



HAL
open science

Etude du mécanisme catalytique de la lipoxygenase 1 d'olive

Jean-Christophe Alberti

► **To cite this version:**

Jean-Christophe Alberti. Etude du mécanisme catalytique de la lipoxygenase 1 d'olive. Sciences agricoles. Université Pascal Paoli, 2013. Français. NNT : 2013CORT0009 . tel-01088061

HAL Id: tel-01088061

<https://theses.hal.science/tel-01088061>

Submitted on 27 Nov 2014

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
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

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

Jean-Christophe ALBERTI

Le 13 décembre 2013

ETUDE DU MECANISME CATALYTIQUE DE LA
LIPOXYGENASE 1 D'OLIVE

Directeurs :

Mme Liliane BERTI, PR, Université de Corse
M. Jacques MAURY, MC, Université de Corse

Rapporteurs :

M. Daniel THOMAS, PR, Université de Compiègne
Mme Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU, MC-HDR, Université de La Rochelle

Jury :

M. Daniel THOMAS, PR, Université de Compiègne
Mme Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU, MC-HDR, Université de La Rochelle
Mme Florence HUSSON, MC-HDR, Université de Bourgogne
M. Félix TOMI, PR, Université de Corse
Mme Liliane BERTI, PR, Université de Corse
M. Jacques MAURY, MC, Université de Corse

REMERCIEMENTS

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire du végétal de l'UMR 6134 SPE à l'université de Corse. Ils ont été financés par le programme européen BioSF.

Mes remerciements vont en tout premier lieu à la directrice du laboratoire, le Professeur Liliane BERTI, qui m'a accueilli au sein de son équipe et m'a accordé sa confiance en me proposant ce sujet de thèse. Je la remercie pour les réunions qui m'ont permis d'avancer, pour le temps qu'elle a passé à évaluer mon travail et à la correction de ce manuscrit. Elle a su être à l'écoute et me guider dans la bonne direction. Je la remercie enfin pour m'avoir confié un service d'enseignement tout au long de cette thèse. La découverte de l'enseignement a été un réel bonheur autant qu'un excellent apprentissage.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Jacques MAURY, mon co-directeur de thèse pour ses précieux conseils tout au long de ces années, son humour et sa bonne humeur. Son aide inestimable dans les expériences, son soutien, sa disponibilité, les nombreuses discussions qui m'auront permis d'avancer m'ont été d'un grand secours à chaque fois que j'en ai eu besoin. Je le remercie pour le temps consacré à me guider, évaluer mon travail et pour les corrections apportées à ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Daniel THOMAS et le Docteur Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU qui ont accepté le rôle de rapporteurs dans l'évaluation de ce travail, et le Professeur Félix TOMI et le Docteur Florence HUSSON qui ont accepté la fonction d'examineur.

J'adresse un merci tout particulier au Docteur Anne LUCIANI, qui m'a encadré pour les enseignements que j'ai dispensés durant ma thèse et m'a fait profiter de ses remarquables qualités de pédagogie et d'organisation. Son écoute attentive, son aide inestimable, son soutien de tous les instants, ses nombreuses qualités tant humaines que scientifiques en font une personne exceptionnelle, à laquelle j'ai bien souvent fait appel.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du département de biochimie qui, même si je n'ai pas travaillé directement avec eux, ont toujours fait preuve d'une gentillesse remarquable, d'une grande disponibilité et ont toujours eu une oreille attentive. Merci donc à Virginie BRUNINI, notamment pour son aide dans la préparation du soutien de Biologie cellulaire, et les bons moments passés au labo, à Jean GIANNETTINI pour les discussions

que nous avons eues, son sens de l'humour et son soutien, à Claude GAMBOTTI pour avoir répondu à mes questions dès qu'il s'agit de travailler avec des lipides, à Laurent VARESI pour m'avoir permis d'effectuer une partie de mon service d'enseignement en DEUST AMB, filière qu'il dirige, à Alessandra FALCHI pour son aide dans les enseignements d'immunologie et enfin à Marie-Cécile DE CIAN pour les nombreuses discussions, son aide précieuse et les bons moments passés.

Comment remercier la « team chat noir »... Vannina, Elodie et Jérémie, je ne sais pas si je pourrais trouver les mots pour vous exprimer toute ma gratitude, ma sympathie, et le bonheur d'avoir fait votre connaissance. Si ces années de thèse ont été si exceptionnelles, c'est en grande partie grâce à vous ! Je crois que je ne pourrai jamais oublier tous ces bons moments passés au labo, à la fac et même en dehors. Vous m'avez accueilli à bras ouverts, vous avez été d'un soutien infailible à chaque instant. Vous avez toujours su m'encourager, me prodiguer de bons conseils quand j'en ai eu besoin, et m'accompagner dans mon travail d'un œil à la fois critique et bienveillant. Je crois que je ne serai pas arrivé au bout de cette thèse sans vous. Un très grand merci à vous trois, les amis.

Je remercie très vivement Stéphanie FEDERICI, sans qui les enseignements de travaux pratiques ne se seraient pas aussi bien déroulés. Son aide précieuse, sa bonne humeur, sa disponibilité, son soutien, ses qualités, les bons moments passés font que j'ai trouvé une amie dans ces salles de travaux pratiques.

Je remercie également Cynthia PALMIERI-THIERS qui m'a accueilli au laboratoire et m'a guidé dans les premières « manips » de ma thèse, ainsi que toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au laboratoire, Sabrina JACOPINI et Magali MARIANI pour leur aide dans les manips et leur gentillesse, ainsi que les stagiaires Shirley, Radia, Sophie et Jenny, pour leur gentillesse, leur soutien et la bonne ambiance qu'elles ont su faire régner lors de leur passage.

Un grand merci à l'ensemble des chimistes, qu'ils soient de Corte ou de Vignola, pour leur aide précieuse, et notamment à Stéphane, Yin et Louis-Félix. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec vous m'ont beaucoup apporté. Merci également à Anne-Marie pour sa collaboration sur les analyses faites en RMN.

Je remercie les doctorants que j'ai eu le plaisir de connaître lors de ces années, en particulier Joseph, Jean-Jo et Bastien. Je repenserai avec nostalgie aux bons moments que nous avons passés ensemble.

Merci à l'ensemble du personnel de l'Université qui a fait que ma thèse se déroule dans de bonnes conditions et tout particulièrement à Marie-Hélène CINQUI et Valérie LETREUX de l'IUS.

J'adresse mes remerciements au Docteur Eric MARECHAL pour m'avoir proposé de travailler sur les galactolipides, pour sa gentillesse, sa disponibilité, pour les discussions que nous avons eues. Je remercie également le Professeur Ernst OLIW pour son aide précieuse dans les analyses en HPLC qu'il a réalisées, pour sa disponibilité et pour ses explications.

Je tiens à remercier également le Docteur et amie Nicole ARRIGHI, qui m'a apporté son soutien dès la licence, en me poussant en master puis vers un doctorat. Merci pour tes encouragements, pour l'aide que tu as su m'apporter à chaque fois que j'ai fait appel à toi.

Il me faut bien entendu remercier tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien et leurs encouragements... Tout d'abord les amis rencontrés à Nice au cours du master : Florian, Emilie, Eléonore, Nicolas, Mélanie et Amine. Je suis heureux d'avoir su garder le contact avec vous et que nous puissions nous retrouver (plus ou moins) régulièrement. Echanger avec vous nos petits ennuis quotidiens de la thèse a été un grand réconfort. Un merci tout particulier à celle qui a égayé mon séjour niçois, et nombre de mes week-ends par la suite, notre libanaise préférée, Grazia. Même si tu es loin, je ne t'oublierai pas.

Merci à mes amis de plus longue date, que je retrouve chaque été avec autant de plaisir, et qui essaient inlassablement de comprendre ce que je peux bien chercher dans les olives : Thomas, Jean-Baptiste, Livia, Laura, Cécile, Marie-Jo et François. Même si ces derniers étés furent courts en votre compagnie, ils ont été une bouffée d'air frais au milieu de cette thèse, me permettant de souffler et de prendre du recul. Merci également à Ghjilormu et Jean-André pour les bons moments passés.

Je ne peux évidemment oublier mes amis d'Ajaccio : Alexia, Jean-Mathieu, Laurie, Laurent, Sophie, Stéphanie et Livia, qui ont toujours été là pour moi, avec qui j'ai toujours passé de bons moments lors de mes (trop rares) week-ends à Ajaccio. Leur soutien m'aura permis d'arriver au bout de cette thèse.

Merci à tous pour votre soutien sans faille, pour votre présence, vos encouragements.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans ceux qui m'ont supporté depuis tant d'années, soutenu infailliblement tout au long de ma scolarité, et m'ont permis d'arriver jusqu'ici. Je remercie avant tout mes parents, sans qui rien n'aurait été possible. Votre soutien inébranlable, votre aide, vos conseils, m'ont permis de mener mes études à leur

terme. J'ai réussi à « aller à l'école le plus longtemps possible »... Merci également à ma sœur Anne-Sophie, avec qui la cohabitation depuis Nice a été source de joie et de réconfort. Ta présence et tous ces bons moments passés m'ont permis d'avancer sereinement depuis toutes ces années.

Je tiens également à remercier deux personnes dont tout le monde a déjà entendu parler : Babbo et Mammo. Votre dévouement, votre gentillesse, votre « soutien logistique » et votre soutien tout court depuis toutes ces années m'ont toujours été d'une grande aide. Je n'aurai pas réussi sans vous.

Je remercie ma grand-mère, Angèle, pour l'intérêt constant qu'elle porte à ma thèse.

Merci également à mes oncles et tantes, Françoise, Charles et Camille, ainsi qu'à mes cousins Philippe et Saveria, qui s'enquièreent régulièrement de l'avancement de mes travaux. Leur soutien m'est d'un grand réconfort.

J'adresse enfin un très grand merci à l'ensemble de ma famille.

Résumé

Les lipoxygénases (LOX, EC 1.13.11.12) sont des dioxygénases à fer non hémérique très répandues. Chez les végétaux, ces enzymes sont à l'origine d'une voie métabolique impliquée dans de nombreux processus physiologiques, mais aussi dans la réponse à un stress environnemental. La LOX initie la voie en catalysant l'incorporation régiospécifique et stéréospécifique de dioxygène sur le système pentadiénique d'un acide gras libre polyinsaturé (préférentiellement l'acide linoléique ou l'acide linolénique) pour générer un hydroperoxyde d'acide gras.

Une lipoxygénase d'olive appelée LOX1, clonée au laboratoire, a été exprimée chez *E. coli* et purifiée. Elle produit à partir d'acide linoléique des hydroperoxydes de configuration 9*S* et 13*R* dans des proportions 2:1. Elle est la seule lipoxygénase végétale décrite à ce jour produisant des hydroperoxydes de configuration *R*. Les modèles proposés pour expliquer le contrôle de la spécificité réactionnelle des LOX ne s'appliquent pas à la LOX1 d'olive. Afin de mieux comprendre son mécanisme de fonctionnement, un modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive a été construit. La modification par mutagenèse dirigée de deux résidus particuliers, la phénylalanine 277 et la tyrosine 280, a permis d'identifier l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive. D'autres résidus particuliers ont été modifiés par mutagenèse dirigée afin d'étudier leur rôle dans le mécanisme catalytique et le contrôle de la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive. L'analyse globale des résultats obtenus a permis de proposer une première hypothèse quant au fonctionnement de cette enzyme : le substrat pénétrerait dans le site actif de la LOX1 d'olive par son extrémité carboxylate, et serait stabilisé dans le site actif par plusieurs résidus hydrophobes. Un canal pourrait cibler l'oxygène dans le site actif par l'intermédiaire du résidu L579 sur le système pentadiénique du substrat, contrôlant de cette manière la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive.

Par ailleurs, des oxylipines retrouvées chez *Arabidopsis*, appelées arabidopsides, pourraient être formées par action directe d'une 13-LOX sur des acides gras estérifiés des galactolipides. L'action de la 13-LOX1 de soja, la 9/13-LOX1 d'olive et la 9-LOX de pomme de terre a été testée avec des galactolipides. Une faible activité a été mesurée avec la 13-LOX1 de soja et la 9/13-LOX1 d'olive. Une activité plus importante a été mesurée avec la 9-LOX de pomme de terre. Ces résultats suggèrent que l'action des LOX est possible sur des acides gras estérifiés des galactolipides.

Mots clés : Lipoxygénase, olive, mutagenèse dirigée, oxydation, galactolipides

Abstract

Lipoxygenases (LOXs, EC 1.13.11.12) are widespread dioxygenases containing a non hemic iron atom. In plants, LOXs are at the beginning of a metabolic pathway involved in several physiological processes and in the response to environmental stress. A LOX initiates the pathway, catalyzing a regiospecific and stereospecific insertion of oxygen on the pentadiene system of a free polyunsaturated fatty acid (linoleic or linolenic acid) to form fatty acid hydroperoxides.

An olive lipoxygenase called olive LOX1, cloned at laboratory, has been expressed in *E. coli* strain and purified. Olive LOX1 produces 9*S*-hydroperoxides of and 13*R*-hydroperoxides from linoleic acid, in a ratio of 2:1, being the only plant LOX to produce *R*-hydroperoxides described to date. From the currently known models explaining the control of reactional specificity, none can be applied to olive LOX1. A three-dimensional model has been built by homology modeling to understand the catalytic mechanism of olive LOX1. Site-directed mutagenesis experiments have been used to modify two residues of particular interest, the phenylalanine 277 and the tyrosine 280, allowing us to point the active site entrance near these two residues. Other residues of interest have been modified to study their role in the catalytic mechanism and the reactional specificity of olive LOX1. The results have led us to propose a first hypothesis for the reactional mechanism of this enzyme: the substrate could enter into the active site with its carboxylate-end first, and could be stabilized in the active site by hydrophobic side chains of several residues. A channel could bring oxygen into the active site at a position near the side chain of the leucine 579 residue, this one targeting oxygen onto the pentadiene system of the substrate, controlling by this way the reactional specificity of olive LOX1.

LOX are involved in oxylipins synthesis. Arabidopsides are a class of oxylipins found in *Arabidopsis* that could be produced by action of a 13-LOX on galactolipids, which carry esterified fatty acids. Activity of soybean 13-LOX, olive 9/13-LOX1 and potato 9-LOX has been investigated with galactolipids. A low activity was measured when soybean and olive LOXs were used. Activity was far more important when potato LOX was used. These results suggest that LOX can act on esterified fatty acids, especially galactolipids.

Keywords: lipoxygenase, olive, site-directed mutagenesis, oxidation, galactolipids

TABLE DES MATIERES

Introduction bibliographique.....	1
I. Les acides gras.....	2
II. Les oxylipines	5
1. Oxydation chimique des lipides.....	5
2. Voie métabolique de synthèse des oxylipines.....	5
a. Voie générale de synthèse des oxylipines	6
b. L'OPDA et l'acide jasmonique	7
c. Les aldéhydes et les alcools	12
III. Les lipoxygénases.....	15
1. Nomenclature des lipoxygénases	15
2. Diversité et localisation des lipoxygénases	17
a. Diversité.....	17
b. Localisation des lipoxygénases chez les végétaux.....	18
3. Structure des lipoxygénases	18
a. Domaine N-terminal.....	19
b. Domaine C-terminal.....	20
4. Mécanisme catalytique des lipoxygénases	26
a. Principe de la réaction	26
b. Régiospécificité des lipoxygénases	28
c. Stéréospécificité des lipoxygénases	34
IV. Intérêt économique de la voie de la lipoxygénase	38
V. Objectifs.....	39
Matériels et Méthodes	40
I. Matériel biologique.....	41
II. Identification des acides aminés importants et choix des mutations	41

1. Alignements de séquences en acides aminés	41
2. Modélisation de la structure de la LOX1 d'olive	42
III. Obtention des mutants de la LOX1 d'olive	42
1. Mutagénèse dirigée.....	42
2. Clonage dans les bactéries compétentes	43
3. Extraction et purification du vecteur, et séquençage.....	43
4. Clonage dans les bactéries en vue de l'expression	43
IV. Expression et purification des protéines recombinantes	44
1. Expression des protéines recombinantes	44
2. Préparation du surnageant de lyse	44
3. Purification par chromatographie d'affinité	45
V. Caractérisation biochimique des enzymes purifiées	45
1. Dosage de l'activité lipoxigénase	45
2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et immunoempreinte.....	46
3. Identification des produits de la catalyse enzymatique	47
VI. Activité lipoxigénase sur des galactolipides	47
Résultats et Discussion	49
I. Etude du mécanisme catalytique de la lipoxigénase 1 d'olive.....	50
1. Modélisation par homologie de la LOX1 d'olive	50
a. Etude du modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive.....	50
b. Prédiction de la localisation du site actif de la LOX1 d'olive	52
2. Localisation de l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive	54
a. Expression et purification de la LOX1 d'olive sauvage et des mutants	57
b. Effet des mutations de la LOX1 d'olive sur l'hydroperoxydation de l'acide linoléique et de l'acide linoléique	59
3. Etude de déterminants du mécanisme catalytique chez la LOX1 d'olive	67
a. L'importance des charges situées à l'entrée du site actif.....	69

b. Les déterminants de la régiospécificité chez la LOX1 d'olive	76
c. La stéréospécificité des LOX : l'hypothèse de Coffa et Brash (2004)	83
d. Positionnement du substrat et ciblage de l'oxygène	85
4. Une première hypothèse pour le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive.	95
II. Etude de l'action des lipoxygénases sur les galactolipides	98
1. Solubilisation des galactolipides	99
2. Activité de la lipoxygénase 1 de soja sur les galactolipides	101
3. Activité des lipoxygénases de spécificités différentes sur les galactolipides	102
Conclusion et perspectives	104
Références bibliographiques	109
Annexes.....	118
Communications.....	122

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de quelques acides gras polyinsaturés	3
Figure 2 : Structure des lipides complexes : acide phosphatidique et galactolipide ...	4
Figure 3 : La voie de la lipoxigénase chez les végétaux (d'après Feussner et Wasternack, 2002)	7
Figure 4 : Voie de synthèse de l'acide jasmonique.....	8
Figure 5 : Structure de l'arabidopside A	9
Figure 6 : Mécanisme d'action simplifié de l'acide jasmonique (d'après Wasternack et Hause, 2013)	11
Figure 7 : Produits formés par la voie HPL au cours de la voie de la LOX	13
Figure 8 : Régiospécificité réactionnelle des lipoxigénases végétales et animales .	16
Figure 9 : Structure générale des lipoxigénases : exemple de la LOX1 de soja.....	19
Figure 10 : Conservation du domaine PLAT chez les LOX et les lipases	20
Figure 11 : Domaine C-terminal de la LOX1 de soja, et zoom sur les hélices centrales	21
Figure 12 : Coordination de l'atome de fer catalytique de la LOX1 de soja	23
Figure 13 : Forme de la cavité IIa déterminée pour la LOX1 de soja (d'après Youn <i>et al.</i> , 2006).....	24
Figure 14 : Formes possibles du site actif présent dans la cavité II des LOX (d'après Eek <i>et al.</i> , 2012)	25
Figure 15 : Schéma du mécanisme réactionnel de la lipoxigénase	27
Figure 16 : Modèle de l'orientation dépendance (d'après Hornung <i>et al.</i> , 1999)	30
Figure 17 : Modèle de l'espace de liaison (d'après Hughes <i>et al.</i> , 2001b)	32
Figure 18 : Corrélation entre l'hydrogène arraché et la stéréospécificité du produit formé.	34
Figure 19 : Alignement de séquences de <i>R</i> - et <i>S</i> -LOX (d'après Coffa et Brash, 2004)	35
Figure 20 : Mécanisme de la stéréospécificité des LOX (d'après Coffa et Brash, 2004)	36
Figure 21 : Structure du site actif de la 15-LOX1 de réticulocyte de lapin en présence d'un inhibiteur (d'après Coffa et Brash, 2004).	37
Figure 22 : Structure de la LOX1 d'olive modélisée par homologie	51

Figure 23 : Sphère de coordination de l'atome de fer catalytique dans le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive	52
Figure 24 : Vue agrandie de l'entrée putative du site actif de la LOX1 d'olive	53
Figure 25 : Alignement de séquences entourant l'entrée putative du site actif de la LOX1 d'olive	55
Figure 26 : Modélisation de la substitution des acides aminés encombrants l'entrée du site actif	56
Figure 27 : Analyse par SDS-PAGE et immunoempreinte des fractions purifiées d'enzymes recombinantes	58
Figure 28 : Interaction entre les effets des deux simples mutations sur la catalyse (k_{cat}) réalisée par le double mutant F277A/Y280I (DM)	62
Figure 29 : Identification des produits formés lors de la transformation de l'acide linoléique par les mutants de LOX1 d'olive par RMN du carbone 13 (A) et par CP-HPLC-MS/MS (B et C).....	63
Figure 30 : Vue de la structure secondaire entourant l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive	65
Figure 31 : Site actif de la LOX1 d'olive modélisé par CASTp.....	68
Figure 32 : Résidus chargés de l'entrée du site actif	69
Figure 33 : Modélisation de la modification des résidus R265, R268 et K283 de la LOX1 d'olive	73
Figure 34 : Site actif de la 12/15-LOX de lapin (gauche) et de la 9/13-LOX1 d'olive : agrandissement de la zone localisée par les déterminants de Sloane et de Borngräber.....	77
Figure 35 : Modélisation de la modification S517F	82
Figure 36 : Identification de la position du résidu G568 sur le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive	84
Figure 37 : Alignement de séquences ciblé sur les résidus L572 et L579	85
Figure 38 : Localisation des résidus L572 et L579 sur le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive	86
Figure 39 : Modélisation de la modification du résidu L572 de la LOX1 d'olive	88
Figure 40 : Modélisation du canal putatif d'accès de l'oxygène identifié avec CASTp	92
Figure 41 : Régiospécificité et stéréospécificité des produits formés par l'abstraction de l'hydrogène de configuration D	93

Figure 42 : Modélisation de la modification du résidu L579 de la LOX1 d'olive	94
Figure 43 : Schéma du site actif de la 9/13-LOX1 d'olive	96
Figure 44 : Influence de la concentration en MGDG et du détergent sur l'activité lipoxigénase.....	100
Figure 45 : Influence de la concentration en LOX sur l'activité mesurée sur les MGDG	101

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Nomenclature de quelques acides gras polyinsaturés.....	2
Tableau II : Exemples de produits de la voie de la LOX formant la note verte (d'après Gargouri <i>et al.</i> , 2008).....	14
Tableau III : Déterminants de la régiospécificité (d'après Hornung <i>et al.</i> , 1999).....	31
Tableau IV : Tableau de purification de la LOX1 d'olive et des mutants F277A, Y280I et F277A/Y280I.....	57
Tableau V : Paramètres cinétiques des enzymes recombinantes WT, F277A, Y280I et du double mutant F277A/Y280I	59
Tableau VI : Paramètres cinétiques de la LOX1 WT et des mutants R265Q, R268Q et K283Q	70
Tableau VII : Proportions des régioisomères et stéréoisomères synthétisés par la LOX1 d'olive WT et les mutants R265Q, R268Q et K283Q.....	71
Tableau VIII : Tableau comparatif de purification de la LOX WT et des mutants V583H et V583F	78
Tableau IX : Spécificité des produits synthétisés par les mutants V583H et V583F de la LOX1 d'olive	79
Tableau X : Paramètres cinétiques des mutants L579V et L579I	89
Tableau XI : Proportions des régioisomères et stéréoisomères synthétisés par la LOX1 d'olive WT et les mutants L579V et L579I	90

LISTE DES ABBREVIATIONS

18:2	Acide linoléique
18:3	Acide linoléique
α -DOX	α -dioxgénase
AA	Acide arachidonique
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALA	Acide α -linoléique
AOC	Allène oxyde cyclase
AOS	Allène oxyde synthase
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
COI1	Coronatine insensitive 1
CP-HPLC-MS/MS	Chromatographie liquide haute performance en phase chirale couplée à un spectromètre de masse en tandem
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DES	Divinyl éther synthase
DGDG	Digalactosyl-diacylglycérol
DNase I	Désoxyribonucléase I
dn-OPDA	Dinor-OPDA
dNTP	Désoxyribonucléosides triphosphate
EAS	Epoxyde alcool synthase
FPLC	Chromatographie liquide rapide de protéines
GLA1	Glycérolipase A1
HAT	Acide hexadécatriénoïque
HO ⁻	Ion hydroxyde
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque
HPL	Hydroperoxyde lyase
HPOD	Acide hydroperoxyoctadécadiénoïque
HPOT	Acide hydroperoxyoctadécatriénoïque
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JA	Acide jasmonique
JA-Ile	Jasmonoyl-isoleucine
JAZ	Jasmonate Zim domain
LA	Acide linoléique
LB agar	Milieu Luria-Bertani agar
LB Broth	Milieu Luria-Bertani bouillon
LH2	Lipoxygénase homology 2 domain
LOX	Lipoxygénase
MGDG	Monogalactosyl-diacylglycérol
NZY ⁺	NZ-Amine et extraits de levure (Yeast extract)
OPC	Acide oxophytoénoïque
OPDA	Acide oxo-phytodiénoïque
OPR	OPDA reductase
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne

PDB	Protein Data Bank
PG	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol)
PLA-I γ 1	Phospholipase A1 classe I γ 1
PLAT	Domaine Polycystine-1, Lipoxygénase, α -toxine
POX	Peroxygénase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
TBE	Tris Borate EDTA
WT	Wild type, sauvage

Avant-propos

La voie de la lipoxigénase est une voie métabolique retrouvée chez de nombreux organismes. Chez les animaux, elle mène à la formation de composés impliqués dans les processus inflammatoires, ou encore les processus de cancérisation. Chez les végétaux, les composés issus de cette voie ont des rôles physiologiques variés (croissance, sénescence,...) et sont impliqués dans la réponse aux blessures ou aux pathogènes. Ce sont notamment des composés volatils aux rôles antimicrobiens, antifongiques, et responsables de saveurs regroupées sous le nom de « note verte ». Celle-ci est très recherchée dans les industries agroalimentaires et cosmétiques pour les propriétés aromatisantes et antibactériennes des molécules qui la composent. La « note verte » est retrouvée dans de nombreux fruits et légumes et dans des produits de consommation tels que l'huile d'olive. L'étude de la composition de l'arôme de l'huile d'olive a permis de montrer que des enzymes de la voie de la lipoxigénase sont les principales responsables de la production de cet arôme, notamment la lipoxigénase et l'hydroperoxyde lyase. Le laboratoire s'est intéressé à la biosynthèse de l'arôme de l'huile d'olive à travers l'étude des enzymes de la voie de la lipoxigénase. Ainsi, une lipoxigénase d'olive a été clonée et caractérisée au laboratoire. Le mécanisme catalytique des lipoxigénases est relativement bien identifié : elles catalysent l'insertion régiospécifique et stéréospécifique d'un oxygène sur le système pentadiénique d'un acide gras. Cependant, les mécanismes régissant le contrôle de la régiospécificité et de la stéréospécificité des lipoxigénases demeurent mal connus.

Dans un premier temps, des mutants de la lipoxigénase d'olive ont été construits afin d'étudier plus précisément son site actif, pour découvrir les résidus d'acides aminés impliqués dans le contrôle de son mécanisme catalytique. Cette étude pourrait permettre d'identifier les résidus responsables de la régiospécificité et de la stéréospécificité de l'enzyme, et de modifier la configuration du site actif afin d'en faire un outil biotechnologique pour la production sélective de composés volatils. Par la suite, l'activité de lipoxigénases de différentes spécificités sur des lipides complexes a été étudiée. Ce travail pourrait amener de nouveaux éclaircissements sur la capacité des lipoxigénases à oxygéner des acides gras estérifiés, amenant de nouvelles perspectives sur la physiologie végétale et la voie de signalisation des octadécanoïdes.

Introduction bibliographique

Les lipides sont considérés comme des corps gras insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques. Lorsqu'ils sont des constituants des organismes, ils ont un double rôle : structurel dans la formation des membranes biologiques, et fonctionnel dans de nombreux processus physiologiques : ils peuvent servir de source d'énergie, de molécules de signalisation, ou de précurseurs métaboliques. De nombreuses voies de synthèse et de dégradation des lipides existent, et leur oxydation est un processus essentiel au bon fonctionnement de tous les systèmes biologiques. Les lipides oxydés sont produits à la fois dans des conditions physiologiques et en réponse à des stress.

I. Les acides gras

Les acides gras simples sont des acides carboxyliques formés d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue. Chez les plantes et les animaux, les acides gras retrouvés en majorité comptent de 16 à 20 atomes de carbone. En général, ils possèdent plusieurs insaturations de configuration *cis*. Les acides gras insaturés les plus fréquemment retrouvés sont l'acide linoléique (18:2 ω 6) et l'acide linoléique (18:3 ω 3) (Tableau I, Figure 1). L'acide hexadécatriénoïque (16:3 ω 3) est un composant majoritaire de certains lipides complexes chez les végétaux. Chez les animaux, et chez l'homme en particulier, l'acide arachidonique (20 atomes de carbone) est le précurseur le plus important pour la synthèse d'oxylipines, molécules ayant un rôle dans la réponse inflammatoire, ou encore des processus physiologiques divers. Ces acides gras sont regroupés dans le Tableau I.

Tableau I : Nomenclature de quelques acides gras polyinsaturés

Nom usuel	Nom systématique	Symbole
Acide arachidonique (AA)	Acide (5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraénoïque	20:4 ω 6
Acide linoléique (LA)	Acide (9Z,12Z)-octadéca-9,12-diénoïque	18:2 ω 6
Acide α -linoléique (ALA)	Acide (9Z,12Z,15Z)-octadéca-9,12,15-triénoïque	18:3 ω 3
Acide hexadécatriénoïque (HAT)	Acide (7Z,10Z,13Z)-hexadéca-7,10,13-triénoïque	16:3 ω 3

Leurs structures tridimensionnelles dépendent du nombre d'insaturations qu'ils portent, et de leur configuration : chaque insaturation en *cis* induit une courbure de 30° par rapport à la structure étirée de la chaîne hydrocarbonée (Figure 1).

Ces acides gras sont assez peu retrouvés sous leur forme libre dans les cellules : ils sont en général estérifiés par une molécule de glycérol pour former des lipides complexes appelés glycérolipides qui composent les membranes biologiques.

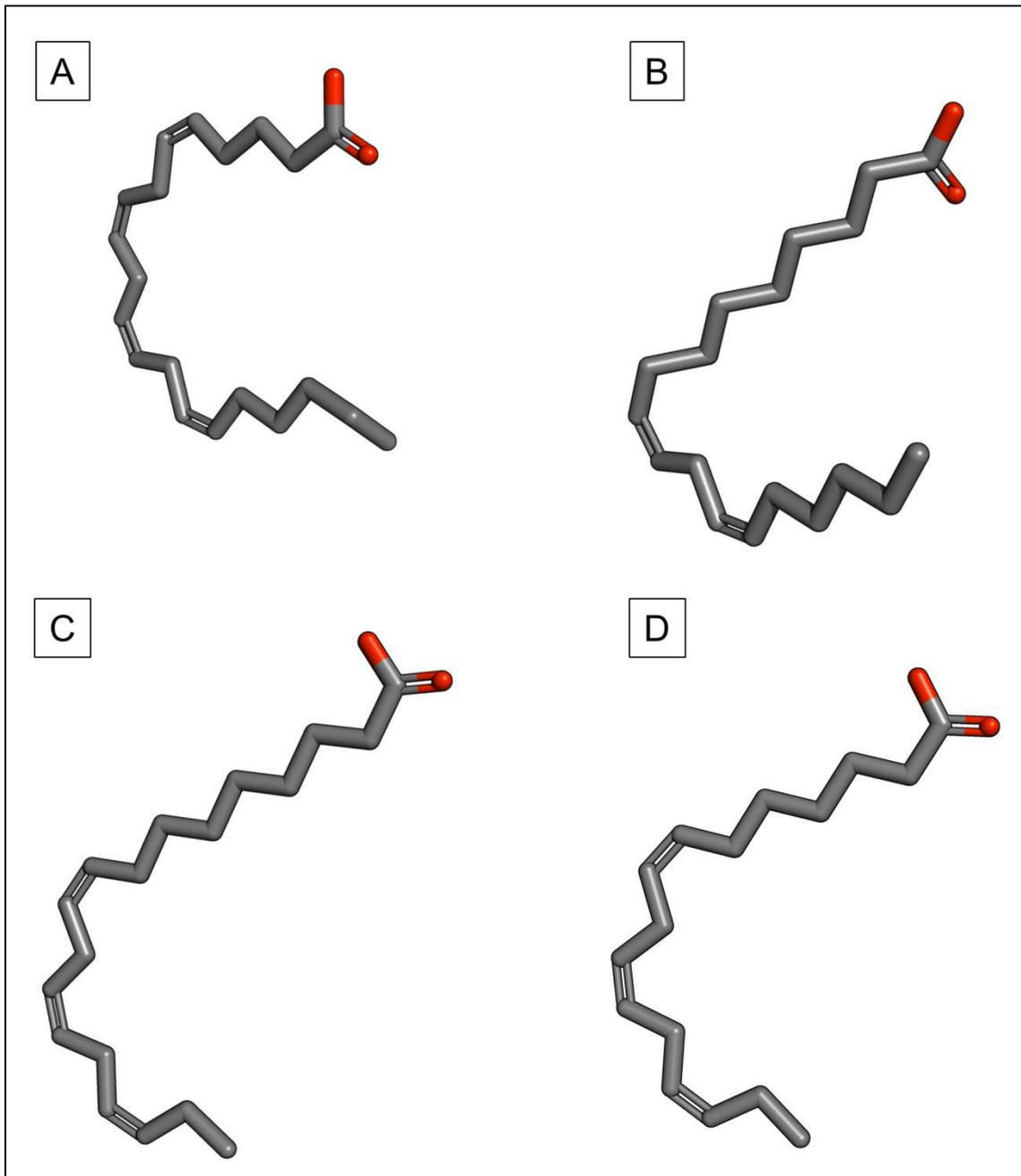


Figure 1 : Structure de quelques acides gras polyinsaturés

A, Acide arachidonique ; B, Acide linoléique ; C, Acide linoléique ; D, Acide hexadécatriénoïque

Ils se composent principalement du squelette de glycérol portant un acide gras sur les positions 1 et 2 (Figure 2). La troisième position peut être occupée par un troisième acide gras, il s'agit alors de triacylglycérol. Si la troisième position est occupée par un groupement phosphate, la molécule est alors appelée acide phosphatidique et est le précurseur de plusieurs phospholipides membranaires. Le groupement peut également être un sucre, comme le galactose, et ces lipides sont appelés galactolipides. Ils sont des constituants majeurs des membranes des thylakoïdes dans les chloroplastes des cellules végétales, représentant environ 75% des lipides membranaires totaux dans les feuilles (Dörmann et Benning, 2002). Les principaux acides gras présents sur les positions 1 et 2 des galactolipides sont l'acide linoléique, l'acide linoléique et l'acide hexadécatriénoïque (Tableau I).

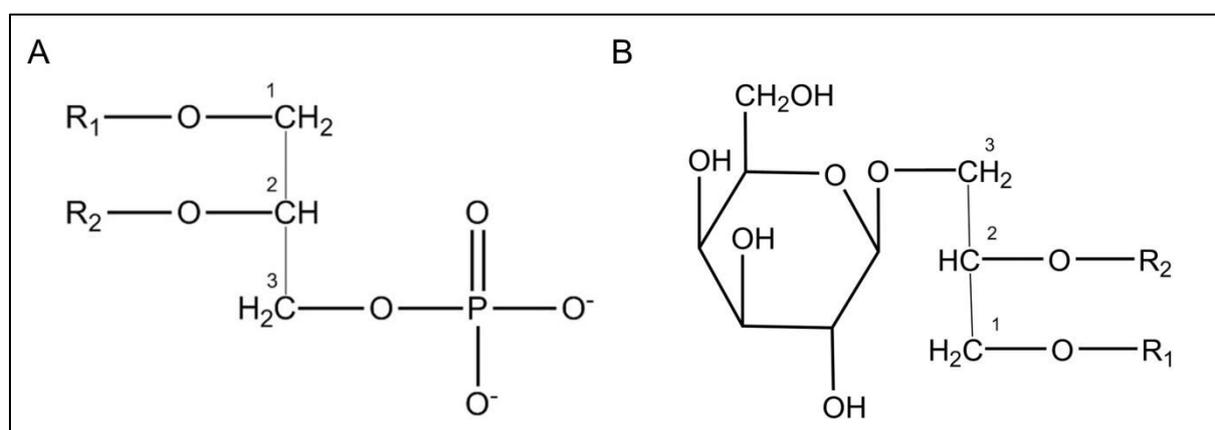


Figure 2 : Structure des lipides complexes : acide phosphatidique et galactolipide

A, représentation schématique d'un acide phosphatidique. B ; représentation schématique d'un monogalactosyldiacylglycérol.

Ces acides gras polyinsaturés, qu'ils soient libres ou intégrés dans des lipides complexes, sont les précurseurs d'une classe de molécules appelées oxylipines aux rôles physiologiques majeurs, et qui sont également retrouvés dans les processus pathologiques.

II. Les oxylipines

Chez les animaux, les oxylipines sont souvent appelées eicosanoïdes, puisqu'elles sont produites à partir d'acides gras à 20 atomes de carbone. Les eicosanoïdes regroupent, par exemple, les prostaglandines, thromboxanes, lipoxines et leucotriènes, molécules majoritairement impliquées dans les processus inflammatoires, l'immunité, ou encore agissant comme messagers secondaires (Brash, 1999).

Chez les végétaux, les phyto-oxylipines sont produites principalement à partir des acides gras à 18 atomes de carbone. Elles regroupent l'acide jasmonique et l'acide *cis*-12-oxophytodiénoïque, des aldéhydes, époxydes et divinyl éthers (Grechkin, 1998).

L'oxydation des acides gras peut se produire de manière chimique (Mueller, 2004) ou enzymatique. Dans ce dernier cas, c'est la voie de la lipoxygénase (Brash, 1999) ou une α -dioxygénase (Hamberg *et al.*, 2002) qui en sont responsables.

1. Oxydation chimique des lipides

L'oxydation chimique des lipides engendre la formation d'un mélange de régioisomères et stéréoisomères. Ils sont produits en général par des espèces réactives de l'oxygène, et ont pu être utilisés comme agents de défense chez les espèces les moins évoluées, pour lesquelles l'oxydation chimique est le seul moyen de production d'oxylipines (Mueller, 2004). Avec l'évolution, et le contrôle de l'oxydation des lipides par voie enzymatique, les deux mécanismes coexistent dans les cellules. Les espèces réactives de l'oxygène mènent à la formation de mélanges de régioisomères et de stéréoisomères, alors que la catalyse enzymatique permet la production sélective et spécifique de certains isomères de lipides oxydés.

2. Voie métabolique de synthèse des oxylipines

Produites par synthèse enzymatique, les phyto-oxylipines proviennent principalement de la voie métabolique de la lipoxygénase. Cette voie essentielle chez les végétaux est activée *in vivo* dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire lors de certaines étapes du développement de la plante (croissance et

développement, régulation par des messagers hormonaux, floraison, formation du pollen, sénescence, ...), ou en réponse à un stress environnemental, qu'il soit mécanique, comme une blessure, ou biologique, comme une attaque d'organismes pathogènes ou d'herbivores (Wasternack et Hause, 2013).

a. Voie générale de synthèse des oxylipines

Il est communément admis que l'acide linoléique et l'acide linolénique, précurseurs des oxylipines, sont libérés à partir de lipides complexes par une phospholipase ou une galactolipase. La lipoxygénase agit ensuite sur ces acides gras libres, bien qu'il ait été rapporté dans la littérature, de manière ponctuelle, une action possible d'une lipoxygénase directement sur des acides gras estérifiés composant des phospholipides ou des galactolipides (Brash *et al.*, 1987 ; Grechkin, 1998 ; Nakashima *et al.*, 2011).

Les acides gras libres peuvent être substrats d'une α -dioxygénase, qui forme des hydroperoxydes sur le deuxième carbone. Ces molécules instables sont réduites en hydroxydes d'acides gras, ou sont réarrangées de manière chimique en aldéhydes en perdant un atome de carbone. Cette voie semble impliquée dans la défense contre les infections microbiennes (Hamberg *et al.*, 2005). Les acides gras libres peuvent également être transformés en hydroperoxydes d'acides gras par la lipoxygénase, qui est la voie la plus étudiée. Les hydroperoxydes d'acides gras sont des molécules extrêmement réactives, et sont donc métabolisées rapidement par de nombreuses enzymes (Figure 3). Des réductases peuvent réduire les hydroperoxydes en hydroxydes d'acides gras, qui sont moins réactifs. La lipoxygénase (LOX) peut également agir à nouveau pour former des céto-acides gras polyinsaturés, en général dans des conditions pauvres en oxygène. Une peroxygénase (POX) et une époxyde alcool synthase (EAS) peuvent transformer les hydroperoxydes d'acides gras en époxy-hydroxy-acides gras, qui pourront être des régioisomères identiques, mais différeront par leur stéréochimie. Une divinyl éther synthase (DES) permet la formation de divinyl éther d'acides gras, tels que l'acide colnéléique ou l'acide colnéléinique, jouant un rôle dans la réponse aux pathogènes (Feussner et Wasternack, 2002).

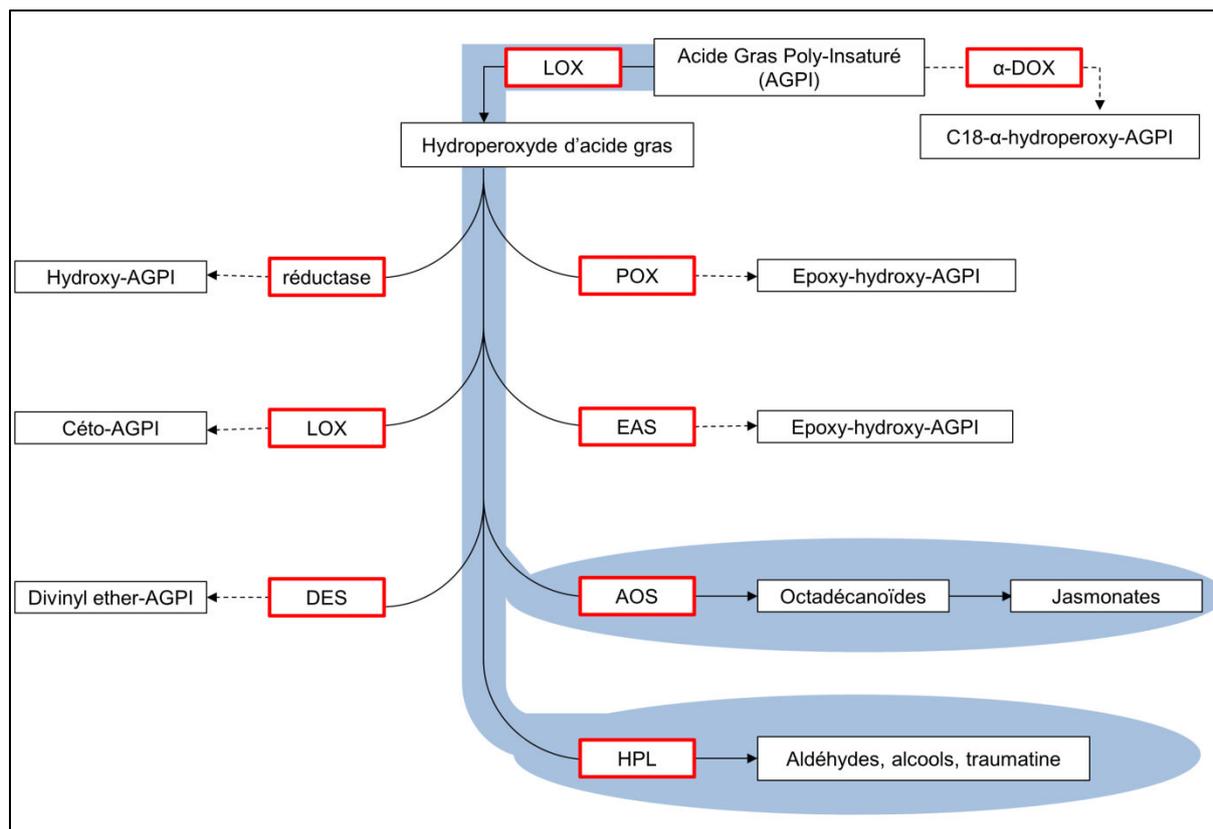


Figure 3 : La voie de la lipoxygénase chez les végétaux (d'après Feussner et Wasternack, 2002)

Sur cette figure sont représentés encadrés en noir, les substrats et produits de la réaction, et encadrées en rouge les enzymes impliquées dans ces réactions (AOS : allène oxyde synthase ; DES : divinyl éther synthase ; α -DOX : α -dioxygénase ; EAS: époxyde alcool synthase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; LOX : lipoxygénase ; POX: peroxygénase). Les voies auxquelles ce travail s'intéresse apparaissent en traits pleins, soulignées en bleu : ce sont les voies de l'AOS et de l'HPL, en aval de l'action de lipoxygénase.

En fonction du substrat de départ, un grand nombre de molécules peuvent être produites par la voie de la LOX, aussi, nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux voies les plus étudiées : la voie de l'allène oxyde synthase (AOS) et la voie de l'hydroperoxyde lyase (HPL). Ces deux voies mènent à la formation des oxylipines les mieux caractérisées, respectivement l'acide *cis*-12-oxophytodiénoïque (OPDA), précurseur de l'acide jasmonique (JA) et de ses dérivés, et les alcools et aldéhydes à six et neuf atomes de carbone.

b. L'OPDA et l'acide jasmonique

i. Voie de synthèse enzymatique

Le précurseur de ces composés est l'acide linoléique, probablement libéré à partir des galactolipides par une phospholipase A1 (PLA-ly1) chez *Arabidopsis*

thaliana (Ellinger *et al.*, 2010), ou une galactolipase (GLA1) chez *Nicotiana attenuata* (Bonaventure *et al.*, 2011) (Figure 4).

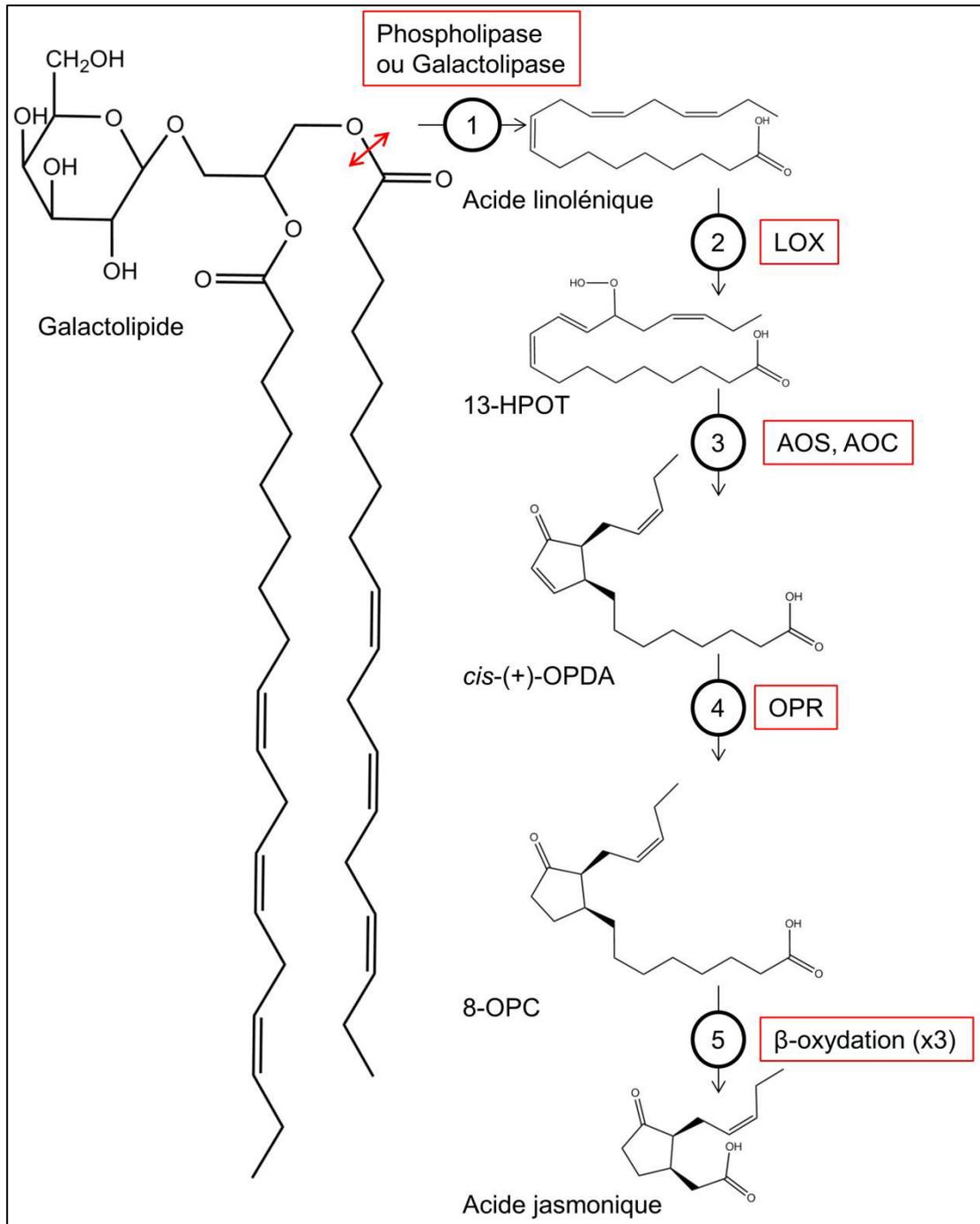


Figure 4 : Voie de synthèse de l'acide jasmonique

Un galactolipide porteur d'acide linoléinique est hydrolysé par une phospholipase ou une galactolipase pour libérer l'acide gras (1), qui est transformé par une 13-LOX en 13-hydroperoxyde d'acide linoléinique (2). Suite à l'action d'une AOS puis d'une AOC, l'hydroperoxyde est transformé en OPDA (3). Une OPDA reductase réduit ce dernier (4), puis trois cycles de β -oxydation permettent la formation de l'acide jasmonique (5). Abréviations : AOC : allène oxyde cyclase ; AOS : allène oxyde synthase ; LOX : lipoxygénase ; cis-(+)-OPDA : acide oxophytodiénoïque ; OPR : OPDA réductase ; 8-OPC : acide oxophytoénoïque ; 13-HPOT : acide 13-hydroperoxyoctadécatriénoïque.

Cependant, lors de l'infection par *Phytophthora parasitica*, GLA1 ne semble pas impliquée dans la production d'acide jasmonique. La libération de l'acide gras à partir de lipides complexes pourrait donc être spécifique du stimulus perçu (Wasternack et Hause, 2013). Une lipoxygénase catalyse ensuite l'insertion sur le carbone 13 d'une fonction hydroperoxyde, formant de cette manière l'acide (9Z,11E,15Z)-13S-hydroperoxyoctadéca-9,11,15-triénoïque (13S-HPOT). Ce dernier est ensuite transformé en OPDA par l'intervention successive d'une allène oxyde synthase (AOS) puis d'une allène oxyde cyclase (AOC). Une OPDA réductase et trois cycles de β -oxydation permettent ensuite la formation de l'acide jasmonique.

Dans les galactolipides, notamment dans les membranes des chloroplastes d'épinard, l'acide hexadécatriénoïque (HAT) peut représenter jusqu'à 25 % et l'acide linoléique près de 72 % des acides gras estérifiés (Gurr *et al.*, 2002). L'HAT peut également emprunter la voie de l'AOS et être transformé en dinor-OPDA (dnOPDA), un analogue structural de l'OPDA à 16 atomes de carbone.

Une classe particulière d'oxylipines a été identifiée ces dernières années (Stelmach *et al.*, 2001) chez *Arabidopsis thaliana* : appelées arabidopsides, leur structure est basée sur le modèle des galactolipides, et les acides gras sont remplacés par des molécules d'OPDA ou de dnOPDA (Figure 5).

