-induced defense responses of Arabidopsis. *Plant Science*, **171**, 415-423.
3. Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwar, T. & 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.
4. Ibdah, M., Lavid, N., Lewinson, E., Amit, A. & Dror, N. (2010) Green routes to green notes. *Chemical Engineering Transactions*, **20**, 241-246.
5. Hassan, M. N., Zainal, Z. & Ismail, I. (2015) Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, **13**, 727-739.
6. Matsui, K., Shibata, Y., Tateba, H., Hatanaka, A. & Kajiwar, T. (1997) Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **61**, 199-201.
7. Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T. & Kajiwar, T. (1996) Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Letters*, **394**, 21-24.
8. Noordermeer, M.A., Van Dijken, A.J., Smeekens, S.C., Veldink, G.A. & Vliegthart, J.F. (2000) Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 2473-2482.
9. Atwal, A.S., Bisakowski, B., Richard, S., Robert, N. & Lee, B. (2005) Cloning and secretion of tomato hydroperoxide lyase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, **40**, 95-102.
10. Santiago-Gomez, M.P., Kermasha, S., Nicaud, J.-M., Belin, J.-M. & Husson, F. (2010) Predicted secondary structure of hydroperoxide lyase from green bell pepper cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **65**, 63-67.
11. Padilla, M. N., Hernandez, M. L., Pérez, A. G., Sanz, C. & 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 5649-5657.
12. Wan, X.H., Chen, S.X., Wang, C.Y., Zhang, R.R., Cheng, S.Q., Meng, H.W. & Shen, X.Q. (2013) Isolation, expression, and characterization of a hydroperoxide lyase gene from cucumber. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 22082-22101.
13. Bate, N. J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J. M. C., Thompson, J. E. & Rothstein, S. J. (1998) Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology*, **117**, 1393-1400.
14. Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. & Vliegthart, J.F. (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome p450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem*, **2**, 494-504.
15. Stumpe, M. & Feussner, I. (2006) Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, **5**, 347-357.

16. Panagakou, I., Touloupakis, E. & Ghanotakis, D.F. (2013) Structural characterization of hydroperoxide lyase in dodecyl maltoside by using circular dichroism. *The Protein Journal*, 32, 1-6.
17. Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. & Lewinsohn, E. (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54, 712-732.
18. Németh, Á. S., Márczy, J. S., Samu, Z., Háger-Veress, Á. & Szajáni, B. (2004) Biocatalytic production of 2 (E)-hexenal from hydrolysed linseed oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 667-672.
19. Gargouri, M., Drouet, P. & Legoy, M.-D. (2004) Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves: Volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids. *Journal of Biotechnology*, 111, 59-65.
20. Rabetafika, H. N., Gigot, C. d., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Destain, J., Du Jardin, P., Wathelet, J.-P. & Thonart, P. (2008) Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnology Letters*, 30, 1115-1119.
21. Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.-L., Muhovski, Y., Wathelet, J.-P., 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 Biochemistry*, 47, 2547-2551.
22. Buchhaupt, M., Guder, J.C., Etschmann, M.M.W. & Schrader, J. (2012) Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 159-168.
23. Huang, F.C., Studart-Witkowski, C. & Schwab, W. (2010) Overexpression of hydroperoxide lyase gene in Nicotiana benthamiana using a viral vector system. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 783-795.
24. Olias, J. M., Perez, A. G., Rios, J. J. & Sanz, L. C. (1993) Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the "green" odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2368-2373.
25. Morales, M. T., Aparicio, R. & Rios, J. J. (1994) Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal of chromatography A*, 668, 455-462.
26. Angerosa, F., Basti, C. & Vito, R. (1999) Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 836-839.
27. Luaces, P., Pérez, A. G. & Sanz, C. (2003) Role of olive seed in the biogenesis of virgin olive oil aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4741-4745.
28. Froehlich, J. E., Itoh, A. & 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 Physiology*, 125, 306-317.
29. Hernandez, M. L., Mancha, M. & Martinez-Rivas, J. M. (2005) Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive. *Phytochemistry*, 66, 1417-1426.
30. Vick, B. A. (1991) A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids*, 26, 315-320.
31. Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J. & Berti, L. (2006) Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 450-454.
32. Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6, 1948-1954.
33. Gill, S. C. & Von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182, 319-326.
34. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
35. Salas, J. J. & Sanchez, J. (1999) Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Science*, 143, 19-26.