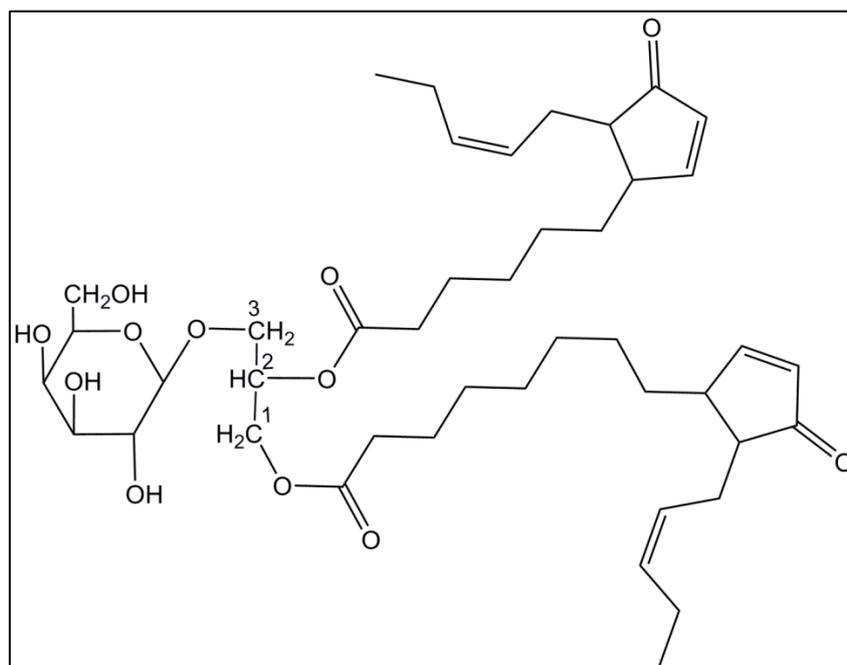


Figure 5 : Structure de l'arabidopside A

L'arabidopside A, formé d'un squelette de glycérol, sur lequel sont présents une molécule d'OPDA en position 1, une molécule de dnOPDA en position 2, et une molécule de galactose en position 3.

La formation de ces arabidopsides est controversée : l'OPDA et/ou le dnOPDA pourraient être formés directement sur l'acide gras estérifié dans les membranes (Mosblech *et al.*, 2009), ou bien pourraient être estérifiés suite à leur formation (Ibrahim *et al.*, 2011). Cependant, une première étude *in vitro* a montré que la lipoxygénase de soja peut, en présence de détergent, catalyser l'hydroperoxydation d'acides gras portés par des galactolipides (Nakashima *et al.*, 2011). Les galactolipides utilisés dans cette dernière étude contiennent plus de 96 % d'acide linoléique, et pas d'HAT. Ainsi, seule la formation d'hydroperoxydes d'acide linoléique a pu être démontrée. Il pourrait être intéressant d'étudier la possibilité d'action d'une lipoxygénase sur l'HAT fixé sur un galactolipide, afin de vérifier si l'OPDA et le dnOPDA peuvent être produits directement sur les galactolipides, ou si une estérification fait suite à leur synthèse.

ii. Structure et fonction de l'OPDA et de l'acide jasmonique

De nombreuses oxylipines sont formées à partir de la structure de l'OPDA, comme l'acide jasmonique et ses nombreux dérivés, appelés jasmonates. Ces dernières années, un grand nombre de jasmonates ont été identifiés : leur structure est celle de l'acide jasmonique sur laquelle sont ajoutés des sucres, des acides aminés, ou encore des groupements méthyle. Parmi cet ensemble d'oxylipines, le rôle de l'acide jasmonique et son dérivé le jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) est le mieux identifié. Ces deux oxylipines fonctionnent de la même manière, aussi, il y sera fait référence par la suite sous le nom de JA/JA-Ile.

Un ensemble de gènes est exprimé en réponse à JA/JA-Ile. Leur expression est dépendante de la concentration en oxylipines, et le mécanisme de perception des jasmonates est aujourd'hui relativement bien identifié (Figure 6).

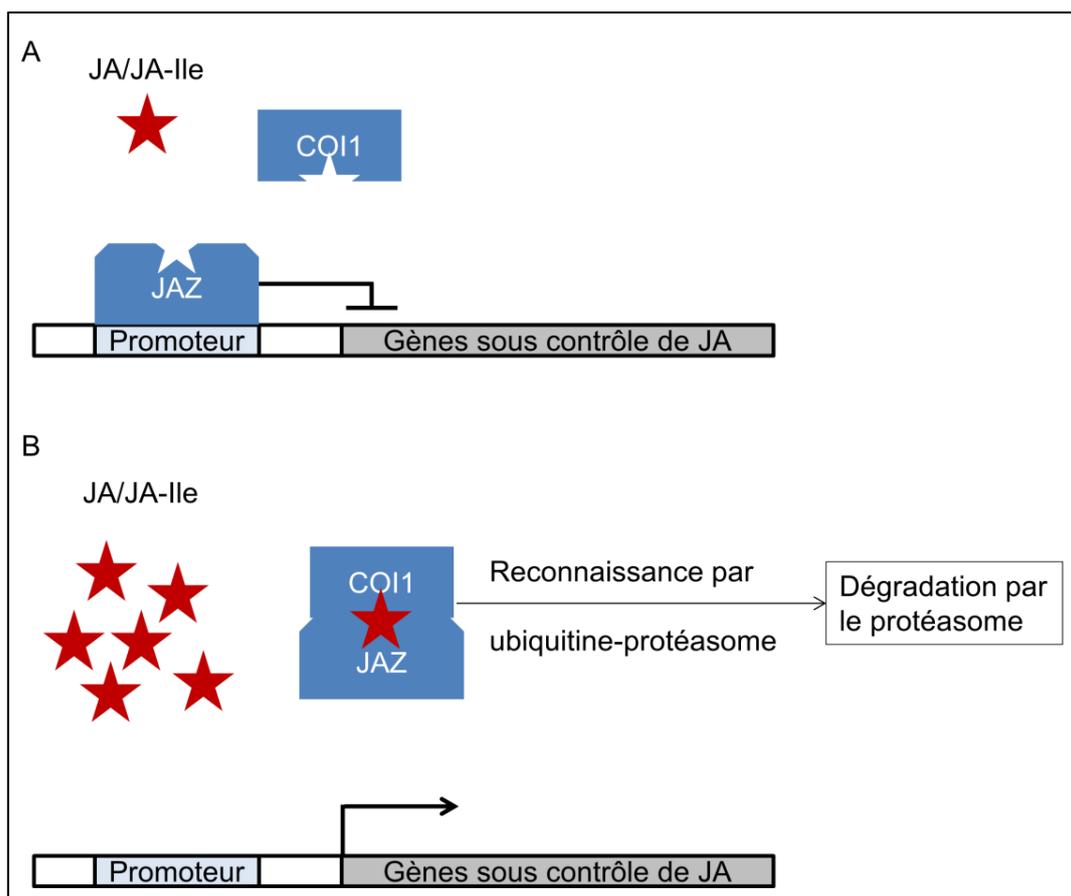


Figure 6 : Mécanisme d'action simplifié de l'acide jasmonique (d'après Wasternack et Hause, 2013)

En A, un faible niveau d'acide jasmonique (JA) et/ou de jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) permet l'inhibition de l'expression des gènes sous contrôle des oxylipines. En B, lorsque les oxylipines s'accumulent, elles permettent la levée de l'inhibition et la transcription des gènes activés en réponse aux oxylipines. Abréviations : COI1 : Coronatine-Insensible 1 ; JA : Acide jasmonique ; JA-Ile : Jasmonoyl-Isoleucine ; JAZ : Jasmonate ZIM-domain.

Une famille de répresseurs formée d'un domaine de liaison aux jasmonates et d'un domaine ZIM, appelée JAZ (Jasmonate ZIM-domain), inhibe la transcription des gènes de réponse aux jasmonates, lorsque les quantités de JA/JA-Ile sont faibles dans les cellules. Lors d'une attaque ou d'une blessure, l'augmentation des quantités de JA/JA-Ile permet la fixation aux protéines JAZ d'une protéine insensible à la coronatine, une phytotoxine, appelée COI1 (Coronatine Insensible 1). Ce complexe fonctionnant comme une ubiquitine-ligase est reconnu par le système ubiquitine-protéasome et permet la dégradation des protéines JAZ, levant ainsi l'inhibition des gènes transcrits en réponse à l'accumulation de jasmonates. Les jasmonates ont donc un rôle majeur dans la transmission du signal, que ce soit lors du développement et de la croissance, ou lors d'un stress biotique ou abiotique

(Wasternack et Hause, 2013). Cependant, de plus en plus d'exemples montrent que certains gènes sont exprimés de manière spécifique en réponse à l'OPDA (Wasternack *et al.*, 2013). L'OPDA n'est pas un ligand du complexe COI1-JAZ. Il semblerait donc exister une voie de signalisation indépendante de l'acide jasmonique, au sein de laquelle l'OPDA jouerait un rôle majeur. De ce fait, le rôle des arabidopsides, réservoir important d'OPDA nécessite d'être étudié.

c. Les aldéhydes et les alcools

i. Voie de synthèse enzymatique

Une classe importante de phyto-oxylipines est synthétisée par la « branche » HPL de la voie de la LOX (Figure 3). L'acide linoléique transformé en 9-HPOD permet la synthèse de *cis*-3-nonéanal par action d'une HPL sur la liaison entre le carbone portant la fonction hydroperoxyde et le carbone impliqué dans la double liaison du système pentadiénique. Cet aldéhyde à 9 atomes de carbone peut ensuite être converti en alcool à 9 atomes de carbone, le *cis*-3-nonénol, par une alcool déshydrogénase (ADH), ou isomérisé en *trans*-2-nonéanal puis converti en *trans*-2-nonénol par une ADH. Si l'acide linoléique est transformé en 13-HPOD, l'action d'une HPL permettra la formation d'un aldéhyde à 6 atomes de carbone, l'hexanal, puis une ADH permettra la formation d'un alcool à 6 atomes de carbone, l'hexanol. (Figure 7). Il en va de même pour la formation des aldéhydes et alcools produits à partir des 9- et 13-hydroperoxydes d'acide linoléique.

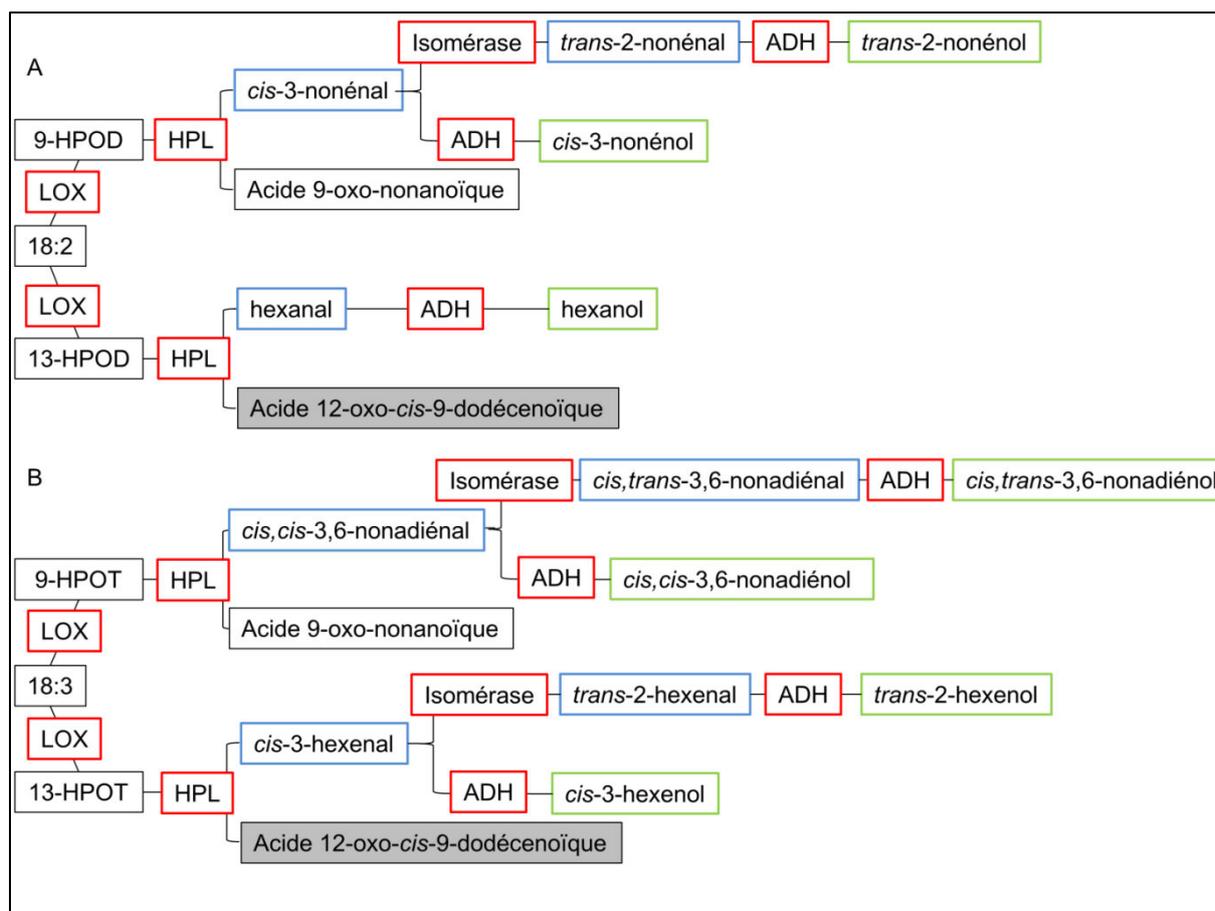


Figure 7 : Produits formés par la voie HPL au cours de la voie de la LOX

Sur ce schéma, les enzymes sont encadrées en rouge, les aldéhydes en bleu et les alcools en vert. En gris apparaît un précurseur de la traumatine. En A, voie de synthèse des aldéhydes et alcools produits à partir de l'acide linoléique (18:2). En B, voie de synthèse des aldéhydes et alcools produits à partir de l'acide linolénique (18:3). Abréviations : 18:2 : acide linoléique ; 18:3 : acide linolénique ; ADH : alcool déshydrogénase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; LOX : lipoxygénase ; 9-HPOD : acide 9-hydroperoxyoctadécadiénoïque ; 9-HPOT : acide 9-hydroperoxyoctadécatriénoïque ; 13-HPOD : acide 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque ; 13-HPOT : acide 13-hydroperoxyoctadécatriénoïque.

Le clivage des 13-hydroperoxydes d'acide gras permet également la libération de l'acide 12-oxo-*cis*-9-dodécénoïque, un précurseur de la traumatine et de l'acide traumatique, hormones végétales importantes produites lors de blessures (Zimmerman et Coudron, 1979).

ii. Structure et fonction des composés formés par la voie HPL

Les aldéhydes et alcools issus de l'action de l'HPL présentent une grande diversité puisqu'ils peuvent être obtenus aussi bien à partir d'acide linoléique que d'acide linolénique. Ce sont des composés volatils parmi lesquels se retrouvent des molécules participant à la « note verte », un ensemble d'odeurs retrouvées dans les

fruits et les légumes, mais aussi dans certains produits de consommation comme l'huile d'olive (Tableau II).

Tableau II : Exemples de produits de la voie de la LOX formant la note verte (d'après Gargouri et al., 2008)

	Molécule	Odeur associée
Aldéhydes	Hexanal	Odeur grasse, verte, fruitée
	<i>trans</i> -2-hexéanal	Feuille verte, fruitée
	<i>trans</i> -2-nonéanal	Citrus gras
	<i>trans,cis</i> -2,6-nonadiéanal	Légume vert, concombre
Alcools	Hexan-1-ol	Odeur verte, huileuse
	<i>trans</i> -2-hexéanol	Vert tranchant, fruité
	<i>trans</i> -2-nonéanol	Melon, cireux
	<i>trans,cis</i> -2,6-nonadiéanol	Vert herbacé, concombre amer

Outre leurs propriétés aromatisantes, il a été montré pour certains de ces composés des propriétés bactéricide sur des bactéries Gram + et Gram – (Nakamura et Hatanaka, 2002 ; Campeol *et al.*, 2003 ; Cho *et al.*, 2004), antivirale et antifongique (Croft *et al.*, 1993). Ces composés présentent donc un intérêt particulier pour les industries cosmétiques (la note verte est utilisée depuis de nombreuses années dans la synthèse de parfums) et pour les industries agroalimentaires. Les procédés de préparation des aliments peuvent engendrer une perte de leurs propriétés organoleptiques. L'utilisation de tels composés peut donc permettre, au-delà de la restitution de saveurs aux aliments, de limiter les pertes de stocks causées par la prolifération de bactéries et de champignons.

Les molécules formées par la voie de la LOX présentent une grande diversité tant dans leur structure que dans leurs fonctions. Elles ont un rôle capital dans les

processus physiologiques et pathologiques, mais peuvent aussi présenter un intérêt dans le domaine industriel.

III. Les lipoxygénases

Selon la nomenclature officielle, les lipoxygénases ou LOX font partie de la famille des oxydoréductases qui incorporent deux atomes d'oxygène (EC 1.13.11.12) sur un substrat.

1. Nomenclature des lipoxygénases

Plusieurs nomenclatures ont été proposées pour classer les LOX. La première a été proposée dans les années 1980 (Galliard et Chan, 1980), classant les lipoxygénases en fonction de leur pH optimum : les LOX de type 1 (LOX-1) ont un pH optimum alcalin, les LOX de type 2 (LOX-2) ont un pH optimum neutre. Une seconde classification proposée par Shibata *et al.* (1994) se base sur leur localisation intracellulaire : les LOX ne possédant pas de peptide d'adressage chloroplastique, et ayant un fort taux d'identité entre elles (supérieur à 75%) sont appelées LOX-1, les LOX possédant un peptide d'adressage chloroplastique sont appelées LOX-2. Ces dernières présentent un faible taux d'identité entre elles (inférieur à 35%).

Une dernière manière de classer les LOX se base sur leur spécificité réactionnelle dans la production d'acides gras oxydés. Les LOX végétales sont ainsi classées en fonction de la position du carbone de l'acide linoléique qui porte le groupement hydroperoxyde (Figure 8), l'oxygène pouvant être inséré sur le carbone 9 (9-LOX) ou sur le carbone 13 (13-LOX), conduisant ainsi à la formation de 9- ou de 13-hydroperoxydes d'acide linoléique (appelés acide 9-hydroperoxyoctadécadiénoïque ou acide 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque, respectivement 9-HPOD et 13-HPOD) (Liavonchanka et Feussner, 2006).

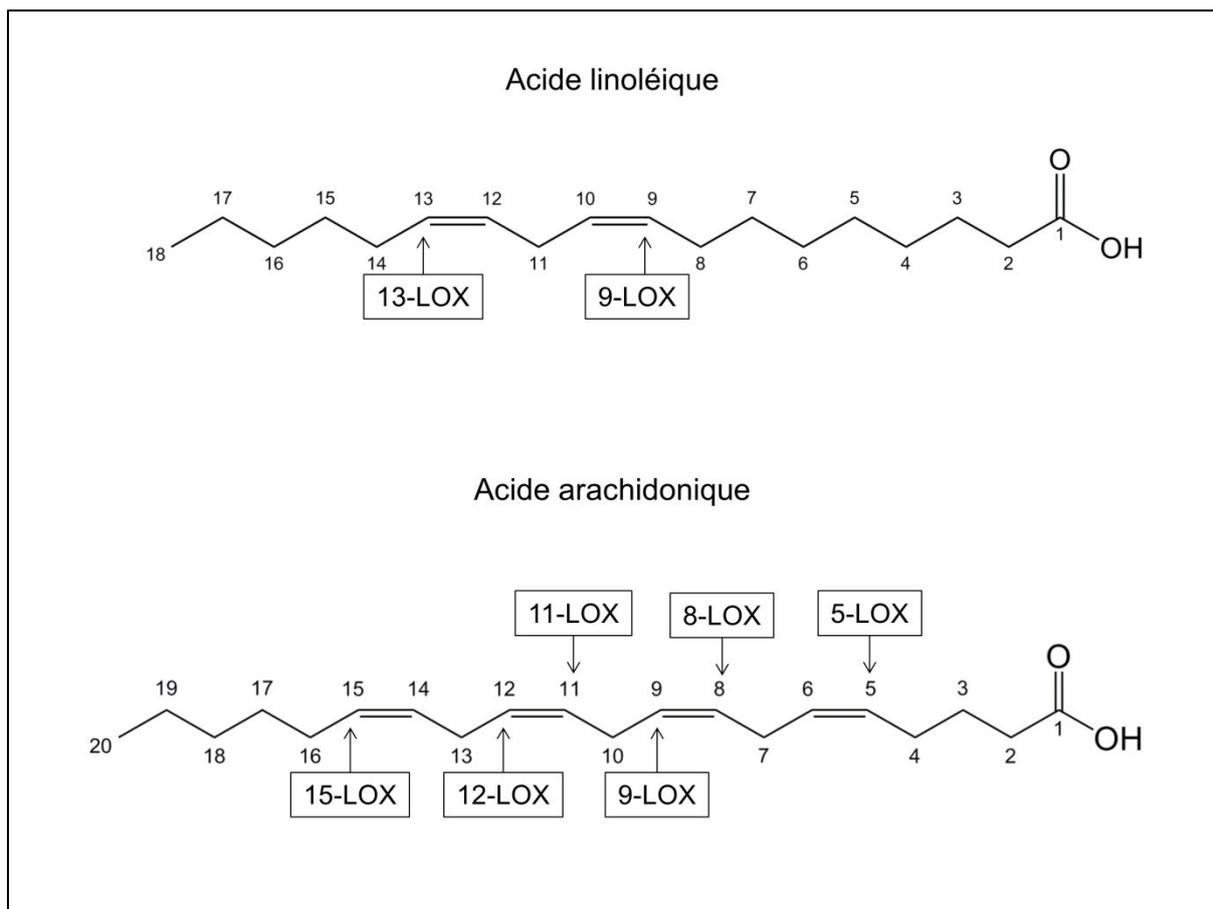


Figure 8 : Régiospécificité réactionnelle des lipoxygénases végétales et animales

L'acide linoléique et l'acide arachidonique sont représentés de manière schématique. Les flèches indiquent la position des carbones susceptibles d'être oxygénés par les lipoxygénases, ainsi que le nom donné aux lipoxygénases correspondantes.

En ce qui concerne les LOX animales, cette classification s'appuie de la même manière sur la position d'oxygénation préférentielle de l'acide arachidonique, qui peut être le carbone 5, 8, 9, 11, 12 ou 15, et donnant respectivement les 5-LOX, 8-LOX, 9-LOX, 11-LOX, 12-LOX et 15-LOX (Schneider *et al.*, 2007). Les hydroperoxydes ainsi formés seront appelés acide n-hydroperoxyeicosatétraénoïque, la valeur n correspondant à la spécificité de la LOX, c'est-à-dire 5, 8, 9, 11, 12 ou 15 (5-HPETE, 8-HPETE, 9-HPETE, 11-HPETE, 12-HPETE ou 15-HPETE).

Outre cette régiospécificité, la nomenclature fait parfois apparaître la notion de stéréospécificité dans le nom donné aux LOX (Brash, 1999) : les lipoxygénases formant des 9-hydroperoxydes de configuration *S* sont appelées 9*S*-LOX, celles formant des 13-hydroperoxydes de configuration *R* sont appelées 13*R*-LOX. Il en va de même pour les LOX animales agissant sur l'acide arachidonique.

Une difficulté demeure néanmoins concernant les LOX affichant une double régiospécificité, c'est-à-dire produisant à la fois des 9-hydroperoxydes et des 13-hydroperoxydes. La dernière nomenclature proposée (Hughes *et al.*, 2001c), et actuellement la plus utilisée, permet de pallier ce problème : si le rapport 13-hydroperoxyde:9-hydroperoxyde est supérieur à 10:1 ou inférieur à 1:10, les lipoxygénases sont appelées 13-LOX ou 9-LOX, respectivement. Si ce rapport est compris entre 10:1 et 1:1 ou entre 1:1 et 1:10, elles sont appelées respectivement 13/9-LOX ou 9/13-LOX, le premier chiffre rendant compte du produit majoritairement formé.

2. Diversité et localisation des lipoxygénases

a. Diversité

Les lipoxygénases ont été mises en évidence tout d'abord chez des espèces végétales et animales, ce sont les plus étudiées (Siedow, 1991 ; Brash, 1999). Par la suite, elles ont été identifiées chez plusieurs espèces de bactéries (Vance *et al.*, 2004 ; Vidal-Mas *et al.*, 2005 ; Hansen *et al.*, 2013) et chez les champignons (Plagemann *et al.*, 2013).

Chez les plantes, 13 isoformes de LOX ont été identifiées pour le soja. Le génome du riz contient plus de 20 gènes codant pour des LOX (Ivanov *et al.*, 2010). Chez l'olive, une 13-LOX a été purifiée à partir de la variété Leccino et caractérisée (Lorenzi *et al.*, 2006), et une 9/13-LOX, *Oep1LOX1*, a été clonée à partir de la variété Leccino et caractérisée (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). Deux 13-LOX appelées *Oep1LOX2* et *Oep2LOX2* (Padilla *et al.*, 2009) et une 9-LOX appelée *Oep2LOX1* (Padilla *et al.*, 2012) ont également été clonées et caractérisées à partir de la variété Picual.

Chez les animaux, plusieurs isoformes ont été identifiées : la souris possède 7 gènes codant pour des LOX et l'homme en possède 6 (Ivanov *et al.*, 2010).

Ces isoformes sont exprimées à des stades divers du développement, ou dans des conditions pathologiques. Elles ne présentent pas les mêmes spécificités vis-à-vis d'un substrat et ne sont pas actives dans les mêmes conditions réactionnelles au sein d'une même espèce.

b. Localisation des lipoxygénases chez les végétaux

Les LOX ont été identifiées dans un grand nombre de tissus et d'organes végétaux : les feuilles (Baracat-Pereira *et al.*, 2001), les fruits (Pérez *et al.*, 1999 ; Salas *et al.*, 1999), la tige, les racines, les tubercules, les cotylédons (Fornaroli *et al.*, 1999), les graines (Hughes *et al.*, 2001a). Au niveau cellulaire, elles sont retrouvées en général dans la fraction soluble ou cytoplasmique (Feussner et Wasternack, 2002). Elles peuvent être retrouvées également dans certains compartiments cellulaires, tels que la membrane des chloroplastes (Pérez-Gilabert *et al.*, 2001 ; Farmaki *et al.*, 2007) ou le stroma (Farmaki *et al.*, 2007), ou encore liées aux mitochondries (Husson *et al.*, 1998) ou aux oléosomes (Feussner et Kühn, 1995).

3. Structure des lipoxygénases

Les lipoxygénases sont des dioxygénases contenant un atome de fer non hémique (Brash, 1999). Ce sont des monomères formés en moyenne de 900 résidus d'acides aminés, pour une masse moléculaire de 94 à 104 kDa chez les plantes. Leur séquence est plus courte chez les animaux d'environ 150 à 200 résidus, pour une masse moléculaire de 75 à 80 kDa (Prigge *et al.*, 1997 ; Brash, 1999). La lipoxygénase 1 de soja (n° PDB : 1YGE) est la plus étudiée. Sa structure a servi de base à l'établissement d'une structure type commune à la famille des lipoxygénases (Figure 9).

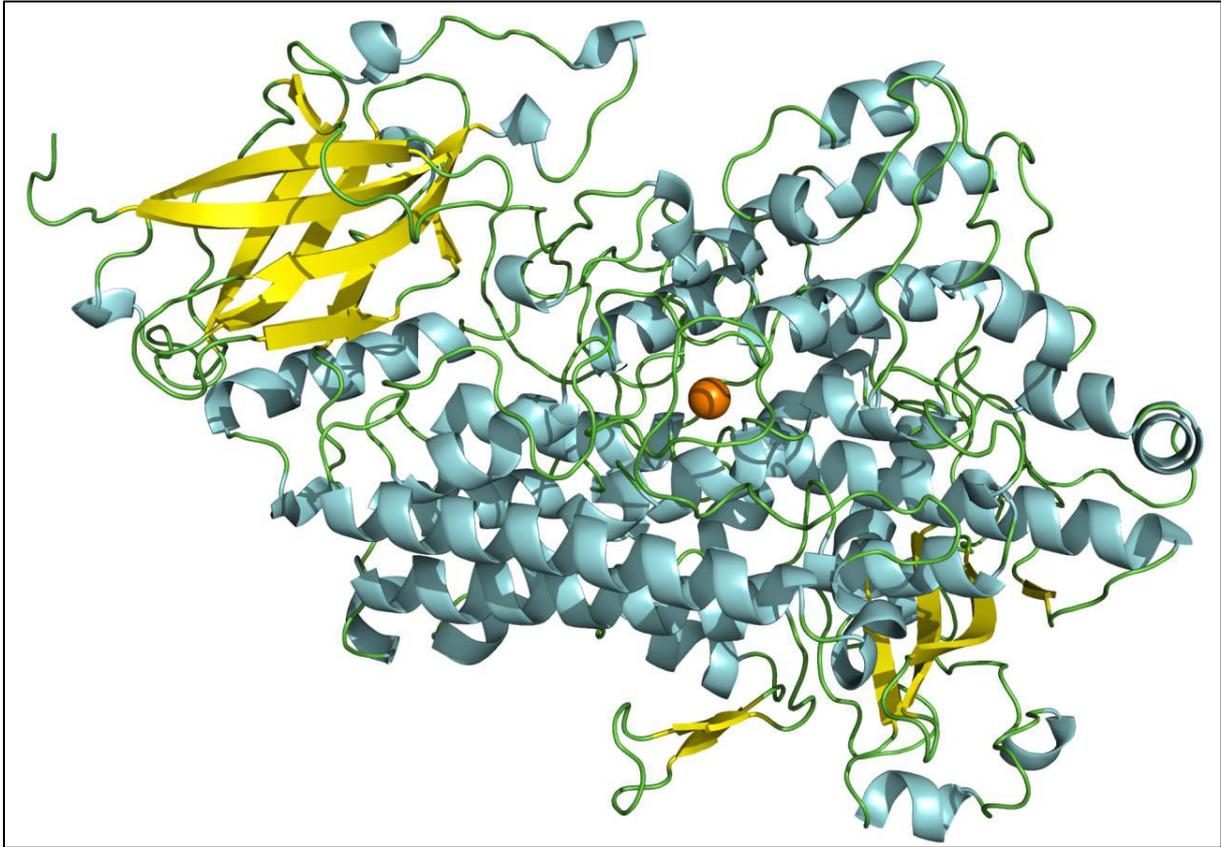


Figure 9 : Structure générale des lipoxygénases : exemple de la LOX1 de soja

Sur cette représentation de la structure de la LOX1 de soja (PDB : 1YGE), le domaine N-terminal est orienté dans le quadrant supérieur gauche : il comporte la structure en tonneau β formée par les deux couches de feuillets β antiparallèles représentés par les flèches jaunes. Le domaine C-terminal correspond au reste de la structure, majoritairement représentée par les hélices colorées en cyan. L'atome de fer catalytique (coloré en orange) se situe au cœur du domaine C-terminal.

Bien que les lipoxygénases animales et végétales présentent peu de similarités dans leurs séquences en acides aminés, leurs structures sont assez semblables, organisées en deux domaines distincts : un domaine N-terminal composé essentiellement de feuillets β organisés en tonneau β , et un domaine C-terminal composé essentiellement d'hélices α (Annexe, Figure B). Ce domaine contient l'atome de fer catalytique (Boyington *et al.*, 1993). Les deux domaines sont reliés par une boucle peptidique.

a. Domaine N-terminal

Il est formé de deux couches de quatre feuillets β antiparallèles, composé en majorité de résidus hydrophobes et aromatiques (Boyington *et al.*, 1993). Sa structure en « tonneau β » est similaire au domaine C-terminal des lipases hépatiques et pancréatiques animales (Figure 10), ce qui laisse suggérer un rôle

dans l'interaction avec les membranes (Brash, 1999). Ce domaine est appelé PLAT (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin) ou LH2 (Lipoxygenase Homology).

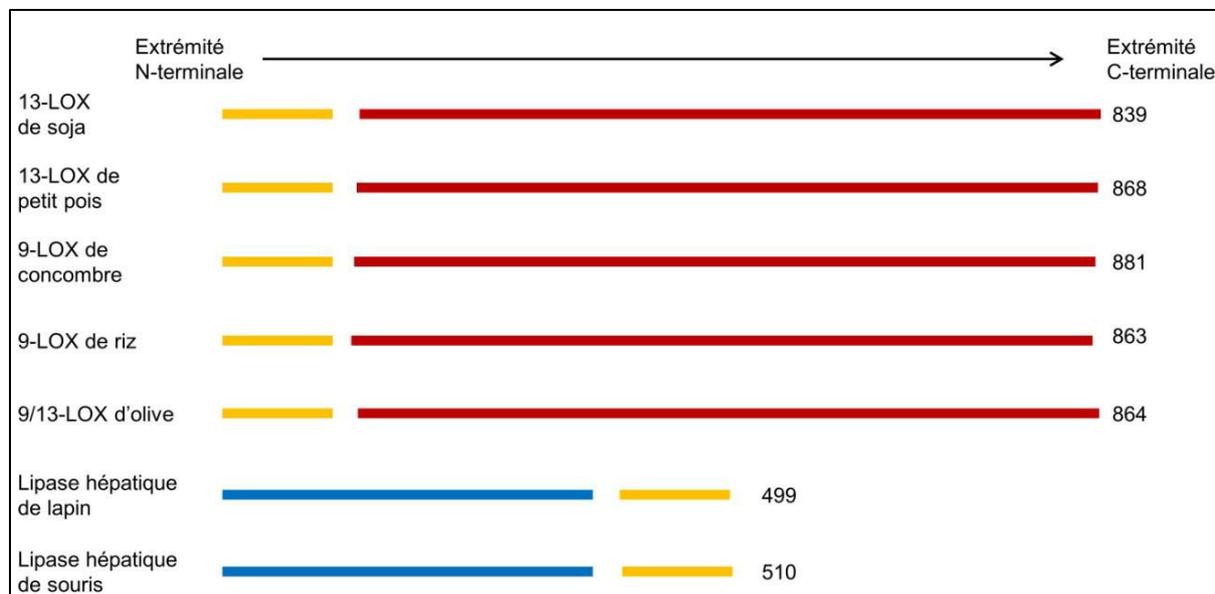


Figure 10 : Conservation du domaine PLAT chez les LOX et les lipases

■ : domaine PLAT conservé chez les LOX et les lipases ; ■ : domaine spécifique des LOX ; ■ : domaine spécifique des lipases

Il ne semble pas impliqué dans le mécanisme réactionnel, mais sa modification ou sa suppression entraîne une inactivation de l'enzyme et un défaut de translocation à la membrane nucléaire chez les 5-LOX (Chen et Funk, 2001), et un défaut de translocation aux membranes chez une isoforme de LOX de concombre (May *et al.*, 2000). Une isoforme de LOX dépourvue de manière constitutive de domaine N-terminal a été clonée chez une cyanobactérie (Andreou *et al.*, 2010). Cette « mini-LOX » d'une masse moléculaire d'environ 65 kDa possède un domaine catalytique C-terminal mais le domaine N-terminal possédant le tonneau β est absent. Cette enzyme est quand même active et forme des hydroperoxydes de configuration 9*R* et 13*S* à partir de l'acide linoléique. Elle est également capable d'agir sur des substrats estérifiés.

b. Domaine C-terminal

De taille plus importante, il est constitué d'un ensemble de 23 hélices chez la LOX1 de soja ainsi que deux feuillets β antiparallèles (Minor *et al.*, 1996 ; Prigge *et*

al., 1997). Les hélices présentes dans ce domaine sont de type 3_{10} , α et π . L'hélice 9, qui est la plus longue, est formée de 43 résidus (Figure 11).

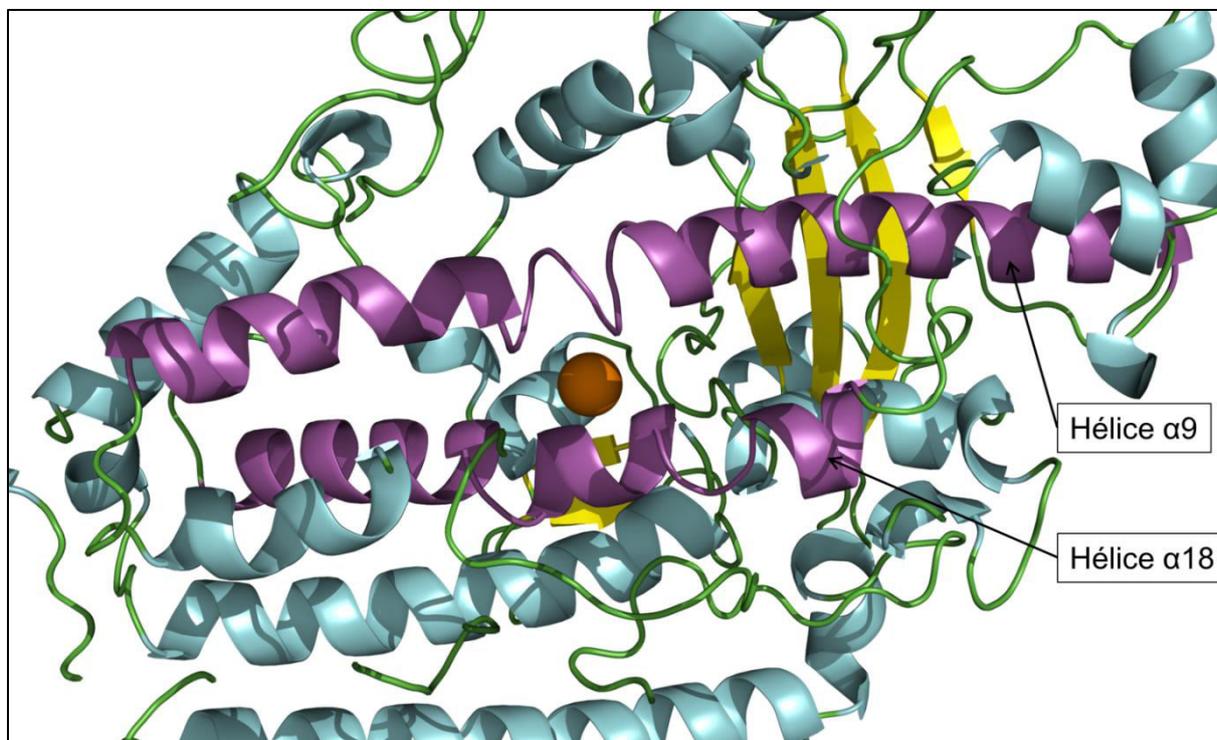


Figure 11 : Domaine C-terminal de la LOX1 de soja, et zoom sur les hélices centrales

Les feuillets β sont indiqués par des flèches jaunes, les hélices α apparaissent en cyan. Les hélices $\alpha 9$ et $\alpha 18$ sont colorées en violet. Sur cet agrandissement de la partie centrale du domaine C-terminal sont représentées l'hélice $\alpha 9$ et l'hélice $\alpha 18$ qui sont presque parallèles et entourent l'atome de fer catalytique.

L'hélice $\alpha 9$ se situe au centre du domaine C-terminal, et est constituée de segments π internes permettant aux chaînes latérales de résidus histidine d'être à proximité de l'atome de fer, de même que l'hélice $\alpha 18$ constituée d'une trentaine de résidus, qui est la seconde hélice la plus longue. Deux feuillets β se situent de part et d'autre de l'ensemble des hélices, à la surface de la protéine. Le site actif se trouve au milieu de cet ensemble d'hélices : il est décrit comme un assemblage de deux cavités, proches de l'atome de fer catalytique (Boyington *et al.*, 1993 ; Minor *et al.*, 1996).

i. Atome de fer

Les lipoxgénases possèdent en général un atome de fer non hémunique. Cet atome de fer existe sous les formes ferreuse et ferrique, et seule la forme ferrique

permet à la réaction enzymatique de se produire (de Groot *et al.*, 1975). Une lipoxygénase contenant un atome de manganèse à la place de l'atome de fer a également été clonée à partir d'un champignon et caractérisée (Su et Oliw, 1998).

Les premières indications concernant la sphère de coordination de l'atome de fer ont été obtenues pour la lipoxygénase 1 de soja (Steczko et Axelrod, 1992 ; Steczko *et al.*, 1992 ; Boyington *et al.*, 1993 ; Minor *et al.*, 1993). Dans la structure obtenue par Boyington *et al.* (1993), trois atomes d'azote appartenant aux cycles des résidus histidines H499, H504 (portés par l'hélice 9) et H690 (porté par l'hélice 18), et un atome d'oxygène appartenant à l'extrémité C-terminale du résidu isoleucine I839 forment un octaèdre très déformé. Les deux positions libres, adjacentes, font face à une cavité reliée à la surface de l'enzyme. Toutes les séquences en acides aminés de lipoxygénases animales et végétales montrent une conservation de ces trois histidines, et seule une séquence diffère par son extrémité C-terminale (5-lipoxygénase de cellules leucémiques de rat), dans laquelle l'isoleucine est remplacée par une valine, toute autre mutation testée rendant les enzymes inactives (Chen *et al.*, 1994 ; Minor *et al.*, 1996). Minor *et al.* (1996) ont par la suite identifié deux nouveaux ligands pour compléter la sphère de coordination de l'atome de fer : une molécule d'eau, et l'atome d'oxygène de la chaîne latérale d'un résidu d'asparagine N694, ce dernier étant relativement éloigné et interagissant de manière faible avec l'atome de fer (Figure 12).

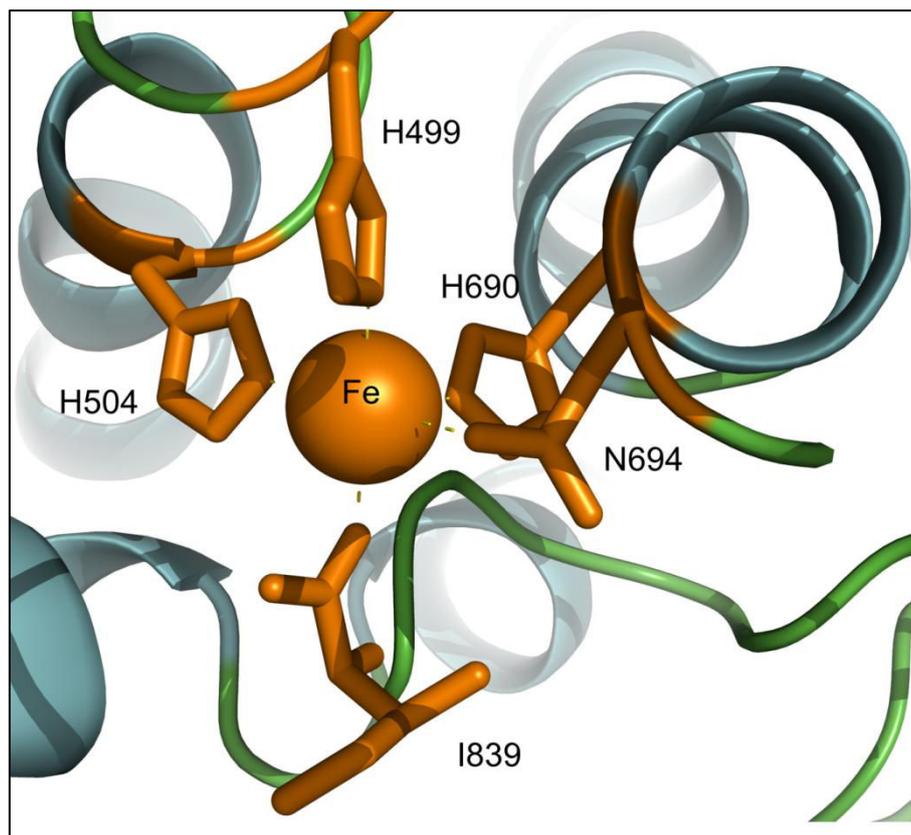


Figure 12 : Coordination de l'atome de fer catalytique de la LOX1 de soja

Représentation de la sphère de coordination de l'atome de fer catalytique de la LOX1 de soja (PDB : 1YGE). Les résidus présents à chaque sommet du tétraèdre sont représentés en orange, l'atome de fer catalytique est représenté par une sphère. Les hélices sont représentées en cyan, les boucles en vert. Les pointillés jaunes montrent les atomes de chaque résidu impliqués dans cette sphère de coordination.

D'autres études *in silico* ont montré que le résidu N694 est un ligand fort de la forme réduite (et donc inactive) de l'atome de fer, alors que la liaison est beaucoup plus faible lorsque l'atome de fer est oxydé (Lehnert et Solomon, 2003). L'implication d'une seconde sphère de coordination dans le mécanisme catalytique a également été étudiée : cette seconde sphère, agissant principalement par un réseau de liaisons hydrogène, autorise une certaine flexibilité au résidu N694, essentielle pour la catalyse (Schenk *et al.*, 2003).

ii. Site catalytique

A l'heure actuelle, il n'y a pas de structure de LOX cristallisée avec un substrat. La LOX3 de soja a été cristallisée avec un produit de la réaction, le 13S-hydroperoxyde d'acide linoléique (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 2001). Plusieurs

structures ont été obtenues avec des inhibiteurs compétitifs présents dans leur site actif. Toutes ces structures positionnent le site actif au sein du domaine C-terminal.

Deux cavités ont été décrites (Boyington *et al.*, 1993). La première, notée cavité I, permettrait le passage de l'oxygène jusqu'au site actif. En effet, l'oxygène ne se fixe pas à la LOX, mais réagit rapidement avec le substrat fixé (Prigge *et al.*, 1997). Minor *et al.* (1996) sont en désaccord avec Boyington sur ce canal formé par la cavité I. Dans leur étude, ils montrent que deux autres voies pourraient faciliter l'accès de l'oxygène au site catalytique. Des études plus récentes réalisées sur la LOX1 de soja (Knapp et Klinman, 2003) puis sur une 12/15-LOX de lapin (Saam *et al.*, 2007) ont montré qu'il existe des canaux pouvant amener l'oxygène au site catalytique, pouvant être formés de manière transitoire par des mouvements dynamiques de chaînes latérales des résidus d'acides aminés. Ces études ont été menées sur des LOX animales. Ces différentes voies d'accès mènent toutes à la seconde cavité, notée cavité II, qui est la plus importante. La cavité II contient le site catalytique dans lequel se trouve le substrat (Figure 13).

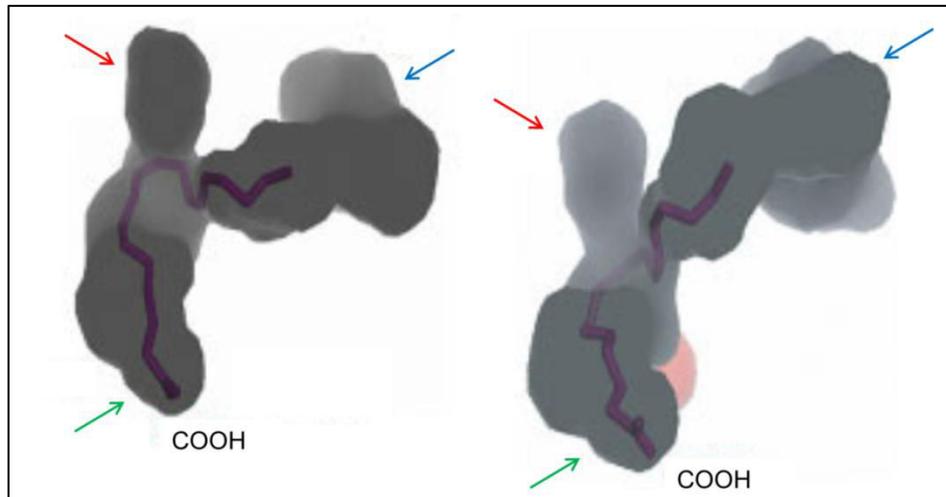


Figure 13 : Forme de la cavité IIa déterminée pour la LOX1 de soja (d'après Youn *et al.*, 2006)

Sur cette figure est représentée la cavité IIa de la LOX1 de soja. L'acide gras est représenté en violet. Les flèches rouges représentent la cavité pouvant accueillir l'oxygène, en contact avec la cavité I. La cavité IIb est représentée par les flèches bleues, l'entrée du site étant pointée par les flèches vertes. L'extrémité méthyle est orientée vers le fond du site, et l'extrémité carboxylate est représentée à l'entrée du site actif. Sur la vue de droite, l'atome de fer apparaît comme une sphère orange. Cette vue est une rotation d'environ 45° par rapport à l'axe horizontal de la vue de gauche.

La cavité II fait face à la position occupée par l'ion hydroxyde dans la sphère de coordination du fer. Elle peut être divisée en deux sous-cavités, notées IIa et IIb (Boyington *et al.*, 1993 ; Minor *et al.*, 1996). Elle forme plusieurs coudes et est globalement constituée de résidus hydrophobes. Le substrat se trouve généralement dans la sous-cavité IIa, même s'il est admis qu'il pourrait pénétrer plus profondément dans le site actif, jusqu'à la sous-cavité IIb. Cependant, le confinement de cette poche pourrait rendre les mouvements du substrat et le déplacement des molécules d'eau présentes difficiles (Minor *et al.*, 1996 ; Ivanov *et al.*, 2010). Des variations existent entre les différentes isoformes de LOX, mais le site actif dans la cavité II est toujours accessible depuis la surface de l'enzyme (Figure 14).

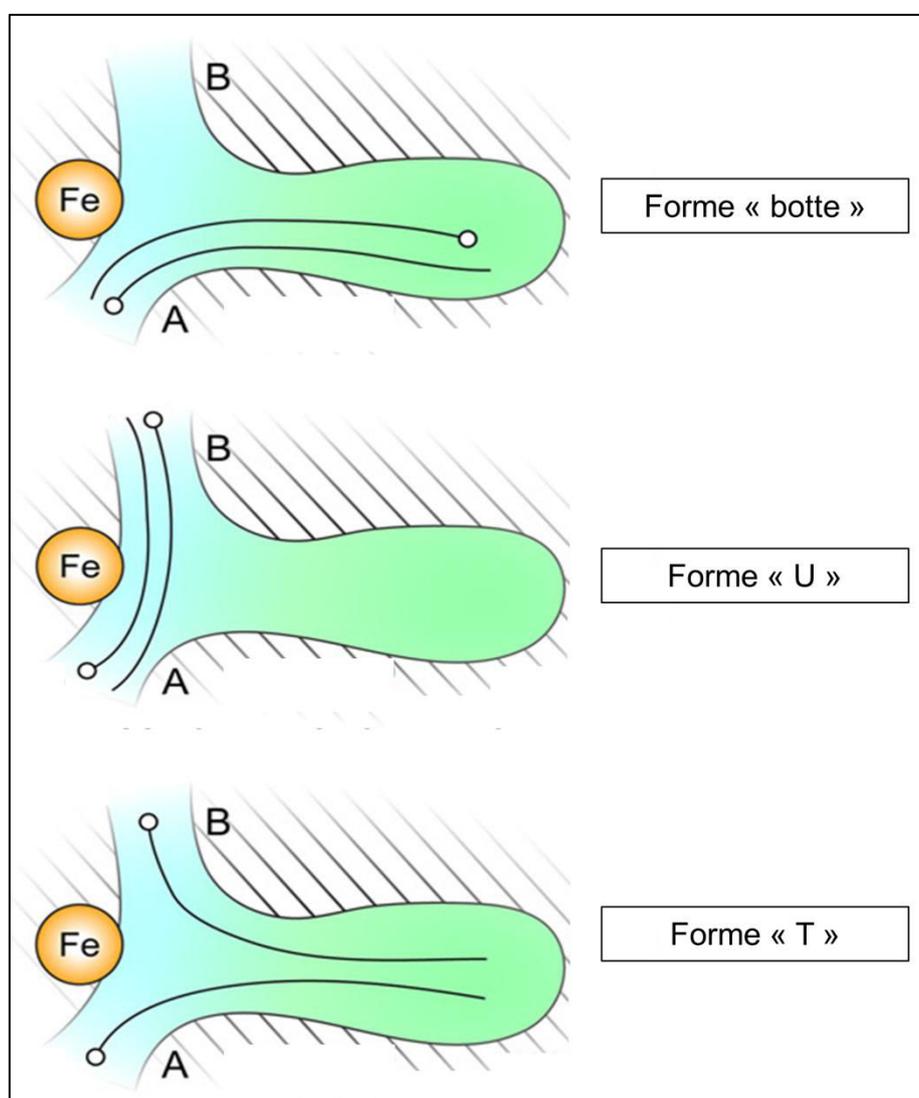


Figure 14 : Formes possibles du site actif présent dans la cavité II des LOX (d'après Eek *et al.*, 2012)

L'atome de fer est représenté en orange, le substrat en trait plein, le cercle blanc représentant l'extrémité carboxylate.

Plusieurs formes de cavités ont été décrites : la forme de botte, la forme « T », ou la forme « U » (Eek *et al.*, 2012), chacune permettant l'entrée ou l'orientation du substrat dans le site actif de manière différente. Dans la forme « botte », une seule entrée est possible pour le substrat qui peut s'orienter dans la cavité soit par son extrémité méthyle au fond du site, soit par son extrémité carboxylate. C'est le type de site actif le plus communément décrit. La forme « U » possède deux entrées (notée A et B), elle a été décrite pour une 8*R*-LOX de corail de l'espèce *Plexaura homomalla* (Neau *et al.*, 2009). Enfin, un autre de type de site actif peut être envisagé, l'extrémité méthyle toujours orientée vers le fond du site et l'entrée se faisant soit par le côté A, soit par le côté B, dans cette forme appelée forme « T » (Eek *et al.*, 2012).

4. Mécanisme catalytique des lipoxygénases

Les différentes étapes conduisant à la production d'hydroperoxydes à partir d'acides gras polyinsaturés portant un système (1*Z*,4*Z*)-pentadiénique par l'intermédiaire des lipoxygénases sont maintenant relativement bien identifiées. En revanche, les mécanismes qui peuvent expliquer les différences de régiospécificité et stéréospécificité entre les différentes lipoxygénases demeurent à ce jour mal connus.

a. Principe de la réaction

La réaction d'hydroperoxydation se déroule en quatre étapes (Figure 15).

La première étape consiste en l'abstraction stéréospécifique d'un atome d'hydrogène à partir du centre méthylénique du système pentadiénique. Cette étape limitante, chez la LOX1 de soja, correspond à un transfert couplé d'électron et de proton (Lehnert et Solomon, 2003). L'atome de fer sous forme oxydée Fe³⁺ est lié à l'ion hydroxyde HO⁻ qui occupe la 6^e place de la sphère de coordination. Dans le même temps, un électron est arraché au substrat par un phénomène de « tunneling » et est dirigé jusqu'à l'atome de fer, ainsi réduit, et le proton est déplacé du substrat à l'ion hydroxyde pour former une molécule d'H₂O. Chez les LOX végétales, seul le carbone 11 prochiral de l'acide linoléique et de l'acide linoléique est attaqué (Grechkin, 1998). Le radical intermédiaire formé par l'abstraction de l'hydrogène sur le carbone central est décrit comme un radical pentadiényl sur lequel la densité électronique serait répartie sur l'ensemble des cinq carbones.

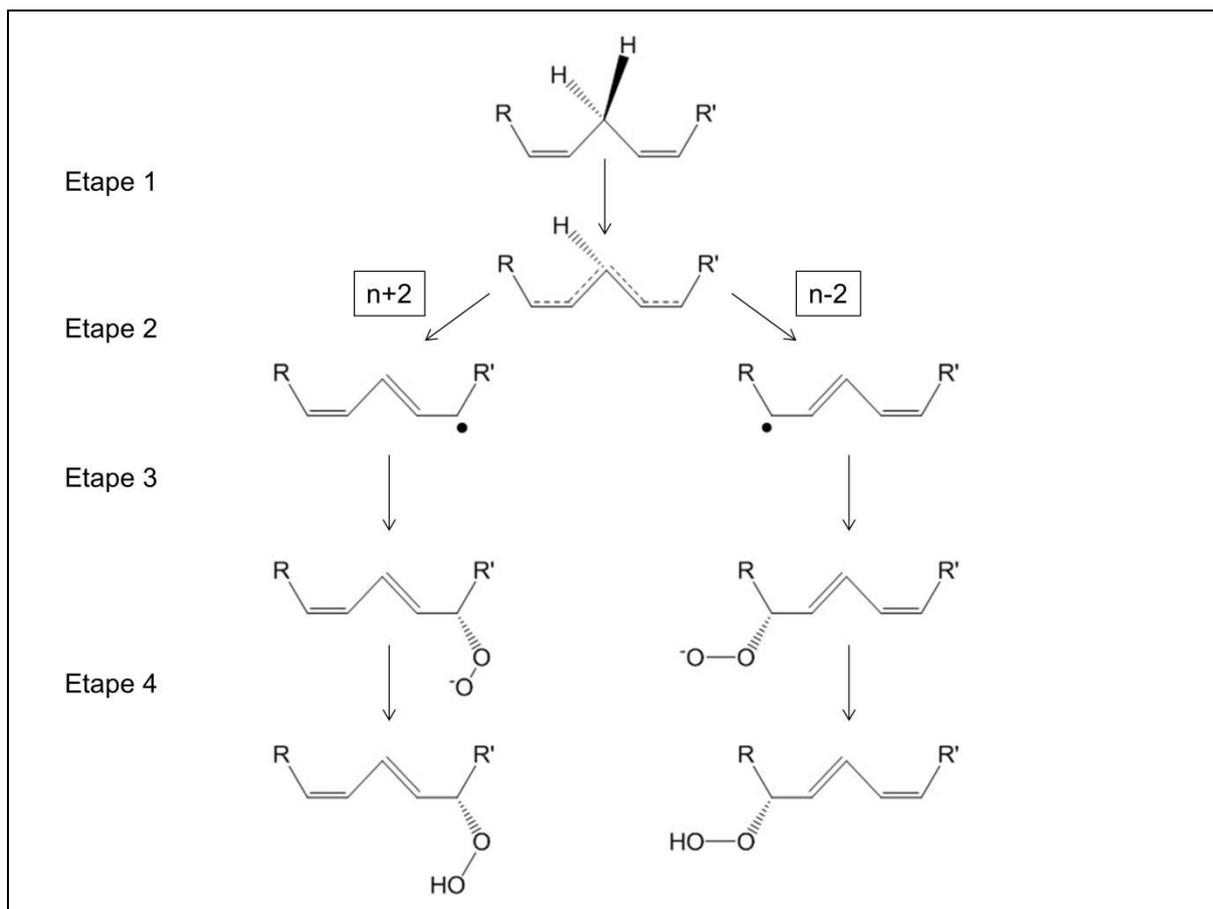


Figure 15 : Schéma du mécanisme réactionnel de la lipoxygénase

R et R' représentent les extrémités carboxylate et méthyle, respectivement, de la chaîne carbonée. Lors de l'étape 1, l'hydrogène est arraché du carbone méthylénique prochiral du système pentadiénique, induisant une délocalisation électronique sur les cinq carbones du système. A l'étape 2, un réarrangement du radical se produit en $n+2$ (partie gauche) ou en $n-2$ (partie droite). L'insertion antarafaciale de l'oxygène se produit à l'étape 3 pour former un radical peroxy, réduit par un électron provenant de l'atome de fer. Au cours de l'étape 4, l'anion formé est protoné pour former la fonction hydroperoxyde.

Lors de la seconde étape, un réarrangement électronique se produit sur le système pentadiénique : l'électron du radical est délocalisé vers l'extrémité méthyle ou vers l'extrémité carboxylate de l'acide gras, il y a donc un réarrangement en $n+2$ ou $n-2$, respectivement. Les deux doubles liaisons se conjuguent, le système conjugué étant sous la forme *cis,trans*.

Plusieurs mécanismes peuvent induire ce réarrangement, définissant ainsi le site accepteur de l'oxygène moléculaire à l'étape suivante : une localisation de l'électron sur l'un des carbones à l'extrémité du système pentadiénique provoquée par des résidus d'acides aminés particuliers, une distorsion du radical pentadiényle qui n'est plus orienté dans un plan, un adressage de l'oxygène sur un carbone particulier

par l'intermédiaire de résidus d'acides aminés particulier (canal spécifique de l'oxygène), ou une oxygénation réversible aléatoire, suivie d'une réduction du radical peroxy stéréosélective (Ivanov *et al.*, 2010)

L'insertion de l'oxygène sur le radical intervient à la troisième étape. Elle se fait de manière antarafaciale par rapport à l'hydrogène arraché à la première étape. Chez la LOX à atome de manganèse, cette insertion a lieu de manière suprafaciale (Hamberg *et al.*, 1998). L'oxygène inséré forme un radical peroxy.

Au cours de la quatrième étape, le radical peroxy est réduit par un électron provenant de l'atome de fer sous forme ferreuse. Le fer est de cette manière ré-oxdé, et l'anion formé est finalement protoné pour former la fonction hydroperoxyde (Ivanov *et al.*, 2010).

La régiospécificité et la stéréospécificité de ces étapes sont des évènements clés pour la suite de la cascade enzymatique. L'ajout de la fonction hydroperoxyde en position n+2 ou n-2 par rapport au carbone méthylénique, mène à la formation de 9-hydroperoxydes d'acide gras ou de 13-hydroperoxydes d'acide gras. Plusieurs déterminants ont été proposés pour expliquer le haut degré de spécificité réactionnelle des LOX, mais il n'y a pas à l'heure actuelle de concept universel permettant d'expliquer le contrôle de cette spécificité.

b. Régiospécificité des lipoxgénases

Le mécanisme catalytique des LOX relativement bien identifié repose sur un contrôle de la régiospécificité et de la stéréospécificité. Mais quels sont les mécanismes qui régissent ce contrôle ? Plusieurs déterminants ont été caractérisés, qui permettent d'expliquer pour certaines LOX une régiospécificité et une stéréospécificité particulière. Mais ces déterminants ne s'appliquent pas à toutes les isoformes.

i. *Déterminants de Sloane*

Une première étude a permis d'identifier des résidus jouant un rôle important dans la régiospécificité (Sloane *et al.*, 1991). Chez les 15-LOX humaine et de lapin, c'est le couple isoleucine/méthionine en position 417/418 et 418/419, respectivement, qui serait responsable du positionnement du substrat dans le site actif. Une modification de ces résidus par ceux retrouvés chez des 12-LOX permet de modifier la régiospécificité : les 15-LOX mutées produisent à la fois des 12- et des

15-hydroperoxydes. Les résidus occupant ces positions semblent donc jouer un rôle majeur dans la régiospécificité des LOX.

ii. *Déterminant de Borngräber*

Un second déterminant de la régiospécificité des 15-LOX de mammifères a été identifié chez une 15-LOX de lapin (Borngräber *et al.*, 1996) : il s'agit de la phénylalanine 353, qui pourrait gêner un arrangement du substrat pour une oxygénation du carbone 12. L'oxygénation du carbone 12 ou du carbone 15 résulterait de l'encombrement du fond du site actif, défini par le résidu F353 et le couple I418/M419. Chez la LOX-1 de soja, la position correspondante à F353 est occupée par une sérine, et le motif T/F est présent à la place du motif I/M. La présence de la phénylalanine encombrante pourrait expliquer une oxygénation sur le carbone 13, sans rôle majeur de la chaîne latérale courte du résidu sérine.

iii. *Déterminants de Jisaka*

Jisaka *et al.* (2000) ont également identifié deux déterminants responsables de la régiospécificité chez deux LOX animales : le couple tyrosine/histidine aux positions 603/604 chez la 8S-LOX de souris serait responsable de la régiospécificité de cette enzyme, puisque leur remplacement par le couple correspondant chez la 15S-LOX-2 humaine, acide aspartique/valine 602/603, permet la modification de la spécificité de 8S à 90% de 15S hydroperoxydes. Dans cette paire de résidus, la tyrosine 603 semble augmenter la spécificité de formation des produits 8S déjà favorisée par l'histidine 604.

iv. *Modèle de l'orientation dépendance*

La régiospécificité des LOX serait dépendante de la manière dont le substrat pénètre dans le site actif, c'est-à-dire par son extrémité carboxylate ou méthyle (Hornung *et al.*, 1999). Le site actif est en grande partie hydrophobe, ce qui aurait tendance à défavoriser l'entrée du substrat par son extrémité carboxylate. Chez la 13-LOX de concombre (Hornung *et al.*, 1999), un résidu histidine à la position 608 correspond au résidu M418 décrit par Sloane *et al.* (1991). La modélisation de la structure de la LOX de concombre par homologie avec la structure de la LOX1 de soja a montré que ce résidu masque l'arginine 758 présente au fond du site (Figure 16).

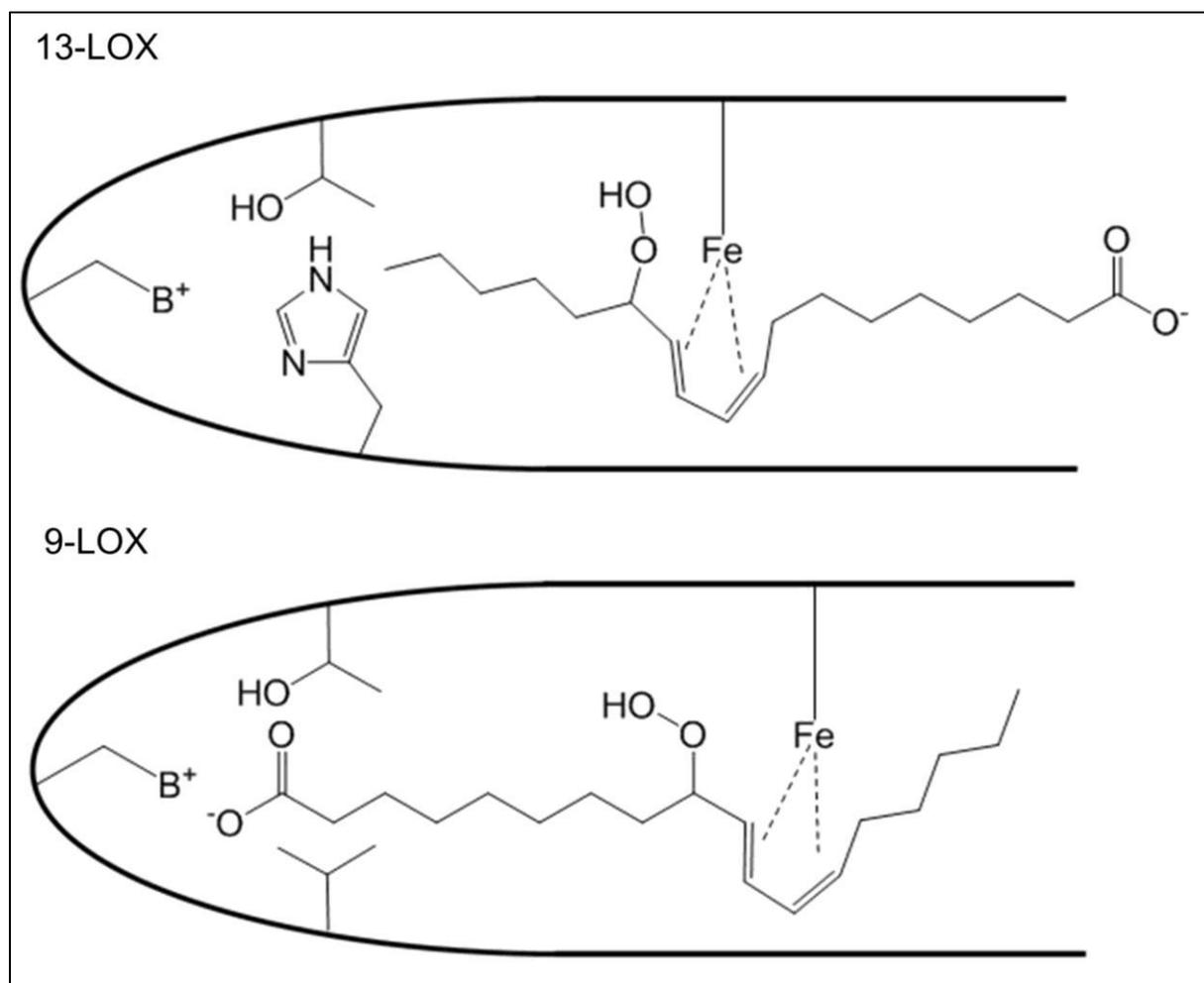


Figure 16 : Modèle de l'orientation dépendance (d'après Hornung *et al.*, 1999)

En haut, l'oxygénation sur le carbone 13 de l'acide linoléique se déroulerait lorsque le substrat entre dans le site actif par son extrémité méthyle, favorisant ainsi un réarrangement électronique en $n+2$. En bas, l'entrée par l'extrémité carboxylate favoriserait un réarrangement électronique en $n-2$ et une oxygénation sur le carbone 9. La charge positive du fond du site conservée chez les LOX serait donc masquée dans le cas des 13-LOX par un résidu encombrant. Un résidu moins encombrant retrouvé en majorité chez les 9-LOX permettrait une interaction ionique entre la charge positive du fond du site et l'extrémité carboxylate.

La mutation du résidu histidine par un résidu plus petit, une valine, permet la modification de la régiospécificité de la 13-LOX de concombre, la transformant en 9-LOX. L'hypothèse avancée est une modification de l'orientation du substrat dans le site actif : l'arginine, porteuse d'une charge positive au fond du site actif, et conservée chez les LOX végétales, pourrait favoriser l'entrée du substrat par son extrémité carboxylate si elle n'est pas masquée par un résidu encombrant.

Chez les 13-LOX sont présents préférentiellement les couples thréonine/histidine, thréonine/phénylalanine, sérine/phénylalanine ou cystéine/phénylalanine (respectivement T/H, T/F, S/F ou C/F), alors que la plupart

des 9-LOX présentent le couple thréonine/valine (T/V) (Tableau III). Ces résidus correspondent aux déterminants de Sloane chez les LOX végétales. Les 13-LOX présentent en général des résidus encombrants au fond de leurs sites respectifs, en faveur d'une orientation « méthyle » au fond du site, et les 9-LOX présentent des résidus plus petits au fond du site, en faveur d'une orientation « carboxylate » au fond du site.

Tableau III : Déterminants de la régiospécificité (d'après Hornung *et al.*, 1999)

Spécificité	Enzyme, espèce végétale	N° d'accès	Position	Résidus
13-LOX	LOX, concombre	X92890	607/608	T/H
	LOX-1, soja	P08170	556/557	T/F
	LOX-H1, pomme de terre	X96405	614/615	S/F
	LOX-2, <i>Arabidopsis</i>	P38418	611/612	C/F
9-LOX	LOX, pomme de terre	P37831	579/580	T/V
	LOX, tabac	X84040	580/581	T/V
	LOX-A, orge	L35931	574/575	T/V

Les 13-LOX possèdent en général un résidu encombrant (histidine ou phénylalanine) à la position correspondante à la méthionine 419 identifiée par Sloane (1991). Les 9-LOX en revanche possèdent des résidus moins encombrants.

Dans la structure de la LOX3 de soja cristallisée par Skrzypczak-Jankun *et al.* (2001), un 13S-hydroperoxyde de l'acide linoléique est présent dans le site actif avec son extrémité carboxylate orientée vers le fond du site, à proximité de l'arginine 726 (n° PDB : 1IK3). Cette structure semble appuyer la possibilité d'une orientation du carboxylate vers le fond du site. Cependant, cette 13-LOX possède un motif TF, le résidu phénylalanine encombrant pouvant donc masquer le résidu R726. Les déterminants identifiés dans la séquence en acides aminés semblent indiquer que l'oxygénation catalysée par cette LOX est favorisée sur le carbone 13, bien que l'orientation de l'extrémité carboxylate au fond du site favorise une oxygénation sur le carbone 9 d'après les travaux d'Hornung. Le modèle de l'orientation-dépendance

semble donc ne pas pouvoir être appliqué à l'ensemble des LOX, d'autres mécanismes pouvant contrôler la régiospécificité des LOX.

v. Modèle de l'espace de liaison

Il est supposé dans ce modèle que le substrat pénètre toujours dans le site actif par son extrémité méthyle hydrophobe. L'encombrement stérique des résidus d'acides aminés présents au fond du site actif vont limiter sa pénétration et donc modifier l'alignement du système pentadiénique par rapport à l'atome de fer catalytique. Cette hypothèse a été émise par Bryant *et al.* (1982), puis développée par plusieurs études (Gillmor *et al.*, 1997 ; Borngräber *et al.*, 1999 ; Hughes *et al.*, 2001b). Le modèle proposé par Hughes *et al.* (Hughes *et al.*, 2001b) (Figure 17), au moins en ce qui concerne le contrôle de la régiospécificité par la 9/13-LOX de pois, s'oppose au modèle d'Hornung *et al.* (1999).

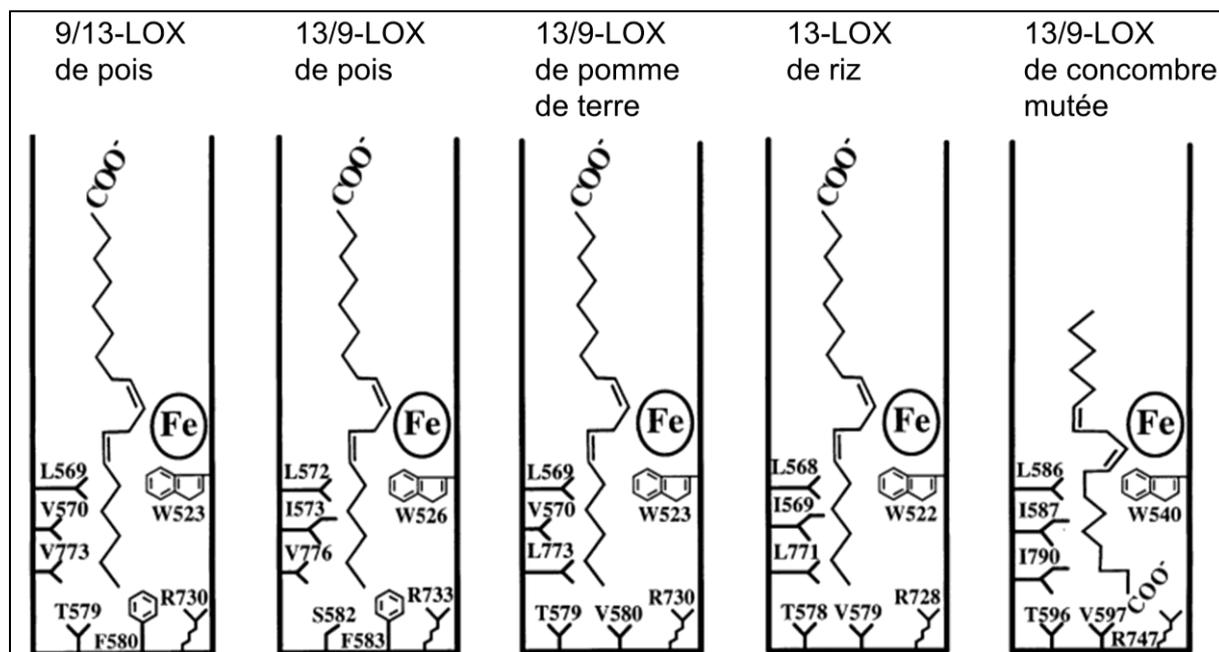


Figure 17 : Modèle de l'espace de liaison (d'après Hughes *et al.*, 2001b)

Les sites actifs de quatre LOX sont représentés avec l'acide linoléique aligné, son carbone 11 proche de l'atome de fer. Les résidus identifiés sur le schéma proviennent des modèles obtenus par homologie.

Les modèles de la 9/13-LOX et de la 13/9-LOX de pois montrent une grande similitude au niveau des acides aminés qui tapissent la paroi du fond du site actif (Figure 17), et ils présentent pourtant des régiospécificités différentes. Dans la 13/9-

LOX de pomme de terre et la 13-LOX de riz, à la place du résidu encombrant identifié par Sloane *et al.* (1991) puis par Hornung *et al.* (1999), c'est le motif T/V caractéristique des 9-LOX qui est présent, en contradiction avec la régiospécificité apparente de ces enzymes. Seule la LOX de concombre mutée par Hornung *et al.* (1999) voit sa régiospécificité changer : le remplacement d'un résidu histidine par un résidu valine transforme la 13-LOX de concombre en 9-LOX. Il semblerait que la régiospécificité soit déterminée par des mécanismes plus complexes chez les LOX à double spécificité, ou différents du contrôle de la spécificité de la 13-LOX de concombre.

vi. *Rôle des résidus chargés dans le positionnement du substrat*

Quelques travaux ont porté sur l'étude de résidus chargés situés à l'entrée du site actif, qui pourraient permettre la formation de liaisons ioniques avec l'extrémité carboxylate du substrat et donc faciliter son entrée dans le site actif par son extrémité méthyle. Gan *et al.* (1996) ont proposé un modèle de positionnement de l'acide arachidonique obtenu *in silico* à partir de la structure de la LOX1 de soja, dans lequel une lysine présente à la surface de l'enzyme, K260, serait impliquée dans une liaison ionique avec l'extrémité carboxylate du substrat. Dans une étude sur la 8*R*-LOX du corail *Plexaura homomalla*, Neau *et al.* (2009) ont identifié un site actif en forme de U, possédant à chacune de ses extrémités un résidu chargé : l'arginine 183 et l'arginine 429. L'arginine 429 est impliquée dans un pont salin, et n'est donc probablement pas impliquée dans la stabilisation de l'extrémité carboxylate à l'entrée du site actif, ce rôle revenant probablement au résidu R183. Di Venere *et al.* (2013) ont montré que le résidu arginine 403 présent à l'entrée du site actif de la 12/15-LOX de lapin est impliqué dans un réseau de liaisons ioniques avec des résidus de l'hélice α_2 . Sa mutation en leucine modifie peu la structure secondaire, mais induit une plus grande flexibilité de la structure tertiaire de la protéine, probablement en raison d'une plus grande surface accessible au solvant. Le résidu R403 semble avoir un rôle différent dans la liaison de l'acide arachidonique et de l'acide linoléique : sa modification réduit considérablement l'efficacité catalytique de l'enzyme vis-à-vis de l'acide linoléique, mais peu vis-à-vis de l'acide arachidonique. D'autres résidus chargés positivement, l'arginine 166 et la lysine 172, sont situés à proximité de l'arginine 403 ; ils pourraient participer à l'orientation de l'acide arachidonique dans le site actif.

Ces trois études montrent l'importance des résidus chargés présents à l'entrée du site actif des LOX, mais l'interaction envisageable avec l'extrémité carboxylate du substrat implique une orientation de l'extrémité méthyle au fond du site actif.

c. Stéréospécificité des lipoxygénases

Les LOX produisent en général des hydroperoxydes de configuration *S*. Quelques *R*-LOX ont été décrites chez les animaux (Boeglin *et al.*, 1998 ; Sun *et al.*, 1998) et des *8R*-LOX ont été identifiées chez les invertébrés marins *Pseudoplexaura porosa* (Bundy *et al.*, 1986) et *Plexaura homomalla* (Neau *et al.*, 2009). Chez les végétaux, seules la LOX1 de maïs qui n'est pas stéréospécifique et produit un mélange de stéréoisomères *R* et *S* en quantités égales, et la *9S/13R*-LOX1 d'olive (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009) sont capables de produire des hydroperoxydes de configuration *R*. Les autres LOX végétales décrites à ce jour sont des *S*-LOX.

Au cours du mécanisme catalytique, l'abstraction de l'hydrogène et l'insertion de l'oxygène se font de manière antarafaciale par rapport au plan du système pentadiénique. L'atome d'hydrogène arraché peut donc être défini comme étant pro-*S* ou pro-*R* en fonction du type de LOX (Figure 18).

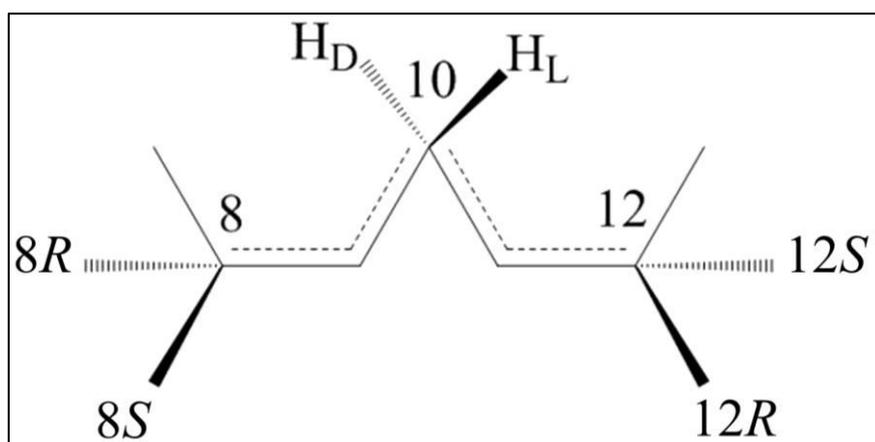


Figure 18 : Corrélation entre l'hydrogène arraché et la stéréospécificité du produit formé.

L'abstraction de l'hydrogène de configuration L permet l'insertion antarafaciale de l'oxygène et la formation d'hydroperoxyde de configuration *8R* ou *12S*, alors que l'abstraction de l'hydrogène de configuration D permet la formation d'hydroperoxyde de configuration *8S* ou *12R*. L'hydrogène de configuration L est donc pro-*R* chez les 8-LOX et pro-*S* chez les 12-LOX, l'hydrogène de configuration D est pro-*S* chez les 8-LOX et pro-*R* chez les 12-LOX.

Il existe de grandes similarités entre les structures des différentes LOX, qu'elles soient végétales ou animales, et plus encore au niveau du site actif. Coffa et Brash (2004) ont mis en évidence un déterminant de la stéréospécificité chez les LOX animales (Figure 19).

N° d'accès GenBank	Nom	Position 1 ^e résidu	Séquence
J03600	5S-LOX humaine	407	INTK A REQLI
M58704	12S-LOX-1 humaine	399	INTR A R T QLI
BC029032	15S-LOX-2 humaine	399	INVR A R T GLV
U78294	15S-LOX humaine	412	INTL A RELLI
L42198	5S-LOX souris	407	INTK A REQLI
X99252	12S-LOX souris (épiderme)	399	INTL A RNNLV
L34570	12S-LOX souris (leucocyte)	400	INVR A RS D LI
AK087724	12S-LOX souris (plaquette)	399	INTR S R T QLI
AK028724	8S-LOX souris	413	INTL A RELLV
P12530	15S-LOX-1 lapin	400	INVR A R N GLV
JQ2267	LOX-1 <i>Arabidopsis</i>	558	INAL A RQILI
S25064	LOX-1 soja	538	INAL A RQSLI
AJ507213	LOX-2 orge	595	INAL A REALI
AF038461	12R-LOX humaine	437	INSI G RAVLL
Y14334	12R-LOX souris	437	INSI G RALLL
AF003692	Domaine 8R-LOX corail	423	IDT I GRKELI
U59223	8R-LOX corail	447	VNSV G IKALL

Figure 19 : Alignement de séquences de R- et S-LOX (d'après Coffa et Brash, 2004)

Les S-LOX possèdent dans la plupart des cas un résidu alanine, qui est remplacé par un résidu glycine chez les R-LOX.

Les S-LOX sont caractérisées par la présence d'une alanine conservée, alors qu'elle est remplacée chez les R-LOX par un résidu glycine. Les auteurs ont proposé un mécanisme d'action régissant la stéréospécificité, et expliquant le rôle de ces résidus, qui est présenté en Figure 20.

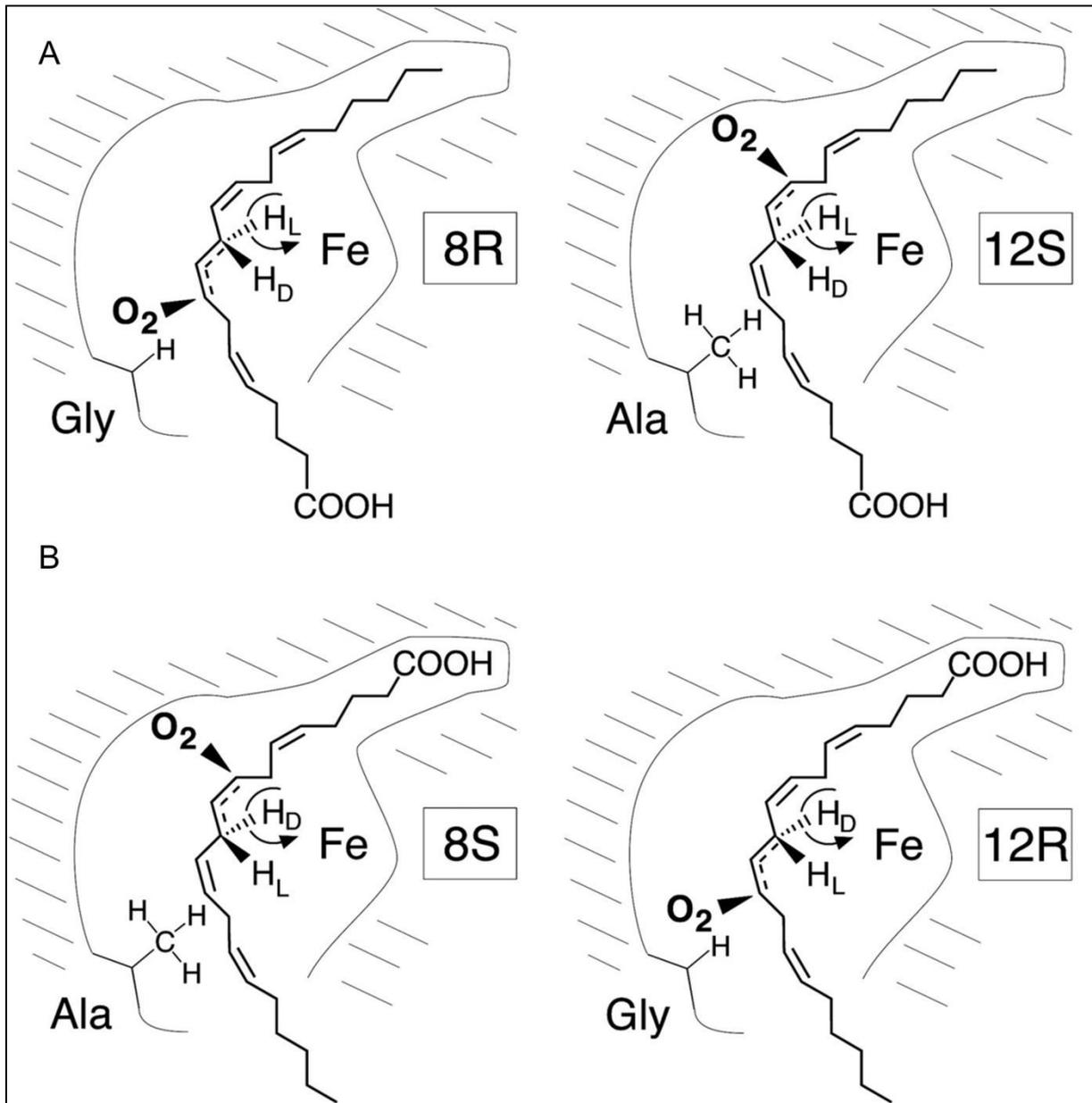


Figure 20 : Mécanisme de la stéréospécificité des LOX (d'après Coffa et Brash, 2004)

Lorsque l'hydrogène avec la configuration L est arraché (A), la présence d'une glycine favorise l'insertion de l'oxygène en n-2 et la présence d'une alanine favorise cette insertion en n+2, le substrat étant orienté avec son extrémité méthyle au fond du site. Lorsque l'hydrogène avec la configuration D est arraché (B), la présence d'une glycine favorise l'insertion de l'oxygène en n+2 et la présence d'une alanine favorise cette insertion en n-2, le substrat étant orienté avec son extrémité carboxylate au fond du site.

Le résidu glycine possède un hydrogène comme chaîne latérale. Cet hydrogène ne générerait pas l'insertion de l'oxygène sur le carbone qui lui fait face. En revanche, l'alanine possède une chaîne latérale formée d'un groupement méthyle CH_3 , plus encombrant, qui favoriserait l'oxygénation du carbone situé de l'autre côté du radical pentadiényl. Cette hypothèse est appuyée par la structure de la 15-LOX1

provenant de réticulocytes de lapin et cristallisée avec un inhibiteur, présentée en Figure 21.

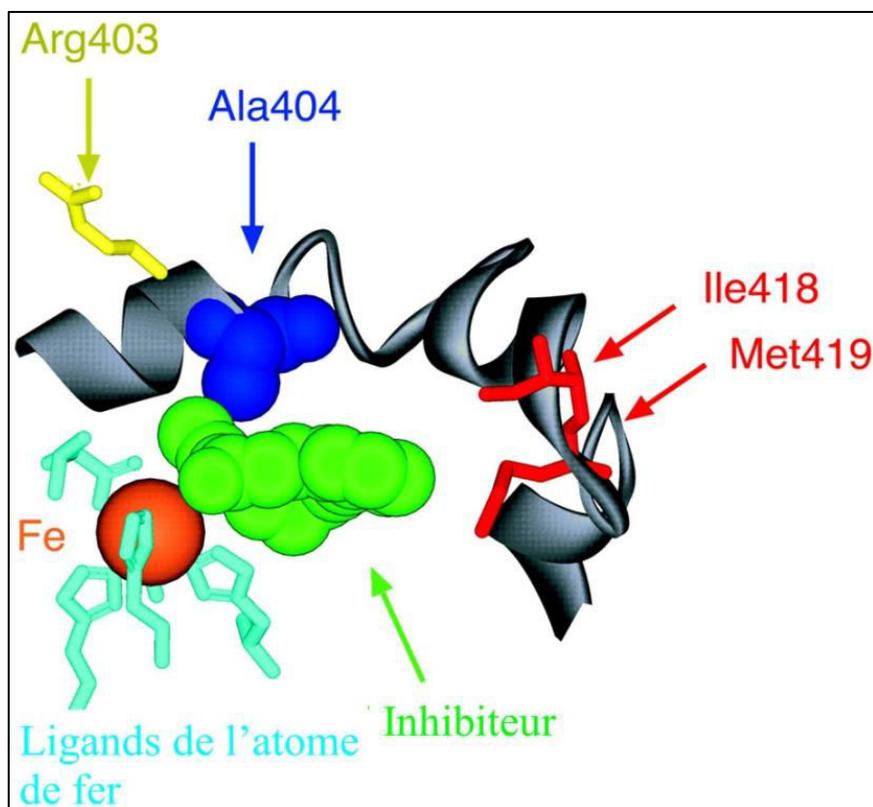


Figure 21 : Structure du site actif de la 15-LOX1 de réticulocyte de lapin en présence d'un inhibiteur (d'après Coffa et Brash, 2004).

Le résidu conservé, l'alanine 404 chez la 15-LOX1 de réticulocyte de lapin, apparaît en bleu foncé. Elle fait face à l'atome de fer, représenté en orange avec les ligands de sa sphère de coordination en cyan. L'inhibiteur cristallisé avec cette LOX est encadré de part et d'autre par l'atome de fer catalytique et le résidu d'alanine supposé contrôler la stéréospécificité de l'insertion de l'oxygène. Les déterminants de Sloane (I418/M419) apparaissent en rouge et définissent le fond du site. En jaune, l'arginine 403, située à la surface de l'enzyme, qui pourrait former une liaison ionique avec l'extrémité carboxylate.

Dans le modèle proposé par Coffa et Brash (2004), l'abstraction du même hydrogène (de configuration L), permet d'envisager la formation d'hydroperoxydes de configuration $8R$ s'il y a présence d'un résidu glycine, et $12S$ s'il y a présence d'un résidu alanine, l'extrémité méthyle de l'acide gras étant orientée au fond du site actif. L'abstraction de l'hydrogène de configuration D s'envisage si le substrat est orienté avec son extrémité carboxylate au fond du site actif, il y a alors formation de $8S$ -hydroperoxyde avec une alanine et de $12R$ -hydroperoxyde avec une glycine. Néanmoins, les auteurs indiquent une diminution de l'activité LOX avec les enzymes

mutées. Ils ajoutent que la chaîne latérale des acides aminés seule ne peut expliquer le contrôle de la stéréospécificité, les mutations modifiant probablement l'arrangement structural du site actif et/ou l'alignement optimal du substrat.

Une étude récente (Jansen *et al.*, 2011) a montré qu'il existe des exceptions à cette règle : une LOX clonée chez le poisson zèbre, portant un résidu glycine, prédite comme étant une *R*-LOX, produit presque exclusivement des 12*S*-hydroperoxydes d'acide arachidonique. Les auteurs ont vérifié le concept du contrôle de la stéréospécificité par les résidus alanine/glycine chez d'autres *S*-LOX animales, et ont montré que la modification du résidu alanine par le résidu glycine induit la production de seulement 10 à 30% de *R*-hydroperoxydes. Cette étude confirme que les résidus glycine ou alanine ne peuvent être les seuls déterminants de la stéréospécificité, d'autres mécanismes doivent permettre ce contrôle.

IV. Intérêt économique de la voie de la lipoxgénase

La voie de la lipoxgénase présente un intérêt économique dans la mesure où les molécules produites par la branche HPL de la voie de la LOX sont des composés volatils à haute valeur ajoutée, recherchés par les industries cosmétiques et agroalimentaires. Depuis de nombreuses années, la vente de molécules « naturelles » s'est développée. Afin de répondre à une demande croissante de la part des consommateurs, des tentatives d'obtention de produits « naturels » se sont multipliées : la production de molécules « naturelles » composant la note verte est devenue un enjeu majeur. La bioproduction de ces molécules utilise de grandes quantités de matières végétales comme source de LOX et d'HPL, et de ce fait n'est pas la plus rentable, puisqu'elle génère de nombreux déchets et il y a compétition pour la transformation des substrats d'intérêt par de nombreuses enzymes. Des brevets ont été déposés (Brunerie et Koziat, 1997 ; Whitehead *et al.*, 2004 ; Feussner et Hornung, 2005) concernant des méthodes de préparation de molécules composant la note verte, ou des LOX ou des HPL dont la régiospécificité ou la stéréospécificité ont été modifiées. Cependant, aucun ne présente de mécanisme complet de préparation de molécules à haute valeur ajoutée par l'action d'enzymes recombinantes.

Dans ce cadre, un projet européen du 7^e PCRD appelé BioSF (Biocatalyzed Synthesis of Fragrances) a été développé en collaboration avec des industriels. Mon travail, intégré à ce projet, devrait permettre une meilleure compréhension du mécanisme réactionnel de la LOX1 d'olive à double spécificité, pouvant mener à la modification de la spécificité réactionnelle de cette enzyme afin d'en faire un outil de production biotechnologique.

V. Objectifs de l'étude

La « flexibilité réactionnelle » des LOX repose sur un ensemble de mécanismes alliant l'orientation du substrat dans le site, le décalage du système pentadiénique par rapport à l'atome de fer catalytique, l'accès de l'oxygène au radical formé, et les contraintes stériques imposées par les chaînes latérales de résidus particuliers. Les différents modèles proposés pour expliquer le caractère régiospécifique et stéréospécifique des lipoxygénases ne s'appliquent pas aux LOX présentant une double spécificité, comme c'est le cas pour la lipoxygénase 1 d'olive. Aussi, une étude approfondie de la structure et de la composition du site actif, par l'utilisation de modèles tridimensionnels et de la mutagenèse dirigée, semble être une approche cohérente pour répondre à ces questions.

Ce travail s'articule autour de deux grands axes : tout d'abord, une étude de la LOX1 d'olive, qui se base sur l'obtention d'un modèle tridimensionnel de la protéine, à partir duquel la localisation du site actif a été prédite. La confirmation de la localisation du site et l'étude des déterminants de la régiospécificité et de la stéréospécificité des LOX, décrits dans la littérature, sont réalisées chez la LOX1 d'olive à double spécificité, incluant des résidus d'acides aminés pouvant jouer un rôle dans la catalyse. Dans une seconde partie, de manière plus générale, le rôle des lipoxygénases dans la synthèse de phyto-oxylipines, a été étudié : la capacité de LOX de spécificités différentes à oxygéner les acides gras portés par des galactolipides a été explorée afin d'apporter un nouveau regard sur la formation des arabidopsides.

Matériels et Méthodes

I. Matériel biologique

La lipoxigénase à double spécificité utilisée au cours de cette étude est la LOX1 recombinante d'olive. L'ADNc (séquence nucléotidique disponible dans GenBank sous le numéro EU678680.1, Annexe, Figure A) codant pour cette enzyme a été obtenu au laboratoire par transcription inverse d'ARNm extraits à partir d'olives noires de la variété Leccino, puis cloné dans le vecteur d'expression pQE-30 (Qiagen). La souche bactérienne compétente transformée à l'aide de ce vecteur d'expression est la souche *Escherichia coli* M15 (Qiagen). Cette souche transformée est nommée *E. coli* M15 pQE-30 olive LOX1 WT (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). Le vecteur d'expression (pQE-30) utilisé permet l'insertion d'une étiquette poly-histidine sur la partie N-terminale de la séquence en acides aminés de la LOX1 d'olive lors de l'expression. Cette étiquette poly-histidine permet une purification par chromatographie d'affinité.

II. Identification des acides aminés importants et choix des mutations

Afin de déterminer les résidus d'acides aminés qui pourraient jouer un rôle dans le mécanisme catalytique de la LOX d'olive, une analyse *in silico* de la séquence en acides aminés de la LOX1 d'olive a été réalisée : des alignements avec les séquences d'autres LOX dont la régiospécificité et la stéréospécificité sont connues ont été effectués. Par la suite, la modélisation de la structure de la LOX1 d'olive, par comparaison avec la structure d'autres LOX, a permis de préciser la possible implication de certains résidus dans le processus catalytique.

1. Alignements de séquences en acides aminés

Les alignements de séquence ont été réalisés à l'aide du programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Le pourcentage d'identité entre les différentes séquences primaires en acides aminés a été déterminé à l'aide du programme Dialign2 (Morgenstern, 1999).

2. Modélisation de la structure de la LOX1 d'olive

La prédiction de la structure tertiaire de la LOX1 d'olive a été réalisée à l'aide du programme PHYRE server (Kelley et Sternberg, 2009) par homologie, basée sur la structure cristallisée de la LOX1 de soja (n° PDB : 1YGE). Les améliorations de la structure modélisée ont été effectuées avec le programme Turbo-Frodo (Roussel et Cambillau, 1989). Enfin, le programme PyMol (DeLano, 2002) avec le plugin MOLE (Petrek *et al.*, 2007), ainsi que l'outil internet CASTp (Dundas *et al.*, 2006) ont permis d'identifier les probables cavités présentes à l'intérieur de la protéine, susceptibles de correspondre au site actif de l'enzyme.

III. **Obtention des mutants de la LOX1 d'olive**

Les études *in silico* ont permis de cibler des résidus d'acides aminés d'intérêt. Ceux-ci ont été étudiés *in vitro* : ils ont été modifiés par mutagenèse dirigée sur le vecteur pQE-30 olive LOX1 WT.

1. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été effectuée à l'aide du kit QuickChange™ Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent), selon les instructions du fournisseur : 10 ng d'ADN plasmidique pQE-30 olive LOX1 WT, en présence de 1 µL de la solution de dNTP fournie, 125 ng de chacune des amorces sens et antisens portant la mutation (Annexe, Tableau A), 1,5 µL de QuickSolution Reagent, 1 µL de QuickChange Lightning Enzyme (*PfuUltra* High Fidelity DNA polymerase) et 5 µL de tampon de réaction 10X sont incubés dans un volume final de 50 µL. Les conditions d'amplification programmées sur le thermocycleur (Eppendorf) sont les suivantes : 1 cycle à 95°C durant 2 minutes suivi de 18 cycles comprenant chacun trois étapes : 95°C durant 20 secondes, 60°C durant 10 secondes et 68°C durant quatre minutes. Un dernier cycle est réalisé durant quatre minutes à 68°C.

Une fois l'amplification terminée, 2 µL de l'enzyme *Dpn* I fournie dans le kit sont ajoutées aux 50 µL de produits de PCR. L'enzyme *Dpn* I a pour rôle d'hydrolyser les brins d'ADN méthylés, qui sont les brins parents et ne portent donc

pas la mutation introduite au cours de la mutagenèse dirigée. L'incubation avec *Dpn I* se déroule durant 5 minutes à 37°C.

2. Clonage dans les bactéries compétentes

Un volume de 45 µL de bactéries compétentes *E. coli* XL1 blue ou XL10 gold (Agilent) est incubé en présence de 2 µL de β-mercaptoéthanol dans un tube de 15 mL durant 2 minutes. 2 µL des produits de PCR traités par *Dpn I* sont ajoutés aux bactéries compétentes et incubés durant 30 minutes dans la glace. Un choc thermique à 42°C durant 30 secondes est effectué, puis les bactéries sont à nouveau incubées dans la glace durant 2 minutes. 500 µL de milieu de culture NZY⁺ préalablement chauffé à 42°C sont ajoutés dans le tube, qui est ensuite incubé à 37°C durant une heure sous agitation. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de pétri contenant du LB agar additionné d'ampicilline 50 µg.mL⁻¹, et mises en culture une nuit à 37°C. Le lendemain, plusieurs colonies sont relancées dans du milieu LB Broth contenant de l'ampicilline 50 µg.mL⁻¹.

3. Extraction et purification du vecteur, et séquençage

L'ADN plasmidique est extrait des bactéries recombinantes provenant de la culture en milieu liquide à l'aide du kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). La quantité et la pureté de l'ADN élué sont déterminés par migration sur gel d'agarose 1 % dans du tampon TBE 1X. Le séquençage est réalisé par la société GATC Biotech, à l'aide d'amorces situées de part et d'autre de la mutation.

4. Clonage dans les bactéries en vue de l'expression

La souche bactérienne utilisée pour l'expression de la protéine recombinante est *E. coli* M15. Ces bactéries contiennent un plasmide, pREP-4, portant un gène de résistance à la kanamycine et le gène *lacI*, répresseur de l'opéron lactose. Ce répresseur est inactivé par l'ajout d'IPTG, qui lève donc l'inhibition de la synthèse de la protéine recombinante. Un volume de 3 µL de plasmide purifié et séquençé est

ajouté à 100 μL de bactéries compétentes *E. coli* M15 décongelées sur glace. Elles y sont incubées durant 20 minutes. Un choc thermique à 42°C est appliqué durant 90 secondes. 500 μL de milieu de culture Psi Broth sont ajoutés aux bactéries, qui sont alors incubées à 37°C durant 60 à 90 minutes sous agitation. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de pétri contenant du LB agar, ampicilline 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycine 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et mises en culture une nuit à 37°C. Elles sont ensuite relancées en milieu liquide (LB Broth) en présence d'ampicilline et kanamycine, comme précédemment.

IV. Expression et purification des protéines recombinantes

1. Expression des protéines recombinantes

La souche bactérienne *E. coli* M15 transformée avec le vecteur pQE-30 portant l'ADNc codant pour un mutant de la LOX1 d'olive est mise en culture en milieu liquide LB Broth (Sigma) en présence d'ampicilline 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sigma) et de kanamycine 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sigma). Une pré-culture de 20 mL est réalisée durant une nuit à 37°C. Le lendemain, elle est ajoutée à 380 mL de LB Broth en présence d'ampicilline et de kanamycine. La culture bactérienne se poursuit jusqu'à ce que l'absorbance du milieu mesurée à une longueur d'onde de 600 nm soit égale à 1 (Andreou *et al.*, 2010). Les cultures sont ensuite refroidies rapidement dans la glace jusqu'à une température d'environ 15°C. La synthèse, induite par l'ajout d'IPTG 1mM, est réalisée durant 24h à une température de 15°C. Du citrate d'ammonium ferrique (Sigma) est également ajouté à une concentration de 250 μM (Andreou *et al.*, 2010). Les cultures sont ensuite centrifugées à une vitesse de 7000 g durant 30 minutes, à une température de 4°C. Le surnageant est éliminé, les culots bactériens sont remis en suspension dans 50 mL d'un tampon de lyse pH 8 composé de phosphate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 500 mM, Triton X100 0,1 %, et lysozyme 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ils sont congelés à une température de -80°C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés pour purification.