36. 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 Biochemistry*, 44, 1122-1127.
37. Márczy, J. S., Németh, A. S., Samu, Z., Háger-Veress, Á. & Szajáni, B. (2002) Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxid lyase enzymes. *Biotechnology Letters*, 24, 1673-1675.
38. Noordermeer, M. A., van der Goot, W., van Kooij, A. J., Veldsink, J. W., Veldink, G. A. & 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4270-4274.
39. Matsui, K., Kajiware, T. & Hatanaka, A. (1992) Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 175-178.

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.

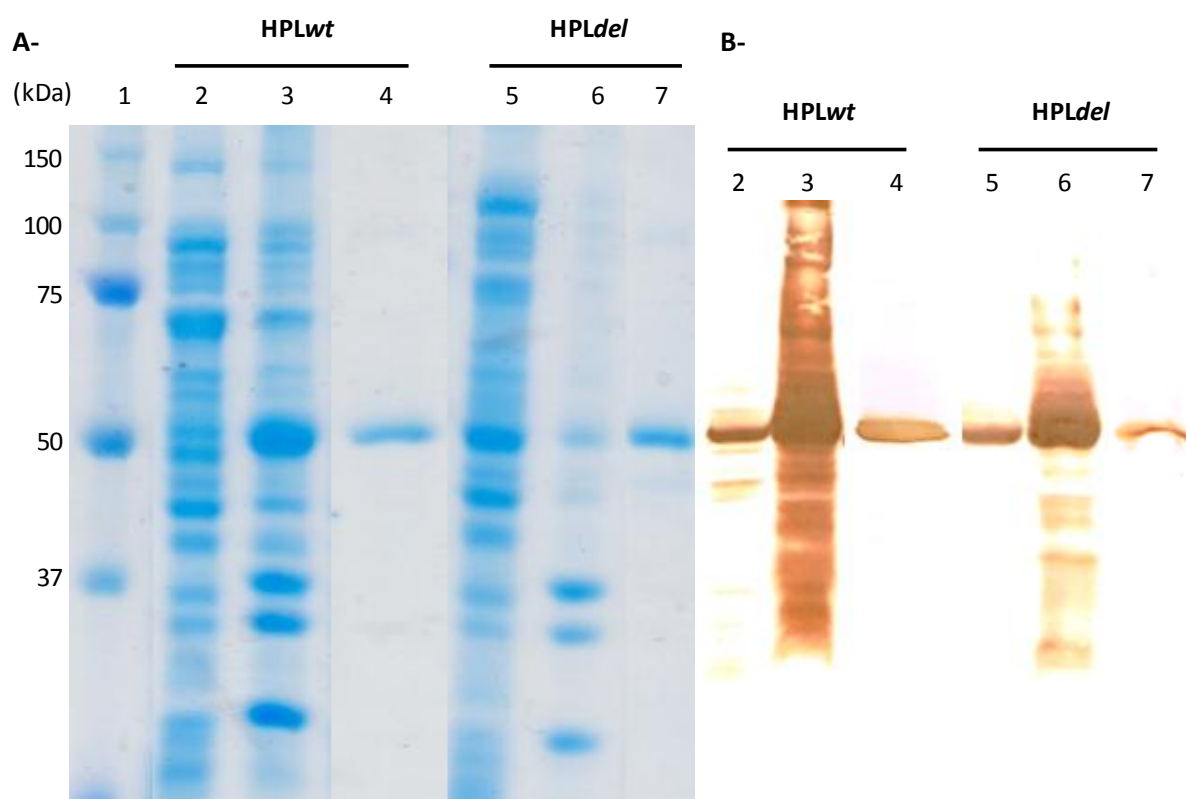


Table 1. Kinetic parameters of purified recombinant olive HPLwt and HPLdel

HPL	Substrates	Km (μM)	Vm (nmol.s^{-1})	kcat (s^{-1})	kcat/Km ($\text{s}^{-1}.\mu\text{M}^{-1}$)
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

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 ⁻¹)	13-HPOD (mM)	Hexanal (mM)	Molar conversion rate (%)	Optimum reaction time (min)
HPLwt				
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
HPLdel				
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 ⁻¹)	13-HPOT (mM)	3Z-hexenal (mM)	Molar conversion rate (%)	Optimum reaction time (min)
HPLwt				
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
HPLdel				
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.