2. Préparation du surnageant de lyse

Les culots repris par du tampon de lyse conservés à -80°C sont décongelés à température ambiante. La DNase I et le MgSO_4 ajoutés à des concentrations

respectives de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et 50 mM vont permettre de dégrader l'ADN bactérien et la benzamidine ajoutée à une concentration de 1 mM permettra de limiter la dégradation de la LOX recombinante par des protéases. Après une incubation d'une durée de 30 minutes à une température de 4°C , le mélange est centrifugé durant 30 minutes à 12000 g à 4°C . Le surnageant de lyse est récupéré afin d'être chargé sur une colonne en vue de la purification de la LOX recombinante.

3. Purification par chromatographie d'affinité

Deux séries d'expériences ont été effectuées. La purification des mutants des résidus F277 et Y280 a été réalisée à l'aide de la résine Talon Metal Affinity (Clontech). La purification des mutants des résidus R265, R268, L572, L579, S517 a été effectuée à l'aide d'un FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare). La résine utilisée est la Talon Superflow Metal Affinity (Clontech). Dans les deux séries d'expériences, la purification est réalisée à une température de 4°C . La colonne est équilibrée avec 50 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7 contenant 300 mM de chlorure de sodium, puis l'élution est réalisée en deux paliers successifs à l'aide du tampon d'équilibrage additionné d'imidazole 40 mM puis 100 mM.

V. **Caractérisation biochimique des enzymes purifiées**

1. Dosage de l'activité lipoxigénase

L'activité lipoxigénase est déterminée selon la mesure spectrophotométrique décrite par Axelrod *et al.* (1981). La transformation du substrat par ajout d'une fonction hydroperoxyde au niveau du système pentadiénique entraîne un réarrangement des doubles liaisons qui deviennent conjuguées. Il en résulte une augmentation de l'absorbance mesurée à 234 nm. Le substrat standard, l'acide linoléique (Sigma), est préparé suivant la méthode décrite par Anthon et Barrett (2003) à une concentration de 25mM en présence de Tween 20 (Sigma) à une concentration de 11 mM. Le mélange réactionnel contient 0,25 mM d'acide linoléique, une prise d'essai de 10 μL de l'extrait protéique dans un volume final de 1 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6. La réaction démarre par addition de l'acide linoléique. L'activité lipoxigénase est suivie par la variation en fonction du

temps de l'absorbance à 234 nm, elle est calculée en prenant pour coefficient d'extinction molaire la valeur $\epsilon=25000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, correspondant aux diènes conjugués (Pérez *et al.*, 1999). Une unité d'activité LOX est égale à la quantité d'enzymes qui catalyse la formation d'une μmole d'hydroperoxyde d'acide linoléique par minute.

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide des équations de Michaelis-Menten en utilisant des concentrations en substrat (acide linoléique et acide linoléique) comprises entre $0,5 \mu\text{M}$ et $200 \mu\text{M}$, adaptées à chacune des protéines recombinantes mutées.

La quantité de protéines dans les extraits purs est déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm et calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ϵ déterminé expérimentalement : $\epsilon = 144330 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Gill et von Hippel, 1989).

2. Dosage de la quantité de fer

A partir des fractions rassemblées après purification, la quantité de fer a été déterminée par colorimétrie, par complexation à la FerroZine® (Percival, 1991). Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire de l'hôpital de Bastia.

3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et immunoempreinte

Une analyse sur gel de polyacrylamide (10%) en présence de SDS (SDS-PAGE) est réalisée. Les protéines sont ensuite colorées à l'aide d'EZ Blue™ Gel Staining Reagent (Sigma) ou transférées sur une membrane de nitrocellulose (Biorad). Cette membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps anti-polyHistidine (Sigma), révélés en présence de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma) et de peroxyde d'hydrogène.

4. Identification des produits de la catalyse enzymatique

Afin d'étudier la régiospécificité et la stéréospécificité de la LOX et de ses mutants, une réaction de synthèse d'hydroperoxydes est effectuée en utilisant comme substrat l'acide linoléique ou l'acide linoléique.

L'acide gras est préparé dans l'eau distillée, dans laquelle l'oxygène est chassé au préalable par barbotage d'azote. Le pH de la solution est augmenté avec de la soude de manière à ce que les acides gras se trouvent chargés en solution. Le tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 6 est oxygéné avant le début de la réaction. Une quantité de LOX (0,5 à 5 unités) est incubée en présence de 10 à 45 mg d'acide gras durant une heure à température ambiante sous agitation et barbotage d'oxygène. Les produits formés sont ensuite extraits à l'aide de trois volumes de diéthyl éther (Sigma), évaporés à l'évaporateur rotatif, puis repris par 1 mL d'éthanol. L'absorbance est mesurée à 234 nm pour déterminer la quantité d'hydroperoxydes d'acides gras extraits, estimés d'après la loi de Beer-Lambert en utilisant le coefficient d'extinction molaire décrit précédemment, $\epsilon=25000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Les analyses par RMN du carbone 13 ou du proton sont réalisées par le laboratoire de Chimie et Biomasse (UMR CNRS 6134 SPE). Cette analyse permet de déterminer la régiospécificité des produits formés, ainsi que le rendement de la réaction.

La régiospécificité ainsi que la stéréospécificité des produits formés sont déterminées par HPLC en phase chirale couplée à un spectromètre de masse en tandem (CP-HPLC-MS/MS) par le Pr Ernst Oliw (Division of Biochemical Pharmacology, Department of Pharmaceutical Biosciences, Biomedical Center, Université d'Uppsala, Suède).

VI. Activité lipoxygénase sur des galactolipides

L'action de la LOX1 d'olive a été étudiée sur des acides gras estérifiés sur une molécule de monogalactosylglycérol ou digalactosylglycérol, appelés de manière plus générale galactolipides. Les galactolipides extraits à partir des thylakoïdes présents dans les chloroplastes de feuilles d'épinards (Joyard et Douce, 1979 ;

Miège *et al.*, 1999) ont été fournis par le Dr Eric Maréchal (UMR 5168 CNRS-CEA, Grenoble).

L'action des lipoxygénases a été étudiée sur deux types de galactolipides : les monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et les digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Ces deux types de substrats ont été préparés à une concentration de 1,8 mM dans une solution aqueuse de déoxycholate de sodium ou de taurodéoxycholate de sodium 2,4 mM, de Tween20 11,4 mM ou dans un mélange de CHAPS 90mM et 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (PhosphoGlycérol, PG) 26 mM. L'activité lipoxygénase a été mesurée comme décrit précédemment.

Les essais ont été mis au point avec la LOX1 de soja commerciale (Sigma). Pour les essais avec le Tween20, un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 8 est utilisé. Pour les essais avec le mélange CHAPS/PG, un tampon phosphate de potassium 250 mM additionné de chlorure de potassium 250 mM pH 8 est utilisé (Maréchal *et al.*, 1994). Par la suite, les activités de la LOX1 d'olive WT et de la 5-LOX de pomme de terre commerciale (Cayman Chemical) ont été testées en présence d'un tampon phosphate de sodium 50 mM aux pH respectifs de 6 et 6,3. Ces essais ont été réalisés sur les MGDG solubilisés à l'aide de Tween20 uniquement. Les produits formés par l'action des trois enzymes ont été extraits par la méthode de Bligh et Dyer (1959), et analysés par CP-HPLC-MS/MS par le Pr Oliw.

Résultats et Discussion

L'étude des résidus d'acides aminés pouvant jouer un rôle dans le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive, ou dans le contrôle de ce mécanisme, est présentée dans une première partie. La stratégie choisie pour réaliser cette étude a été fondée sur l'analyse d'un modèle tridimensionnel de la structure de la LOX1 d'olive associée à la comparaison des séquences en acides aminés de différentes LOX animales et végétales. Des résidus d'acides aminés ont été sélectionnés et modifiés par mutagenèse dirigée, afin d'étudier leur rôle dans le mécanisme catalytique.

Dans une seconde partie, l'étude se focalise sur l'action de trois LOX de spécificités différentes agissant sur des galactolipides, pour étudier la capacité des LOX à catalyser la première étape de formation des arabidopsides.

I. Etude du mécanisme catalytique de la lipoxygénase 1 d'olive

1. Modélisation par homologie de la LOX1 d'olive

Les structures tridimensionnelles des enzymes peuvent apporter des éléments de réponse quant au mécanisme catalytique et à la spécificité réactionnelle. Comme la structure tridimensionnelle de la LOX1 d'olive n'est pas disponible, le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive a été étudié grâce à un modèle construit par homologie. Les séquences en acides aminés des lipoxygénases possèdent un fort taux d'identité entre elles, et la LOX1 d'olive a le plus fort taux d'identité (supérieur à 55 %) avec la LOX1 et LOX3 de soja. La structure de la lipoxygénase 1 de soja (sLOX1), obtenue à partir de la base de données <http://www.rcsb.org> (n°PDB : 1YGE) et cristallisée par Minor *et al.* (1996), a été choisie comme modèle.

a. Etude du modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive

Le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive obtenu par homologie présente les structures secondaires caractéristiques communes aux lipoxygénases (Figure 22) (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). Un petit domaine N-terminal formé des résidus d'acides aminés 1 à 164 est replié en 8 feuillets β antiparallèles. Ces feuillets sont organisés en forme de tonneau β , décrit dans la littérature comme un domaine pouvant faciliter la liaison des LOX avec les liposomes et les corps lipidiques (May *et al.*, 2000).

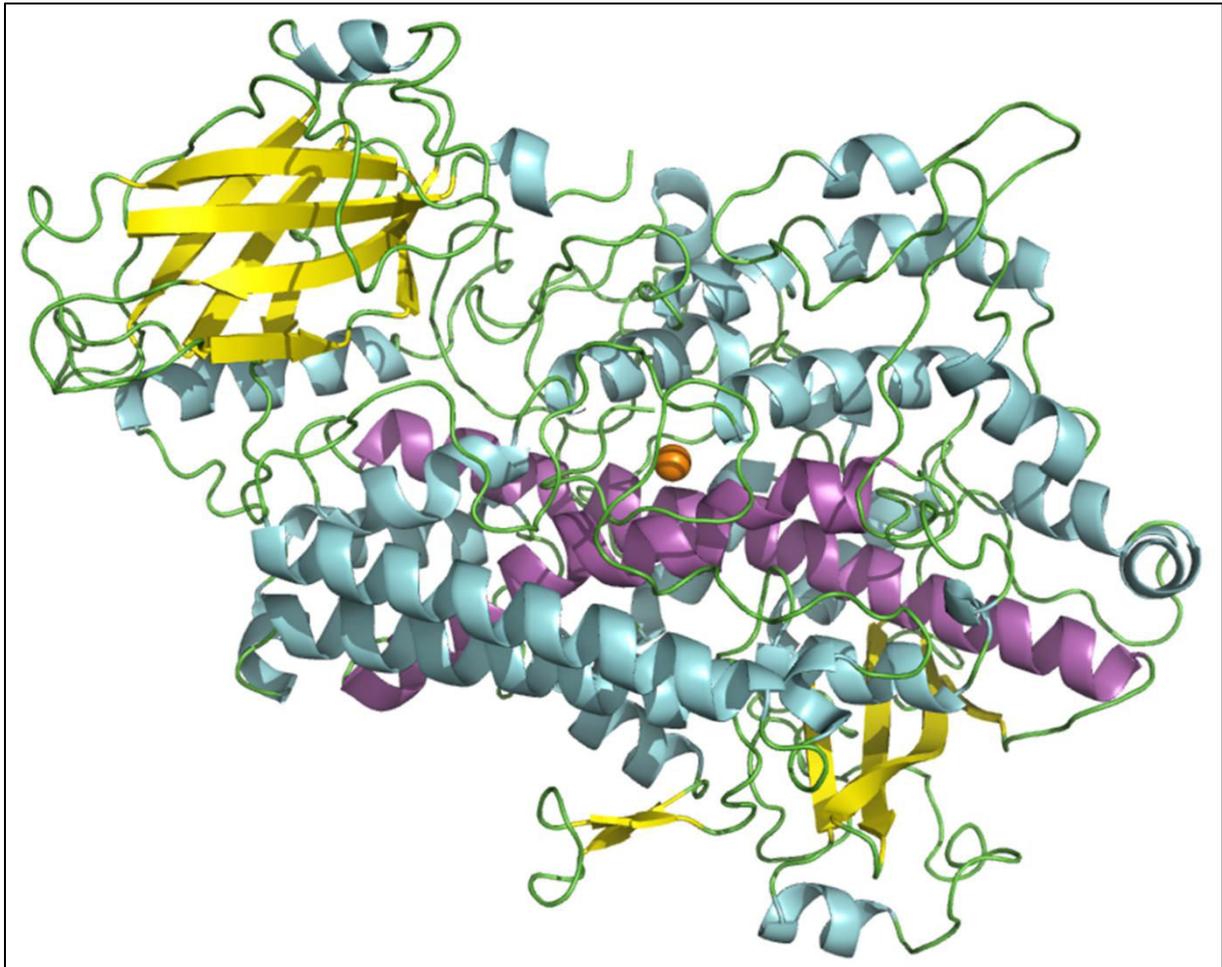


Figure 22 : Structure de la LOX1 d'olive modélisée par homologie

Le domaine N-terminal formé par un tonneau β se situe dans le quadrant supérieur gauche, le reste de la structure correspond au domaine C-terminal. Les feuillets β sont représentés par des flèches jaunes et les hélices α en cyan. Les hélices α_9 et α_{18} , les plus longues, apparaissent en violet. L'atome de fer catalytique présent au centre du domaine C-terminal est représenté par une sphère orange.

Le domaine C-terminal (résidus 165 à 864), beaucoup plus grand, est composé en majorité d'hélices α . Les hélices α_9 et α_{18} sont les plus longues, comme cela est décrit pour la LOX1 de soja (Minor *et al.*, 1996 ; Prigge *et al.*, 1997). Elles sont situées de part et d'autre de l'atome de fer catalytique, et portent toutes deux les résidus qui forment la sphère de coordination de l'atome de fer : les histidines H525, H530, H716, l'asparagine N720 et l'isoleucine terminale I864 (Figure 23). Une place vacante dans cette sphère de coordination pourrait être occupée par l'ion hydroxyde.

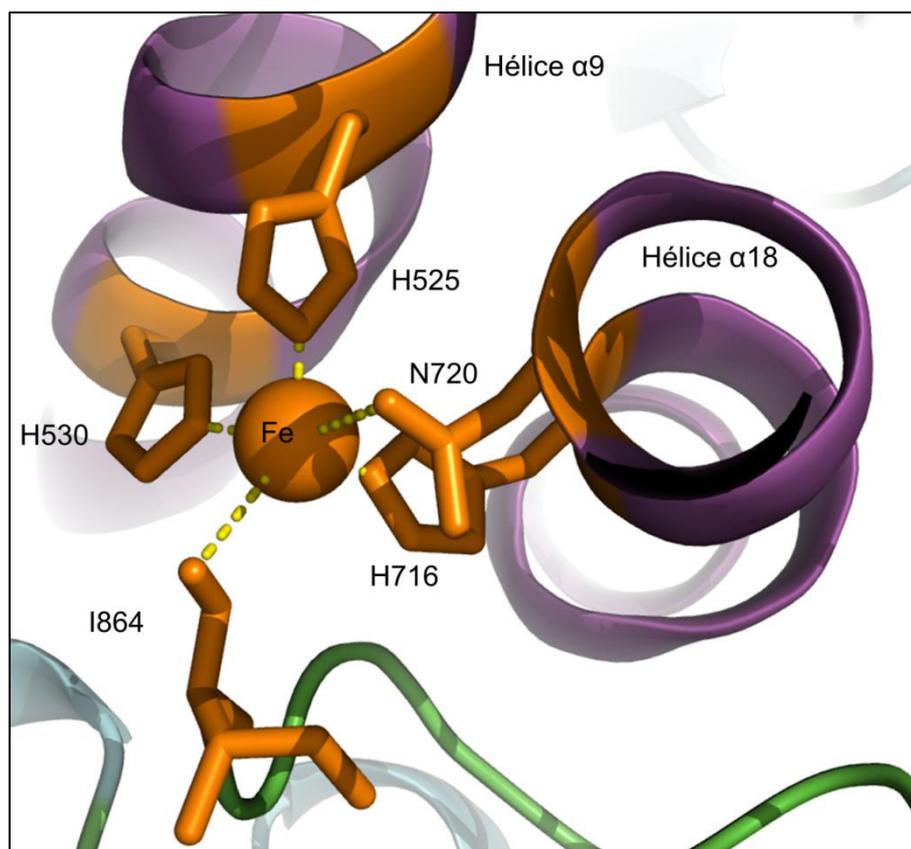


Figure 23 : Sphère de coordination de l'atome de fer catalytique dans le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive

La présence des structures caractéristiques des lipoxygénases décrites dans la littérature et la conservation de la coordination de l'atome de fer semblent valider le modèle tridimensionnel obtenu. Ce modèle peut donc servir de base pour l'étude du rapport entre la structure de l'enzyme et la fonction de certains résidus d'acides aminés particuliers.

b. Prédiction de la localisation du site actif de la LOX1 d'olive

Afin de localiser le site actif de la LOX1 d'olive, deux stratégies ont été utilisées : tout d'abord, la superposition du modèle de la LOX1 d'olive avec la structure de la LOX3 de soja co-cristallisée avec un acide 13(*S*)-hydroperoxy-9(*Z*),11(*E*)-octadécadiénoïque (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 2001) (n° PDB : 1IK3) a permis de prédire la localisation du site actif de la LOX1 d'olive à l'intérieur du domaine catalytique C-terminal. Dans un second temps, l'utilisation de l'outil informatique CASTp (Dundas *et al.*, 2006) (<http://sts.bioengr.uic.edu/castp/>), et du programme MOLE (Petrek *et al.*, 2007) intégré au logiciel PyMol (DeLano, 2002), ont permis de déterminer une cavité principale au sein du domaine C-terminal de la

LOX1 d'olive. Cette cavité correspond à la localisation du site actif prédit par la superposition avec la LOX3 de soja. Le site actif putatif prédit par CASTp et MOLE aurait une même entrée localisée à la surface de la protéine, et plongerait au cœur du domaine C-terminal en passant près de l'atome de fer catalytique. Il est important de noter toutefois que la cavité prédite par CASTp est un peu plus grande que celle identifiée par MOLE. L'entrée du site actif putatif à la surface de l'enzyme semble être obstruée par les chaînes latérales des résidus aromatiques phénylalanine 277 (F277) et tyrosine 280 (Y280) (Figure 24).

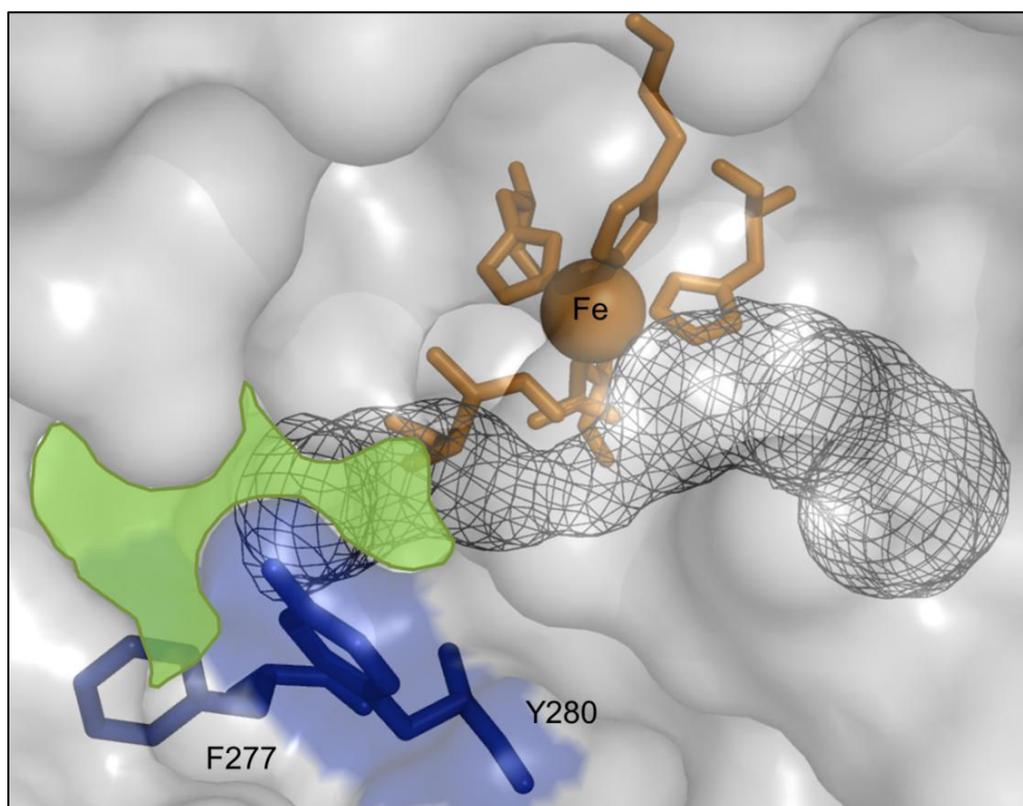


Figure 24 : Vue agrandie de l'entrée putative du site actif de la LOX1 d'olive

La surface accessible au solvant apparaît en gris. Les résidus encombrants F277 et Y280 identifiés à l'entrée putative sont colorés en bleu, de même que leurs surfaces. L'atome de fer catalytique et ses ligands sont colorés en orange. Les parois du site actif putatif sont représentées par une grille grise. L'espace disponible correspondant à l'ouverture sur le modèle est identifié par la forme verte.

Les résidus d'acides aminés F277 et Y280 sont directement accessibles à la surface de l'enzyme. Le résidu Y280 semble se positionner un peu plus en avant par rapport au résidu F277, plus en retrait. La position de leurs chaînes latérales peut être directement responsable de la dimension de l'ouverture de l'entrée du site actif

et par conséquent, jouer un rôle dans la pénétration du substrat à l'intérieur du site actif. Une étude ciblant ces deux résidus d'acides aminés a donc été réalisée.

2. Localisation de l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive

Un alignement de la séquence de la LOX1 d'olive avec d'autres LOX végétales et animales montre que le résidu F277 est très conservé chez la plupart des LOX des deux règnes. Le résidu Y280 est très conservé parmi les séquences de LOX végétales principalement (Figure 25). Chez la LOX1 de soja, ces résidus sont remplacés par une alanine et une isoleucine, respectivement, conservant le caractère hydrophobe de ces résidus, mais avec des chaînes plus courtes et moins encombrantes. Chez les espèces animales et végétales où Y280 n'est pas retrouvé, il est en général remplacé par un résidu polaire principalement une lysine, une thréonine ou une sérine. Le haut degré de conservation des résidus F277 et Y280 laisse supposer que les chaînes latérales de ces résidus pourraient influencer la pénétration du substrat dans le site actif.

N° d'accès	Nom		Séquence en acides aminés						
			265	268	273	277	280	283	
ACG56281	Olive_LOX1	246	DPNSESRIPLLTSLDIYIPRDERFGHLKMSDFL	AYALKS	VVQFLLPEFEDLCDS-				
P27481	LOXB_PHAVU	135KPSDFVY-----L.....A.....S.....	G.....	S.DV..VLT.AF.-G				
P38417	LOX4_SOYBN	241KPSDFVY-----L.....A.....S.....	GI.....	S.DV..VLT.AF.-G				
P38414	LOX1_LENCU	254	E.Q....SDTVY-----L.....A...V.S....	V.I....	AS.NIV.QLRSVVT-L				
P08170	LOX1_SOYBN	228	..T.KQGEVIFY-----V....NL....SK.A.EIGT..	LS.IVQ.A..	SAF.-L				
P09439	LOX2_SOYBN	258	.Q...KPGEVY-----V....N....S.....	GI.....	LS.YV..A..SVF.-L				
P14856	LOX2_PEA	254KPATETY-----V....N....S.....	GI.....	S.CVV.A..SAF.-L				
P24095	LOXX_SOYBN	252KP-GEVY-----V....N....S.....	T.GI...L	LSHDVI.L.KSAIFQL				
P27480	LOXA_PHAVU	254	..KC.IPTSDTY-----.....N....SG...T..I..	LT.NV..T.QKAFG-					
P09186	LOX3_SOYBN	246SNDVY-----L.....A.....S.....	T.G.....	S.NV..LLQS-AFDL				
P09918	LOX3_PEA	249SDYVY-----L.....A.....S.....	T.G..A.S.NVV.AL.SVFFDL					
Q9LUW0	LOX5_ARATH	264	..K....LA..N..N..V.....S.V.F.....	T.V.V..IASV..K.					
P37831	LOX1_SOLTU	243	..K.....IL....V.....T.....I...I...LHA.F.G.						
P38415	LOXA_SOLLC	242	..K.....IL....V.....T.....I...I...LHA.F.G.						
P38416	LOXB_SOLLC	241	..C...N..PM....V.....V.K...TSS...SL.T...A.KA...N.						
Q06327	LOX1_ARATH	241	..QT...L.ITS....V.....AIA..IQ.AL.AVF.D.						
P29114	LOX1_HORVU	238	..SL...LS..EQ--..V...K.....T...G.SI.AIT.GI..AVRTYV.-.						
Q7G794	LOX3_ORYSJ	243	..D...LS.VEQ--..V.....A...G.SI.AIAEGIV.AIRTYV.-.						
P29250	LOX2_ORYSJ	240	..TA...LS..EN--..V.....A...G.SI.AL.DGIV.AIRTYV.-.						
Q76I22	LOX1_ORYSJ	240LS..EQ--..V.S...A.....AG.SI.AI..GI..AIRTYV.-.						
Q53RB0	LOX4_ORYSJ	249	..T...L...DLN..V.....G.S..AI.EGV..IIRTYV.-.						
P38419	LOXC1_ORYSJ	305	..--K.ETRKGN---V.V...E.SPE.EDY..RKTVG..L.AAV.AAQS.LLDK						
Q84YK8	LOXC2_ORYSJ	322	..--K.ETRKGN---V.V...E.SEV.NAQ..LKT.Q..LHAAV.AAQSALIDN						
P93184	LOX21_HORVU	300	..F..E.SHKEH---.V...A.TER..GA.DTKKFM.QLHA.TTGLKTAKHK.						
Q8GSM3	LOX22_HORVU	298	..S..EESHKKGE--M.V...T.TER.EQA..TKQ.L.QLHG.CTGLKVNK.I.						
Q8GSM2	LOX23_HORVU	281	..--.TETRSSP---V.V...Q.SDV.GRT.S.TT.R.GLHAI..AVAP.LNN.						
P38418	LOX2_ARATH	284	..--S.EQRYGGE--F.V...E.STA.GTS.TGK.VLAALPSIF.QI.SVLL.P						
Q9FNX8	LOX4_ARATH	310	.MM..R.VEKPLP--M.V...Q.EES.QNT.A.CR..A.LHN.I.SLKASILAE						
Q9LNR3	LOX3_ARATH	304	.KDA...VEKPLP--M.V...Q.EES.QDT.A.GR..A.LHH.I.SLKASIVAE						
Q9CAG3	LOX6_ARATH	297	..PC...GKEKEE--F.V...V.EEI.RDT.R.GRF.ALPHN.V.SIAAALSNL						
Q8H016	LOX6_ORYSJ	300	NMLA...VEKPHP--.V...A.EE..QGA.SSGR.RA.LHT.I.SLIASISAE						
Q7XV13	LOX5_ORYSJ	286	.ASA...VEYPEP--.VS...E.EEG.NEMLSEG.I.ALLHNFM.LLVSSVSPD						
O15296	LX15B_HUMAN	170	-----LBNIKYSTA.NAN.YLQ.GSAFAE---MKIKG.L.R.						
O19043	LOX12_RABIT	161	-----L.V...LED.KI..E.SLAWGLAE---LALKNSLNI.						
P39654	LX12L_MOUSE	161	-----L.V.Q..RED.RLE.E.SQVLGTM---TVINFPKNT.						
3FG4 A	8RLOX_Coral	167	-----L..VQ.TDE.SRSYQESRKAAL.NLGIGSLFTMFE-						

Figure 25 : Alignement de séquences entourant l'entrée putative du site actif de la LOX1 d'olive

Les résidus identiques à la séquence de la LOX1 d'olive sont représentés par des points. Les résidus hautement conservés F277 et Y280 sont soulignés en rouge et orange, respectivement. Les résidus chargés entourant le site actif (arginines 265 et 268, lysines 273 et 283) sont soulignés en vert. La présence d'un résidu chargé différent est soulignée en bleu. Identifiants taxonomiques : PHAVU, *Phaseolus vulgaris* ; SOYBN, *Glycine max* ; LENCU, *Lens culinaris* ; PEA, *Pisum sativum* ; ARATH, *Arabidopsis thaliana* ; SOLTU, *Solanum tuberosum* ; SOLLC, *Solanum lycopersicum* ; HORVU, *Hordeum vulgare* ; ORYSJ, *Oryza sativa subsp. japonica* ; HUMAN, *Homo sapiens* ; RABIT, *Oryctolagus cuniculus* ; MOUSE, *Mus musculus* ; CORAL, *Plexaura homomalla*.

Afin de tester cette hypothèse sur le rôle supposé de ces résidus d'acides aminés, des mutants de la LOX1 d'olive ont été obtenus par mutagenèse dirigée. Les résidus encombrants F277 et Y280 ont été remplacés respectivement par les résidus plus petits retrouvés sur la structure de la LOX1 de soja : une alanine dans le mutant F277A, et une isoleucine dans le mutant Y280I. Un double mutant portant les deux mutations, appelé F277A/Y280I a également été obtenu (Figure 26).

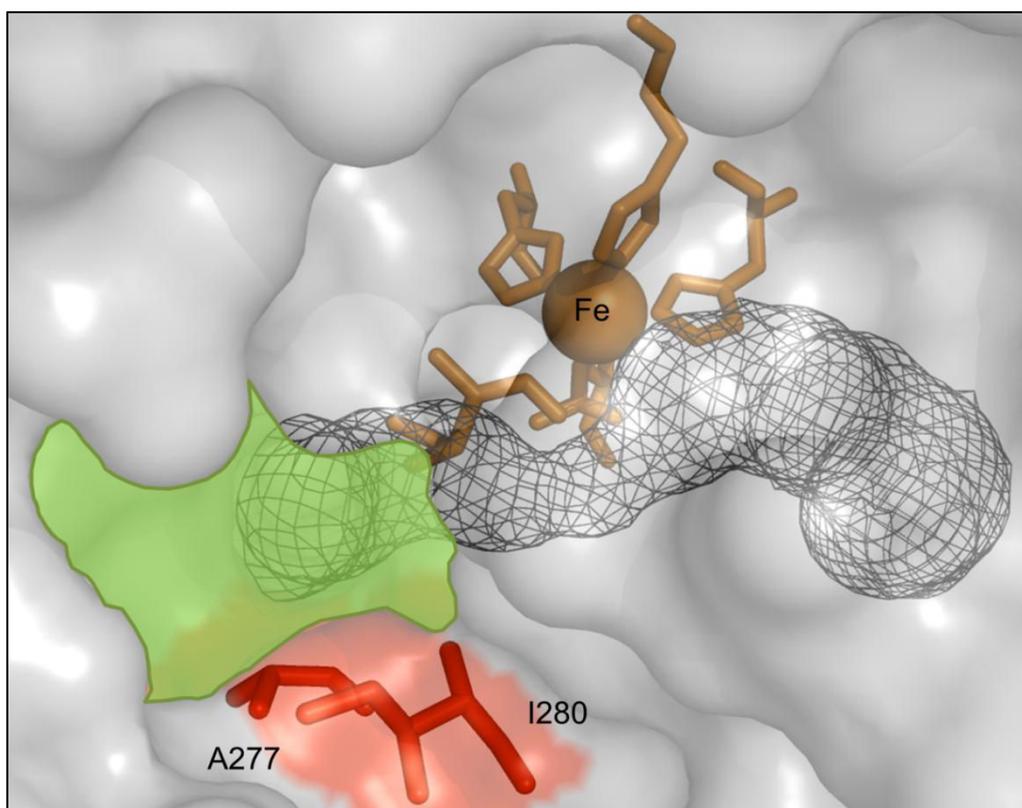


Figure 26 : Modélisation de la substitution des acides aminés encombrants l'entrée du site actif

La surface accessible au solvant apparaît en gris. Les résidus mutés A277 et I280 à l'entrée putative sont colorés en rouge, de même que leurs surfaces. L'atome de fer catalytique et ses ligands sont colorés en orange. Les parois du site actif putatif sont représentées par une grille grise. L'espace disponible correspondant à l'ouverture sur le modèle est identifié par la forme verte.

Ces modifications permettent d'augmenter l'ouverture de l'entrée du site actif putatif en éliminant l'encombrement stérique, ce qui devrait se traduire par une modification des paramètres cinétiques de l'enzyme et ainsi confirmer la localisation de l'entrée du site actif.

a. Expression et purification de la LOX1 d'olive sauvage et des mutants

Les enzymes recombinantes sauvage (WT) et mutées F277A, Y280I et le double mutant F277A/Y280I, ont été exprimées chez des bactéries *E.coli* comme protéines de fusion portant une étiquette poly-histidine. La purification des enzymes recombinantes par chromatographie d'affinité a été réalisée en chambre froide (4°C) sur une résine contenant du cobalt (Talon Metal Affinity, Clontech) (Tableau IV).

Tableau IV : Tableau de purification de la LOX1 d'olive et des mutants F277A, Y280I et F277A/Y280I

	Etape de purification	Activité totale (unités ^a)	Quantité de protéines ^b (mg)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	Rendement (%)	Facteur de purification
WT	Lysat cellulaire	794,90	593,20	1,34	100	1
	Fraction purifiée	80,20	2,53	31,70	10	23,6
F277A	Lysat cellulaire	256,60	191,50	3,50	100	1
	Fraction purifiée	34,60	0,38	91,10	13,5	26
Y280I	Lysat cellulaire	445,00	116,50	3,82	100	1
	Fraction purifiée	73,80	0,76	97,10	16,5	25,4
F277A/Y280I	Lysat cellulaire	505,00	111,70	4,29	100	1
	Fraction purifiée	67,10	0,54	124,20	13,3	28,9

^a une unité correspond à la quantité de LOX nécessaire à la production d'une μ mole d'hydroperoxyde d'acide linoléique par minute dans les conditions expérimentales standards.

^b des quantités plus faibles d'enzymes purifiées ont été obtenues avec les mutants car une quantité moindre de bactéries a été utilisée pour les produire.

Un volume de 250 mL de surnageant de lyse a été utilisé pour la purification de la LOX1 d'olive WT. Un volume inférieur, 150 mL, a été utilisé pour la purification des mutants F277A, Y280I et F277A/Y280I. A l'issue de la purification, un rendement de 10 % a été obtenu pour la LOX1 d'olive WT. Un rendement similaire (\approx 13 %) pour les mutants F277A et F277A/Y280I a été obtenu. Le rendement est légèrement supérieur pour le mutant Y280I (16,5 %). Les activités spécifiques obtenues sont égales à 31,7 U.mg⁻¹ pour l'enzyme sauvage, 91,1 U.mg⁻¹ pour le mutant F277A, 97,1 U.mg⁻¹ pour le mutant Y280I et 124,2 U.mg⁻¹ pour le mutant F277A/Y280I. La pureté des fractions purifiées a été vérifiée par électrophorèse sur gel de

polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate puis par immunoempreinte (Figure 27).

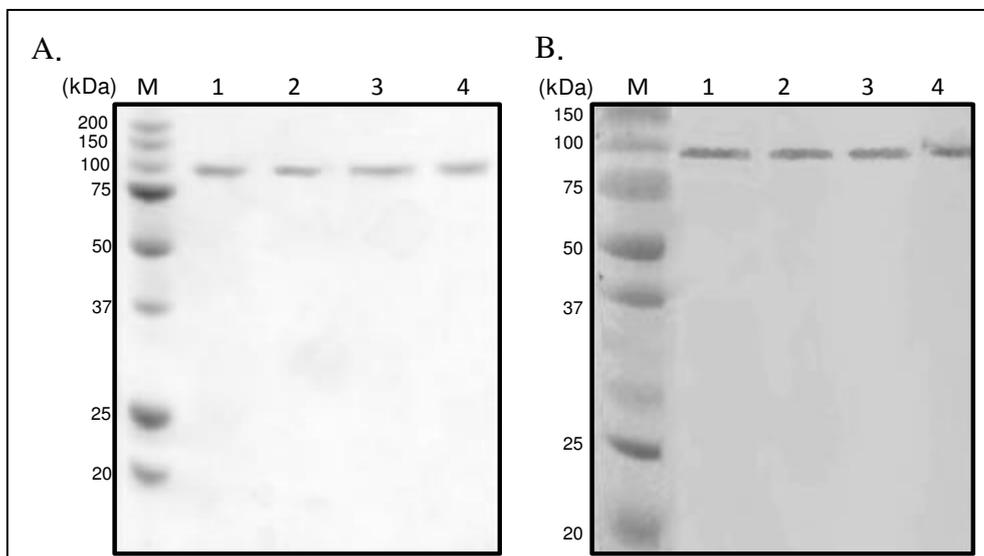


Figure 27 : Analyse par SDS-PAGE et immunoempreinte des fractions purifiées d'enzymes recombinantes

Piste M : marqueur de taille ; Piste 1 : LOX1 d'olive sauvage ; Piste 2 : mutant F277A ; Piste 3 : mutant Y280I ; Piste 4 : double mutant F277A/Y280I. (A) analyse par SDS-PAGE (12% acrylamide) des fractions purifiées par chromatographie d'affinité (15µg de protéines), coloration réalisée avec le réactif EZ Blue Staining Reagent (Sigma). (B) analyse par immunoempreinte (0,5 µg), révélation par un anticorps anti-polyHistidine.

Une seule bande de 98 kDa a été observée, ce qui correspond à la masse moléculaire attendue pour la LOX1 d'olive et les mutants.

Afin de vérifier que les différences d'activité spécifique ne sont pas dues à une perte de l'atome de fer, les quantités de fer ont été mesurées pour l'enzyme recombinante sauvage et les enzymes mutées F277A, Y280I et F277A/Y280I. Elles sont respectivement égales à $0,62 \pm 0,04$, $0,70 \pm 0,03$, $0,65 \pm 0,04$ et $0,54 \pm 0,03$ mole par mole d'enzyme, indiquant que les enzymes n'ont pas perdu l'atome de fer catalytique après purification. Les protéines recombinantes présentent le même niveau de pureté, et contiennent les mêmes quantités de fer : l'activité spécifique différente mesurée pour chacune des enzymes semble indiquer que les mutations entraînent une augmentation de l'activité enzymatique.

b. Effet des mutations de la LOX1 d'olive sur l'hydroperoxydation de l'acide linoléique et de l'acide linoléique

L'effet des mutations a été étudié dans un premier temps sur les paramètres cinétiques de l'enzyme, puis dans un second temps sur la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive.

i. Influence des mutations sur les paramètres cinétiques de la LOX1 d'olive

Les paramètres cinétiques de l'enzyme recombinante sauvage et des mutants ont été déterminés pour l'acide linoléique et l'acide linoléique. Les constantes de Michaelis K_m et les constantes catalytiques k_{cat} sont indiquées dans le Tableau V.

Tableau V : Paramètres cinétiques des enzymes recombinantes WT, F277A, Y280I et du double mutant F277A/Y280I

	Acide linoléique		Acide linoléique	
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
WT	20,78	0,47	40,58	0,08
F277A	2,76	2,36	24,90	0,22
Y280I	4,44	0,35	5,72	0,72
F277A/Y280I	4,07	2,77	11,23	1,25

Les constantes cinétiques de la LOX1 d'olive WT pour l'acide linoléique et l'acide linoléique montrent que le substrat préférentiel de l'enzyme est l'acide linoléique, comme cela a été décrit précédemment (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). Le K_m mesuré pour l'acide linoléique (20,78 μM) n'est pas significativement inférieur au K_m mesuré pour l'acide linoléique (40,58 μM). Les valeurs de k_{cat} mesurées (0,47 s^{-1} pour l'acide linoléique et 0,08 s^{-1} pour l'acide linoléique) suggèrent cependant que l'efficacité catalytique de la LOX1 d'olive est supérieure pour l'hydroperoxydation de l'acide linoléique que pour celle de l'acide linoléique.

Il existe des différences significatives entre nos résultats et ceux publiés précédemment (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009) : dans l'étude antérieure, les valeurs de

K_m mesurées pour l'acide linoléique et pour l'acide linoléique étaient égales respectivement à 174,94 μM et 343,66 μM . De la même manière, les valeurs de k_{cat} mesurées étaient égales à 48,61 s^{-1} et 47,78 s^{-1} pour l'acide linoléique et l'acide linoléique. Hughes *et al.* (2001b) ont rapporté des résultats similaires obtenus avec une 9/13-LOX de pois recombinante : les différences observées sont en grande partie dues aux concentrations des enzymes utilisées lors des mesures, ainsi qu'aux méthodes de purification. Lors de la détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme, la gamme des concentrations du substrat doit être adaptée à la concentration de l'enzyme. Le K_m est déterminé à partir des valeurs des vitesses initiales de la réaction enzymatique. Le degré de pureté de l'enzyme et la quantité d'enzyme utilisée influent sur la mesure de ces vitesses initiales. Une quantité trop importante d'enzyme peut gêner la mesure des vitesses initiales : la réaction étant trop rapide, les valeurs de vitesses mesurées ne représentent pas la vitesse initiale de la réaction. De ce fait, les conditions de mesure des vitesses peuvent introduire un biais dans la détermination des paramètres cinétiques. Nous avons utilisé une méthode de purification différente, de faibles quantités d'enzymes (1 μg d'enzyme contre 4 μg d'enzyme dans l'étude précédente), ainsi que de plus faibles concentrations en substrat, ce qui explique probablement l'obtention de plus faibles valeurs de K_m .

Les niveaux de pureté identiques pour chacune des enzymes recombinantes et l'utilisation de quantités identiques de protéines dans les essais permettent la comparaison entre l'enzyme recombinante sauvage et les mutants de la LOX1 d'olive.

Lorsque le mutant F277A est comparé à l'enzyme sauvage, l'affinité de l'enzyme pour l'acide linoléique est améliorée d'un facteur 7,5 ($K_m = 2,76 \mu\text{M}$) et le k_{cat} augmente d'un facteur 5 ($k_{cat} = 2,36 \text{s}^{-1}$). L'affinité du mutant Y280I pour l'acide linoléique ($K_m = 4,44 \mu\text{M}$) est supérieure à celle de l'enzyme WT d'un facteur 4,7, mais le k_{cat} est sensiblement identique ($k_{cat} = 0,35 \text{s}^{-1}$). Le double mutant F277A/Y280I comparé à l'enzyme WT possède une affinité améliorée d'un facteur 5 ($K_m = 4,07 \mu\text{M}$) et un k_{cat} augmenté d'un facteur 5,9 ($k_{cat} = 2,77 \text{s}^{-1}$) pour l'acide linoléique. Ces mutants ont donc une efficacité catalytique améliorée pour l'hydroperoxydation de l'acide linoléique comparée à l'enzyme sauvage.

Le mutant F277A a une affinité ($K_m = 24,90 \mu\text{M}$) qui n'est pas significativement différente de celle de l'enzyme WT ($K_m = 40,58 \mu\text{M}$) pour l'acide linoléique. Le k_{cat}

est augmenté d'un facteur 2,75 ($k_{cat} = 0,22 \text{ s}^{-1}$). Le mutant Y280I a une affinité augmentée d'un facteur 7 ($K_m = 5,72 \text{ }\mu\text{M}$) et un k_{cat} augmenté d'un facteur 9 ($k_{cat} = 0,72 \text{ s}^{-1}$). L'affinité du mutant F277A/Y280I pour l'acide linoléique est augmentée d'un facteur 3,6 ($K_m = 11,23 \text{ }\mu\text{M}$) et son k_{cat} est augmenté d'un facteur 16 ($k_{cat} = 1,25 \text{ s}^{-1}$). Ces mutants ont une efficacité catalytique améliorée pour l'hydroperoxydation de l'acide linoléique comparée au WT. Pour les mutations simples, cette amélioration est plus marquée pour le mutant Y280I.

Il peut être difficile d'identifier le rôle de chacune des mutations dans la résultante de leurs effets combinés dans un double mutant. D'un point de vue mathématique, il a été montré que l'effet de la seconde mutation ne peut influencer sur l'effet de la première mutation que selon l'une des cinq possibilités suivantes : additive, partiellement additive, synergique, antagoniste ou sans effet (Mildvan *et al.*, 1992 ; Mildvan, 2004). Mildvan (2004) a proposé le concept de « *inverse thinking* » pour analyser les interactions entre les effets des mutations individuelles dans le double mutant. En accord avec ce concept, ce sont les paramètres du double mutant qui sont utilisés comme référence. Un k_{cat} relatif est déterminé pour chaque simple mutant et pour l'enzyme sauvage : il est calculé par le rapport $k_{cat}^{rel}(\text{WT}) = k_{cat}^{WT}/k_{cat}^{F277A/Y280I}$ ou $k_{cat}^{rel}(\text{simple mutant}) = k_{cat}^{mutant}/k_{cat}^{F277A/Y280I}$. Les données sont ensuite représentées graphiquement comme le logarithme du k_{cat}^{rel} de chaque enzyme. Cette valeur résulte donc de la restauration de chaque résidu séparément par rapport au double mutant, et de la restauration des deux résidus mutés par rapport au double mutant (Figure 28). En utilisant cette méthode, nous avons étudié l'interaction entre les effets des deux simples mutations F277A et Y280I sur la catalyse de l'hydroperoxydation de l'acide linoléique et de l'acide linolénique dans le double mutant F277A/Y280I de l'enzyme.

En ce qui concerne l'acide linoléique, la restauration du résidu Y280 (qui correspond au mutant F277A) induit une diminution du k_{cat} de $10^{0,07}$ fois ($\approx 1,2$), alors que la restauration du résidu F277A (qui correspond au mutant Y280I) induit une diminution du k_{cat} de $10^{0,9}$ fois ($\approx 7,9$). La restauration des deux résidus F277 et Y280 (qui correspond donc à l'enzyme sauvage), s'il n'y a pas d'interaction entre eux, se calcule par le produit des effets de la restauration des deux résidus pris individuellement : $10^{0,9} \times 10^{0,07} = 10^{0,97}$ c'est-à-dire $\approx 9,3$. Or, la restauration de ces deux résidus décroît la valeur du k_{cat} de $10^{0,77}$ fois ($\approx 5,9$), ce qui est $10^{0,2}$ fois ($\approx 1,6$) inférieur au produit des effets de la restauration des deux résidus pris

individuellement ($10^{0,97}$), ce qui tend à montrer un effet antagoniste de ces résidus sur la catalyse de l'hydroperoxydation de l'acide linoléique.

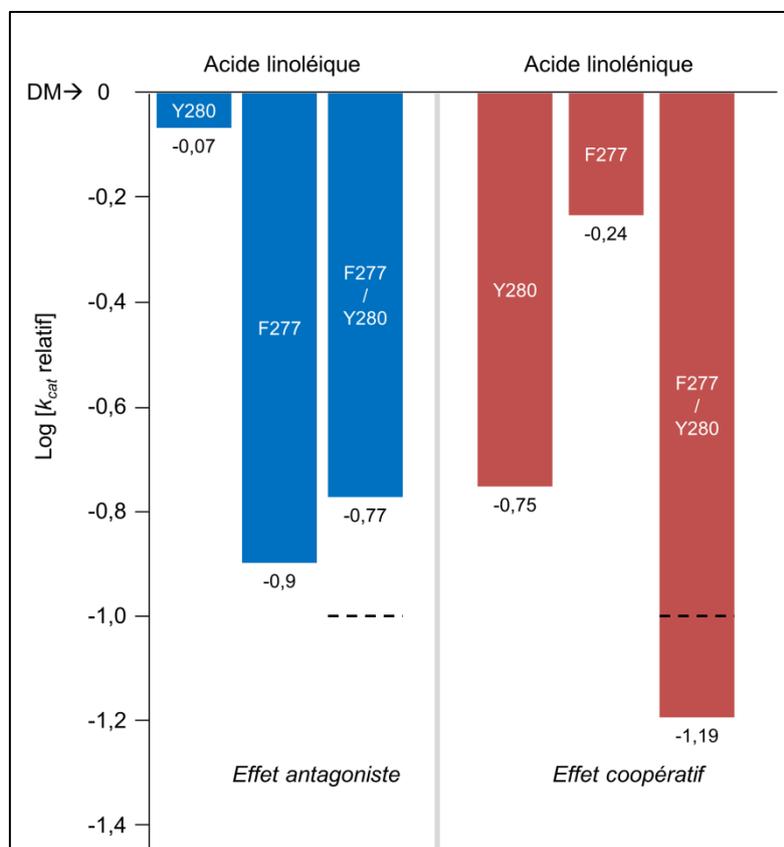


Figure 28 : Interaction entre les effets des deux simples mutations sur la catalyse (k_{cat}) réalisée par le double mutant F277A/Y280I (DM)

La référence utilisée est le k_{cat} du double mutant, conformément à la méthode de Mildvan (2004). L'analyse par cette méthode montre les effets de la restauration individuelle des résidus, puis par paire. Le résidu noté en blanc correspond au résidu restauré. Les valeurs correspondent donc aux enzymes F277A, Y280I et WT. Les lignes pointillées représentent la valeur du k_{cat} théorique si les deux résidus F277 et Y280 sont restaurés (enzyme WT) et que l'interaction entre les effets de ces mutations est simplement additive. Une valeur expérimentale différant de ces valeurs théoriques indique une interaction de type coopérative, synergique ou antagoniste entre les effets des résidus F277 et Y280 sur la catalyse.

L'interaction des effets des simples mutations sur la catalyse de l'hydroperoxydation de l'acide linoléénique a été étudiée de la même manière. La restauration du résidu F277 seul diminue le k_{cat} d'un facteur $10^{0,24}$ ($\approx 1,7$), et la restauration du résidu Y280 seul diminue le k_{cat} d'un facteur $10^{0,75}$ ($\approx 5,6$). La restauration des deux résidus F277 et Y280 (enzyme sauvage), s'il n'y a pas d'interaction entre eux, se calcule par le produit des effets de la restauration des

deux résidus pris individuellement : $10^{0,24} \times 10^{0,75} = 10^{0,99}$ c'est-à-dire $\approx 9,8$. La restauration des deux résidus à la fois diminue le k_{cat} d'un facteur $10^{1,19}$ ($\approx 15,5$) qui est supérieur au produit des effets de la restauration individuelle de chaque résidu (d'un facteur $10^{0,2}$, soit $\approx 1,6$). Ce résultat montre un effet coopératif de ces deux résidus sur la catalyse de l'hydroperoxydation de l'acide linoléique.

La modification des résidus F277 et Y280 entraîne donc une modification des paramètres cinétiques de l'enzyme. Le remplacement de ces résidus par des résidus moins encombrants permet d'améliorer l'efficacité réactionnelle de l'enzyme. Nos résultats montrent que les résidus F277 et Y280 seraient bien localisés à l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive.

ii. *Influence des mutations F277A et Y280I sur la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive*

L'effet des mutations des résidus F277 et Y280 sur la régiospécificité et la stéréospécificité de l'enzyme a été déterminé par l'analyse des produits formés après action de chacun des trois mutants lors de l'hydroperoxydation de l'acide linoléique (Figure 29).

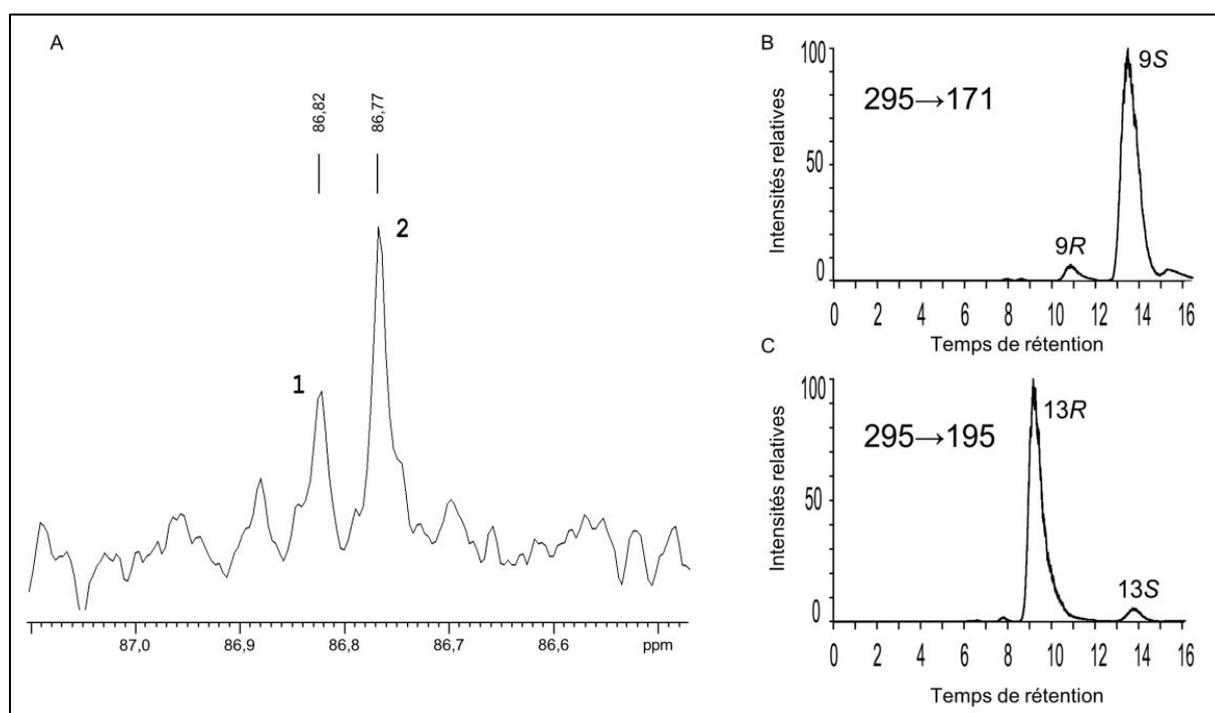


Figure 29 : Identification des produits formés lors de la transformation de l'acide linoléique par les mutants de LOX1 d'olive par RMN du carbone 13 (A) et par CP-HPLC-MS/MS (B et C)

Les résultats présentés ici pour le mutant F277A sont représentatifs de toutes les expériences. En A, une portion du spectre RMN du carbone 13 (87,0 à 86,6 ppm). En B, le chromatographe reconstitué de la séparation des énantiomères *R* et *S* du 9-HPOD. En C, le chromatographe reconstitué montre la séparation des énantiomères *R* et *S* du 13-HPOD,

Les analyses par RMN du carbone 13 ont montré que les mutants F277A, Y280I et le double mutant F277A/Y280I produisent de la même manière que la LOX1 d'olive sauvage des acides 9-hydroperoxyoctadécadiénoïques et 13-hydroperoxyoctadécadiénoïques (9-HPOD et 13-HPOD) dans des proportions 2:1 (Figure 29A) : le premier pic (1, 86,82 ppm) correspond au 13^e carbone de l'acide linoléique portant une fonction hydroperoxyde (13-HPOD). Le second pic (2, 86,77 ppm) correspond au 9^e carbone de l'acide linoléique portant une fonction hydroperoxyde (9-HPOD). La chiralité de ces composés a été déterminée par HPLC en phase chirale couplée à un spectromètre de masse en tandem (CP-HPLC MS/MS). La masse de l'ion spécifique des 9-HPOD est égale à 171, l'élution de cet ion est suivie pour reconstruire le chromatogramme de la Figure 29B : parmi les deux stéréoisomères, le composé 9*S*-HPOD est majoritaire. La masse de l'ion spécifique des 13-HPOD est égale à 195, l'élution de cet ion est suivie pour reconstruire le chromatogramme de la Figure 29C : parmi les deux stéréoisomères, le composé 13*S* est majoritaire. L'intégration des aires des pics montre que le rapport 9*S*-HPOD:13*R*-HPOD est égal à 2:1. Les mutations n'ont donc pas d'influence sur la régiospécificité, sur la stéréospécificité ou sur le rapport entre les produits formés par l'enzyme.

Les taux de conversion de l'acide linoléique évalués par RMN du carbone 13 atteignent environ 25% pour l'enzyme sauvage et plus de 98% pour chacun des mutants (résultats non montrés). La substitution des résidus F277 et Y280 par des résidus moins encombrants sur la LOX1 d'olive augmente de manière importante le taux de conversion de l'acide linoléique, probablement en facilitant l'entrée du substrat dans le site actif de l'enzyme.

iii. Rôle des résidus F277 et Y280 dans la pénétration du substrat dans le site actif de la LOX1 d'olive

L'entrée du substrat dans le site actif de la LOX1 de soja a été étudiée par Minor *et al.* (1996) : il a été suggéré que la pénétration du substrat requiert le mouvement des chaînes latérales de résidus positionnés sur les hélices α_2 et α_{11} , et plus particulièrement de la thréonine 259 présente sur l'hélice α_2 . L'acide aminé correspondant chez la LOX1 d'olive, la leucine 282, n'est probablement pas impliqué

dans ce phénomène, sa chaîne latérale étant éloignée de l'entrée du site actif et du canal du site actif (Figure 30).

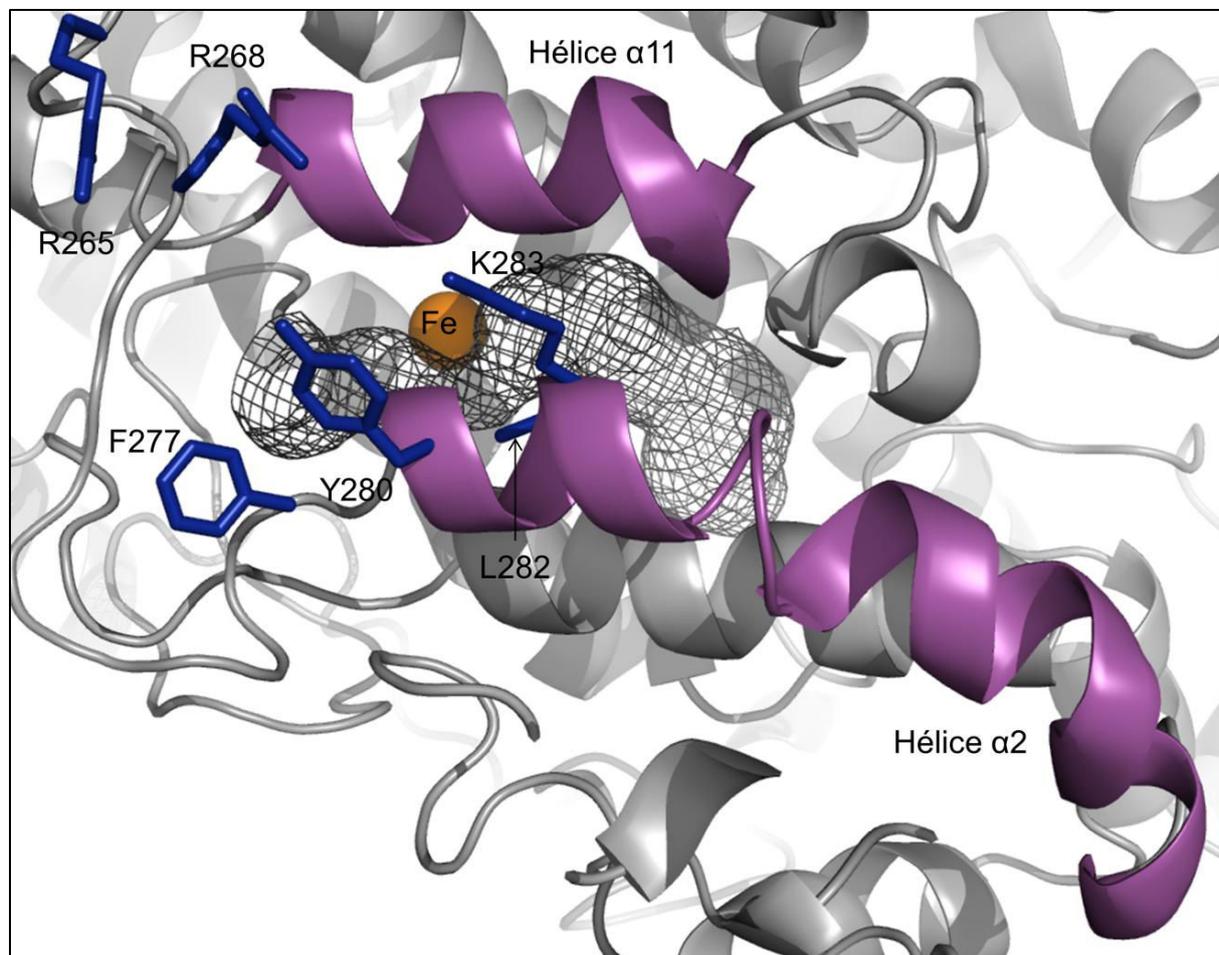


Figure 30 : Vue de la structure secondaire entourant l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive

La structure secondaire de la LOX1 d'olive modélisée apparaît en gris. Les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 11$ sont représentées en violet, les résidus entourant l'entrée du site actif F277 et Y280 sont représentés en bleu. La position du site actif apparaît comme un grillage gris, passant devant l'atome de fer catalytique représenté par une sphère orange. La leucine 282 est visible en arrière de la chaîne $\alpha 2$. Trois résidus chargés positivement encadrent l'entrée du site actif, les résidus R265, R268 et K283.

En revanche, sur notre modèle, il est important de noter la présence sur l'hélice $\alpha 2$ du résidu tyrosine 280 (Y280), localisé à proximité du résidu phénylalanine 277 (F277), tous deux ayant des chaînes latérales pointant vers l'entrée du site actif. Les atomes les plus proches de ces résidus sont distants de 3,19 Å. La pénétration du substrat dans le site actif de la LOX1 d'olive pourrait donc nécessiter le mouvement des chaînes latérales de ces résidus encombrants. La substitution de

F277 par un résidu alanine moins encombrant pourrait permettre un réarrangement spatial de la chaîne latérale du résidu en position 280, qu'il s'agisse de la tyrosine (mutant F277A) ou de l'isoleucine (mutant F277A/Y280I), facilitant ainsi la pénétration du substrat dans le site actif de la LOX1 d'olive. Cependant, le réarrangement de la chaîne latérale de la tyrosine 280, tel qu'il pourrait se produire chez le mutant F277A ne semble pas aussi efficace pour faciliter l'accès de l'acide linoléique au site actif en comparaison de l'acide linoléique. Lorsque la tyrosine 280 est remplacée par l'isoleucine, résidu moins encombrant, le groupement phényle de la phénylalanine 277 peut présenter une plus grande liberté de mouvement, ce qui pourrait induire des réarrangements spatiaux de chaînes latérales des résidus constituant l'hélice α_2 et aussi faciliter l'entrée du substrat dans le site actif. Les mouvements de chaînes latérales de ces résidus semblent donc d'une importance capitale dans la pénétration du substrat dans le site actif de la LOX1 d'olive sauvage.

Le résidu F277 est très conservé à la fois chez les végétaux et les animaux, alors que la tyrosine 280 de la LOX1 d'olive est un résidu très conservé chez les végétaux uniquement (Figure 25). Nos résultats montrent que la suppression de l'encombrement stérique à l'entrée de la poche catalytique entraîne une augmentation de l'efficacité catalytique : le remplacement des résidus encombrants F277 et Y280 par des résidus plus petits pourraient entraîner une réorganisation locale de la structure de l'enzyme, ce qui faciliterait la pénétration à la fois de l'acide linoléique et de l'acide linoléique dans le site actif de l'enzyme. Les résidus F277 et Y280 peuvent par conséquent être considérés comme des déterminants importants de l'accessibilité du substrat au site actif des LOX végétales.

Le résidu correspondant à F277 chez la 8*R*-LOX de corail est la tyrosine 179 (Figure 25). Les mouvements simultanés de chaînes latérales de plusieurs résidus, dont la tyrosine 179, seraient nécessaires pour faciliter l'entrée de l'acide arachidonique dans le site actif (Oldham *et al.*, 2005 ; Ivanov *et al.*, 2010). De plus, le résidu F277 étant également très conservé chez les LOX de mammifères, il pourrait être considéré comme déterminant majeur de l'accessibilité du substrat au site actif.

Un second mécanisme a été proposé pour la pénétration du substrat dans le site actif de la 12/15-LOX de lapin par Choi *et al.* (2008) : l'entrée du substrat dans le site actif de cette LOX requiert un mouvement majeur d'éléments de la structure secondaire (hélice α_2). Le résidu F175 correspond au résidu F277 de la LOX1

d'olive. Cette phénylalanine est localisée sur un segment mobile lors du passage de la forme ouverte à la forme fermée. Elle pourrait donc jouer un rôle différent chez la 12/15-LOX de lapin dans le déplacement de l'hélice $\alpha 2$.

La modification des résidus F277 et Y280 a permis de montrer qu'ils définissent la localisation de l'entrée du site actif. Plusieurs résidus chargés positivement sont présents autour des résidus F277 et Y280 chez la LOX-1 d'olive (Figure 25). Des résidus chargés à l'entrée du site actif pourraient jouer un rôle dans la stabilisation du substrat comme cela a été suggéré par Neau *et al.* (2009).

3. Etude de déterminants potentiellement impliqués dans le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive

Après avoir identifié l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive, nous avons étudié l'importance de résidus localisés à l'entrée du site actif. Par la suite, nous avons étudié différents résidus qui seraient impliqués dans le mécanisme catalytique (Figure 31). La possibilité pour des résidus chargés localisés à l'entrée du site actif de stabiliser les acides gras libres dans le site en neutralisant la charge du groupement carboxylique a été décrite dans la littérature. Nous avons étudié les résidus chargés positivement R265, R268 et K283 localisés à l'entrée du site actif, qui pourraient jouer ce rôle. Nous avons ensuite étudié les déterminants de la régiospécificité décrits dans la littérature, le résidu V583, déterminant de Sloane, et le résidu S517, déterminant de Borngräber.

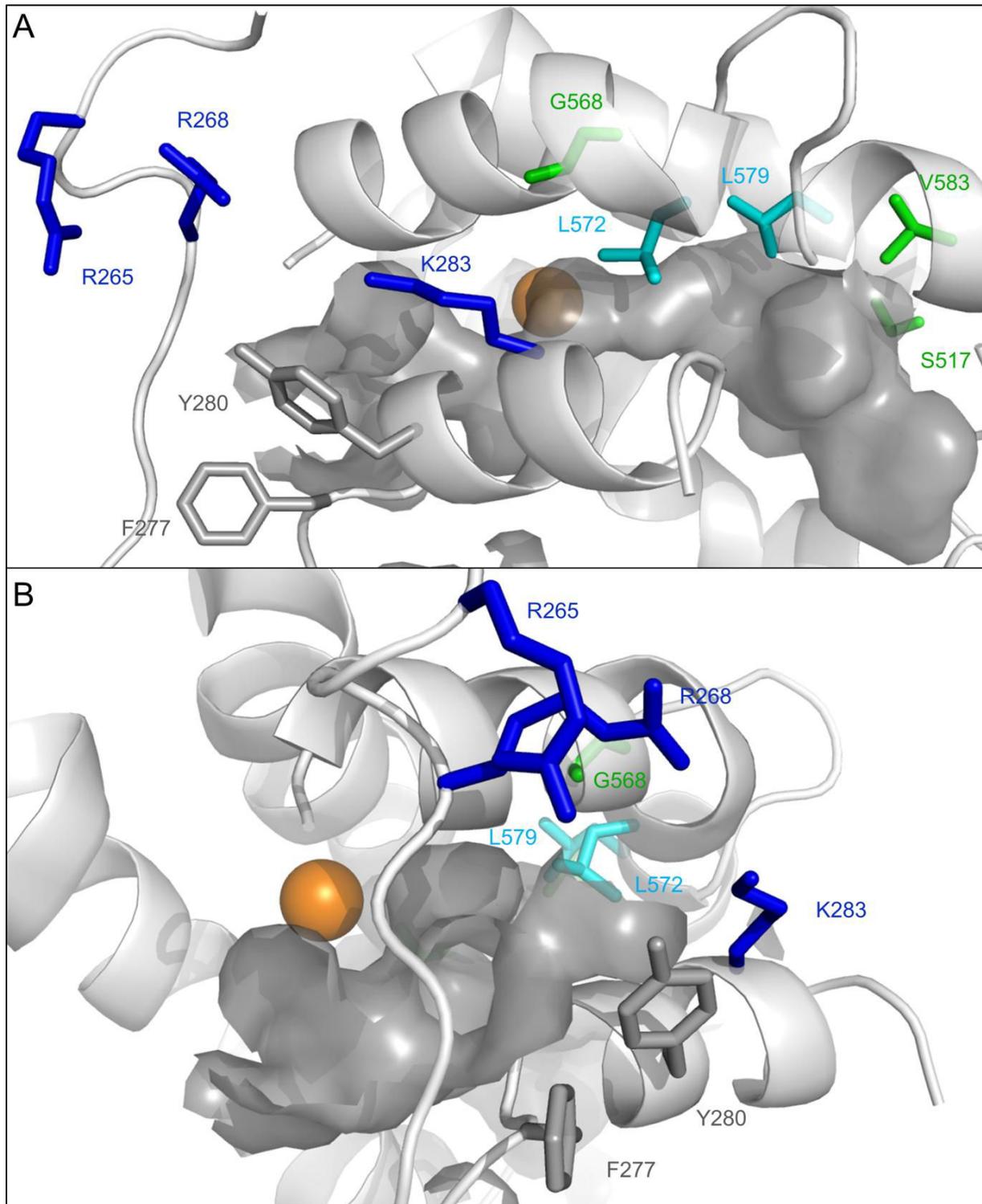


Figure 31 : Site actif de la LOX1 d'olive modélisé par CASTp

A, vue de profil du site actif de la LOX1 d'olive modélisé par CASTp, coloré en gris foncé. La structure secondaire de l'enzyme, apparaît en gris clair. L'atome de fer catalytique apparaît comme une sphère orange. Les résidus définissant l'entrée du site actif F277 et Y280 sont colorés en gris foncé, des résidus chargés positivement entourant cette entrée, R265, R268 et K283 sont colorés en bleu. Des résidus impliqués dans la régiospécificité et la stéréospécificité sont représentés : V583, S517 et G568 (vert). Deux résidus conservés peuvent jouer un rôle dans le positionnement du substrat, L572, et dans le ciblage de l'oxygène, L579 (cyan). B, rotation à 90° sur l'axe horizontal de la vue présentée en A, permettant de voir la position relative des résidus chargés par rapport à l'entrée du site actif.

Nous nous sommes également intéressés au déterminant de Coffa, G568, responsable de la stéréospécificité. Les deux résidus localisés à proximité de l'atome de fer catalytique qui peuvent jouer un rôle important dans le positionnement du substrat dans le site actif ou dans le ciblage de l'oxygène dans le site actif, les résidus L572 et L579, respectivement, ont également été étudiés.

a. L'importance des charges situées à l'entrée du site actif

L'entrée du site actif de la LOX1 d'olive est constituée des résidus encombrants F277 et Y280, mais également de résidus chargés R265, R268 et K283 (Figure 32). Le résidu K273, qui est également un résidu conservé (Figure 25), ne semble pas orienté vers l'entrée du site actif sur notre modèle tridimensionnel. En revanche, les chaînes latérales des résidus R265, R268 et K283 pointent toutes trois vers l'entrée du site actif.

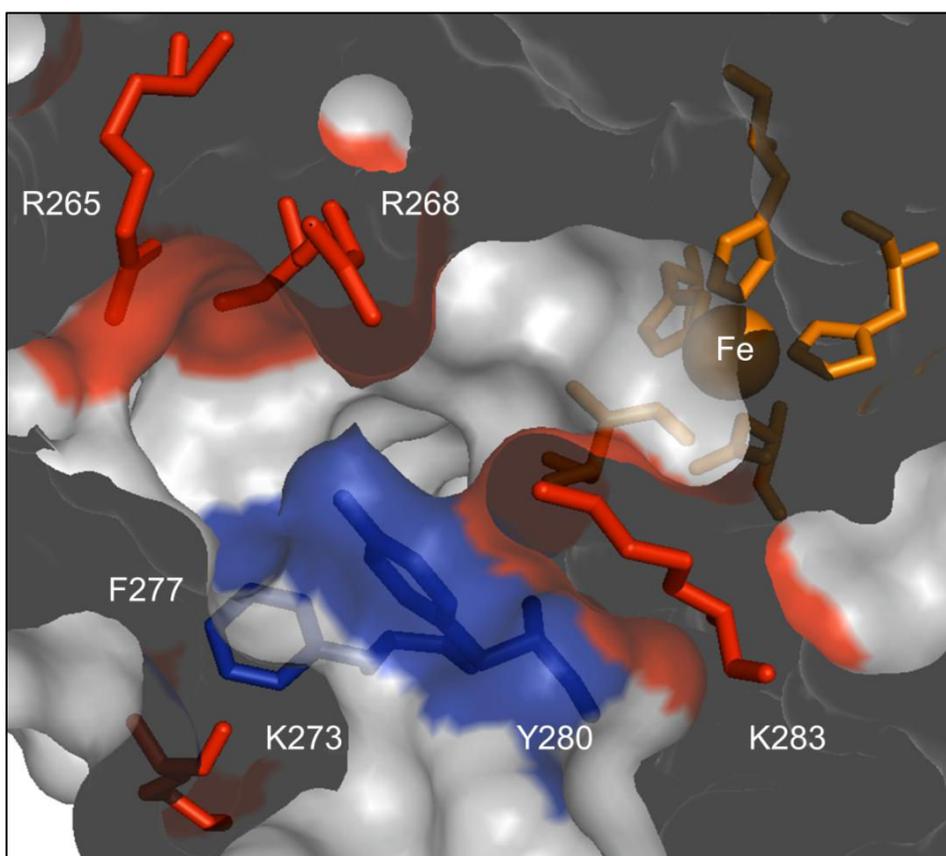


Figure 32 : Résidus chargés de l'entrée du site actif

La surface gris clair représente la surface accessible au solvant. Les parties gris foncé correspondent au plan de coupe. Les résidus F277 et Y280 définissant l'entrée du site actif apparaissent en bleu. Dans le fond, l'atome de fer et ses ligands sont représentés en orange. Les quatre résidus chargés entourant l'entrée du site apparaissent en rouge. Les arginines 265 et 268 surplombent les résidus F277 et Y280, la lysine 283 se situe juste à côté du résidu Y280. Seule la lysine 273, en bas à gauche, pointe en dehors de l'entrée du site actif.

Afin de vérifier l'implication des charges de ces résidus dans le mécanisme catalytique, et plus précisément dans l'interaction avec le groupement carboxylique du substrat, trois mutants de la LOX1 d'olive ont été construits où chaque résidu a été remplacé par une glutamine. La glutamine a été choisie car elle permet de supprimer la charge tout en conservant un caractère polaire, ainsi qu'une certaine longueur de chaîne latérale. Ces trois mutants sont appelés R265Q, R268Q et K283Q. Leur caractérisation biochimique a été réalisée par la détermination des paramètres cinétiques et l'identification des produits formés par leur action sur les acides linoléique et linoléinique.

i. Effet des mutations sur les caractéristiques biochimiques de l'enzyme

Les mesures des paramètres cinétiques ont été réalisées en utilisant l'acide linoléique et l'acide linoléinique comme substrats (Tableau VI).

Tableau VI : Paramètres cinétiques de la LOX1 WT et des mutants R265Q, R268Q et K283Q

	Acide linoléique		Acide linoléinique	
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
WT	6,98	11,96	31,03	5,76
R265Q	3,26	12,29	7,95	5,04
R268Q	8,38	19,82	8,43	3,98
K283Q	7,47	5,07	1,58	0,68

Les paramètres cinétiques de l'enzyme WT présentent quelques différences par rapport à la préparation précédente (Tableau V). Ces variations peuvent être dues à la modification de la méthode de purification : le processus de purification en une étape a été automatisé, utilisant une chromatographie d'affinité avec la résine Talon Superflow Metal Affinity (Clontech) par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Akta Purifier, GE Healthcare).

L'affinité des mutants R265Q ($K_m = 3,26 \mu\text{M}$) et R268Q ($K_m = 8,38 \mu\text{M}$) pour l'acide linoléique est peu différente de celle mesurée pour l'enzyme WT ($K_m = 6,98 \mu\text{M}$). Les valeurs de k_{cat} varient peu. La modification de ces résidus ne semble pas avoir d'effet sur l'activité enzymatique en ce qui concerne l'acide linoléique. L'affinité du mutant K283Q ($K_m = 7,47 \mu\text{M}$) ne semble pas modifiée en comparaison de l'enzyme WT. En revanche, le k_{cat} ($k_{cat} = 5,07 \text{ s}^{-1}$) est diminué d'un facteur 2 en comparaison de l'enzyme WT.

En ce qui concerne l'acide linoléique, l'affinité est augmentée d'un facteur 3,9, 3,7 et 19,6 respectivement pour les mutants R265Q ($K_m = 7,95 \mu\text{M}$), R268Q ($K_m = 8,43 \mu\text{M}$) et K283Q ($K_m = 1,58 \mu\text{M}$). Les valeurs de k_{cat} sont similaires en ce qui concerne les mutants R265Q ($k_{cat} = 5,04 \text{ s}^{-1}$) et R268Q ($k_{cat} = 3,98 \text{ s}^{-1}$) comparées à l'enzyme WT ($k_{cat} = 5,76 \text{ s}^{-1}$). En revanche, la valeur de k_{cat} du mutant K283Q ($k_{cat} = 0,68 \text{ s}^{-1}$) est très faible par rapport à celui de l'enzyme WT.

Des réactions de synthèse d'hydroperoxydes à partir d'acide linoléique et d'acide linoléique ont été réalisées afin de déterminer si la perte de l'une des charges à l'entrée du site actif a un impact sur la régiospécificité et la stéréospécificité des hydroperoxydes formés par action de la LOX1 d'olive.

ii. Influence de la modification des résidus R265, R268 et K283 sur la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive

Les produits obtenus après action de la LOX1 WT et des mutants sur l'acide linoléique et sur l'acide linoléique ont été analysés par CP-HPLC/MS-MS (Tableau VII). La présence d'un seul stéréoisomère pour chacun des régioisomères exclut une autooxydation des substrats, confirmant donc qu'il s'agit d'une activité enzymatique.

Tableau VII : Proportions des régioisomères et stéréoisomères synthétisés par la LOX1 d'olive WT et les mutants R265Q, R268Q et K283Q

	HPOD		HPOT	
	9S (%)	13R (%)	9S (%)	13R (%)
WT	68	32	43	57
R265Q	71	29	33	67
R268Q	72	28	47	53
K283Q	76	24	49	51

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité totale d'hydroperoxydes formés. HPOD : acide hydroperoxyoctadécadiénoïque ; HPOT : acide hydroperoxyoctadécatriénoïque.

La LOX1 d'olive WT produit principalement des 9*S*-HPOD et des 13*R*-HPOD dans un rapport 2:1 à partir d'acide linoléique. Lorsque les réactions sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, la tendance à former des 9*S*-HPOD semble légèrement favorisée chez le mutant K283Q, et le rapport 9*S*-HPOD:13*R*-HPOD devient égal à 3:1. Lorsque les réactions sont réalisées sur l'acide linoléique, la LOX1 d'olive WT produit environ autant de 9*S*-HPOT que de 13*R*-HPOT. Ce rapport ne varie pas pour les mutants R268Q et K283Q. En revanche, la formation de 13*R*-HPOT est favorisée pour le mutant R265Q, puisque le rapport 9*S*-HPOT:13*R*-HPOT devient égal à 1:2.

La modification des résidus R265, R268 et K283 situés à l'entrée du site actif n'induit pas de modification majeure de la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive.

iii. Effet de la charge de l'acide gras sur la catalyse

L'utilisation de l'ester méthylique de l'acide linoléique permet de supprimer la charge de l'acide gras, sans présenter une modification majeure de l'encombrement stérique du substrat. Une réaction de synthèse d'hydroperoxydes par la LOX1 d'olive WT a été réalisée et seul un produit de réaction, le 9*S*-HPOD, formé à un taux très faible, a pu être identifié par CP-HPLC-MS/MS. Ce résultat montre que le substrat commercial utilisé contient de faibles quantités d'acide linoléique non méthylé qui a été le substrat de la réaction. Il semble donc que le méthyl-linoléate n'est pas un substrat pour la 9/13-LOX1 d'olive. Ce résultat permet de supposer que la charge du substrat est nécessaire à une interaction avec l'enzyme, lors du recrutement du substrat ou lors de sa stabilisation au sein du site catalytique.

iv. Rôle des résidus R265, R268 et K283 dans la pénétration du substrat dans le site actif

Le résidu R265 est très conservé parmi les séquences de LOX (Figure 25). Le résidu R268 est également conservé, mais peut être remplacé par des résidus polaires : asparagine, glutamine, acide glutamique, lysine ou thréonine. De manière ponctuelle, il peut également être remplacé par un résidu hydrophobe, alanine ou valine. Le résidu K283 est très conservé, parfois remplacé par des résidus polaires (glutamine, arginine, sérine). Quelques résidus apolaires sont également retrouvés de manière ponctuelle. La présence de résidus polaires à l'entrée du site actif semble donc être une constante chez de très nombreuses LOX animales et végétales. Les mutants R265Q, R268Q et K283Q ont été produits afin d'étudier le rôle des charges

présentes à l'entrée du site actif dans la stabilisation de l'extrémité carboxylate du substrat. D'après le modèle tridimensionnel, les chaînes latérales pointent vers l'entrée du site. Une interaction de type électrostatique pourrait donc favoriser l'entrée du substrat dans le site actif, et également le stabiliser pour qu'il soit positionné correctement en vue de la catalyse. La modification des résidus R265, R268 et K283 entraîne une augmentation plus ou moins importante de l'espace situé à l'entrée du site actif, en fonction de la mutation introduite (Figure 33).

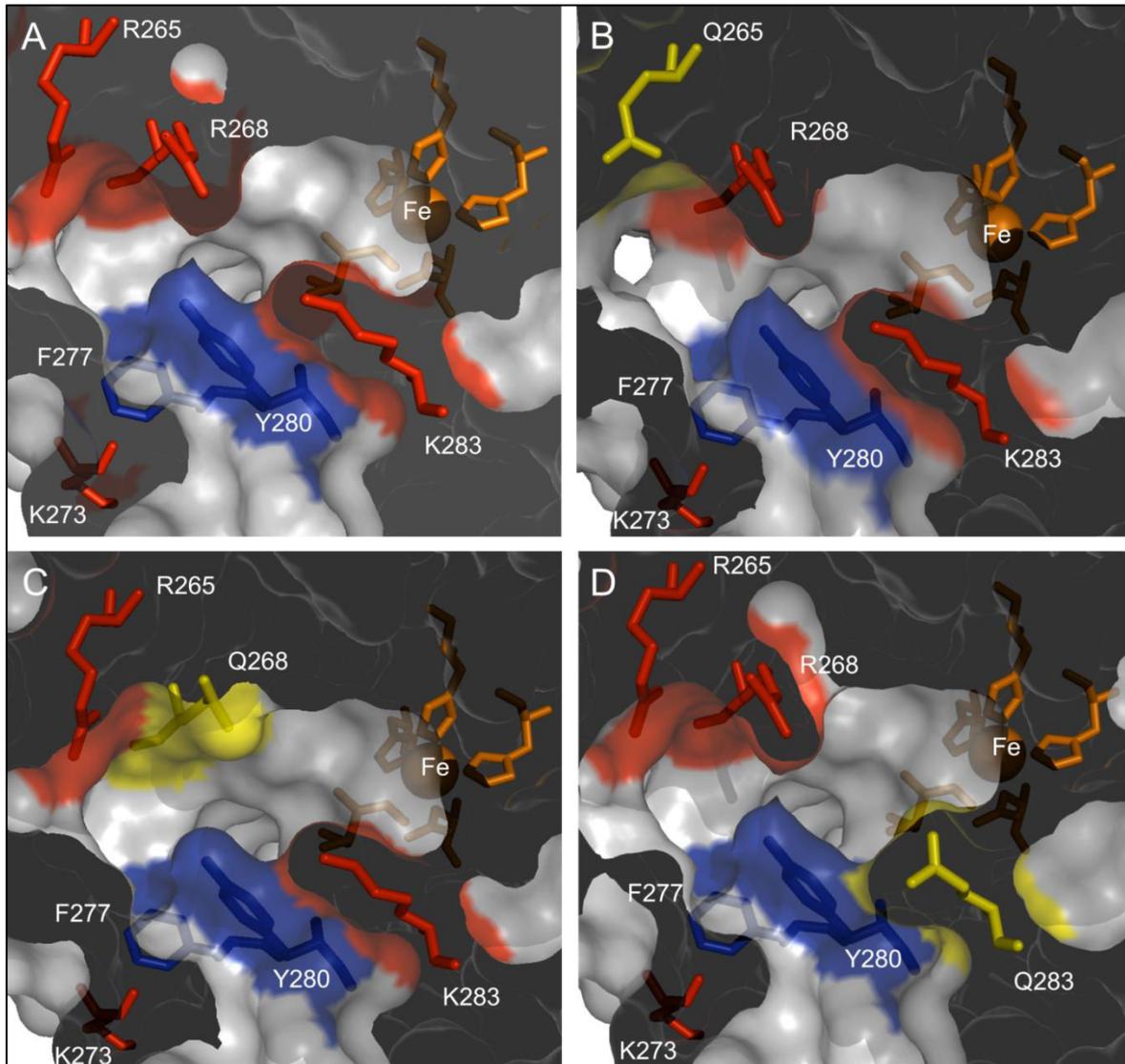


Figure 33 : Modélisation de la modification des résidus R265, R268 et K283 de la LOX1 d'olive

Les résidus F277 et Y280 sont représentés en bleu. Les résidus R265, R268 et K283 sont représentés en rouge et les modifications apparaissent en jaune. A, l'entrée du site actif de la LOX1 WT. B, la modification Q265 permet une extension de l'ouverture du site actif importante. C, La modification Q268 semble avoir peu d'influence sur l'espace ouvert devant le site actif. La chaîne latérale plus courte de la glutamine libère l'espace au-dessus de la chaîne latérale de la tyrosine 280. D, la modification Q283 réduit la longueur de la chaîne latérale de ce résidu. L'espace semble un peu plus ouvert.

Nos résultats semblent indiquer que les résidus R265 et R268 sont peu importants au regard de la pénétration de l'acide linoléique, puisque leur modification n'entraîne pas de changement majeur dans les paramètres cinétiques. L'augmentation de l'espace disponible à l'entrée du site actif, associée à la relative flexibilité de l'acide linoléique, peuvent expliquer la conservation des paramètres cinétiques des mutants R265Q et R268Q. Les résidus R265 et R268 ne semblent pas avoir d'interaction directe avec le substrat, et sont peu ou pas impliqués dans sa pénétration dans le site actif.

La modification du résidu K283 entraîne une diminution d'un facteur 2 du k_{cat} . La modification de ce résidu semble avoir un impact sur la catalyse de l'hydroperoxydation de l'acide linoléique par la LOX1 d'olive.

Une première hypothèse permet d'expliquer cette diminution : une perte d'interaction avec l'extrémité carboxylate de l'acide linoléique, due à la perte de la charge de la lysine, pourrait entraîner une mauvaise stabilisation du substrat dans le site actif, mais cette hypothèse n'est pas cohérente avec l'affinité conservée entre le mutant K283Q et l'enzyme WT : la perte d'une interaction permettant la stabilisation de l'acide linoléique devrait entraîner une diminution de l'affinité de l'enzyme pour ce substrat.

Dans une seconde hypothèse, il est possible d'envisager l'implication de la chaîne latérale de ce résidu lysine dans un réseau de liaisons hydrogène ou électrostatiques. La perte de la charge de la lysine pourrait perturber ce réseau et désorganiser légèrement la structure du site actif. Un mouvement des chaînes latérales des résidus situés sur les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 11$ a été évoqué lors de la pénétration du substrat chez la LOX1 de soja (Minor *et al.*, 1996). Chez la 15S-LOX de lapin (Choi *et al.*, 2008), une conformation dite « ouverte », en absence de ligand, et une conformation « fermée », avec un ligand dans le site actif, ont été décrites. Durant le passage d'une forme à l'autre, un déplacement de l'hélice $\alpha 2$ d'environ 12 Å se produit. La lysine présente sur l'hélice $\alpha 2$ pourrait jouer un rôle soit dans le mouvement de chaînes latérales de résidus portés par cette hélice, soit dans son déplacement. Cette hypothèse pourrait expliquer la diminution du k_{cat} déterminé pour le mutant K283Q, sans impact sur l'affinité : une perturbation dans l'organisation structurale de l'enzyme liée avec son substrat est envisageable. La diminution de la valeur de k_{cat} observée lors de la modification du résidu K283 pourrait donc

s'expliquer par un rôle de cet acide aminé dans la stabilisation de la structure de l'enzyme, en dehors de toute interaction avec le substrat.

Les trois mutants n'entraînent pas de modification de la régiospécificité, ni de la stéréospécificité. Ils ne semblent donc pas être impliqués dans le sens de pénétration de l'acide linoléique dans le site actif, ni dans sa stabilisation. La production favorisée de 9S-HPOD uniquement par le mutant K283Q pourrait s'expliquer par les perturbations de la structure de l'enzyme évoquées ci-dessus. Cependant, les trois mutations R265Q, R265Q et K283Q entraînent une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour l'acide linoléique. Une interaction avec l'extrémité carboxylate des chaînes latérales aurait impliqué une diminution de l'affinité chez les mutants. Les résidus R265, R268 et K283 ne sont donc probablement pas impliqués dans une liaison avec l'extrémité carboxylate de l'acide gras.

Cette augmentation d'affinité pourrait être attribuée à la modification de l'espace disponible à l'entrée du site actif. L'augmentation de cet espace autour de l'entrée du site actif pourrait permettre une meilleure formation du complexe enzyme-substrat, en facilitant les mouvements de l'acide linoléique : la présence de deux systèmes pentadiéniques contigus confère à l'acide linoléique une moins grande flexibilité que l'acide linoléique. Un espace plus ouvert et plus large pourrait faciliter son entrée dans le site actif, expliquant ainsi la diminution des valeurs du K_m . De plus, la chaîne latérale du résidu K283 située à proximité de la chaîne latérale du résidu Y280 pourrait jouer un rôle dans l'orientation des chaînes latérales des résidus de l'hélice α_2 , et dans leurs mouvements lors de la pénétration du substrat dans le site actif. Son remplacement par une chaîne plus courte pourrait accorder plus de liberté à la chaîne latérale encombrante du résidu tyrosine 280, facilitant des réarrangements des résidus entourant l'entrée du site actif pour faciliter la pénétration de l'acide linoléique moins flexible.

Les k_{cat} des mutants R265 et R268 ne sont pas différents de ceux déterminés pour l'enzyme sauvage. En revanche, le k_{cat} est très fortement diminué pour le mutant K283Q. La modification du résidu K283 présent sur l'hélice α_2 pourrait perturber un mouvement de celle-ci dans l'hypothèse d'un mouvement global de l'hélice, qui modifierait légèrement la structure du site actif. Le k_{cat} de K283Q sur l'acide linoléique pourrait être le résultat des difficultés de mouvement de l'hélice α_2

associées à une flexibilité moindre de l'acide linoléique, qui se positionnerait mal dans le site actif.

Le résidu K283Q pourrait donc être impliqué dans les mouvements des chaînes latérales des résidus localisés à l'entrée du site actif, comme évoqué par Minor *et al.* (1996), ou alors être impliqué dans le mouvement de l'hélice α_2 , comme évoqué par Choi *et al.* (2008).

La régiospécificité et la stéréospécificité de ces mutants n'est pas modifiée par rapport à l'enzyme sauvage. Les légères différences observées portent uniquement sur les rapports entre les 9*S*-hydroperoxydes et les 13*R*-hydroperoxydes. L'hypothèse selon laquelle aucun des trois résidus R265, R268 et K283 ne serait impliqué dans une liaison avec l'extrémité carboxylate du substrat est confortée par nos résultats.

b. Etude de quelques déterminants de la régiospécificité chez la LOX1 d'olive

Des études réalisées sur des LOX animales (15-LOX humaine et 12/15-LOX de lapin) ont permis d'identifier des résidus impliqués dans la régiospécificité des LOX (Sloane *et al.*, 1991 ; Borngräber *et al.*, 1996) : il s'agit des résidus I417/M418 ou I418/M419 de la 15-LOX humaine ou de la 12/15-LOX de lapin, respectivement, et désignés par « déterminant de Sloane », et du résidu F353 désigné par « déterminant de Borngräber » (Figure 34A). De plus, Ivanov *et al.* (2010) ont proposé que les résidus I418, F353 et une isoleucine en position 593 constitueraient une « triade » définissant le fond du site actif des 12/15-LOX. Ces résidus pourraient définir la régiospécificité des LOX de par la nature encombrante de leurs chaînes latérales : le substrat pénétrerait par son extrémité méthyle dans le site actif, mais serait bloqué au fond du site par les chaînes latérales de ces résidus. L'oxygénation se produirait alors sur le carbone 15, proche de l'atome de fer catalytique. Chez la LOX1 d'olive, les résidus peu encombrants T582/V583 et S517 sont situés aux positions équivalentes aux déterminants de Sloane et Borngräber (Figure 34B).

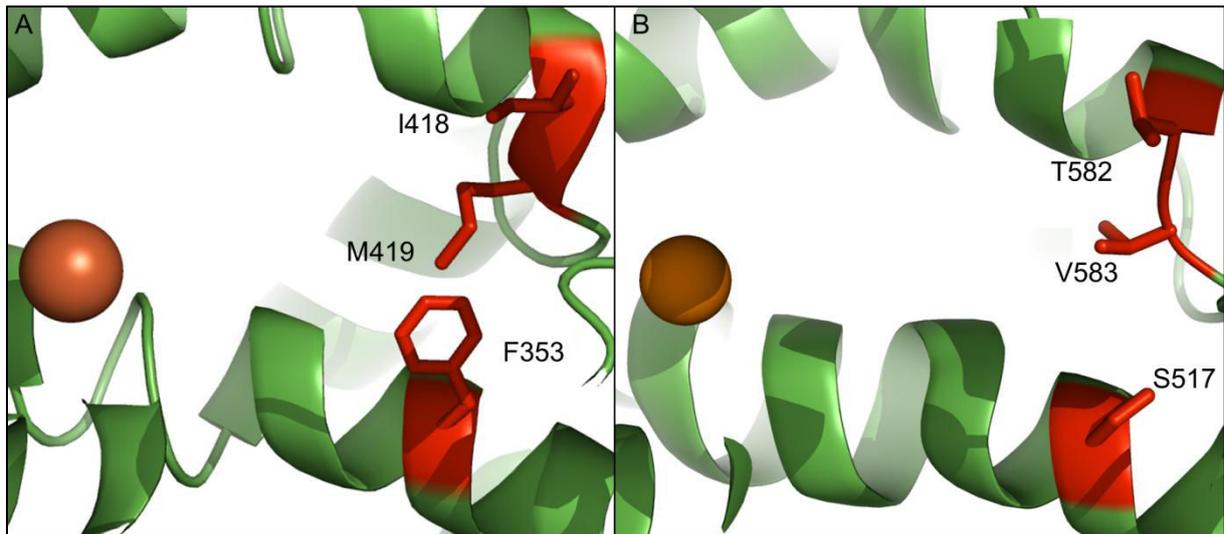


Figure 34 : Site actif de la 12/15-LOX de lapin (gauche) et de la 9/13-LOX1 d'olive : agrandissement de la zone localisée par les déterminants de Sloane et de Borngräber

Les résidus formant en partie la triade du fond du site actif apparaissent en rouge. En A, les résidus F353, I418 et M419 pour la 12/15-LOX de lapin (n°PDB : 2P0M). En B, les résidus S517, T582 et V583 pour la 9/13-LOX1 d'olive.

Le substrat pourrait donc pénétrer plus profondément dans le site actif et induire une oxygénation du carbone 9, suivant ainsi l'hypothèse de l'espace de liaison proposée par Hughes *et al.* (2001b), ou alors pénétrer par son extrémité carboxylate, pour interagir avec l'arginine 733 chargée présente au fond du site actif, suivant ainsi l'hypothèse de l'orientation-dépendance proposée par Hornung *et al.* (1999).

i. Etude des déterminants de Sloane

Les résidus isoleucine 417 / méthionine 418 décrits chez la 15-LOX humaine par Sloane *et al.* (1991) régiraient la régiospécificité. Les résidus correspondants décrits par Hornung *et al.* (1999) chez les LOX végétales sont le couple thréonine/valine chez les 9-LOX, et le couple thréonine, sérine ou cystéine associées à une histidine ou une phénylalanine chez les 13-LOX (Tableau III). Chez la 9/13-LOX1 d'olive, c'est le couple T582/V583 qui est retrouvé, classant cette enzyme parmi les 9-LOX. Le produit majoritairement formé est effectivement un 9-hydroperoxyde d'acide gras, mais un tiers des produits totaux est composé de 13-hydroperoxydes (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). Les résidus correspondants sur les autres séquences de LOX d'olive sont le motif T583/V584 sur la 9-LOX d'olive (Padilla *et al.*, 2012) et les motifs C629/F630 et G616/F617 sur les deux 13-LOX

(Padilla *et al.*, 2009) ; les régiospécificités de ces LOX sont en accord avec les déterminants décrits par Hornung *et al.* (1999) chez les LOX végétales (Tableau III).

Afin de vérifier si le résidu V583 contrôle la régiospécificité de la 9/13-LOX1 d'olive, des mutations ont été réalisées : le résidu V583 a été remplacé par une histidine ou par une phénylalanine, et les mutants V583H et V583F ont été exprimés et purifiés. Bien que les deux mutants soient actifs, nous avons constaté une diminution des activités enzymatiques par rapport à la LOX sauvage. En effet les activités spécifiques des extraits bruts des mutants V583H et V583F sont respectivement de 0,080 U.mg⁻¹ de protéines et 0,054 U.mg⁻¹ de protéines, ce qui représente respectivement 6,7% et 4,5% de l'activité spécifique (1,19 U.mg⁻¹ de protéines) de l'extrait brut de la souche non mutée (Tableau VIII).

Tableau VIII : Tableau comparatif de purification de la LOX WT et des mutants V583H et V583F

		LOX WT	V583H	V583F
Extrait brut (surnageant de lyse)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹ de protéines)	1,19	0,080	0,054
	Pourcentage relatif (%)	100	6,7	4,5
Elution 1^e palier (40mM imidazole)	Activité totale (U)	150,02	6,48	7,5
	Pourcentage relatif (%)	100	4,32	5
Elution 2^e palier (100 mM imidazole)	Activité totale (U)	80,22	0,58	-

Les activités sont exprimées en unités d'activité, correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire à la production d'une μmol d'hydroperoxyde par minute.

Nous avons utilisé le même protocole de purification par chromatographie d'affinité pour les mutants et pour la LOX sauvage. Nous avons obtenus pour la première élution (par 40mM d'imidazole) des valeurs de rendement et de facteur de purification pour les mutants similaires à celles obtenues lors de la première élution de la purification de la LOX WT. Toutefois le nombre d'unité enzymatique total (U) des mutants V583H et V583F obtenu à l'issue de cette première élution est très

faible (respectivement 6,48 U et 7,5 U) par rapport au nombre d'unité totale de LOX WT obtenu dans les mêmes conditions (150 U). Après élution par 100mM d'imidazole, nous avons obtenu 0,58 U de LOX V583H. Nous n'avons pas mesuré d'activité enzymatique dans les fractions éluées par 100 mM d'imidazole pour le mutant V583F. Les quantités d'enzyme purifiée des différents mutants se sont avérées trop faibles pour déterminer les paramètres cinétiques des LOX mutées. Nous avons, néanmoins, décidé d'utiliser les enzymes partiellement purifiées pour réaliser la synthèse des hydroperoxydes. Les produits de synthèse ont été analysés par RMN du ^{13}C et par CP-HPLC-MS/MS. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau IX.

Tableau IX : Spécificité des produits synthétisés par les mutants V583H et V583F de la LOX1 d'olive

	Méthode d'analyse	LOX sauvage	LOX V583H	LOX V583F
Régiospécificité	RMN ^{13}C	9/13, rapport 2:1	9	nd
	HPLC-MS/MS	9/13, rapport 2:1	9/13, rapport 3:1	nd
Stéréospécificité	CP-HPLC-MS/MS	9 <i>S</i> et 13 <i>R</i>	9 <i>S</i> et 13 <i>R</i>	nd

nd : non détecté

L'analyse par RMN du ^{13}C et par CP-HPLC-MS/MS des produits formés par l'action de la 9/13-LOX1 d'olive sauvage confirme la production de 9*S*- et 13*R*-hydroperoxydes d'acide linoléique dans des proportions 2:1. En revanche, l'analyse par RMN du ^{13}C des produits formés par l'action de la LOX V583H montre la présence d'une quantité très faible de 9-hydroperoxydes. Ce résultat est en désaccord avec l'analyse des hydroperoxydes par CP-HPLC-MS/MS qui montre la présence de 9-hydroperoxyde et de 13-hydroperoxyde, dans un rapport estimé à 3:1, sous la configuration 9*S* et 13*R*. La différence observée entre ces résultats est vraisemblablement due à une différence de niveau de sensibilité entre les deux méthodes analytiques. L'analyse des produits formés par l'action de la LOX V583F

n'a pas permis de détecter d'hydroperoxydes, probablement à cause d'une quantité insuffisante de produits synthétisés. L'introduction de résidus encombrants dans le fond du site actif semble donc perturber le mécanisme réactionnel. Ces résultats semblent indiquer que la 9/13-LOX1 d'olive ne suit pas le même mode de fonctionnement que la 13-LOX de concombre utilisée par Hornung *et al.* (1999) pour établir leur modèle. La substitution d'un résidu peu encombrant par un résidu plus volumineux ne permet pas la modification de la régiospécificité de la 9/13-LOX1 d'olive. En revanche, les résultats sont en accord avec ceux publiés par Hughes *et al.* (2001b) : le remplacement d'un résidu encombrant (F580) chez la 9/13 LOX1 de pois par un résidu plus petit (valine ou alanine) ne permet pas la modification de la régiospécificité.

Le résidu V583 de la 9/13-LOX1 d'olive semble donc avoir un rôle dans le site actif, même s'il ne contrôle pas la régiospécificité de l'enzyme. La mutation de ce résidu situé dans le fond du site actif par un résidu d'histidine ou un résidu de phénylalanine, tous deux pouvant limiter la pénétration du substrat dans le site par encombrement stérique, semblent avoir des effets différents. En effet, le mutant V583H semble être plus efficace que le mutant V583F sur l'acide linoléique et semble produire trois fois plus de 9-hydroperoxydes que de 13-hydroperoxydes. Ce rapport (3:1) est différent de celui obtenu avec la LOX sauvage. La charge de l'histidine, à pH6, pourrait jouer un rôle en permettant la formation d'une liaison ionique avec le groupement carboxylate de l'acide linoléique. Cette hypothèse semble indiquer que le substrat pénétrerait dans le site actif par son extrémité carboxylate.

Le remplacement du résidu V583 par un résidu plus encombrant diminue l'activité enzymatique, il est raisonnable de supposer que l'espace disponible au fond du site actif pour le positionnement du substrat est un critère important pour le mécanisme réactionnel de la LOX1 d'olive.

ii. Etude du déterminant de Borngräber

En combinaison avec les déterminants de Sloane, le déterminant de Borngräber (F353) semble jouer un rôle dans la régiospécificité des LOX animales. Avec l'isoleucine 417 décrite par Sloane et une isoleucine en position 593, ces trois résidus forment une triade qui constitue le fond du site actif chez les 12/15-LOX

(Figure 34). Ce concept de triade fournit une explication à la régiospécificité de ces enzymes, en se basant sur l'hypothèse de l'espace de liaison. La modification des résidus occupant ces positions permet de faire varier le volume de la poche catalytique (Ivanov *et al.*, 2010). L'occupation de ces positions par des résidus peu encombrants permettrait l'entrée du substrat, par son extrémité méthyle, plus profondément dans le site actif, favorisant ainsi l'oxygénation du carbone 9. En revanche, la présence de résidus encombrants favoriserait l'oxygénation du carbone 13, le substrat ne pouvant entrer profondément dans le site actif.

De nombreuses études de mutagenèse dirigée ont été réalisées sur des 12/15-LOX animales et supportent cette hypothèse (Sloane *et al.*, 1991 ; Borngräber *et al.*, 1996 ; Borngräber *et al.*, 1999 ; Bürger *et al.*, 2000 ; Vogel *et al.*, 2010). Le résidu correspondant à F353 chez la 9/13-LOX d'olive est la sérine 517 (Figure 34). Cette sérine est conservée chez la 9-LOX d'olive *Oep2LOX1* (résidu S518) et chez la 13-LOX d'olive *Oep2LOX2* (résidu S551). Elle est remplacée par un résidu alanine chez la 13-LOX d'olive *Oep1LOX2* (A564). Le résidu sérine est retrouvé également chez la 13-LOX de soja (S491). Le remplacement de la sérine 517 par un résidu d'alanine permet de supprimer le groupement alcool de la chaîne latérale et d'introduire un résidu apolaire à la place. Le remplacement du résidu S517 par un résidu plus encombrant, une phénylalanine, permettrait de réduire le volume du fond du site actif. Nous avons réalisé ces deux mutations (mutants S517A et S517F, respectivement) et étudié leurs effets sur l'activité de l'enzyme.

Nous avons constaté que la modification de la sérine 517 en alanine entraîne une diminution de l'activité enzymatique de 44 %. L'alanine qui est un résidu hydrophobe perturberait la structure du fond du site actif.

Lorsque la sérine 517 est remplacée par la phénylalanine, la diminution d'activité enzymatique est de 70 %. L'encombrement du cycle aromatique pourrait perturber l'organisation des chaînes latérales des résidus voisins.

Les paramètres cinétiques des mutants S517A et S517F n'ont pas été mesurés, de même que les synthèses d'hydroperoxydes n'ont pas été réalisées, en raison de la faible activité des enzymes purifiées.

Le résidu S517 semble jouer un rôle important dans le positionnement du substrat dans le site actif de la LOX1 d'olive. Ce rôle pourrait être structural : la modification S517A change la nature de l'acide aminé, introduisant un résidu hydrophobe à la place d'un résidu polaire. Le remplacement par une phénylalanine

encombre le site actif, et peut désorganiser la structure du fond du site (Figure 35). Il pourrait être intéressant de remplacer le résidu sérine par un résidu tyrosine, afin de conserver la nature encombrante de la phénylalanine tout en maintenant la fonction alcool de la sérine.

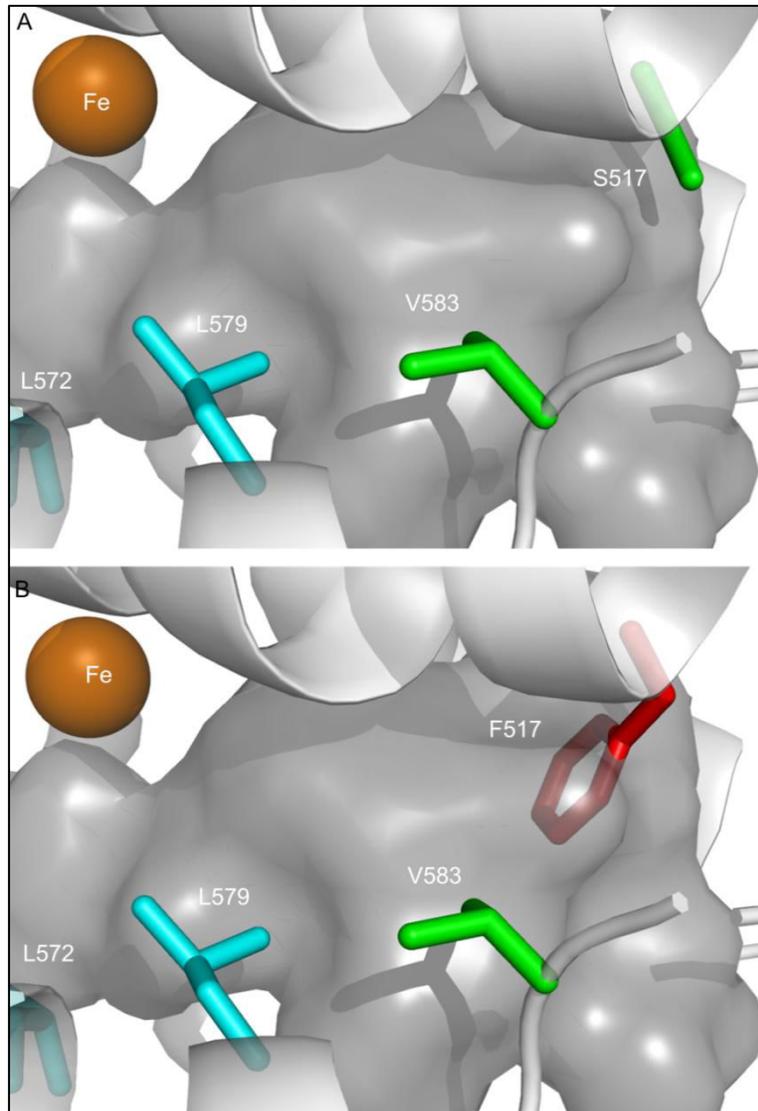


Figure 35 : Modélisation de la modification S517F

En A, un agrandissement du fond du site actif représentant les résidus L572, L579, V583 et S517. Le site actif est représenté par la surface gris foncé. En B, lorsque le résidu S517 est modifié en phénylalanine (F517, en rouge), la chaîne latérale de cette dernière plonge dans le site actif.

Malgré les nombreuses études réalisées sur les 12/15-LOX animales, le rôle précis de cette triade du fond du site actif ne semble pas encore clairement identifié et est toujours sujet à controverse (Meruvu *et al.*, 2005 ; Vogel *et al.*, 2010).

En ce qui concerne la LOX1 d'olive, la modification d'un seul de ces résidus diminue fortement l'activité enzymatique, sans en modifier la spécificité réactionnelle pour le résidu V583. Une étude complémentaire du rôle du résidu S517 semble nécessaire pour identifier son rôle précis.

Par ailleurs, le résidu I593, troisième partenaire de la « triade du fond du site », correspond à la leucine 776 chez la LOX1 d'olive. Ce résidu est localisé à proximité du site actif. Il pourrait être également intéressant de vérifier l'implication de ce résidu dans le contrôle du volume du fond du site actif, et son implication dans le contrôle de la régiospécificité de la LOX1 d'olive.

c. La stéréospécificité des LOX : l'hypothèse de Coffa et Brash (2004)

La stéréospécificité des LOX a été attribuée par Coffa et Brash (2004) à la présence d'un résidu glycine ou alanine à une position critique conservée : si la séquence comporte un résidu glycine, l'enzyme produira des hydroperoxydes de configuration *R*, si c'est une alanine qui est présente, les produits seront de configuration *S*. Il existe des LOX qui ne suivent pas ce concept, comme la 12*S*-LOX de poisson zèbre qui possède un résidu glycine à cette position critique (Jansen *et al.*, 2011).

La LOX1 d'olive produit des hydroperoxydes dont la configuration est 9*S* ou 13*R*. Elle possède le résidu glycine en position 568 (Figure 36), qui selon le concept de Coffa, devrait lui conférer une stéréospécificité *R*.

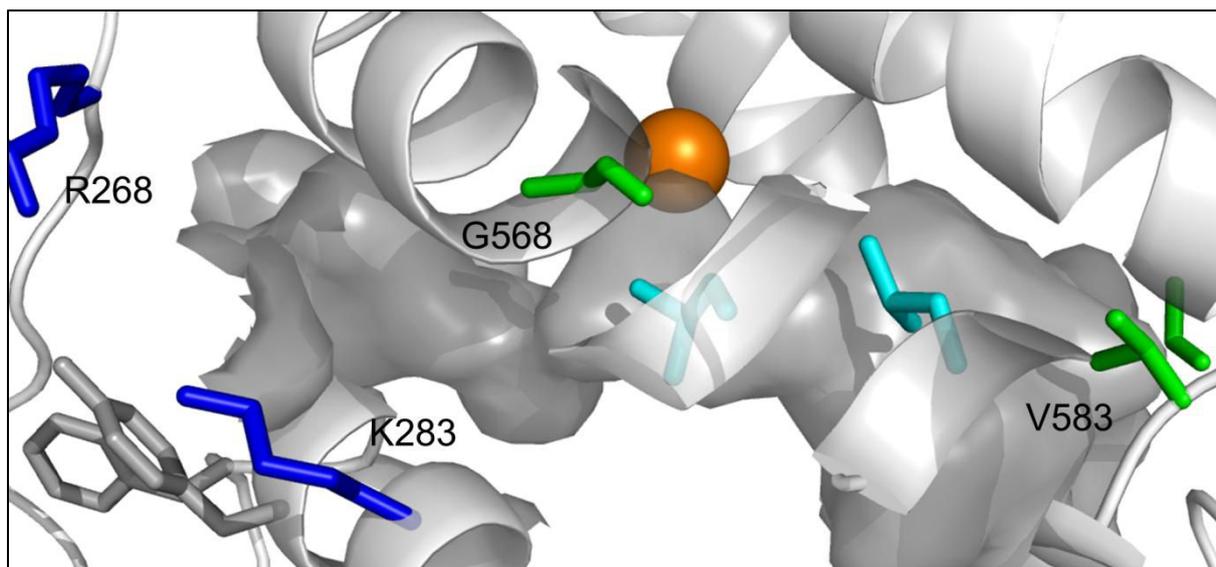


Figure 36 : Identification de la position du résidu G568 sur le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive

Les résidus définissant l'entrée du site F277 et Y280 apparaissent en gris, les résidus chargés R268 et K283 en bleu. Le résidu responsable de la stéréospécificité dans le concept de Coffa, G568, apparaît en vert. Le déterminant de Sloane V583 apparaît également en vert. Deux résidus semblent jouer un rôle dans le mécanisme catalytique, L572 et L579 apparaissent en cyan. Le site actif est représenté en gris foncé et l'atome de fer en orange.

Le résidu G568 a été modifié en alanine, et le mutant G568A a été produit et purifié par chromatographie d'affinité. Bien que l'enzyme mutante G568A soit active, nous avons constaté une diminution de l'activité par rapport à l'enzyme sauvage. En effet, l'activité spécifique de l'extrait brut du mutant G568A est égal à $0,20 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines, ce qui représente environ 17 % de l'activité spécifique ($1,19 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines) de l'extrait brut de la souche sauvage. Une activité enzymatique de 1,8 unité a été obtenue dans la fraction purifiée. Cette quantité obtenue s'est avérée trop faible pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme. Nous avons toutefois réalisé la synthèse des hydroperoxydes en utilisant l'acide linoléique comme substrat. Les hydroperoxydes formés ont été analysés par RMN du carbone 13 et par CP-HPLC-MS/MS : le mutant G568A produit des 9*S*-hydroperoxydes d'acide linoléique et des 13*R*-hydroperoxydes d'acide linoléique dans un rapport 2:1. Nos résultats, en accord avec ceux de Jansen *et al.* (2011), montrent que le résidu G568 n'est pas impliqué dans la stéréospécificité de la LOX1 d'olive. Le résidu G568 se trouve sur l'hélice $\alpha 11$. Minor *et al.* (1996) ont suggéré que la pénétration du substrat dans le site actif de la LOX1 de soja nécessite des mouvements des chaînes latérales de résidus localisés sur cette hélice. Le déplacement de l'hélice $\alpha 2$ de la

15S-LOX de lapin d'environ 12 Å, décrit par Choi *et al.* (2008) pourrait également induire un réarrangement des hélices situées à proximité. Un réarrangement des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 11$ pourrait également se produire chez la LOX1 d'olive à double spécificité lors de la pénétration du substrat dans le site actif. Ces mouvements pourraient modifier la position relative des résidus portés par l'hélice $\alpha 11$. D'autres résidus pourraient donc, chez la LOX1 d'olive, être responsables de la stéréospécificité de l'enzyme.

d. Positionnement du substrat et ciblage de l'oxygène

D'autres résidus sont décrits comme jouant un rôle dans le mécanisme catalytique : ils peuvent être impliqués dans le positionnement du substrat au sein du site actif, ou encore dans le ciblage de l'oxygène sur le système pentadiénique. Parmi ces résidus, la leucine 572 et la leucine 579 présentent un intérêt particulier. Le résidu L572 apparaît conservé chez la grande majorité des LOX (Figure 37).

N° d'accès	Nom		Séquence en acides aminés																
ACG56281	Olive_LOX1	566	A	V	G	R	Q	I	L	I	N	A	G	G	I	L	E	A	T
P08170	LOX1_SOYBN	540	.	L	A	.	.	S	.	.	.	N	.	.	I	.	T	.	
P09186	LOX3_SOYBN	559	G	L	A	.	L	S	.	V	.	D	.	.	V	I	.	Q	.
P38417	LOX4_SOYBN	554	S	L	A	.	K	A	.	V	.	.	D	.	.	I	.	K	.
Q06327	LOX1_ARATH	560	.	L	A	G	.	.	.	F	.	I	.	
P38418	LOX2_ARATH	595	.	R	A	.	.	S	.	V	.	G	.	.	.	I	.	T	C
Q9LNR3	LOX3_ARATH	619	.	L	A	.	.	S	.	.	S	.	D	.	V	I	.	G	G
Q9FNX8	LOX4_ARATH	626	.	.	A	.	.	T	.	.	S	.	D	.	V	I	.	S	C
Q9LUW0	LOX5_ARATH	583	.	L	A	.	H	V	.	.	S	D	.	V	.	.	R	.	
Q9CAG3	LOX6_ARATH	616	.	R	A	.	K	S	.	.	.	G	.	.	.	I	.	S	C
Q76I22	LOX1_ORYSJ	559	.	L	A	.	.	T	.	.	G	.	.	.	F	.	Q	.	
P29250	LOX2_ORYSJ	566	.	L	A	.	.	T	.	.	G	.	.	.	F	.	M	.	
P38419	LOXC1_ORYSJ	622	.	R	A	.	S	A	.	.	S	I	.	R	S
P37831	LOX1_SOLTU	563	.	S	A	.	.	L	.	V	V	.	.	S	.
P38414	LOX1_LENCU	567	.	L	A	.	N	V	.	V	.	.	E	.	.	I	.	S	.
P29114	LOX1_HORVU	558	.	L	A	.	.	T	F	.	M	.
P93184	LOX21_HORVU	628	.	Q	A	.	A	M	I	.	G	S
P14856	LOX2_PEA	566	.	L	A	.	D	S	N	.	L	I	.	R	S
P09918	LOX3_PEA	563	S	L	A	.	L	S	.	V	.	D	.	.	.	I	.	K	.

Figure 37 : Alignement de séquences ciblé sur les résidus L572 et L579

Sur cet alignement de séquences partiel, les résidus identiques à la séquence de la LOX1 d'olive sont représentés par des points. Les résidus conservés L572 et L579 sont soulignés en rouge. Identifiants taxonomiques : SOYBN, *Glycine max* ; ARATH, *Arabidopsis thaliana* ; ORYSJ, *Oryza sativa subsp. Japonica* ; SOLTU, *Solanum tuberosum* ; LENCU, *Lens culinaris* ; HORVU, *Hordeum vulgare* ; PEA, *Pisum sativum*.

Sur les structures de LOX et les différents modèles, ce résidu est toujours situé à proximité de l'atome de fer catalytique (Ivanov *et al.*, 2010). Il a été suggéré que ce résidu pourrait jouer un rôle dans le bon alignement du substrat au niveau du fer catalytique (Figure 38).

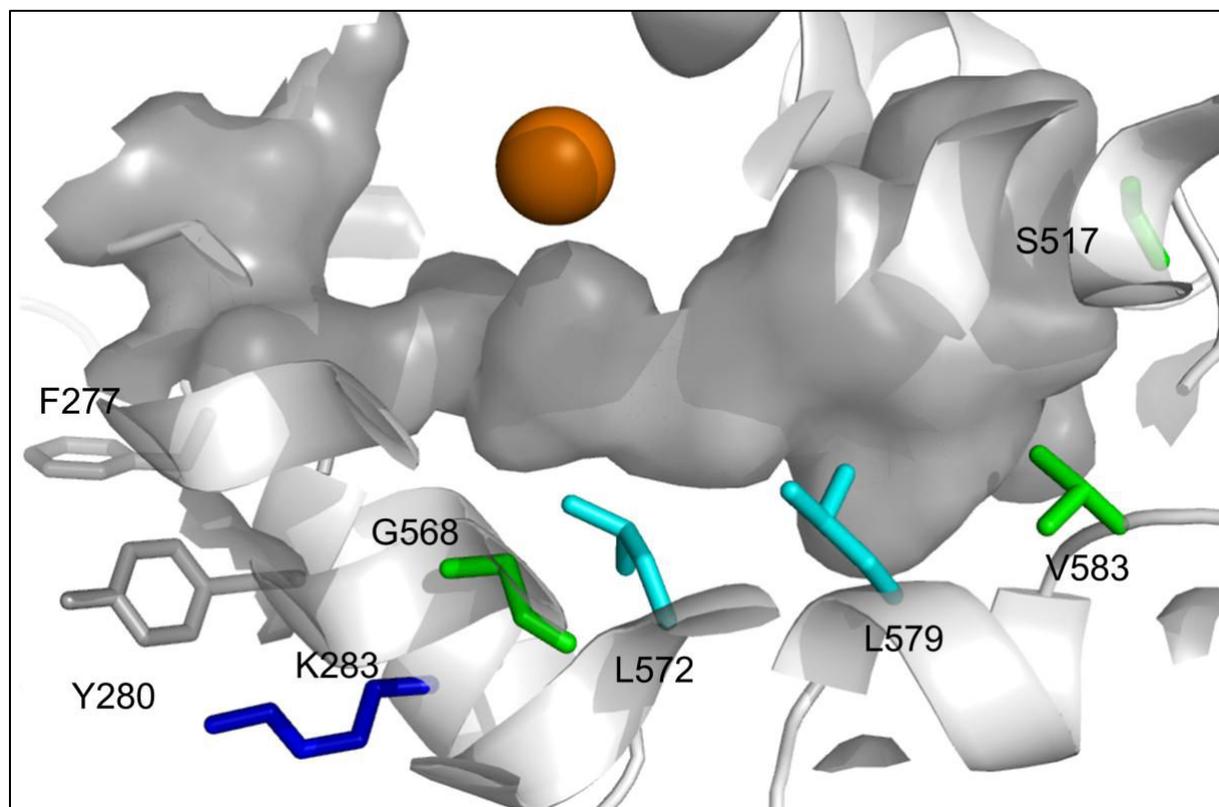


Figure 38 : Localisation des résidus L572 et L579 sur le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive

Sur cette vue de dessus du site actif, les résidus L572 et L579 sont représentés en cyan. Les résidus définissant l'entrée du site actif F277 et Y280 sont représentés en gris, la lysine K283 en bleu, les résidus G568, V583 et S517 sont représentés en vert. L'atome de fer apparaît comme une sphère orange. Le site actif est représenté par une surface gris foncé.

Chez la 8*R*-LOX de corail, le rôle du résidu situé à cette position, la leucine 432, a été étudié par mutagenèse dirigée (Neau *et al.*, 2009). Lorsque ce résidu est modifié en alanine, isoleucine ou phénylalanine, une perte de plus de 95% de l'activité est observée, alors que sa modification en valine entraîne une perte d'activité de plus de 80%.

Le second résidu, la leucine 579, est le résidu situé à la position équivalente au résidu I553 de la LOX1 de soja (Figure 37). Il a été suggéré que ce résidu pourrait être responsable du ciblage de l'oxygène dans le site actif. Il serait localisé près d'un tunnel putatif permettant l'accès de l'oxygène au site actif. La modification du résidu

I553 de la LOX1 de soja en phénylalanine provoque une diminution des constantes cinétiques : une réduction importante de la vitesse d'oxygénation du substrat est observée, alors que le k_{cat} déterminé varie peu (Knapp *et al.*, 2001). Cette diminution pourrait être due à l'encombrement occasionné par la chaîne latérale de la phénylalanine, gênant l'accès de l'oxygène au site actif. Un canal permettant l'accès de l'oxygène au site actif arriverait en effet au niveau du résidu I553.

Afin d'étudier le rôle des résidus L572 et L579 respectivement dans le positionnement du substrat et dans le ciblage de l'oxygène dans le site, nous avons muté ces deux résidus.

i. Effets de la modification du résidu L572 sur l'activité enzymatique de la LOX1 d'olive et rôle du résidu dans le mécanisme catalytique

Le résidu L572 a été modifié en valine ou en phénylalanine (Figure 39). Les enzymes mutées ont été exprimées et purifiées par chromatographie d'affinité. Les mutations L572F et L572V entraînent respectivement une diminution de 82 % et de 71 % de l'activité de l'enzyme. Chez la 8*R*-LOX de corail (Neau *et al.*, 2009) les mutations L432F et L432V se traduisent par une perte de 95 % et 80 % de l'activité enzymatique. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans cette étude. Nous n'avons pas déterminé les paramètres cinétiques de ces mutants en raison des faibles activités enzymatiques mesurées. Sur le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive (Figure 38 et Figure 39A), le résidu L572 et l'atome de fer catalytique se trouvent de part et d'autre de la cavité formée par le site actif. La modification du résidu L572 en valine (Figure 39B) pourrait permettre d'agrandir la cavité au niveau de l'atome de fer catalytique. Cet espace élargi pourrait agir en défaveur du positionnement du substrat, qui pourrait avoir plus de flexibilité, gênant par conséquent la formation de la liaison transitoire entre l'atome de fer, l'ion hydroxyde et l'atome de carbone en position 11, liaison nécessaire à l'initiation du mécanisme catalytique par arrachage d'un électron.

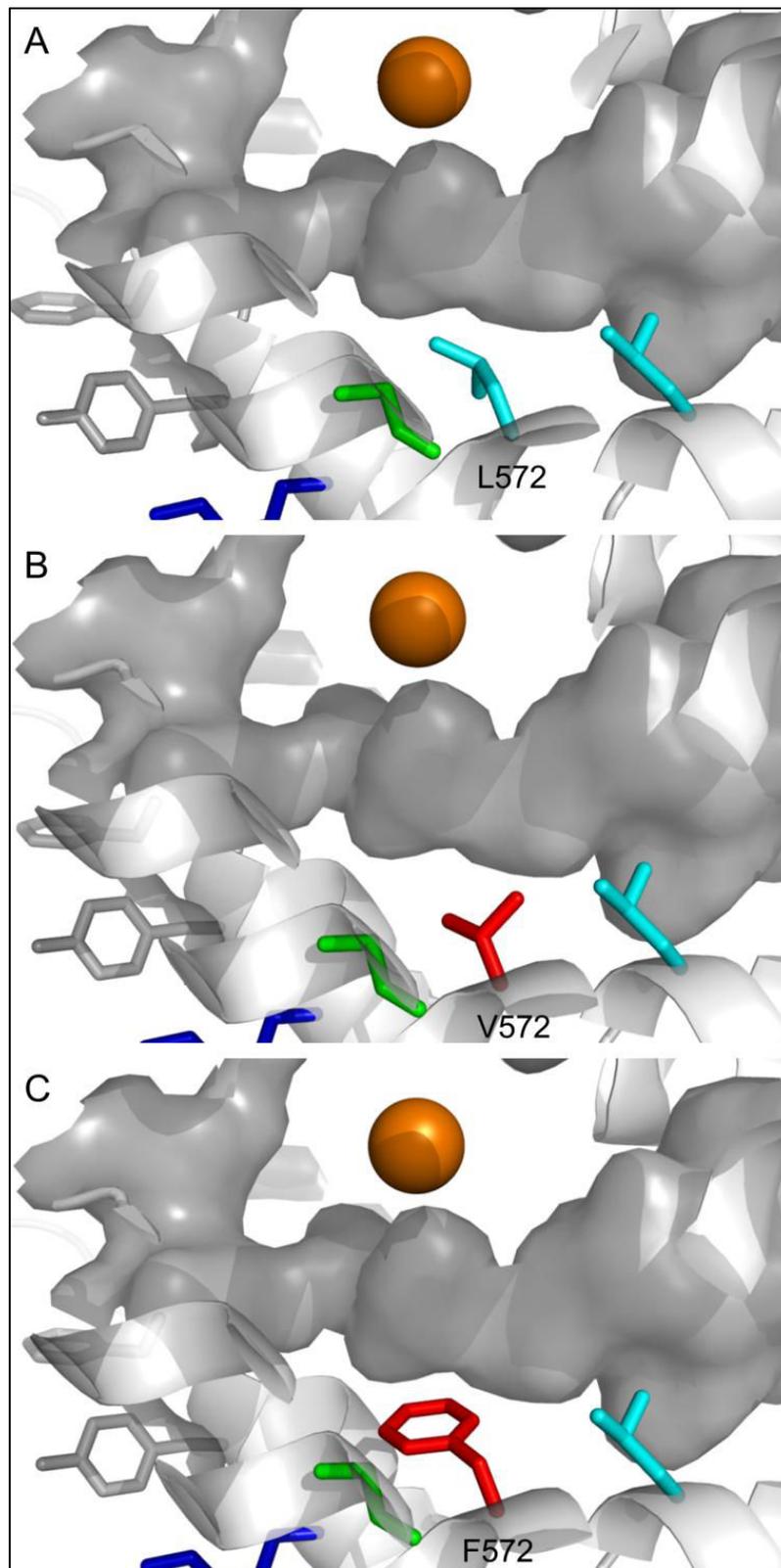


Figure 39 : Modélisation de la modification du résidu L572 de la LOX1 d'olive

En A, positionnement du résidu L572 sur la LOX1 d'olive WT. En B, la modification L572V apparaît en rouge. La chaîne latérale plus courte est plus éloignée de la cavité définie pour l'enzyme sauvage. En C, la modification L572F entraîne une augmentation de la taille de la chaîne latérale, la rapprochant de la cavité définie pour le WT.

La mutation L572F (Figure 39C) pourrait en revanche réduire l'espace de liaison du substrat, ou induire un arrangement spatial défavorable. Le cycle de la phénylalanine pourrait par exemple former des liaisons de type π avec les doubles liaisons du système pentadiénique, modifiant l'orientation du système, ce qui aurait pour effet de déstabiliser le positionnement du substrat vis-à-vis de l'atome de fer catalytique.

Les hypothèses formulées ci-dessus nécessitent d'être vérifiées par la détermination des paramètres cinétiques et des proportions relatives des régioisomères et stéréoisomères formés à partir de l'acide linoléique et de l'acide linoléique. Les valeurs obtenues pourraient permettre de préciser le rôle joué par le résidu L572 dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. La forte diminution d'activité constatée lors de la modification du résidu L572 semble néanmoins indiquer un rôle majeur de ce résidu dans le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive.

ii. Effet de la modification du résidu L579 sur les caractéristiques biochimiques de la LOX1 d'olive

Afin d'étudier le rôle du résidu L579 dans le ciblage de l'oxygène dans le site actif, deux mutants, L579V et L579I, ont été produits. Les paramètres cinétiques K_m et k_{cat} des enzymes recombinantes ont été déterminés en utilisant l'acide linoléique et l'acide linoléique comme substrats (Tableau X).

Tableau X : Paramètres cinétiques des mutants L579V et L579I

	Acide linoléique		Acide linoléique	
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
WT	6,98	11,96	31,03	5,76
L579V	6,29	29,6	15,51	15,34
L579I	10,53	46,62	46,19	29,82

Les valeurs de K_m des mutants L579V et L579I ne sont pas différentes des K_m déterminés pour l'enzyme WT. Les mutations L579V et L579I ne semblent donc pas avoir d'effet majeur sur l'affinité de l'enzyme pour l'acide linoléique ou l'acide linoléique. En revanche, les constantes catalytiques pour le mutant L579V sont augmentées d'un facteur 2,5 ($k_{cat} = 29,6 \text{ s}^{-1}$) pour l'acide linoléique et d'un facteur 2,7 ($k_{cat} = 15,34 \text{ s}^{-1}$) pour l'acide linoléique, en comparaison des constantes catalytiques mesurées pour l'enzyme sauvage ($k_{cat} = 11,96 \text{ s}^{-1}$ et $5,76 \text{ s}^{-1}$ pour l'acide linoléique et l'acide linoléique, respectivement). L'augmentation est encore plus importante pour le mutant L579I, avec un facteur de 3,9 ($k_{cat} = 46,62 \text{ s}^{-1}$) et 5,2 ($k_{cat} = 29,82 \text{ s}^{-1}$) pour l'acide linoléique et l'acide linoléique, respectivement. La modification du résidu leucine par des résidus valine ou isoleucine semble avoir un effet relativement important sur l'efficacité catalytique de la LOX1 d'olive.

iii. Influence de la modification du résidu L579 sur la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive

L'influence des mutations sur la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive a été étudiée : des réactions de synthèse d'hydroperoxydes ont été réalisées avec l'acide linoléique et l'acide linoléique comme substrats, et les hydroperoxydes formés ont été identifiés par CP-HPLC-MS/MS (Tableau XI).

Tableau XI : Proportions des régioisomères et stéréoisomères synthétisés par la LOX1 d'olive WT et les mutants L579V et L579I

	HPOD		HPOT	
	9S (%)	13R (%)	9S (%)	13R (%)
WT	68	32	43	57
L579V	77	23	66	34
L579I	71	29	51	49

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité totale d'hydroperoxydes formés. HPOD : acide hydroperoxyoctadécadiénoïque ; HPOT : acide hydroperoxyoctadécatriénoïque.

Les hydroperoxydes formés par l'action des mutants L579V et L579I sur l'acide linoléique sont majoritairement des 9S-HPOD. La modification du résidu L579

en isoleucine ne semble pas modifier le rapport 9S-HPOD:13R-HPOD. La modification du résidu L579 en valine semble favoriser la formation de 9S-HPOD puisque le rapport 9S-HPOD:13R-HPOD qui est égal à 2:1 pour l'enzyme sauvage passe à 3:1 pour le mutant. La production d'hydroperoxydes de configuration 9S semble donc favorisée. Les résultats obtenus avec l'acide linoléique montrent que la modification du résidu L579 en isoleucine ne change pas le rapport 9S-HPOT:13R-HPOT, qui est d'environ 1:1. Cependant, ce rapport est modifié par le remplacement de leucine 579 par une valine : la formation de 9S-HPOT semble favorisée, le rapport étant égal à 2:1. Le résidu L579 semble donc jouer un rôle dans le contrôle de la régiospécificité de la LOX1 d'olive.

iv. Rôle du résidu L579 dans le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive

Bien que le résidu L579 soit assez peu conservé chez les LOX végétales, la présence d'un résidu hydrophobe à cette position semble être une constante, puisqu'il est remplacé par une isoleucine dans la plupart des séquences (Figure 37). Le résidu localisé à cette position a été décrit comme jouant un rôle majeur dans le ciblage de l'oxygène : chez la LOX1 de soja, le résidu I553 correspondant se trouverait au contact d'un canal pouvant amener l'oxygène au site actif de l'enzyme. Ce résidu lorsqu'il est muté en résidu plus encombrant, comme une phénylalanine, entraîne une diminution d'un facteur 20 de l'efficacité catalytique de la LOX1 de soja (Knapp *et al.*, 2001). Knapp *et al.* (2001) ont attribué la diminution de l'efficacité catalytique à une limitation de la diffusion de l'oxygène, perturbée par la chaîne latérale de la phénylalanine. Le résidu I553 semble donc bien jouer un rôle dans l'adressage de l'oxygène au site actif. Toutefois, Meyer *et al.* (2008) se sont intéressés dans une seconde étude plus particulièrement à l'implication du résidu I553 dans le mécanisme réactionnel de la LOX1 de soja, en le remplaçant par un résidu de valine, de leucine, d'alanine ou encore de glycine, réduisant ainsi l'encombrement stérique de la chaîne latérale du résidu localisé à cette position particulière. Le k_{cat} n'est pas modifié par la mutation I553L, et il diminue pour les mutations I553V et I553G. L'isoleucine en position 553 jouerait un rôle majeur pour le positionnement du substrat, bien plus que pour le ciblage de l'oxygène, chez la LOX1 de soja.

La recherche de cavités présentes dans le modèle tridimensionnel de la LOX1 d'olive à l'aide de CASTp nous a permis d'identifier un canal putatif, dont l'ouverture

est située au niveau de la surface de l'enzyme, et dont le fond débouche sur la chaîne latérale du résidu L579 (Figure 40). Ce canal putatif pourrait correspondre au canal de l'oxygène, dans la mesure où il se dirige vers le centre du site catalytique, près de l'atome de fer.

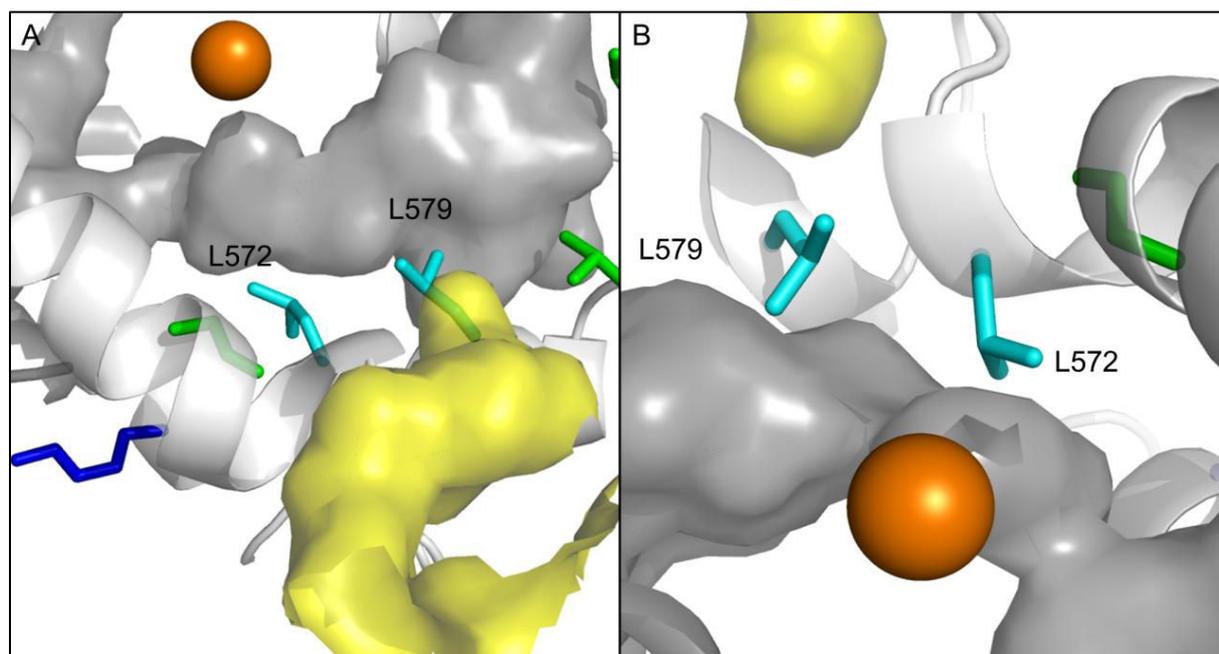


Figure 40 : Modélisation du canal putatif d'accès de l'oxygène identifié avec CASTp

A, vue de la position du canal putatif de l'oxygène représenté en jaune, qui arrive sur la chaîne latérale du résidu L579 représenté en cyan. B, vue du côté opposé, agrandissement de la zone réunissant le résidu L579, le fond du canal putatif de l'oxygène et le site actif.

La formation des isomères *9S* et *13R* est cohérente avec un modèle d'entrée du substrat dans un seul sens, par son extrémité méthyle ou carboxylate. L'abstraction de l'hydrogène de configuration D entraîne l'insertion antarafaciale de l'oxygène sur le carbone 9 ou sur le carbone 13, avec formation des stéréoisomères *9S* et *13R* (Figure 41).

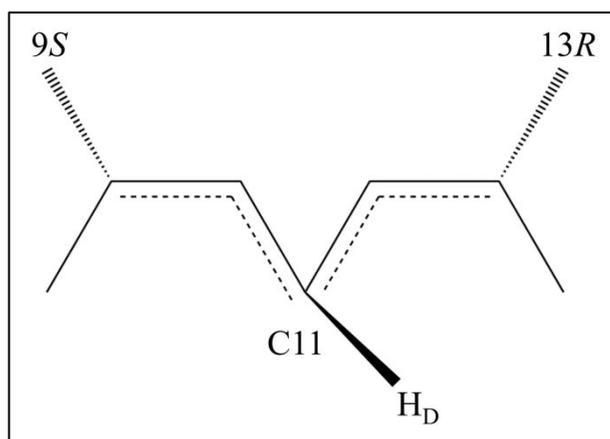


Figure 41 : Régiospécificité et stéréospécificité des produits formés par l'abstraction de l'hydrogène de configuration D

La position du canal putatif de l'oxygène semble cohérente avec le mécanisme d'action des LOX, c'est-à-dire l'insertion antarafaciale de l'oxygène sur le substrat : le canal putatif de l'oxygène serait localisé d'un côté du site actif, l'atome de fer catalytique étant localisé de l'autre côté du site actif. Dans le modèle tridimensionnel, la jonction du canal de l'oxygène avec le site actif est obstruée par la chaîne latérale du résidu L579. Les mouvements de cette chaîne latérale peuvent permettre la communication entre le canal du site actif et le canal de l'oxygène. Le résidu L579 pourrait également orienter l'oxygène dans le site actif, facilitant ainsi la formation d'un régioisomère par rapport à l'autre. Nos résultats sur la LOX1 d'olive indiquent une augmentation des valeurs de k_{cat} pour les deux mutants L579V et L579I déterminées à la fois pour l'acide linoléique et l'acide linoléique. La chaîne latérale du résidu L579 se trouverait localisée à l'intersection du site actif et du canal de l'oxygène sur le modèle tridimensionnel. Une modification de l'encombrement stérique de cette chaîne latérale pourrait faciliter l'accès de l'oxygène au site actif, permettant ainsi l'oxygénation plus rapide du radical formé sur le système pentadiénique, ou une modification du point de jonction entre les deux canaux. Les mutations L579V et L579I ont été modélisées (Figure 42).

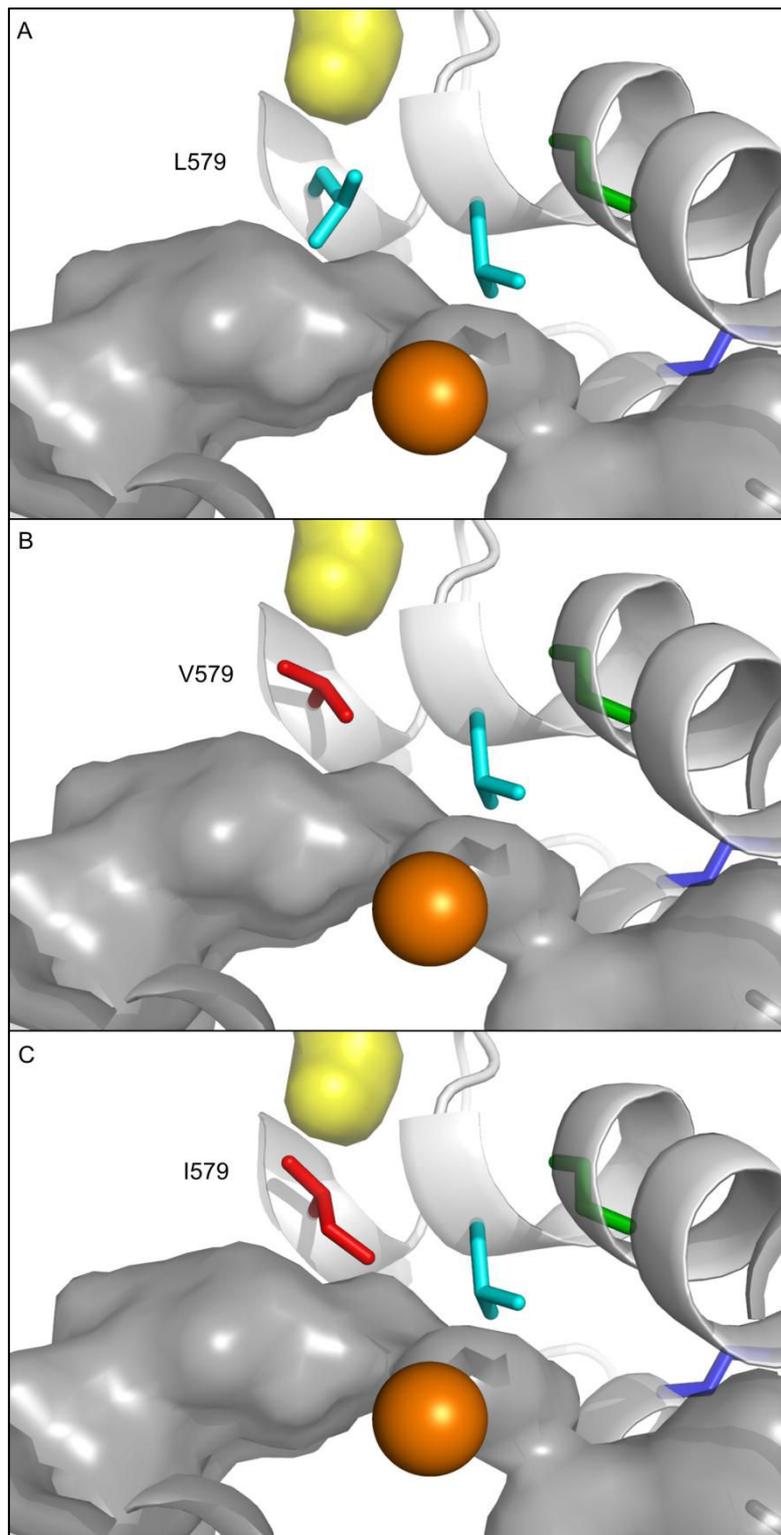


Figure 42 : Modélisation de la modification du résidu L579 de la LOX1 d'olive

A, position relative du résidu L579 (cyan) par rapport au canal putatif de l'oxygène (jaune). B, mutation L579V. Le résidu muté V579 apparaît en rouge. C, mutation L579I. Le résidu muté I579 apparaît en rouge.

La réduction de la chaîne latérale du résidu (mutant L579V) pourrait effectivement permettre de libérer l'espace entre les canaux du site actif et de l'oxygène, se traduisant par un accès facilité de l'oxygène au site actif. De plus, la chaîne latérale plus courte du résidu valine pourrait permettre une plus grande mobilité du substrat à proximité. Un rapprochement de l'extrémité du substrat et du fond du canal de l'oxygène est de ce fait envisageable. La formation favorisée de 9S-HPOD et de 9S-HPOT pourrait donc s'expliquer dans ce contexte, si le substrat pénètre dans le site actif par son extrémité carboxylate.

Lorsque le résidu L579 est remplacé par une isoleucine, les valeurs de k_{cat} sont augmentées pour l'acide linoléique et pour l'acide linoléique. La longueur de la chaîne latérale est conservée entre les résidus leucine et isoleucine. Les modifications des constantes catalytiques pourraient s'expliquer par un ciblage facilité de l'oxygène : une organisation différente de la chaîne latérale du résidu en position 579, comme dans le cas de l'isoleucine, pourrait modifier l'orientation du canal de l'oxygène dans le site actif. L'encombrement stérique au bout de la chaîne latérale est moins important que pour la leucine, il est dès lors possible d'imaginer un mouvement de cette chaîne latérale pour faciliter le passage de l'oxygène, et orienter l'arrivée du canal de l'oxygène directement sur le système pentadiénique du substrat.

Les valeurs de K_m ne sont pas modifiées lorsque le résidu L579 est remplacé. Il est donc peu probable que ce résidu ait une interaction directe avec le substrat.

4. Une première hypothèse pour le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive

Les différentes mutations introduites dans la séquence en acides aminés de la LOX1 d'olive ont permis de préciser en partie le rôle de certains résidus dans le mécanisme catalytique de l'enzyme. L'analyse globale des résultats obtenus pour chacun des mutants pourrait permettre de définir un premier modèle pour ce mécanisme catalytique (Figure 43).

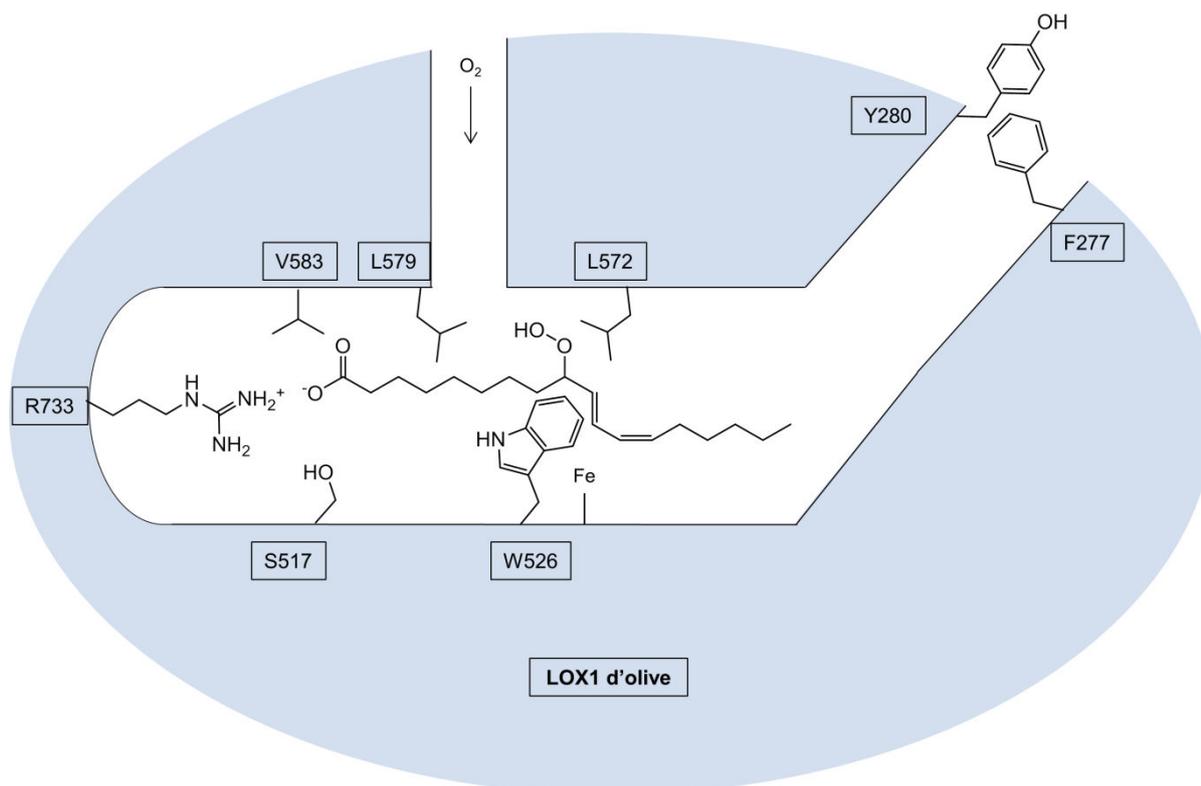


Figure 43 : Schéma du site actif de la 9/13-LOX1 d'olive

Sur ce schéma apparaissent les résidus semblant jouer un rôle dans le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive, que ce soit dans le positionnement du substrat dans le site actif ou dans le ciblage de l'oxygène.

Ainsi, l'entrée du substrat dans le site catalytique se ferait au niveau d'un espace ouvert compris entre les chaînes latérales des résidus chargés R265, R268, et K283, et des chaînes latérales hydrophobes des résidus F277 et Y280. Il n'y a pas d'interaction directe des chaînes latérales de ces résidus avec l'extrémité carboxylate du substrat, bien que l'on puisse supposer que l'environnement polaire conféré par les charges des résidus positifs soit favorable à une attraction de l'extrémité carboxylate. Le résidu K283 pourrait être impliqué dans un réseau de liaisons électrostatiques ou hydrogènes, et les mouvements des chaînes latérales des résidus portés par l'hélice $\alpha 2$ permettraient au substrat de pénétrer dans le site actif. Une modification plus générale de la position de l'hélice $\alpha 2$ est également envisageable, sur la base de celle observée pour la 15S-LOX de lapin (Choi *et al.*, 2008).

Le substrat à l'intérieur du site actif serait immobilisé au niveau de l'atome de fer catalytique par un résidu tryptophane à la position 526 conservé chez la plupart

des LOX et situé à proximité de l'atome de fer catalytique. Ce résidu, lorsqu'il est modifié, induit une perte d'activité majeure des enzymes (Hughes *et al.*, 2001b), confirmant ainsi son rôle majeur dans le mécanisme catalytique. Il est parfois remplacé par une phénylalanine. Des interactions π entre les cycles aromatiques des résidus tryptophane ou phénylalanine et le système pentadiénique semblent être impliquées. La présence du résidu L572 permettrait de stabiliser le substrat du côté opposé à l'atome de fer, rendant possible l'arrachage de l'électron et du proton sur le carbone 11 de l'acide gras. Le résidu L579 dirigerait ensuite l'ouverture du canal de l'oxygène sur le système pentadiénique, facilitant l'oxygénation du radical formé. La plus grande proportion de 9S-hydroperoxydes formés semble indiquer que le substrat pénétrerait dans le site actif par son extrémité carboxylate, rejoignant ainsi en partie l'hypothèse formulée par Hornung *et al.* (1999) : le substrat chez les 9-LOX pénétrerait par son extrémité carboxylate. Parmi les éléments qui tendent à soutenir cette hypothèse, l'absence d'activité de la LOX1 d'olive sur l'ester méthylique de l'acide linoléique semble indiquer que la charge de l'acide gras est nécessaire à une interaction avec l'enzyme. Les modifications des résidus V583 et S517 ont entraîné d'importantes pertes d'activité de l'enzyme. Les chaînes latérales de ces résidus pointent vers la cavité du fond du site actif de la LOX1 d'olive. Ces deux résidus sont probablement impliqués dans le positionnement du substrat au fond du site actif, pouvant de ce fait favoriser une interaction électrostatique avec le résidu arginine présent au fond du site. Les modifications de ces résidus ont pu perturber cet arrangement dans l'espace et conduire à une déstabilisation du substrat dans le site actif.

Plusieurs points nécessitent cependant d'être éclaircis : des mutations du résidu arginine en position 733 chez la LOX1 d'olive, localisé au fond du site actif, entre les résidus S517 et V583, pourraient permettre d'indiquer si ce résidu est impliqué dans une interaction avec le substrat. Il serait également intéressant de vérifier l'implication du résidu W526, afin de confirmer son rôle dans le positionnement du substrat au niveau du site actif. Ce rôle pourrait être étudié par mutagenèse dirigée, en le remplaçant par une phénylalanine puis par une alanine. De plus, des études complémentaires des mutants du résidu L572 sont nécessaires afin de confirmer le rôle de ce résidu : la mesure des paramètres cinétiques de ce mutant, ainsi que des réactions de synthèse d'hydroperoxydes peuvent être envisagées pour identifier à la fois l'impact du résidu sur le mécanisme catalytique et

sur le contrôle de la spécificité réactionnelle de la LOX1 d'olive. Par ailleurs, les paramètres cinétiques ont été déterminés par la mesure de l'absorbance à 234 nm, révélatrice de la formation d'un système de doubles liaisons conjuguées consécutives à la formation du radical pentadiényl. Il serait intéressant de déterminer les paramètres cinétiques à partir de la mesure de la consommation d'oxygène, afin de refléter la seconde partie de la réaction enzymatique, c'est-à-dire l'incorporation de l'oxygène sur le radical, notamment pour des mutants concernant le résidu L579. Cette étude pourrait être réalisée par l'utilisation d'une électrode à oxygène de Clark.

II. Etude de l'action des lipoxygénases sur les galactolipides

Les LOX sont des enzymes décrites pour agir en général sur des acides gras libres. Des études ont cependant montré qu'elles pouvaient agir sur des acides gras estérifiés (Brash *et al.*, 1987 ; Grechkin, 1998 ; Nakashima *et al.*, 2011). Parmi les oxylipines produites par la voie de la LOX, la formation des arabidopsides identifiées ces dernières années chez *Arabidopsis thaliana* demeure controversée. Deux hypothèses ont été émises : l'OPDA que l'on retrouve estérifié par une molécule de galactosylglycérol serait formé directement par l'action successive de la LOX, l'AOS puis l'AOC sur l'acide gras estérifié, ou alors l'acide gras serait libéré à partir d'un lipide complexe, il emprunterait la voie de la LOX puis l'OPDA nouvellement formé serait estérifié sur le galactosylglycérol. Afin d'apporter des éléments de réponse à la question de la formation des arabidopsides, l'activité lipoxygénase a été étudiée sur des galactolipides porteurs d'acide gras contenant un système pentadiénique. Cette étude est réalisée en collaboration avec le Docteur Eric Maréchal (CEA-CNRS Grenoble). Nous avons tout d'abord réalisé des essais de solubilisation des galactolipides à l'aide de différents détergents, puis mis au point les conditions expérimentales de mesure de l'activité lipoxygénase. Enfin, l'action de LOX d'origine et de spécificités différentes sur les galactolipides a été étudiée.

1. Solubilisation des galactolipides

Les galactolipides sont relativement peu solubles dans l'eau. Nakashima *et al.* (2011) ont étudié l'action de la LOX1 de soja sur des MGDG enrichis en acide linoléique (18:3, > 96 %) extraits des chloroplastes de feuilles de trèfle blanc (*Trifolium repens*), qui est une plante en 18:3, c'est-à-dire dépourvue d'acide hexadécatriénoïque 16:3. Nakashima *et al.* ont montré que la LOX1 de soja peut agir sur ces MGDG uniquement en présence d'acide déoxycholique. La solubilisation des MGDG par un détergent semble donc être indispensable pour que la LOX1 de soja agisse.

Nous avons utilisé dans notre étude des MGDG extraits de chloroplastes de feuilles d'épinards (fournis par le Dr Eric Maréchal). Leur composition en acides gras est la suivante : acide linoléique (18:3) : 77 % ; acide hexadécatriénoïque (16:3) : 18 % ; acide linoléique (18:2) : 2 % ; acide hexadécadiénoïque (16:2) : 0,4 % ; autres acides gras ne possédant pas de système pentadiénique : 2,6 %.

Les acides gras pouvant être substrats des LOX sont donc en majorité l'acide linoléique, puis l'acide hexadécatriénoïque (précurseur du dinor-OPDA), et enfin dans une moindre mesure l'acide linoléique et l'acide hexadécadiénoïque.

Afin de solubiliser les MGDG, nous avons utilisé les détergents suivants : déoxycholate de sodium et taurodéoxycholate de sodium (Amara *et al.*, 2009), Tween 20 et un mélange de CHAPS et de phosphoglycérol (CHAPS/PG) (Maréchal *et al.*, 1994). Bien que le déoxycholate et le taurodéoxycholate de sodium permettent la solubilisation des MGDG, nous n'avons pas pu utiliser ces conditions de solubilisation pour la suite de l'étude car dans nos conditions expérimentales de mesure de l'activité LOX, la solution de substrat forme une solution blanchâtre dans le milieu réactionnel présent dans la cuve du spectrophotomètre et une forte augmentation de l'absorbance à 234 nm est mesurée au cours du temps en absence d'enzyme. Il nous était donc impossible de déterminer une mesure d'activité LOX. Nakashima *et al.* (2011) ont pu utiliser cette méthode de solubilisation car ils ont utilisé une électrode à oxygène de Clark pour mesurer la consommation d'oxygène lors de la réaction catalysée par la lipoxygénase. En revanche, la solubilisation des MGDG par du Tween 20 ou par un mélange de CHAPS/PG a permis la mesure de l'activité lipoxygénase par spectrophotométrie en suivant l'absorbance à 234 nm.

Différentes concentrations en MGDG ont été utilisées en présence de 0,24 unités de LOX1 de soja (Figure 44).

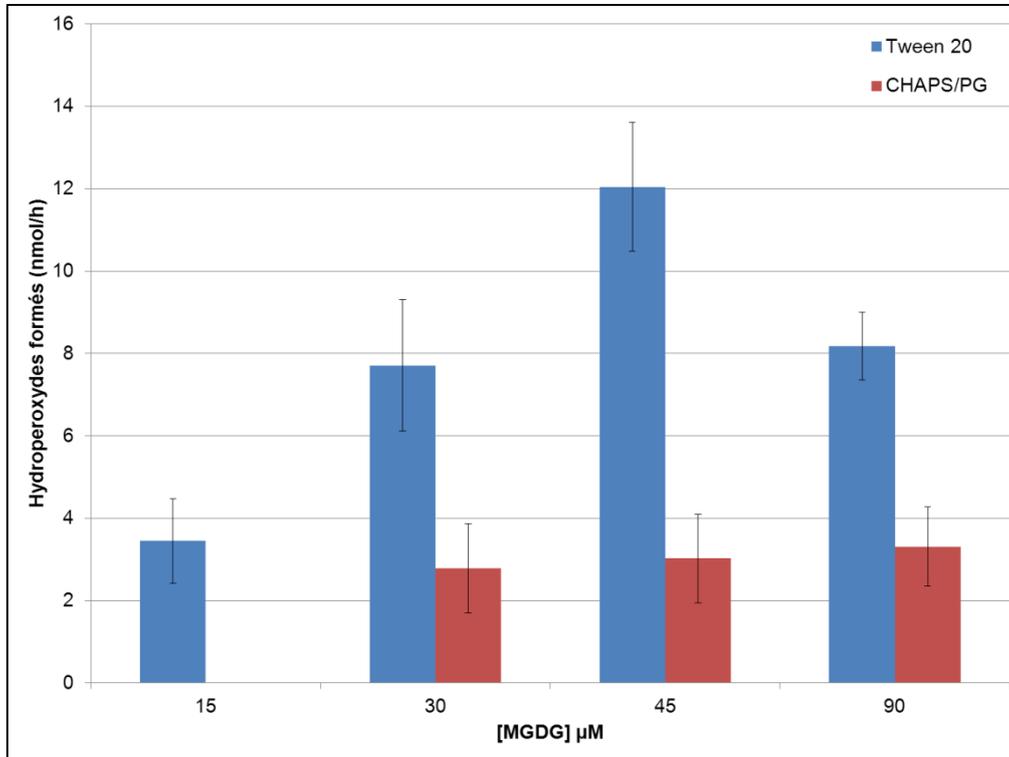


Figure 44 : Influence de la concentration en MGDG et du détergent sur l'activité lipoxygénase

Les valeurs obtenues représentent la moyenne de trois expériences, les barres d'erreur correspondant à l'erreur standard.

Quatre concentrations en MGDG ont été testées avec les deux méthodes de solubilisation. La quantité d'hydroperoxydes formés augmente lorsque la concentration en MGDG augmente de 15 à 45 μM , lorsque les MGDG sont solubilisés par du Tween 20. La quantité maximale d'hydroperoxydes formés est égale à 12 $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}$ avec 45 μM de MGDG. Lorsqu'une concentration en MGDG égale à 90 μM est utilisée, l'absorbance mesurée à 234 nm diminue en même temps qu'elle augmente à environ 270 et 280 nm. Ce phénomène pourrait être dû à une déshydratation de la fonction hydroperoxyde portée par les acides gras, menant à la formation de fonctions cétones et de trois liaisons conjuguées. Les triples liaisons conjuguées ont trois maximum d'absorbance à environ 260 nm, 270 nm et 280 nm (Angioni *et al.*, 2002).

Aucune activité n'est mesurée lorsqu'une concentration égale à 15 μM de MGDG solubilisés par le mélange CHAPS/PG est utilisée. La quantité d'hydroperoxydes formés est d'environ 3 $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}$ lorsque des concentrations supérieures en MGDG (30 μM , 45 μM et 90 μM) sont utilisées. La quantité d'hydroperoxydes obtenue lorsque les MGDG sont solubilisés par le mélange CHAPS/PG est environ 4 fois inférieure à celle obtenue lorsque le détergent utilisé est le Tween 20. Dans les conditions expérimentales utilisées, le Tween 20 est plus efficace que le mélange CHAPS/PG pour réaliser la solubilisation des MGDG.

2. Activité de la lipoxigénase 1 de soja sur les galactolipides

Dans un second temps, quatre concentrations en LOX1 de soja ont été testées sur les MGDG solubilisés à l'aide de Tween 20 ou du mélange CHAPS/PG (Figure 45).

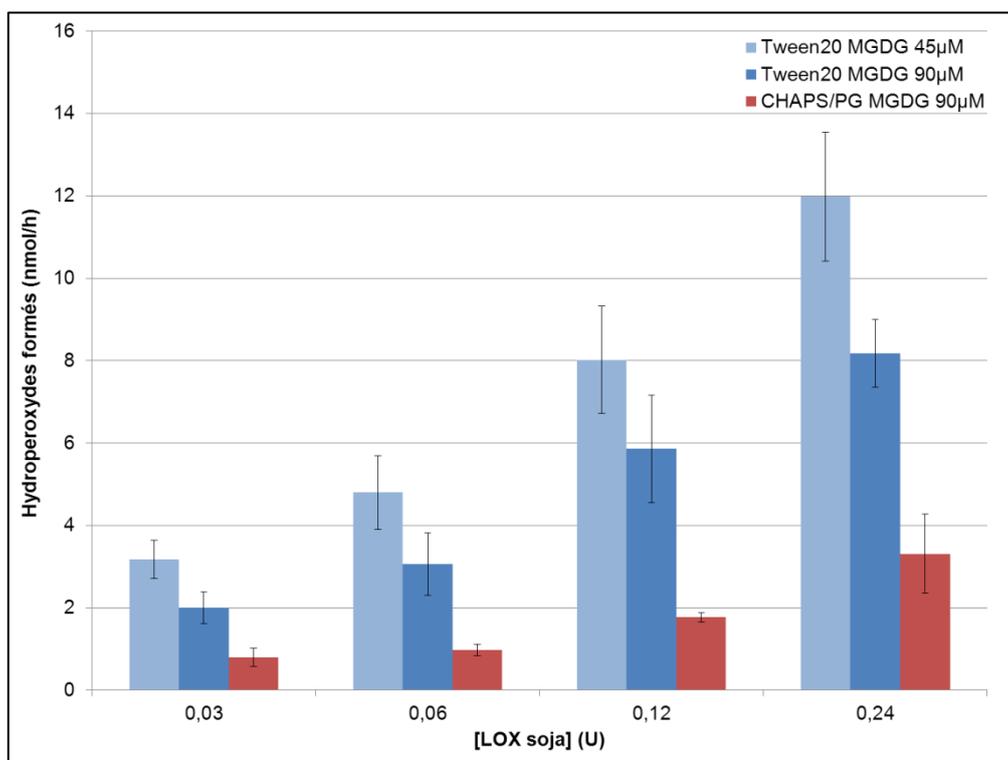


Figure 45 : Influence de la concentration en LOX sur l'activité mesurée sur les MGDG

Les valeurs obtenues représentent la moyenne de trois expériences, les barres d'erreur correspondant à l'erreur standard calculée.

Deux concentrations de MGDG, 45 μ M et 90 μ M, ont été testées en présence de Tween 20 et avec des concentrations croissantes de LOX. Les conditions les plus favorables sont 0,24 U de LOX et 45 μ M de solution de MGDG solubilisés par le Tween 20. La concentration d'hydroperoxydes formés en présence du mélange CHAPS/PG est la plus faible.

3. Activité des lipoxygénases de spécificités différentes sur les galactolipides

Trois lipoxygénases de spécificités différentes ont été utilisées dans les essais avec les MGDG : la 13-LOX1 de soja commerciale (Sigma), la 9/13-LOX1 d'olive et la 9-LOX de pomme de terre commerciale (Cayman Chemical). L'action des trois LOX sur les MGDG a été suivie par spectrophotométrie en mesurant la variation de l'absorbance à 234 nm en fonction du temps dans les conditions expérimentales optimales déterminées pour la 13-LOX1 de soja. Les cinétiques obtenues ont permis de montrer que la 13-LOX1 de soja et la 9/13-LOX1 d'olive présentent une vitesse de formation des hydroperoxydes de l'ordre de 0,2 nmol par minute, alors que la 9-LOX de pomme de terre présente une vitesse de l'ordre de 4,5 nmol par minute. La quantité de produits formés par l'action de ces trois LOX sur les MGDG étant très faible, nous avons décidé d'augmenter le temps de réaction à 60 minutes afin d'en obtenir suffisamment pour les analyser par HPLC-MS/MS. Les produits formés ont été extraits par la méthode de Bligh et Dyer (1959). Les échantillons ont ensuite été hydrolysés par du sérum de rat afin de libérer les acides gras des MGDG puis analysés par HPLC-MS/MS. Les résultats indiquent que de trop faibles quantités d'hydroperoxydes ont été synthétisées par la LOX1 de soja et par la 9/13-LOX1 d'olive pour être détectés par HPLC-MS/MS. En revanche, les produits formés par l'action de la 9-LOX de pomme de terre ont été identifiés comme étant des 9-HPOT, c'est-à-dire des hydroperoxydes portés par le carbone 9 de l'acide linoléique. Il semblerait donc que l'acide hexadécatriénoïque (16:3) estérifié ne soit pas substrat de la 9-LOX de pomme de terre, ou que les hydroperoxydes formés ne soient pas en quantités suffisantes pour être détectés.

Nos résultats semblent indiquer que la 13-LOX1 de soja et la 9/13-LOX1 d'olive sont peu actives sur les MGDG. Il est néanmoins possible que cette activité soit suffisante *in vivo* (ou plus importante) pour former des 13-hydroperoxydes

d'acides gras (acide linoléique ou acide hexadécatriénoïque) estérifiés par le galactosylglycérol. Ces 13-hydroperoxydes pourraient être à leur tour précurseurs des arabidopsides (galactosylglycérol portant des molécules d'OPDA ou de dn-OPDA). L'identification des produits formés par l'action de ces deux enzymes sur les MGDG par HPLC-MS/MS permettrait d'envisager une action directe des 13-LOX sur les galactolipides et d'apporter des éléments de réponse concernant la biosynthèse des arabidopsides. Leur présence n'a été détectée à ce jour que chez des espèces d'*Arabidopsis*. Il serait intéressant d'étudier l'activité de 13-LOX provenant d'*Arabidopsis thaliana* sur les MGDG. L'identification de 13-LOX particulièrement actives sur les galactolipides chez le genre *Arabidopsis* pourrait expliquer pourquoi les molécules d'arabidopsides n'ont été détectées que chez les espèces d'*Arabidopsis*. La comparaison de ces différentes 13-LOX pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de ces différentes enzymes vis-à-vis de leur substrat.

L'action de la 9-LOX de pomme de terre sur les galactolipides permet la formation de 9-hydroperoxydes estérifiés. Les 9-hydroperoxydes sont connus pour être substrats notamment des peroxygénases, des lyases et des allène oxyde synthases qui agissent au cours de la voie de la LOX, pour former des époxydes et époxy-alcools ou des aldéhydes et oxo-acides, ou encore des composés cycliques et des α -cétols et γ -cétols, respectivement. Il serait intéressant d'étudier l'activité de telles enzymes sur les 9-hydroperoxydes estérifiés par un galactosylglycérol.

Conclusion et perspectives

L'utilisation d'une approche combinant la modélisation moléculaire de la structure tridimensionnelle des protéines et la mutagenèse dirigée a permis de réaliser une étude de la relation structure-fonction de l'entrée du site actif des lipoxygénases. Les résultats obtenus mettent en évidence l'importance des mouvements des chaînes latérales des résidus localisés à l'entrée du site actif et impliqués dans la pénétration du substrat. Le résidu phénylalanine 277 de la LOX1 d'olive, très conservé dans les séquences en acides aminés de nombreuses LOX végétales et animales, pourrait perturber les mouvements des chaînes latérales de certains résidus présents sur l'hélice $\alpha 2$ impliqués dans la pénétration du substrat dans le site actif, et en particulier les mouvements de la chaîne latérale du résidu tyrosine 280, qui joue un rôle clé dans la pénétration de l'acide linoléique et de l'acide linoléique dans le site actif de la LOX1 d'olive. Le fort taux de conservation de ces résidus parmi les LOX végétales permet de suggérer qu'ils peuvent être considérés comme des déterminants majeurs de l'accessibilité au site actif des LOX végétales. Cette considération peut être étendue à l'ensemble des LOX en ce qui concerne le résidu phénylalanine trouvé à la position 277 chez la LOX1 d'olive. Les effets des mutations des résidus F277 et Y280 semblent conforter l'hypothèse de leur localisation à l'entrée du site actif de la LOX1 d'olive.

La présence de résidus chargés positivement à l'entrée du site actif a été très documentée dans la littérature. Nous avons étudié trois résidus localisés à proximité des résidus F277 et Y280 positionnant l'entrée du site actif. Les résidus R265, R268 et K283 ont été remplacés chacun par un résidu glutamine. Seule la modification du résidu K283 semble avoir un effet sur les constantes cinétiques de l'enzyme. Les modifications des paramètres cinétiques observées peuvent être attribuées à une perturbation des mouvements des chaînes latérales nécessaires à la pénétration du substrat dans le site actif, ou à une perturbation de la mobilité d'éléments de la structure secondaire tels que l'hélice $\alpha 2$, plutôt qu'à une modification de l'interaction avec le substrat. Il semble donc que les résidus chargés positivement à l'entrée du site actif ne sont pas impliqués dans la stabilisation de l'extrémité carboxylate du substrat.

Des déterminants de la régiospécificité des LOX décrits dans la littérature ont également été étudiés. Le résidu V583, correspondant au déterminant de Sloane M418 chez une LOX animale, a été modifié afin d'étudier son rôle dans la régiospécificité de la LOX1 d'olive. Une forte diminution des paramètres cinétiques

de l'enzyme a été observée, confirmant le rôle de ce résidu dans le mécanisme catalytique. Un second résidu, la sérine en position 517, a été étudié. Il correspond au déterminant de Borngräber et serait responsable de la régiospécificité de certaines LOX, en association avec les déterminants de Sloane. La modification de ce résidu en alanine ou en phénylalanine réduit fortement l'activité de l'enzyme, indiquant un rôle important dans le mécanisme catalytique. Les résidus V583 et S517 ont un rôle important dans le contrôle de la régiospécificité de la LOX1 d'olive. Une étude approfondie du rôle de ces résidus semble nécessaire afin de préciser leurs fonctions dans le contrôle de la spécificité réactionnelle de l'enzyme. Il pourrait être particulièrement intéressant de modifier ces deux résidus en même temps afin de vérifier si leur action concertée est impliquée dans la régiospécificité de la LOX1 d'olive. D'autres résidus responsables de la régiospécificité peuvent également être étudiés, notamment le second déterminant de Sloane, le résidu T582 chez la LOX1 d'olive, ou encore le déterminant de Jisaka (Y603/H604 identifiés chez la 8S-LOX de souris). Un rôle coordonné de plusieurs résidus d'acides aminés peut être envisagé.

La stéréospécificité de la LOX1 d'olive a été étudiée à travers le déterminant de Coffa. La présence d'une alanine à une position critique entraîne la formation d'hydroperoxydes de configuration *S* et la présence d'un résidu glycine à cette même position entraîne la formation d'hydroperoxydes de configuration *R*. Chez la LOX1 d'olive, le déterminant de Coffa correspond à la glycine en position 568. Or, la LOX1 d'olive forme à la fois des produits de configuration *R* et *S*, le produit majoritaire étant de configuration *S* avec l'acide linoléique. La modification de ce résidu permet d'inverser la stéréospécificité pour de nombreuses lipoxigénases. Nous avons réalisé la mutation G568A : cette modification ne permet pas de modifier la stéréospécificité de la LOX1 d'olive. Des résultats similaires ont été obtenus pour plusieurs LOX, confirmant que le concept de Coffa n'est pas applicable à l'ensemble de la famille des lipoxigénases.

Deux autres résidus ont été également étudiés : la leucine 572, potentiellement impliquée dans le positionnement du substrat dans le site actif, et la leucine 579, potentiellement impliquée dans le ciblage de l'oxygène dans le site actif. Les modifications de la leucine 572 ont entraîné une perte importante de l'activité de l'enzyme, confirmant le rôle important de ce résidu dans le mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive. La leucine 579 lorsqu'elle est modifiée en valine ou en isoleucine permet l'augmentation de la constante catalytique de l'enzyme pour l'acide linoléique

et l'acide linoléique. Elle pourrait être impliquée à la fois dans le ciblage de l'oxygène dans le site actif, en modifiant la localisation du fond du canal de l'oxygène, et dans le positionnement du substrat dans le fond du site actif. La formation de 9*S*-hydroperoxyde d'acide linoléique et d'acide linoléique favorisée par les mutations de ce résidu semble indiquer une orientation de l'extrémité carboxylate du substrat au fond du site, en accord avec l'hypothèse de l'orientation-dépendance formulée par Hornung. Le ciblage de l'oxygène dans le site actif, par l'intermédiaire de la leucine 579, pourrait également régir la stéréospécificité de l'enzyme : en orientant l'oxygène sur le système pentadiénique, ce résidu entraîne la formation d'isomères de configuration 9*S* et 13*R*.

L'analyse des résultats permet de formuler une première hypothèse pour le mécanisme réactionnel de la LOX1 d'olive. Le substrat pourrait interagir par son extrémité carboxylate avec un résidu chargé localisé dans le fond du site actif, probablement l'arginine 733 conservée. Il est positionné dans le site actif par les résidus L572 et L579, et probablement par les résidus V583 et S517. Il pourrait être intéressant d'utiliser comme substrat un acide linoléique pour lequel l'hydrogène de configuration D, puis l'hydrogène de configuration L du carbone 11 seraient remplacés par un atome de deutérium. Cette étude permettrait de vérifier si le même hydrogène est arraché du substrat pour la formation du 9-HPOD et du 13-HPOD. Un effet sur les paramètres cinétiques mesurés, par rapport au substrat non deutéré, impliquerait l'abstraction du deutérium. Lors d'une analyse par spectrométrie de masse des hydroperoxydes formés, les ions spécifiques seraient facilement identifiables.

L'étude du mécanisme catalytique de la LOX1 d'olive s'est appuyée sur l'utilisation d'un modèle tridimensionnel construit par homologie avec la structure cristallisée de la LOX1 de soja. Il serait particulièrement intéressant de pouvoir obtenir une structure cristallisée de la LOX1 d'olive. L'obtention de la structure tridimensionnelle de la LOX1 d'olive pourrait permettre de confirmer notre modèle d'étude. Par la suite, cette structure pourrait servir de base pour la caractérisation du contrôle de la spécificité réactionnelle de cette enzyme.

Les études menées sur les galactolipides ont montré que la 13-LOX1 de soja et la 9/13-LOX1 d'olive sont peu actives *in vitro* sur les acides gras estérifiés des MGDG. Cette faible activité pourrait néanmoins être suffisante *in vivo* pour réaliser la

première étape de la formation des arabidopsides. Les premiers résultats obtenus ne permettent pas d'écarter l'une des deux hypothèses formulées pour expliquer la synthèse des arabidopsides. Nous envisageons d'utiliser des quantités de 13-LOX1 de soja et de 9/13-LOX1 d'olive plus importantes afin de produire des quantités d'hydroperoxydes suffisantes pour être identifiées par HPLC-MS/MS. Nous avons observé une forte activité avec la 9-LOX de pomme de terre sur ces mêmes acides gras estérifiés. La formation de 9-hydroperoxydes estérifiés pourrait être une étape préliminaire à la formation de molécules empruntant la voie des peroxygénases et des lyases qui agissent au cours de la voie de la LOX, et donc être d'un intérêt physiologique particulier. Nous envisageons de poursuivre cette étude par l'identification des enzymes pouvant agir sur les 9-hydroperoxydes estérifiés.

L'étude de LOX provenant d'*Arabidopsis thaliana*, chez qui les arabidopsides ont été identifiées (Stelmach *et al.*, 2001), pourrait être réalisée afin de vérifier que ces enzymes ne se sont pas spécialisées pour catalyser la formation d'hydroperoxydes sur les acides gras estérifiés des MGDG. L'étude de l'activité des LOX de soja, d'olive et de pomme de terre, ainsi que des LOX d'*Arabidopsis thaliana*, sur un autre type de galactolipides, les digalactosyldiacylglycérol, doit également être envisagée.

Références bibliographiques

- Amara, S., Lafont, D., Fiorentino, B., Boullanger, P., Carrière, F., et De Caro, A.** (2009). Continuous measurement of galactolipid hydrolysis by pancreatic lipolytic enzymes using the pH-stat technique and a medium chain monogalactosyl diglyceride as substrate. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 983-990.
- Andreou, A., Gobel, C., Hamberg, M., et Feussner, I.** (2010). A bisallylic mini-lipoxygenase from cyanobacterium *Cyanothece* sp that has an iron as cofactor. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 14178-14186.
- Angioni, E., Lercker, G., Frega, N.G., Carta, G., Melis, M.P., Murru, E., Spada, S., et Banni, S.** (2002). UV spectral properties of lipids as a tool for their identification. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 59-64.
- Anthon, G.E., et Barrett, D.M.** (2003). Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytrienoic acid lyase in tomatoes. *Food Chemistry* 81, 275-279.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laakso, S., et John, M.L.** (1981). [53] Lipoxygenase from soybeans : EC 1.13.11.12 Linoleate:oxygen oxidoreductase. In *Lipids Part C* (Academic Press), pp. 441-451.
- Baracat-Pereira, M.C., de Almeida Oliveira, M.G., de Barros, E.G., Moreira, M.A., et Santoro, M.M.** (2001). Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: Presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant Physiol Biochem* 39, 91-98.
- Bligh, E.G., et Dyer, W.J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Cell Biology* 37, 911-917.
- Boeglin, W.E., Kim, R.B., et Brash, A.R.** (1998). A 12*R*-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6744-6749.
- Bonaventure, G., Schuck, S., et Baldwin, I.T.** (2011). Revealing complexity and specificity in the activation of lipase-mediated oxylipin biosynthesis: a specific role of the *Nicotiana attenuata* GLA1 lipase in the activation of jasmonic acid biosynthesis in leaves and roots. *Plant, Cell & Environment* 34, 1507-1520.
- Borngräber, S., Browner, M., Gillmor, S., Gerth, C., Anton, M., Fletterick, R., et Kühn, H.** (1999). Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 37345-37350.
- Borngräber, S., Kuban, R.J., Anton, M., et Kühn, H.** (1996). Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *Journal of Molecular Biology* 264, 1145-1153.
- Boyington, J.C., Gaffney, B.J., et Amzel, L.M.** (1993). The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science (New York, N.Y)* 260, 1482-1486.
- Brash, A.R.** (1999). Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 23679-23682.
- Brash, A.R., Ingram, C.D., et Harris, T.M.** (1987). Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids. *Biochemistry* 26, 5465-5471.

- Brunerie, P., et Koziat, Y.** (1997). Process for producing natural *cis*-3-hexenol from unsaturated fatty acids. Brevet US 5620879.
- Bryant, R.W., Bailey, J.M., Schewe, T., et Rapoport, S.M.** (1982). Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 257, 6050-6055.
- Bundy, G.L., Nidy, E.G., Epps, D.E., Mizsak, S.A., et Wnuk, R.J.** (1986). Discovery of an arachidonic acid C-8 lipoxygenase in the gorgonian coral *Pseudoplexaura porosa*. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 747-751.
- Bürger, F., Krieg, P., Marks, F., et Fürstenberger, G.** (2000). Positional- and stereo-selectivity of fatty acid oxygenation catalysed by mouse (12S)-lipoxygenase isoenzymes. *The Biochemical Journal* 348 Pt 2, 329-335.
- Campeol, E., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Cremonini, R., et Ceccarini, L.** (2003). Volatile fractions from three cultivars of *Olea europaea* L. collected in two different seasons. *J Agric Food Chem* 51, 1994-1999.
- Chen, X.S., et Funk, C.D.** (2001). The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 811-818.
- Chen, X.S., Kurre, U., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., et Funk, C.D.** (1994). cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 13979-13987.
- Cho, M.J., Buescher, R.W., Johnson, M., et Janes, M.** (2004). Inactivation of pathogenic bacteria by cucumber volatiles (*E,Z*)-2,6-nonadienal and (*E*)-2-nonenal. *Journal of Food Protection* 67, 1014-1016.
- Choi, J., Chon, J.K., Kim, S., et Shin, W.** (2008). Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins* 70, 1023-1032.
- Coffa, G., et Brash, A.R.** (2004). A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15579-15584.
- Croft, K., Juttner, F., et Slusarenko, A.J.** (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology* 101, 13-24.
- de Groot, J.J.M.C., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Boldingh, J., Wever, R., et van Gelder, B.F.** (1975). Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology* 377, 71-79.
- DeLano, W.L.** (2002). The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific).
- Di Venere, A., Horn, T., Stehling, S., Mei, G., Masgrau, L., González-Lafont, A., Kühn, H., et Ivanov, I.** (2013). Role of Arg403 for thermostability and catalytic activity of rabbit 12/15-lipoxygenase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Dörmann, P., et Benning, C.** (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* 7, 112-118.

- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., et Liang, J.** (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research* 34, W116-118.
- Eek, P., Jarving, R., Jarving, I., Gilbert, N.C., Newcomer, M.E., et Samel, N.** (2012). Structure of a calcium-dependent 11*R*-lipoxygenase suggests a mechanism for Ca²⁺ regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 22377-22386.
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I.I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., Berger, S., Schuenemann, D., et Mueller, M.J.** (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: Redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Physiology* 153, 114-127.
- Farmaki, T., Sanmartin, M., Jiménez, P., Paneque, M., Sanz, C., Vancanneyt, G., León, J., et Sánchez-Serrano, J.J.** (2007). Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 58, 555-568.
- Feussner, I., et Hornung, E.** (2005). Linoleate and linolenate-lipoxygenase mutants. Brevet US 6875847.
- Feussner, I., et Kühn, H.** (1995). The lipid body lipoxygenase from cucumber seedlings exhibits unusual reaction specificity. *FEBS Lett* 367, 12-14.
- Feussner, I., et Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53, 275-297.
- Fornaroli, S., Petrusa, E., Braidot, E., Vianello, A., et Macrì, F.** (1999). Purification of a plasma membrane-bound lipoxygenase from soybean cotyledons. *Plant Science* 145, 1-10.
- Galliard, T., et Chan, H.W.-S.** (1980). Lipoxygenases. In *The Biochemistry of Plants*, P.K. Stumpf, et E.E. Conn, eds. (New York : Academic), pp. 131-161.
- Gan, Q.F., Browner, M.F., Sloane, D.L., et Sigal, E.** (1996). Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase. Molecular modeling and mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 25412-25418.
- Gargouri, M., Ben Akacha, N., Kotti, F., et Ben Rejeb, I.** (2008). Voie de la lipoxygénase : valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de saveurs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 12, 185-202.
- Gill, S.C., et von Hippel, P.H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Gillmor, S.A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E., et Browner, M.F.** (1997). The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nature Structural & Molecular Biology* 4, 1003-1009.
- Grechkin, A.** (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research* 37, 317-352.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., et Frayn, K.N.** (2002). Lipid biochemistry, 5th edn (John Wiley & Sons).

- Hamberg, M., Ponce de Leon, I., Rodriguez, M.J., et Castresana, C.** (2005). α -Dioxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 169-174.
- Hamberg, M., Sanz, A., et Castresana, C.** (2002). α -Dioxygenase, a new enzyme in fatty acid metabolism. *International Congress Series* 1233, 307-317.
- Hamberg, M., Su, C., et Oliw, E.** (1998). Manganese lipoxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 13080-13088.
- Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fusté, M.C., Busquets, M., et Manresa, A.** (2013). Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 4737-4747.
- Hornung, E., Walther, M., Kühn, H., et Feussner, I.** (1999). Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4192-4197.
- Hughes, R.K., Lawson, D.M., Hornostaj, A.R., Fairhurst, S.A., et Casey, R.** (2001a). Mutagenesis and modelling of linoleate-binding to pea seed lipoxygenase. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 268, 1030-1040.
- Hughes, R.K., Lawson, D.M., Hornostaj, A.R., Fairhurst, S.A., et Casey, R.** (2001b). Mutagenesis and modelling of linoleate-binding to pea seed lipoxygenase. *European Journal of Biochemistry* 268, 1030-1040.
- Hughes, R.K., West, S.I., Hornostaj, A.R., Lawson, D.M., Fairhurst, S.A., Sanchez, R.O., Hough, P., Robinson, B.H., et Casey, R.** (2001c). Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. *The Biochemical Journal* 353, 345-355.
- Husson, F., Couturier, A., Kermasha, S., et Belin, J.M.** (1998). Induction and localization of a lipoxygenase from *Fusarium proliferatum*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5, 159-163.
- Ibrahim, A., Schütz, A.-L., Galano, J.-M., Herrfurth, C., Feussner, K., Durand, T., Brodhun, F., et Feussner, I.** (2011). The alphabet of galactolipids in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Physiology* 2, 95-95.
- Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V.B., Kuhn, H., et Walther, M.** (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 503, 161-174.
- Jansen, C., Hofheinz, K., Vogel, R., Roffeis, J., Anton, M., Reddanna, P., Kuhn, H., et Walther, M.** (2011). Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases. Newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 37804-37812.
- Jisaka, M., Kim, R.B., Boeglin, W.E., et Brash, A.R.** (2000). Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 1287-1293.
- Joyard, J., et Douce, R.** (1979). Chloroplast envelope is the site of galactolipid synthesis. *Plant Physiology* 63, 120-120.

- Kelley, L.A., et Sternberg, M.J.** (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363-371.
- Knapp, M.J., et Klinman, J.P.** (2003). Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* 42, 11466-11475.
- Knapp, M.J., Seebeck, F.P., et Klinman, J.P.** (2001). Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1. *Journal of the American Chemical Society* 123, 2931-2932.
- Lehnert, N., et Solomon, E.I.** (2003). Density-functional investigation on the mechanism of H-atom abstraction by lipoxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 294-305.
- Liavonchanka, A., et Feussner, I.** (2006). Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* 163, 348-357.
- Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J., et Berti, L.** (2006). Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol Biochem* 44, 450-454.
- Maréchal, E., Block, M.A., Joyard, J., et Douce, R.** (1994). Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 5788-5798.
- May, C., Höhne, M., Gnau, P., Schwennesen, K., et Kindl, H.** (2000). The N-terminal beta-barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies. *European Journal of Biochemistry* 267, 1100-1109.
- Meruvu, S., Walther, M., Ivanov, I., Hammarström, S., Fürstenberger, G., Krieg, P., Reddanna, P., et Kühn, H.** (2005). Sequence determinants for the reaction specificity of murine (12*R*)-lipoxygenase: targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 36633-36641.
- Meyer, M.P., Tomchick, D.R., et Klinman, J.P.** (2008). Enzyme structure and dynamics affect hydrogen tunneling: the impact of a remote side chain (I553) in soybean lipoxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1146-1151.
- Miège, C., Maréchal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M.A., Ohta, H., Takamiya, K.-i., Douce, R., et Joyard, J.** (1999). Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *European Journal of Biochemistry* 265, 990-1001.
- Mildvan, A.S.** (2004). Inverse thinking about double mutants of enzymes. *Biochemistry* 43, 14517-14520.
- Mildvan, A.S., Weber, D.J., et Kuliopulos, A.** (1992). Quantitative interpretations of double mutations of enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294, 327-340.
- Minor, W., Steczko, J., Bolin, J.T., Otwinowski, Z., et Axelrod, B.** (1993). Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemistry* 32, 6320-6323.
- Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J.T., Walter, R., et Axelrod, B.** (1996). Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* 35, 10687-10701.

- Morgenstern, B.** (1999). DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 15, 211-218.
- Mosblech, A., Feussner, I., et Heilmann, I.** (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* 47, 511-517.
- Mueller, M.J.** (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 441-448.
- Nakamura, S., et 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., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Sugimoto, K., Takabayashi, J., et Matsui, K.** (2011). Monogalactosyl diacylglycerol is a substrate for lipoxygenase: its implications for oxylin formation directly from lipids. *Journal of Plant Interactions* 6, 93-97.
- Neau, D.B., Gilbert, N.C., Bartlett, S.G., Boeglin, W., Brash, A.R., et Newcomer, M.E.** (2009). The 1.85 Å structure of an 8*R*-lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity. *Biochemistry* 48, 7906-7915.
- Oldham, M.L., Brash, A.R., et Newcomer, M.E.** (2005). Insights from the X-ray crystal structure of coral 8*R*-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 39545-39552.
- Padilla, M.N., Hernandez, M.L., Sanz, C., et Martínez-Rivas, J.M.** (2009). Functional characterization of two 13-lipoxygenase genes from olive fruit in relation to the biosynthesis of volatile compounds of virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 57, 9097-9107.
- Padilla, M.N., Hernández, M.L., Sanz, C., et Martínez-Rivas, J.M.** (2012). Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. *Phytochemistry* 74, 58-68.
- Palmieri-Thiers, C., Canaan, S., Brunini, V., Lorenzi, V., Tomi, F., Desseyn, J.L., Garscha, U., Oliw, E.H., Berti, L., et Maury, J.** (2009). A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 339-346.
- Percival, M.D.** (1991). Human 5-lipoxygenase contains an essential iron. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 10058-10061.
- Pérez-Gilabert, M., López-Nicolás, J.M., et García Carmona, F.** (2001). Purification of a novel lipoxygenase from eggplant (*Solanum melongena*) fruit chloroplasts. *Physiologia Plantarum* 111, 276-282.
- Pérez, A.G., Sanz, C., Olias, R., et Olias, J.M.** (1999). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *J Agric Food Chem* 47, 249-253.
- Petrek, M., Kosinova, P., Koca, J., et Otyepka, M.** (2007). MOLE: A Voronoi diagram-based explorer of molecular channels, pores, and tunnels. *Structure* 15, 1357-1363.

- Plagemann, I., Zelena, K., Arendt, P., Ringel, P.D., Krings, U., et Berger, R.G.** (2013). LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
- Prigge, S.T., Boyington, J.C., Faig, M., Doctor, K.S., Gaffney, B.J., et Amzel, L.M.** (1997). Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* 79, 629-636.
- Roussel, A., et Cambillau, C.** (1989). Turbo-Frodo. *Silicon graphics geometry partners directory* 86.
- Saam, J., Ivanov, I., Walther, M., Holzhütter, H.-G., et Kuhn, H.** (2007). Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13319-13324.
- Salas, J.J., Williams, M., Harwood, J.L., et Sánchez, J.** (1999). Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 1163-1168.
- Schenk, G., Neidig, M.L., Zhou, J., Holman, T.R., et Solomon, E.I.** (2003). Spectroscopic characterization of soybean lipoxygenase-1 mutants: the role of second coordination sphere residues in the regulation of enzyme activity. *Biochemistry* 42, 7294-7302.
- Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A., et Brash, A.R.** (2007). Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry & Biology* 14, 473-488.
- Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D., et Bell, E.** (1994). Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, S41-S42.
- Siedow, J.N.** (1991). Plant lipoxygenase: Structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 145-188.
- Skrzypczak-Jankun, E., Bross, R.A., Carroll, R.T., Dunham, W.R., et Funk, M.O.** (2001). Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase. *Journal of the American Chemical Society* 123, 10814-10820.
- Sloane, D.L., Leung, R., Craik, C.S., et Sigal, E.** (1991). A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature* 354, 149-152.
- Steczko, J., et Axelrod, B.** (1992). Identification of the iron-binding histidine residues in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 686-689.
- Steczko, J., Donoho, G.P., Clemens, J.C., Dixon, J.E., et Axelrod, B.** (1992). Conserved histidine-residues in soybean lipoxygenase - Functional consequences of their replacement. *Biochemistry* 31, 4053-4057.
- Stelmach, B.A., Muller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavec, M., et Weiler, E.W.** (2001). A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 12832-12838.
- Su, C., et Oliw, E.H.** (1998). Manganese lipoxygenase purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 13072-13079.
- Sun, D., McDonnell, M., Chen, X.-S., Lakkis, M.M., Li, H., Isaacs, S.N., Elsea, S.H., Patel, P.I., et Funk, C.D.** (1998). Human 12(*R*)-Lipoxygenase and the mouse ortholog. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 33540-33547.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., et Gibson, T.J.** (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Vance, R.E., Hong, S., Gronert, K., Serhan, C.N., et Mekalanos, J.J.** (2004). The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2135-2139.
- Vidal-Mas, J., Busquets, M., et Manresa, A.** (2005). Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 245-251.
- Vogel, R., Jansen, C., Roffeis, J., Reddanna, P., Forsell, P., Claesson, H.-E., Kuhn, H., et Walther, M.** (2010). Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 5369-5376.
- Wasternack, C., Forner, S., Strnad, M., et Hause, B.** (2013). Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* 95, 79-85.
- Wasternack, C., et Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111, 1021-1058.
- Whitehead, I.M., Slusarenko, A.J., Waspi, U., Gaskin, D.J.H., Brash, A.R., et Tijet, N.** (2004). Guava (*Psidium guajava*) 13-hydroperoxide lyase and uses thereof. Brevet US 6780621.
- Youn, B., Sellhorn, G.E., Mirchel, R.J., Gaffney, B.J., Grimes, H.D., et Kang, C.** (2006). Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3. *Proteins* 65, 1008-1020.
- Zimmerman, D.C., et Coudron, C.A.** (1979). Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-*trans*-10-dodecenoic acid. *Plant Physiology* 63, 536-541.

Annexes

```

1 cccattttca attaaattaa aacctttgca gtatctatct cccaaaactt atagttttcc
61 gatacaaacg tgtttggttt tttccataga gcaagagaga tgctgagcca tatagtcgag
121 gctttcacgg ggaaaaatga agaagaaaat aagaagaaga tcaaagggaa agtcgtggtg
181 atgaaaaaga atgtgttaga tttcaatgat ttcggtgggt cagttccttga tcgagttcat
241 gagttattag gccaaaaggt gtctctgcag ctccattagtt ccatcaatgg cgatcctgaa
301 aataagttga aaggaaagct aggaagagca gcatacttgg aggattggat cactacattc
361 acctctttaa cccctgggtga ttcagcattt catgtcacat ttgattggga agaagaagag
421 attggaattc caggggcatt tattattcaa aattttcac atactgaatt ttacctcaag
481 acacttacc ttgaagatgt tcttggacat catgggtcca tccactttgt ttgcaactct
541 tgggtttatc ctgctgaaaa gtacaaaaca gaccgcggtt tcttcacaaa taagacctat
601 cttccaagcg aaacaccaga accactagtc aaatacagag aagaagaatt agttaacttg
661 agaggaaatg gaagtggaca acttgaggaa tgggacaggg tatatgacta tgcttactac
721 aatgatttag gagatcctga taaaggttcc gattatgcta ggccggttct tggaggatcc
781 gtggagtatc cgtatcctcg taggggaaga accggtcggc ctccaacaaa gacagatccg
841 aattctgaga gcaggattcc actgcttacg agcttagata tttacattcc aagagatgaa
901 cgttttggac acttgaagat gtccgatttt cttgcttatg cactaaaatc cgtcgttcag
961 tttcttctcc cggagtttga ggatctatgt gacagtattc acaatgagtt tgacagcttc
1021 gaagatatcc ttcaaatcta tgaaggaggt ttcaagctac cagaggggcc tttgctcaaa
1081 aatattttcg aaaacattcc ctttgagatg ctaaagggtac ttcttcgaag tgatggcgag
1141 ggacttttca aattcccatt gcctcaggtt atcaaagatg ataaatctgc atggagaaca
1201 gatgaagaat tcgcgagaga gatgttggca ggagtgaacc ctgtcataat tagccgtctc
1261 caggagtttc ctccgacaag taagctcgat ccgaatctct atgggtgatca gactagcaca
1321 atatcaggag gccacataga gaataagttg gacggactaa caattgacga ggcaatcagg
1381 acgaacaaac tgttcatatt gaaccaccac gatgcaacta tgccatattt aaagcgaata
1441 aactcgacta ccacaaagac ttatgctca agaactctgc ttttcttgca aaaagacgga
1501 agtttgaagc cattagcaat tgaactgagc ttacctcatc cggatggata ccagttcggg
1561 gccattgaca aagtatattt acctgctgaa cacgggatcg atagttccat atggcaattg
1621 gctaaggctt atgtcgccat caacgactct ggtgttcac agttaattag ccactgggta
1681 aatacacatg cttcaatcga gccattcgtg attgcaacaa ataggcagct aagtgtgctt
1741 taccctatcc ataagcttct tcatcctcac ttccgagaca caatgaacat aaatgctgtg
1801 ggacgacaaa tcttgattaa tgctggagga atccttgagg cgacagtttt tccggcaaaa
1861 tattccatgg aatgtcagc tgtgatttat aaggactggg ttttcacaga acaaggactc
1921 cctgctgac tacttaagag aggaatggca gtggacgact cgaattcacc acatggcctt
1981 cgtcttttaa tcgaagacta tctttatgct gttgatggac tggagatctg gtcagcaata
2041 aaaacatggg tacaggacta ctgtaacttc tactatacat cagatatttt ggttcagaaa
2101 gacgctgaac tccagtcctg gtggaccgaa gtccgggaaa agggacatgg cgacaaaaag
2161 aacgagccct ggtggcctaa aatgcaaact cgaggagAAC tagtcgactc ctgtactact
2221 ataatatgga tggcatctgc tcttcatgct gctgtcaatt ttgggcagta cccctatgct
2281 ggctacctcc cggttcgtcc taccttaagt cggaggttca tgccggaacc tggaaaacc
2341 gagtatgatg agctgaagac taaccoggat aaggttttcc tgaagacaat tactgctcgg
2401 ctacagacat tactgggcat ttcccttgata gaaattttgt caagccattc atcggacgag
2461 gtttaccttg gacagagaga cgctcttgaa tggactaagg atgtggaacc acttgaagct
2521 ttcgacagat ttgggacgaa gttgagggaa gtagaggAAC gaatcaaaca gatgaacaac
2581 gacaaaaaat ggagaaaccg ggttgacca gtgaatgttc catacacttt actttatcct
2641 acaagtgaag agggacttac tggcaaggga attccaaca gtgtgtcaat ctgaagctta
2701 tctgtttagg gatattacat ttgtatgcat attccttaca tttcttttac ttttgaagaa
2761 ggtttgatga gtgaaaatag taatgcagat cgatgtattc tcatttaca taatgaataa
2821 aagtaaaaca tataaccaa aaaaaaaaa aa

```

Figure A : Séquence nucléotidique de la LOX1 d'olive (GenBank EU678670.1).

En jaune apparaissent le commencement et la fin du cadre de lecture ouvert représentés respectivement par les codons ATG et TGA.

LOX1 olive	MLSHIVEAFT GKNEEENKKK IKGKVVLMKK NVLDFNDFGG SVLDRVHELL GQKVSLLQLIS	60
LOX1 soja	-----MFS AG-----HK IKGTVVLMPPK NELEVNPDG- SAVDNLNAFL GRSVSLQLIS	46
LOX1 olive	SINGDPENKL KGKLGRAAYL EDWITTFSTL TPGDSAFHVT FDWEEEEIGI PGAFIIQNFH	120
LOX1 soja	ATKADAHG-- KGKVGKDTFL EGINTSLPTL GAGESAFNIH FEWDG-SMGI PGAFYIKNYM	103
LOX1 olive	HTEFYLKTLT LEDVPGHHGP IHFVCNSWVY PAEKYKTRV FFTNKTYLPS ETPEPLVKYR	180
LOX1 soja	QVEFFLKSLT LEAIS-NQGT IRFVCNSWVY NTKLYKSVRI FFANHTYVPS ETPAPLVSYR	162
LOX1 olive	EEELVNLRGN GSGQLEEWDR VYDYAYNDL GDPDKGSDYA RPVLGGSVEY PYPRRGRTGR	240
LOX1 soja	EEELKSLRGN GTGERKEYDR IYDYDVYNDL GNPDKSEKLA RPVLGGSSTF PYPRRGRTGR	222
LOX1 olive	PPTKTDPNSE SRIPLLTSLD IYIPRDERFG HLKMSDFLAY ALKSVVQFLI PEFEDLCDSI	300
LOX1 soja	GPTVTDPNTE K-----QGEV FYVPRDENLG HLKSKDALEI GTKLSLQIVQ PAFESAFDLK	277
LOX1 olive	HN--EFDSFE DILQIYEGGF KLPEGPLLKN IFENIPFEML KVLRLSDGEG LFKFPLPQVI	358
LOX1 soja	STPIEFHSFQ DVHDLYEGGI KLPR----DV ISTIIPLPVI KELYRTDGQH ILKFPQPHVV	333
LOX1 olive	KDDKSAWRD EEFAREMLAG VNPVIISRLQ EFPPTSCLDP NLYGDQSTI SGGHIENKLD	418
LOX1 soja	QVSQSAWMTD EEFAREMIAG VNPCVIRGLE EFPKSNLDP AIYGDQSSKI TADSLD--LD	391
LOX1 olive	GLTIDEAIRT NKLFI LNHH ALMPYLKRIN ST-TTKTYAS RTLLFLQKDG SLKPLAIELS	477
LOX1 soja	GYTMDREALGS RRLFMLDYHD IFMPYVRQIN QLSAKTYAT RTILFLREDG TLKPVAVIELS	451
LOX1 olive	LPHPDGYQFG AISKVYLP AE HGIDSSIWQL AKAYVAINDS GVHQLISHWL NTHASIEPFV	537
LOX1 soja	LPHSAGDL SA AVSQQVLP AK EGVESTIWLL AKAYVIVNDS CYHQLMSHWL NTHAAMEPFV	511
LOX1 olive	IATNRQLSVL YPIHKLLHPH FRDTMNINAV GRQILINAGG ILEATVFPK YSMEMSAVIY	597
LOX1 soja	IATHRHLSVL HPIYKLLTPH YRNNMNINAL ARQSLINANG IIETTFPLPSK YSVMSSAVY	571
LOX1 olive	KDWVFTEQGL PADLLKRGMA VDDNSPHGL RLLIEDYPYA VDGLEIWSAI KTWVQDYCNF	657
LOX1 soja	KNWVFTDQAL PADLIKRGVA IKDPSTPHGV RLLIEDYPYA ADGLEIWAAI KTWVQEYVPL	631
LOX1 olive	YYTSDILVQK DAELQSWWTE VREKGHGDKK NEPWPKMQT RGELVDSCTT IIWMASALHA	717
LOX1 soja	YYARDDDVKN DSELQHWWE AVEKGHGDLK DKPWWPKLQT LEDLVEVCLI IIWIASALHA	691
LOX1 olive	AVNFGQYPYA GYLPVRPTLS RRFMPEPGKP EYDELKTNPD KVFLKTITAR LQTLLGISLI	777
LOX1 soja	AVNFGQYPYG GLIMNRPTAS RRLLEKGTTP EYEEMINNHE KAYLRITITSK LPTLISLSVI	751
LOX1 olive	EILSSHSSDE VYLGQRDALE WTKDVEPLEA FDRFGTKLRE VEERIKQMND KKWR-NRVG	836
LOX1 soja	EILSTHASDE VYLGQRDNPH WTSDSKALQA FQKFGNKLKE IEEKLVRRNND PSLQGNRLG	811
LOX1 olive	PVNVPTLLY PTSEEGLTGK GIPNSVSI	864
LOX1 soja	PVQLPYTLLY PSSEEGLTFR GIPNSISI	839

Figure B : Annotation de la structure secondaire de la LOX1 d'olive par alignement avec la LOX1 de soja

La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique est alignée avec la séquence en acides aminés de la LOX1 de soja. Les domaines N-terminal et C-terminal sont délimités par un trait bleu au niveau du résidu d'asparagine 164. Les hélices α sont notées en vert, les feuillets β en rouge.

Tableau A : Liste des oligonucléotides utilisés comme amorces pour la mutagenèse dirigée.

Les codons en gras et soulignés sont porteurs de la mutation.

Fonction	Mutation	Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)
Résidu chargé de l'entrée du site actif	R268Q	LoxR268Qsens	GATATTTACATTCCAAGAGATGAA <u>CAA</u> TTTGGACACTGAAG	67,5
		LoxR268Qantisens	CTTCAAGTGTCCAAA <u>TTG</u> TTTCATCTCTTGAATGTAAATATC	67,5
	R265Q	LoxR265Qsens	GATATTTACATTCCA <u>CAA</u> GATGAACGTTTTGGA	63,3
		LoxR265Qantisens	TCCAAAACGTTTCATC <u>TTG</u> TGGAATGTAAATATC	63,3
	K283Q	LoxY280K283Qsens	CTTGCTTATGCACTA <u>CAA</u> TCCGTCGTTTCAGTTTC	68,3
		LoxY280K283Qanti	GAAACTGAACGACGGA <u>TTG</u> TAGTGCATAAGCAAG	68,3
Déterminant de Sloane	V583H	V583Hsens	CCTTGAGGCGACA <u>CAT</u> TTTCCGGCAAAAT	66,7
		V583Hantisens	ATTTTGCCGGAAA <u>ATG</u> TGTCGCCTCAAGG	66,7
	V583F	V583Fsens	CCTTGAGGCGACA <u>TTT</u> TTTCCGGCAAAAT	65,3
		V583Fantisens	ATTTTGCCGGAAA <u>AAA</u> TGTCGCCTCAAGG	65,3
Déterminant de Borngräber	S517F	LoxS517Fsens	GTCGCCATCAACGAC <u>TTT</u> GGTGTTCATCAGTTA	68,2
		LoxS517Fantisens	TAACTGATGAACACC <u>AAA</u> AGTCGTTGATGGCGAC	68,2
	S517A	LoxS517Asens	CTCGCCATCAACGAC <u>GCT</u> GGTGTTCATCAGTTA	70,7
		LoxS517Aantisens	TAACTGATGAACACC <u>AGC</u> GTCGTTGATGGCGAG	70,7
Déterminant de Coffa	G568A	G568Asens	CATAAATGCTGTG <u>GCA</u> CGACAAATCTTGA	63,9
		G568Aantisens	TCAAGATTTGTCG <u>TGCC</u> CACAGCATTTATG	63,9
Ciblage potentiel de l'oxygène	L579I	LoxL579Isens	AATGCTGGAGGAATC <u>ATT</u> GAGGCGACAGTTTTTC	68,3
		LoxL579Iantisens	GAAAACTGTCGCCTC <u>AAT</u> GATTCTCCAGCATT	68,3
	L579V	LoxL579Vsens	AATGCTGGAGGAATC <u>GTT</u> GAGGCGACAGTTTTTC	69,5
		LoxL579Vantisens	GAAAACTGTCGCCTC <u>CAA</u> CGATTCTCCAGCATT	69,5
Positionnement potentiel du substrat	L572F	LoxL572Fsens	GTGGGACGACAAATC <u>TTT</u> ATTAATGCTGGAGGA	67,0
		LoxL572Fantisens	TCCTCCAGCATTAAT <u>AAA</u> GATTTGTCGTCCTCCAC	67,0
	L572V	LoxL572Vsens	GTGGGACGACAAATC <u>GTG</u> ATTAATGCTGGAGGA	69,5
		LoxL572Vantisens	TCCTCCAGCATTAAT <u>CAC</u> GATTTGTCGTCCTCCAC	69,5

Communications

Communications par affiche :

Jean-Christophe Alberti, Cynthia Palmieri-Thiers, Sabrina Jacopini, Virginie Brunini-Bronzini, Claude Gambotti, Jean Giannettini, Liliane Berti, Jacques Maury (2010) « Application de la voie de la lipoxygénase dans la production de molécules aux propriétés aromatiques » *Journée du Doctorant*, Corte

Jean-Christophe Alberti, Cynthia Palmieri-Thiers, Virginie Brunini, Claude Gambotti, Félix Tomi, Stéphane Canaan, Ernst H. Oliw, Jacques Maury, Liliane Berti (2011) : « Identification d'acides aminés impliqués dans l'accessibilité du substrat au site actif de la lipoxygénase de l'olive » *Journée du Doctorant*, Corte

Jean-Christophe Alberti, Cynthia Palmieri-Thiers, Stéphane Canaan, Virginie Brunini, Claude Gambotti, Félix Tomi, Ernst H. Oliw, Liliane Berti, Jacques Maury (2011) « Identification of putative residues involved in the accessibility of the substrate-binding site of lipoxygenase by site-directed mutagenesis studies » *8th Lipidomics Meeting "Membranes and Bioactive Lipids"*, Lyon

Jean-Christophe Alberti, Cynthia Palmieri-Thiers, Stéphane Canaan, Virginie Brunini, Claude Gambotti, Félix Tomi, Ernst H. Oliw, Liliane Berti, Jacques Maury (2012) « Identification of putative residues involved in the accessibility of the substrate-binding site of lipoxygenase by site-directed mutagenesis studies » *Journée du Doctorant*, Corte

Communication orale :

Jean-Christophe Alberti, Sabrina Jacopini, Virginie Brunini-Bronzini, Claude Gambotti, Liliane Berti et Jacques Maury (2012) « Utilisation des enzymes de la voie de la lipoxygénase dans la production biotechnologique de molécules aux propriétés aromatiques » *4^e Tribune des chercheurs*, Bastia

Publication acceptée :

Cynthia Palmieri-Thiers, Jean-Christophe Alberti, Stéphane Canaan, Virginie Brunini, Claude Gambotti, Félix Tomi, Ernst H. Oliw, Liliane Berti, Jacques Maury (2011) « Identification of putative residues involved in the accessibility of the substrate-binding site of lipoxygenase by site-directed mutagenesis studies » *Archives of Biochemistry and Biophysics* 509, 82-89.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

Identification of putative residues involved in the accessibility of the substrate-binding site of lipoxygenase by site-directed mutagenesis studies

Cynthia Palmieri-Thiers^{a,1}, Jean-Christophe Alberti^{a,1}, Stéphane Canaan^b, Virginie Brunini^a, Claude Gambotti^a, Félix Tomi^c, Ernst H. Oliw^d, 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 Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse, CNRS, UPR 9025, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, Cedex 20, France

^c Université de Corse, CNRS UMR6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

^d Division of Biochemical Pharmacology, Department of Pharmaceutical Biosciences, Biomedical Center, Uppsala University, SE-751 24 Uppsala, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2010

and in revised form 3 February 2011

Available online 21 February 2011

Keywords:

Olive lipoxygenase

Homology-modeling

Site-directed mutagenesis

Substrate-binding accessibility

ABSTRACT

Lipoxygenases (LOXs) are a class of widespread dioxygenases catalyzing the hydroperoxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA). Recently, we isolated a cDNA encoding a LOX, named olive LOX1, from olive fruit of which the deduced amino acid sequence shows more than 50% identity with plant LOXs. In the present study, a model of olive LOX1 based on the crystal structure of soybean LOX-1 as template has been generated and two bulky amino acid residues highly conserved in LOXs (Phe277) and in plant LOXs (Tyr280), located at the putative entrance of catalytic site were identified. These residues may perturb accessibility of the substrate-binding site and therefore were substituted by less space-filling residues. Kinetic studies using linoleic and linolenic acids as substrates were carried out on wild type and mutants. The results show that the removal of steric bulk at the entrance of the catalytic site induces an increase of substrate affinity and of catalytic efficiency, and demonstrate that penetration of substrates into active site of olive LOX1 requires the movement of the side chains of the Phe277 and Tyr280 residues. This study suggests the involvement of these residues in the accessibility of the substrate-binding site in the lipoxygenase family.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Lipoxygenase (LOX: linoleate oxygen oxidoreductase; EC 1.13.11.12)² is a nonheme iron-containing dioxygenase found in many plants and animals [1], which catalyses the hydroperoxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) with a (1Z, 4Z)-pentadiene system to form fatty acid hydroperoxides [2]. PUFA hydroperoxides are subsequently metabolized into compounds involved in numerous physiological processes and in development of fresh and off flavors in many plant food products. LOX from different sources, catalyses oxygenation at different points along the carbon chain, referred to as “positional” or “regio” specificity.

In plant, the insertion of the oxygen takes place either on carbon 9 or carbon 13 of PUFA, to generate the corresponding 9- or 13-hydroperoxides. So, plant LOXs have been classified according to their positional specificity of linoleic acid oxygenation into 9- and 13-LOXs [3]. However a few non-traditional plant LOXs can

produce both 9- and 13-hydroperoxides. In addition to the regio-specificity, most of LOXs control the stereochemistry of hydroperoxide products [4,5].

Based on amino acid sequence alignments, it is clear that the catalytic site is a very similar structure throughout the LOX gene family. In the past, the few sequence differences of catalytic site have been the subject of numerous site-directed mutagenesis studies which allowed identifying residues in the primary structure as determinants for the “regio” [6–10] and stereospecificity [11,12] of LOXs.

Recently, we isolated and characterized a cDNA encoding a LOX, named olive LOX1, from olive fruit, and showed that the recombinant enzyme produces both 9- and 13-hydroperoxide of linoleic acid in a 2:1 ratio [13].

Many studies have been conducted on soybean LOX-1 of which three-dimensional structure and catalytic mechanism have been well-characterized [14–16]. This LOX presents a good opportunity to correlate isolated structural changes with known differences in catalysis and to extend the insights to the entire lipoxygenase family.

For a larger knowledge of action mechanism of LOXs, structural modeling of various LOXs was carried out using the X-ray coordinates of soybean LOX-1 [17–22]. In this way, we modeled the

* Corresponding author. Fax: +33 495 610 551.

E-mail address: maury@univ-corse.fr (J. Maury).

¹ The two authors contributed equally to this work.

² Abbreviations used: LOX, linoleate oxygen oxidoreductase; PUFA, polyunsaturated fatty acids; DM, double mutant.

three-dimensional structure of olive LOX1. We pointed out the presence, at the putative entrance of catalytic site, of residues of Phe and Tyr at the position 277 and 280, respectively. The alignment of amino acid sequence of plant LOXs shows that these residues are highly conserved at the corresponding position, excepted for soybean LOX-1 which exhibits the Ala and Ile residues. Considering the bulky side-chain of these aromatic residues, we propose that they are responsible of the hindrance of the site entrance, and may influence the penetration of the substrate into the active site, leaving presume a lower catalytic efficiency of olive LOX1. In this regard, we previously found that linoleic acid conversion rate is about 25% with olive LOX1 while it reaches 90% with soybean LOX-1 [23].

In our study, we further examine the involvement of Phe277 and Tyr280 in the catalysis of linoleic and linolenic acid hydroperoxidation by olive LOX1, substituting these residues by the corresponding less space-filling residues Ala and Ile of the soybean LOX-1. We have determined kinetic parameters of the F277A, Y280I and F277A/Y280I mutants and shown that they display a higher catalytic efficiency for hydroperoxidation of linoleic and linolenic acids compared to the wild type enzyme. In views of these results, we discussed the involvement of the Phe277 and Tyr280 residues during the penetration of linoleic and linolenic acids into the active site of olive LOX1.

Materials and methods

Materials, bacterial strains

The oligonucleotides used in site-directed mutagenesis were synthesized by Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Cobalt-affinity resin (Talon[®] Metal Affinity) was purchased from Clontech (Heidelberg, Germany). All other chemicals were commercial products of analytical grade or molecular biological grade.

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used for site-directed mutagenesis. T5 RNA-polymerase-mediated gene expression was performed in *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen).

Site-directed mutagenesis and expression

A construct model named pQE30-LOX, containing the plasmid pQE30 (Qiagen) and the full-length wild type olive LOX-encoding gene [13], was used as template. Site-directed mutagenesis experiments were performed using the Quick Change[™] site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's protocol with primers containing the mutations F277A (5'-GAA GATGTCGGATGCTCTTGCTTATGCA-3'/5'-GTGCATAAGCAAGAGCAT CCGACATCTTC-3'), Y280I (5'-CGGATTTTCTTGCTATTGCACTAAAA TCCG-3'/5'-CGGATTTTAGTGCAATAGCAAGAAAATCCG-3') and F277A/Y280I (5'-GAAGATGTCGGATGCTCTTGCTATTGC-3'/5'-GCAA TAGCAAGAGCATCCGACATCTTC-3'). The PCR reaction was done as follows: 95 °C for 30 s, and 18 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 1 min, 72 °C for 4 min, final extension at 72 °C, 10 min. Plasmid DNA were purified and mutations were confirmed by DNA sequencing by Genome Express SA (Grenoble, France). Following the subcloning into *E. coli* XL1-Blue strain (Stratagene) mutated olive LOX1 were expressed in *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen) as described previously [13].

Purification of recombinant wild type and mutant olive LOX1

The enzymes were purified by a one-step purification procedure. The soluble protein fraction (250 mL for the wild type and 150 mL for the mutants) obtained by bacterial lysis [13] was loaded onto Talon (Clontech) column (2 mL bed volume) pre-

equilibrated with buffer A (50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing 300 mM NaCl). Most of the *E. coli* proteins elute in the flow through, and once the A_{280} of the effluent returned to baseline, one wash (corresponding to about 10 column volumes) was performed with 40 mM imidazole in buffer A, to elute the unspecifically bounded proteins. Then, the His-tagged olive LOX1 was eluted with 100 mM imidazole in buffer A. Fractions showing LOX activity and containing pure protein on SDS-PAGE were pooled and concentrated by dialysis against Aquacide III (Calbiochem) and then 50 mM sodium phosphate buffer pH 6. The concentrated protein sample was used immediately or stored at 4 °C and used within 3 days.

Protein analysis

Protein concentrations were determined spectroscopically for the pure recombinant wild type and mutant olive LOX1 using a theoretical A_{280} extinction coefficient (ϵ) calculated from the tyrosine and tryptophan content [24,25] of the deduced amino acid sequences. Protein concentrations of soluble fractions obtained by bacterial lysis were determined by the Bradford method [26] using bovine serum albumin as the standard.

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 with the monoclonal peroxidase-conjugated anti-His antibody (Sigma).

Total iron content was determined colorimetrically by complexation with Ferrozine [27,28]. The values of the iron content of the final wild-type and mutant preparations represent the mean of three independent replicates.

Enzymatic assay and kinetic studies

LOX activity was determined by continuously monitoring the formation of conjugated dienes at 235 nm [29] as described previously [13] and calculated using the extinction coefficient $\epsilon = 25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Specific activity was expressed in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. One unit of LOX activity is defined as the amount of enzyme catalysing the formation of 1 μmol of hydroperoxide per minute.

The kinetic parameters were done with 1 μg of pure protein using a range of substrate concentrations (linoleic and linolenic acids) between 0.5 and 150 μM . The experimental data were fitted to Michaelis-Menten equation.

Synthesis and analysis of wild type and mutant olive LOX1 products

Hydroperoxides of linoleic acid were synthesized according to Vick and Zimmerman [30] with adaptations. Briefly, purified wild type and mutant olive LOX1 (1.5 Units), 5.36 mM of linoleic acid, and 11 mM NaOH were added to 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), previously oxygenated at 25 °C. After 30 min, under gentle oxygenation, the reaction was stopped by acidification. Hydroperoxides were extracted with 3 \times 30 mL of diethyl ether and washed with 2 \times 30 mL of water. Solvent was removed and replaced by CDCl_3 (0.5 mL) for NMR experimentation.

Identification of LOX products was performed as described by Lorenzi et al. [23] using a Bruker 400 Avance Fourier Transform spectrometer operating at a 100.623 MHz for ^{13}C , equipped with a 5 mm probe, in deuteriochloroform, with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ^{13}C NMR spectra were obtained with the following acquisition parameters: pulse width 45° (4 μs), acquisition time 2.73 s for 128 K data table with a spectral width of 25,000 Hz (250 ppm), digital resolution = 0.183 Hz per point. ^{13}C NMR chemical shift of hydroperoxides extracted was

compared to values obtained by Lorenzi et al. [23] with soybean commercial LOX on esterified 9- and 13- hydroperoxides of linoleic acid:

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 134.03 (9-OOH, C-12), 133.86 (13-OOH, C-11), 131.31 (13-OOH, C-11), 131.14 (9-OOH, C-11), 130.00 (9-OOH, C-10), 129.91 (13-OOH, C-12), 127.56 (13-OOH, C-9), 127.38 (9-OOH, C-13), 86.82 (13-OOH, C-13), 86.77 (9-OOH, C-9) 31.75 (13-OOH, C-16), 31.51 (9-OOH, C-16), 27.92 (9-OOH, C-14), 27.70 (13-OOH, C-8), 25.21 (9-OOH, C-7), 24.97 (13-OOH, C15).

Enantiomer composition analysis was carried out by chiral-phase HPLC with on-line MS/MS [31]. The hydroperoxides were reduced by triphenylphosphine, separated by chiral-phase HPLC on a column with amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbonate) coated on silica gel (Reprosil Chiral-AM; 10 μm ; 250 mm \times 2 mm; Dr. Maisch) and eluted with ethanol/hexan/acetic acid, 95/5/0.02 (0.2 mL min^{-1}). The effluent was mixed in a tee with isopropanol/water, 3/2 at 0.1 mL min^{-1} and the products were detected by MS/MS analysis of carboxylate anions. The capillary temperature was 315 $^\circ\text{C}$, the spray voltage was 4.5 kV, and prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ was utilized for tuning. Mass spectrometry experiments were performed on a linear ion-trap (LIT) mass spectrometer using Xcalibur as operating system (LTQ, ThermoFisher). Electrospray ionization was conducted and negative ions were detected.

Primary sequence comparisons and homology-modeling

The alignment of LOX primary sequences were performed using the ClustalW program [32]. The degree of identity of primary

sequences was determined using the program Dialign2 [33]. It appeared to be higher than 50% with several other LOXs (data not shown). Another alignment, performed using the algorithm PSI-BLAST against PDB database, showed that two LOXs (soybean LOX-1 and soybean LOX-3, respectively PDB ID 1YGE and 1IK3) had a high degree of primary sequence identity with olive LOX1 (respectively 57% and 61%).

Tertiary structure predictions were accomplished by homology-modeling using soybean LOX-1 as template through the PHYRE server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>), which incorporates multiple structure prediction algorithms. Structural refinements were performed by superposition with three-dimensional structure of soybean LOX-1 using the Turbo-Frodo program [34]. Identification of potential cavities inside the protein, corresponding to the putative active site, was performed using the software PyMol with the plugin MOLE [35].

Results

Homology-modeling of olive LOX1 and choice of mutations

Although the lipoxygenases show a high degree of sequence identity among them, each one has a reactional specificity. Subtle differences existing at a structural level seem to play a key role on the lipoxygenase characteristics. As the crystal structure of olive LOX1 was not yet elucidated, we decided to model its three-dimensional structure by homology-modeling. Soybean LOX-1 (PDB:

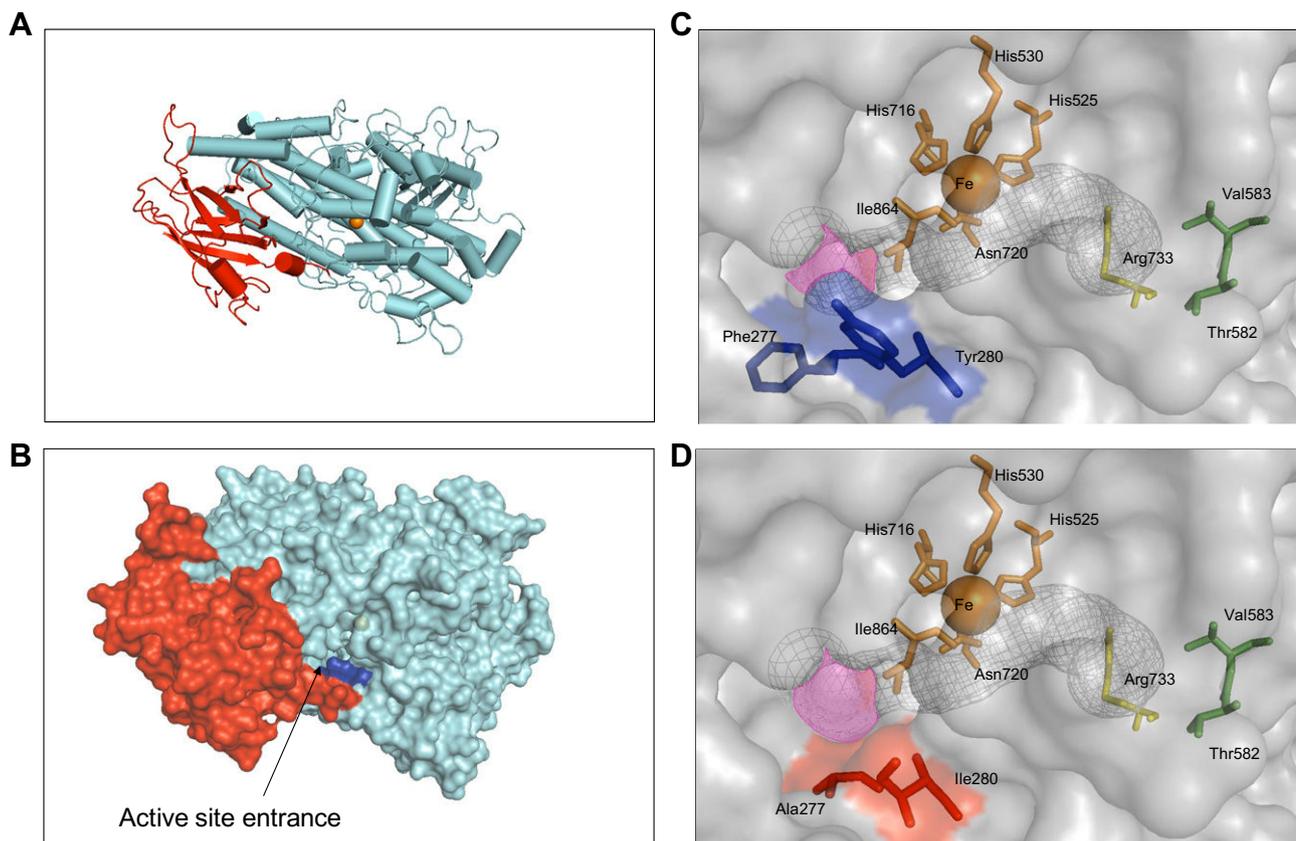


Fig. 1. Modeled three-dimensional structures of wild type olive LOX1 and its F277A/Y280I double mutant. The overall structure of olive LOX1 shows two domains (A), the N-terminal domain mostly constituted of β -sheets structures (represented as arrows) colored red and the C-terminal domain mostly constituted of α -helix structures (represented as cylinders) colored cyan. The catalytic iron atom is pointed in orange. The molecular surface of the modeled protein (B) shows the entrance of the putative active site of olive LOX1, pointed by the two residues Phe277 and Tyr280 colored blue. A focus into the entrance of the active site (C, D) let appear the putative cavity of the active site of the olive LOX1 delimited by a grey fence. The entrances are lined pink and the bottoms are represented by yellow Arg residues. The catalytic iron atoms and their ligands are shown in orange. Residues suspected responsible for the bulkiness of the site entrance are colored blue for wild type olive LOX1 and red for double mutant olive LOX1.

1YGE) displaying high sequence identity with olive LOX1 (57%) was used as template.

The three-dimensional model of olive LOX1 shows the secondary structural elements characteristic of the folding of LOXs (Fig. 1A and B). As previously predicted from its primary sequence [13], the olive LOX1 consists of two folding units: an N-terminal eight stranded antiparallel β -barrel domain and a larger C-terminal domain formed predominantly by α -helices.

Superposition of the generated model with soybean LOX-3 co-crystallized in complex with 13(S)-hydroperoxy-9(Z), 11(E)-octadecadienoic acid [36] revealed the putative substrate-binding site within the C-terminal domain (Fig. 1B).

The exploration of the putative active site of the modeled olive LOX1 leads to disclose the presence of two particularly bulky residues located at the site entrance. Indeed, in olive LOX1 the substrate binding site seems cluttered by the presence of the aromatic amino acid residues Phe277 and Tyr280 (Fig. 1C). We propose that the Phe277 and Tyr280, directly accessible from the surface of the olive LOX1 (Fig. 1B and C), are responsible of the overall dimensions of the site entrance, and thus are involved in the substrate penetration into the active site. Furthermore, the alignment of amino acid sequences of LOXs shows that the Phe277 residue of olive LOX1 is highly conserved in most of the LOXs sequences and Tyr280 residue is very conserved in plant LOXs (Fig. 2), which leaves suggest that these residues might be involved in the penetration of the substrate into the active site of the enzyme.

To investigate a functional role for Phe277 and Tyr280, mutant enzymes were constructed by replacement of bulky amino acid residues with the less space-filling residues. Thus, three mutants were constructed: the Phe277Ala (F277A) and Tyr280Ile (Y280I) single mutants, and the Phe277Ala/Tyr280Ile (F277A/Y280I) double mutant. As predicted by Fig. 1D, these mutations would eliminate the cluttering of the site entrance and should allow an easier accessibility of the substrate to the active site.

Expression and purification of wild type and mutant olive LOX1

The wild type and mutant olive LOX1 were expressed in *E. coli* as a fusion protein with histidine-tag. Expression was induced by 1 mM IPTG and low temperature (15 °C) incubation, as previously described [13]. In these conditions, the soluble protein fraction of wild type olive LOX1, F277A, Y280I and F277A/Y280I mutants showed a specific LOX activity of 1.34, 3.50, 3.82, 4.29 U mg⁻¹ protein, respectively, with linoleic acid as substrate.

The recombinant enzymes (wild type and mutants) were purified by affinity chromatography using Cobalt chelated column. The purification flow sheet is given in Table 1 and shows that the specific activity of the wild type LOX reached 31.7 U mg⁻¹ protein with linoleic acid, while it rose to 91.1, 97.1 and 124.2 U mg⁻¹ protein with the same substrate for the F277A, Y280I and F277A/Y280I mutants, respectively. An approximately 26-fold purification was achieved for all the recombinant enzymes. We have obtained

ACG56281	Olive_LOX1	246	DPNSESRIPLLTSLDIYIPRDERFGHLKMSDFLALYALKSVVQFLLPEFEDLCDS---IHN
P27481	LOXB_PHAVU	135KPSDFVY----L...A...S...G...S.DV..VLT.AF.-GNLLSL
P38417	LOX4_SOYBN	241KPSDFVY----L...A...S...GI...S.DV..VLT.AF.-GNLISL
P38414	LOX1_LENCU	254	E.Q...SDTVY----L...A...V.S...V.I...AS.NIV.QLRVVT-LQLNNP
P08170	LOX1_SOYBN	228	..T.KQGEVIFY----V...NL...SK.A.EIGT..LS.IVQ.A..SAF.-LKSTPI
P09439	LOX2_SOYBN	258	.Q...KPGEVY----V...N...S...GI..LS.YV..A..SVF.-LNFTF.
P14856	LOX2_PEA	254KPATETY----V...N...S...GI...S.CVV.A..SAF.-LNFTF.
P24095	LOXX_SOYBN	252KP-GEVY----V...N...S...T.GI..LSHDVI.L.KSAIFQLRVTS
P27480	LOXA_PHAVU	254	..KC.IPTSDTY----...N...SG..T..I..LT.NV..T.QKAFG-...FN.
P09186	LOX3_SOYBN	246SNDVY----L...A...S...T.G...S.NV..LLQS-AFDLNFNTPR
P09918	LOX3_PEA	249SDYVY----L...A...S...T.G..A.S.NVV.AL.SVFFDLNFNTP.
Q9LUW0	LOX5_ARATH	264	..K...LA..N..N..V...S.V.F...T.V.V..IASV..K...TI.
P37831	LOX1_SOLTU	243	..K...IL...V...T...I...I...LHA.F.G...TP.
P38415	LOXA_SOLLC	242	..K...IL...V...T...I...I...LHA.F.G...TP.
P38416	LOXB_SOLLC	241	..C...N..PM...V...V.K...TSS...SLT...A.KA..N...TP.
Q06327	LOX1_ARATH	241	..QT...L.ITS...V...AIA..IQ.AL.AVF.D...TPK
P29114	LOX1_HORVU	238	..SL...LS..EQ--..V...K...T...G.SI.AIT.GI..AVRTYV.-...TTPG
Q7G794	LOX3_ORYSJ	243	..D...LS.VEQ--..V...A...G.SI.AIAEGIV.AIRTYV.-...TTPG
P29250	LOX2_ORYSJ	240	..TA...LS..EN--..V...A...G.SI.AL.DGIV.AIRTYV.-...LTPG
Q76I22	LOX1_ORYSJ	240LS..EQ--..V.S...A...AG.SI.AI..GI..AIRTYV.-...LTPG
Q53RB0	LOX4_ORYSJ	249	..T...L..DLN..V...G.S...AI.EGV..IIRTYV.-...TTPK
P38419	LOXC1_ORYSJ	305	..--K.ETRKGN--V.V...E.SPE.EDY..RKTVG..L.AAV.AAQS.LLDKLNWNL
Q84YK8	LOXC2_ORYSJ	322	..--K.ETRKGN--V.V...E.SEV.NAQ..LKT.Q..LHA.V.AAQSALIDNLSLNL
P93184	LOX21_HORVU	300	..F..E.SHKEH---.V...A.TER..GA.DTKKFM.QLHA.TTGLKTAKHK...SQ
Q8GSM3	LOX22_HORVU	298	..S..EESHKKE--M.V...T.TER.EQA..TKQ.L.QLHG.CTGLKVNK.I...LP
Q8GSM2	LOX23_HORVU	281	..--T.ETRSP--V.V...Q.SDV.GRT.S.TT.R.GLHAI..AVAP.LNN...SH
P38418	LOX2_ARATH	284	..--S.EQRYGGE--F.V...E.STA.GTS.TGK.VLAALPSIF.QI.SVLL.P...QE
Q9FNX8	LOX4_ARATH	310	.MM..R.VEKPLP--M.V...Q.EES.QNT.A.CR..A.LHN.I.SLKASILAED.---
Q9LNR3	LOX3_ARATH	304	.KDA...VEKPLP--M.V...Q.EES.QDT.A.GR..A.LHH.I.SLKASIVAED.---
Q9CAG3	LOX6_ARATH	297	..PC...GKEKEE--F.V...V.EEI.RDT.R.GRF.ALPHN.V.SIAAALSNDI---
Q8H016	LOX6_ORYSJ	300	NMLA...VEKPHP--.V...A.EE..QGA.SSGR.RA.LHT.I.SLIASISAETH---
Q7XV13	LOX5_ORYSJ	286	.ASA...VEYPEP--.VS...E.EEG.NEMLSEG.I.ALLHNFM.LLVSSVSPDIR---
O15296	LX15B_HUMAN	170	-----LELNKYSTA.NAN.YLQ.GSAFAE---MKIKG.L.R...-KG
O19043	LX12/15_RBT	161	-----L.V...LED.KI..E.SLAWGLAE---LALKNSLNI...-LA
P39654	LX12L_MOUSE	161	-----L.V.Q..RED.RLE..E.SQVLGTMD---TVINFPKNT...-VT
3FG4 A	8RLOX_Coral	165	-----L...VQ.TDE.SRSYQESRKAAL.NLIGISLFTMFEE...---

Fig. 2. A partial sequence alignment of lipoxygenases. A focus is done on the supposed region of entrance of the active site. Underlined in red, the highly conserved residue of Phe277, and underlined in orange the very conserved residue of Tyr280. Identical amino acids are represented by dot. Taxonomic identifiers: PHAVU, *Phaseolus vulgaris*; SOYBN, *Glycine max*; LENCU, *Lens culinaris*; PEA, *Pisum sativum*; ARATH, *Arabidopsis thaliana*; SOLTU, *Solanum tuberosum*; SOLLC, *Solanum lycopersicum*; HORVU, *Hordeum vulgare*; ORYSJ, *Oryza sativa subsp. japonica*; HUMAN, *Homo sapiens*; RBT, *Oryctolagus cuniculus*; MOUSE, *Mus musculus*; CORAL, *Plexaura homomalla*.

Table 1
Flow sheet of recombinant wild-type and mutant olive LOX1 purification.

	Purification step	Total activity (Units) ^a	Protein (mg) ^b	Specific activity (U/mg)	Activity recovery (%)	Purification factor
Wild type	Cell lysate	794.90	593.20	1.34	100	1
	Talon chromatography	80.20	2.53	31.70	10	23.6
F277A	Cell lysate	256.60	191.50	3.50	100	1
	Talon chromatography	34.60	0.38	91.10	13.5	26
Y280I	Cell lysate	445.00	116.50	3.82	100	1
	Talon chromatography	73.80	0.76	97.10	16.5	25.4
F277A/Y280I	Cell lysate	505.00	117.70	4.29	100	1
	Talon chromatography	67.10	0.54	124.20	13.3	28.9

^a One unit corresponds to 1 μmol of hydroperoxide released per minute using linoleic acid as substrate under standard conditions.

^b Lower amounts of purified enzyme were obtained for the mutants because of the use of lower bacteria amount.

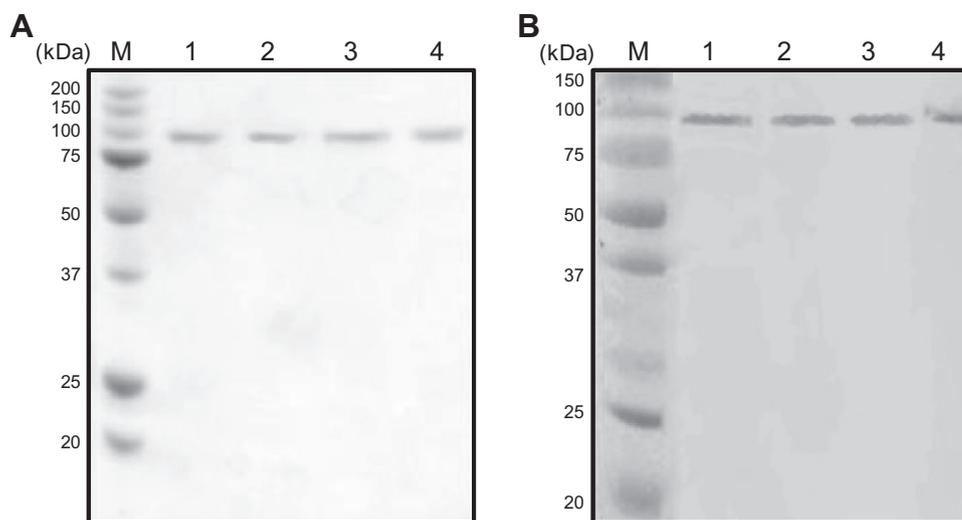


Fig. 3. SDS-PAGE (12% acrylamide) analysis of purified wild type and mutant olive LOX1. The proteins (15 μg for A and 0.5 μg for B) were (A) stained with EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma) or (B) blotted and probed with the specific monoclonal peroxidase conjugated anti-His antibody. Lane M, molecular mass standard, Lane 1, wild type olive LOX1, Lane 2, F277A olive LOX1 mutant, Lane 3, Y280I olive LOX1 mutant, Lane 4, F277A/Y280I olive LOX1 double mutant.

2.53 mg of recombinant wild type enzyme from 250 mL of soluble protein fraction and 0.38, 0.76 and 0.54 mg for the F277A, Y280I and F277A/Y280I mutants, respectively from 150 mL of soluble protein fraction. Lower amounts of purified enzyme were obtained for the mutants because of the use of lower bacteria amount. The iron contents of purified wild type, F277A, Y280I and F277A/Y280I mutants were estimated at 0.62 ± 0.04 , 0.70 ± 0.03 , 0.65 ± 0.04 and 0.54 ± 0.03 mol/mol of enzyme, respectively.

Purified wild type and mutant olive LOX1 appeared as a unique band at 98 kDa in both Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE and immunoblot, that was in good agreement with the predicted molecular mass (Fig. 3).

Effect of mutations of olive LOX1 on hydroperoxidation of linoleic and linolenic acids

Kinetic parameters of wild type and mutants were investigated using linoleic and linolenic acids as substrates. A Michaelis–Menten type curve without lag-phase was obtained for each enzyme, and kinetic parameters were determined from Lineweaver–Burk plots (Table 2).

The kinetic constants of linoleic and linolenic acids oxygenation by wild type olive LOX1 show that linoleic acid is the preferred substrate, as previously described [13]. Indeed, although the K_m for linoleic acid (20.78 μM) was not significantly lower than the K_m for linolenic acid (40.58 μM), the estimates k_{cat}/K_m for linoleic acid hydroperoxidation ($22.62 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) and for linolenic acid hydroperoxidation ($2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) suggested that the

catalytic efficiency of the wild type olive LOX1 was 11-fold higher for linoleic acid hydroperoxidation than for linolenic acid hydroperoxidation. There are significant differences between the K_m reported in Table 2 for the wild type olive LOX1 (20.78 and 40.58 μM for linoleic and linolenic acids, respectively) and those previously reported (174.94 and 343.66 μM for linoleic and linolenic acids, respectively) [13]. As previously reported by Hughes et al. [18] for recombinant pea 9/13-LOX these differences are largely due to the enzyme concentration used in the assay. Indeed, we previously used larger amounts of enzyme in the assay (4 μg) [13], whereas in the present study, the use of lower amounts of enzyme (1 μg) led to lower K_m values. A comparison of K_m for linoleic and linolenic acids between wild type and mutant olive LOX1 was justified on the basis that the enzymes were at similar levels of purity (Fig. 3) and the same amounts of enzyme were assayed.

Relative to the wild type enzyme, the F277A mutant presents highest affinity for linoleic acid ($K_m = 2.76 \mu\text{M}$) and shows a 5-fold increase of the turnover (2.36 s^{-1}) for linoleic acid hydroperoxidation (Table 2). These results lead to a consequent 37-fold increase in the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for linoleic acid hydroperoxidation. The F277A mutation appears to strongly enhance the hydroperoxidation of linoleic acid, whereas the Y280I mutation gives rise to an only 3.4-fold increase in the k_{cat}/K_m for linoleic acid hydroperoxidation relative to the wild type enzyme. The F277A/Y280I double mutant exhibits a high catalytic efficiency for hydroperoxidation of linoleic acid, but slightly lower to that of the F277A mutant.

The double mutant is usually produced in order to combine the effects of the two single mutations. Mildvan et al. [37,38] have

Table 2
Kinetic parameters for wild type and olive LOX1 mutants.

	Linoleic acid				Linolenic acid			
	K_m (μM)	V_{max} (nmol s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{max} (nmol s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Wild type	20.78	0.23	0.47	22.62	40.58	0.16	0.08	2.00
F277A	2.76	0.76	2.36	855.07	24.90	0.70	0.22	8.83
Y280I	4.44	0.15	0.35	78.83	5.72	0.31	0.72	125.87
F277A/Y280I	4.07	2.53	2.77	680.60	11.23	1.14	1.25	111.31

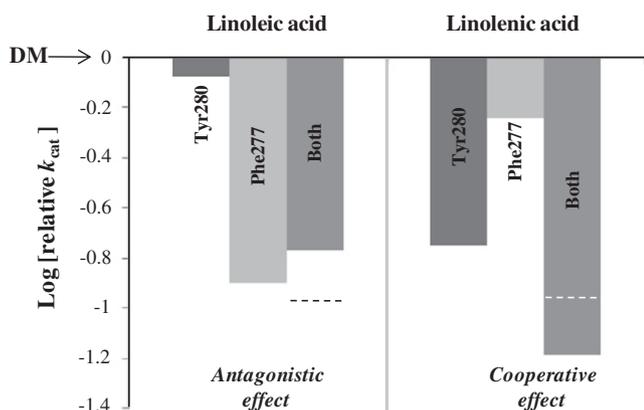


Fig. 4. Interactions of the effects of the two single mutations (F277A and Y280I) on catalysis (k_{cat}) in the double mutant (F277A/Y280I) of enzyme [38]. Analysis, carried out using the k_{cat} of the double mutant (DM) as the reference point rather than those of the wild type enzyme, shows the effects of restoring wild type residues individually and in pairs. The magnitude of the bars is expressed as the log of the relative k_{cat} . Values were calculated using the equations $k_{\text{cat}}^{\text{rel}}(\text{wild type}) = k_{\text{cat}}^{\text{wild type}}/k_{\text{cat}}^{\text{double mutant}}$ and $k_{\text{cat}}^{\text{rel}}(\text{single mutant}) = k_{\text{cat}}^{\text{single mutant}}/k_{\text{cat}}^{\text{double mutant}}$. The dotted lines represent the magnitude of restoring both single mutants together if their respective effects were simply additive, i.e., no interaction between residues. Deviation from this additive value indicates partial additive (cooperative), synergy (anti-cooperative) or antagonism in the interaction of the two residues. The bars designated Phe277 represent the relative k_{cat} for linoleic or linolenic acid upon restoration of that residue, which would be the Y280I single mutant. The bars designated Tyr280 represent the relative k_{cat} for linoleic or linolenic acid upon restoration of that residue, which would be the F277A single mutant, and the bars designated both represent the relative k_{cat} for linoleic or linolenic acid upon restoration of the two residues, which would be the wild type enzyme.

pointed out that mathematically, the effect of the second mutation could interact with the effect of the first mutation in one of only five possible ways in the double mutant: additive, partially additive, synergistic, antagonistic, or no additional effect. Mildvan [38] proposed the significant conceptual “inverse thinking” method to analyze interaction of the effect of individual mutations in the double mutant. According to this method, the parameters of the double mutant are used as the reference point rather than those of the wild type. The data are expressed in a logarithmic plot of the parameters relative to the double mutant that results from restoring each residue and both together. Because free energy barriers to catalysis were being added, we were comparing the product of the effects on catalysis of the two single mutants with the effect of the double mutant. Using the “inverse thinking” method of Mildvan [38], we have investigated the interaction of the effects of the two single mutations (F277A and Y280I) on catalysis of the hydroperoxidation of linoleic acid in the double mutant of enzyme (Fig. 4).

The k_{cat} of the double mutant for linoleic acid hydroperoxidation is $10^{0.77}$ (i.e. 5.9)-fold higher than that of the wild type. Restoring Tyr280 (as in the F277A single mutant) decreases k_{cat} by $10^{0.07}$ (i.e. 1.2)-fold while restoring Phe277 (as in the Y280I single mutant) decreases k_{cat} by $10^{0.9}$ (i.e. 7.9)-fold. Restoring both Phe277 and Tyr280 (as in the wild type enzyme) decrease k_{cat} by $10^{0.77}$

(i.e. 5.9)-fold which is $10^{0.2}$ (i.e. 1.6)-fold lower than the product of the effects of restoring Phe277 and Tyr280 individually ($10^{0.9} \times 10^{0.07} = 10^{0.97}$ i.e. 9.3), directly measuring the antagonism of the two residues, indicating opposing effects of the two residues on the catalysis of the linoleic acid hydroperoxidation.

Furthermore, substitution of Tyr280 by less space-filling isoleucine induces changes in both kinetic parameters, K_m (5.72 μM compared to 40.58 μM for the wild type) and k_{cat} (0.72s^{-1} compared to 0.08s^{-1} for the wild type), concerning the hydroperoxidation of linolenic acid relative to the wild type enzyme (Table 2). This results to a consequent 63.7-fold enhancement in catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for hydroperoxidation of linolenic acid. The F277A mutation gives rise to an only 4.4-fold increase in the k_{cat}/K_m for linolenic acid hydroperoxidation relative to the wild type enzyme, whereas the F277A/Y280I mutant exhibits a similar increase of the catalytic efficiency that the Y280I mutant.

The interaction of the effect of F277A and Y280I mutations on catalysis of the hydroperoxidation of linolenic acid in the double mutant have been studied using the “inverse thinking” method of Mildvan [38] (Fig. 4). The double mutant presents a k_{cat} for linolenic acid $10^{1.19}$ (i.e. 15.5)-fold greater than that of the wild type enzyme. Restoring only Phe277 to the double mutant decreases k_{cat} by $10^{0.24}$ (i.e. 1.7)-fold. Restoring only Tyr280 to the double mutant decrease k_{cat} by $10^{0.75}$ (i.e. 5.6)-fold. Restoring both Phe277 and Tyr280 to the double mutant decreases k_{cat} by $10^{1.19}$ (i.e. 15.5)-fold which exceeds the product of the effects of individually restoring Phe277 and Tyr280 ($10^{0.24} \times 10^{0.75} = 10^{0.99}$ i.e. 9.8) by $10^{0.2}$ (i.e. 1.6)-fold, corresponding to the cooperative contribution to catalysis.

Finally, we also investigated the effect of the mutations on the “regio” and stereospecificity of the enzyme. When linoleic acid was used as substrate in the reaction mixture, the F277A, Y280I and F277A/Y280I mutants as well as the wild type produced 9- and 13-hydroperoxy octadecadienoic acids in a 2:1 ratio, predominantly in the 9S and 13R configuration (Fig. 5). These results show that the two mutations did not affect the “regio” nor the stereospecificity of the enzyme. The rates of linoleic acid conversion evaluated by ^{13}C NMR reached about 25% for the wild type and >98% for the mutants. These results show that the substitution of F277 and Y280 by less space-filling residues in olive LOX1 greatly improves the rate of linoleic acid conversion, probably by facilitating the entry of the substrate in the active site of the enzyme.

Discussion

Based upon homology modeling, a model of the tertiary structure of the olive LOX1 was built using the soybean LOX-1 as template. The obtained model of three-dimensional structure of olive LOX1 showed the common structural fold observed in the LOXs characterized to date: the smaller N-terminal domain (positions 1–164) constituted of β -barrel structure, known to mediate binding of lipid body LOX to liposomes and lipid bodies [39], and the larger C-terminal region (positions 165–864) including the catalytic site. Moreover, many of the residues of the soybean LOX-1

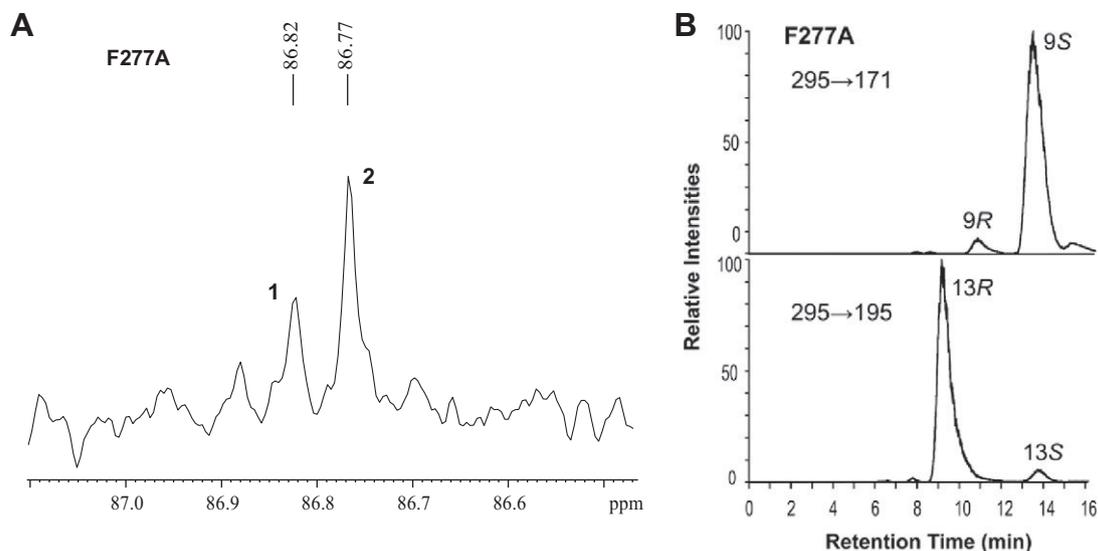


Fig. 5. Analysis of products obtained by incubating linoleic acid with wild type or mutant olive LOX1. In A, expanded plot of ^{13}C NMR spectrum of products. Peak 1: carbon 13 of 13-hydroperoxy octadecadienoic acid, peak 2: carbon 9 of 9-hydroperoxy octadecadienoic acid. In B, chiral-phase HPLC-MS/MS analysis of products. Top trace, separation of the enantiomers of 9-hydroxy octadecadienoic acid and MS/MS analysis (m/z 295 \rightarrow full scan) with monitoring m/z 171. Bottom trace, separation of the enantiomers of 13-hydroxy octadecadienoic acid and MS/MS analysis (m/z 295 \rightarrow full scan) with monitoring m/z 195. As similar results were obtained with all enzymes, only those concerning F277A olive LOX1 mutant are shown.

template that are involved in the catalysis, as the ligands of the catalytic iron atom (His525, His530, His716, Asn720 and the C-terminal Ile864 on the olive LOX1) are conserved and spatially well positioned. Altogether, these data appear to validate our model. Structure alignment between olive LOX1 and soybean LOX-3 co-crystallized in complex with its product reaction allowed us to position the active site. The detailed exploration of the putative active site on the olive LOX1 modeled structure revealed the presence at the entrance of the active site of two aromatic Phe277 and Tyr280 residues. We proposed that these bulky residues disturb the penetration of the substrate into the active site. To verify our hypothesis we restricted the hindrance at the entrance of the active site of olive LOX1 by site-directed mutagenesis. Phe277Ala (F277A), Tyr280Ile (Y280I) and Phe277Ala/Tyr280Ile (F277A/Y280I) mutants were constructed and their kinetics parameters were determined and compared to wild type using linoleic and linolenic acids as substrates. Here, we report that mutants display a higher catalytic efficiency for hydroperoxidation of linoleic and linolenic acids than the wild type enzyme and that this improvement of kinetic parameters is not due to a difference in iron content of enzymes, suggesting that both residues Phe277 and Tyr280 are involved in the penetration of linoleic and linolenic acids into the active site of the enzyme.

Minor et al. [16] suggested a possible entry of substrate into soybean LOX-1 through the movement of the side chains of the residues constituting the $\alpha 2$ and $\alpha 11$ helices and particularly the side chain movement of the residue Thr259 of the $\alpha 2$ helix. The corresponding residue (Leu282) on the olive LOX1 is probably not involved in the entry of substrate because its side chain appears far removed from the site entrance and from the channel of the active site. On the three-dimensional model of the olive LOX1, the $\alpha 2$ helix contains the Tyr280 residue that is located near to the Phe277 residue (atoms are the nearest remote of 3.19 Å). We suggest that the penetration of linoleic and linolenic acids into the catalytic site of olive LOX1 requires the movement of the side chain of these two residues. Substitution of Phe277 by the less space-filling alanine could allow the spatial arrangement of the side chain of the residue located at position 280 either tyrosine (as in the F277A single mutant) or isoleucine (as in the F277A/Y280I double

mutant) thereby facilitating the penetration of substrate into the active site of olive LOX1. However, spatial arrangement of the side chain of Tyr280 as it would occur in the F277A mutant does not seem also effective for the entering of linolenic acid than for the entering of linoleic acid into the active site of the enzyme. When Tyr280 was substituted by the less space-filling isoleucine, the phenyl group of Phe277 residue may move, which would induce spatial arrangement of side chain of residues constituting the $\alpha 2$ helix allowing the substrate to penetrate into the active site of the enzyme. Side chain movements of these residues seem critical during the penetration of substrate into the active site of the wild type olive LOX1.

The amino acid sequence alignment of olive LOX1 with LOXs from different sources has shown that Phe277 is highly conserved in plant and mammalian LOXs and that in coral 8R-LOX the counterpart residue is a Tyr179, whereas Tyr280 is conserved in plant lipoxygenases solely. Our results show that the removal of steric bulk at the entrance of the catalytic pocket causes an increase in the catalytic efficiency. The replacement of bulky residues Phe277 and Tyr280 by the less space-filling residues (as in the F277A/Y280I double mutant) may cause a local structure reorganization which allows an easier penetration of both linoleic and linolenic acids into the active site of the enzyme. Thus, we propose that Phe277 and Tyr280 might be considered as primary determinant of substrate accessibility to the active site of plant LOXs.

Moreover, as Phe277 is highly conserved in mammalian LOXs, a similar functional role of this residue for the entering of the substrate into the active site might be considered. Unfortunately, there is no experimental data concerning this highly conserved Phe in mammalian LOXs, and this functional role remains hypothetical. However, the involvement of this residue in substrate penetration into the active site of the rabbit 12/15-LOX is unlikely. Indeed, Choi et al. [40] reported recently that the entry of the substrate in the active site of the rabbit 12/15-LOX required a major movement of secondary structural elements (i.e. $\alpha 2$ helix). The sequence alignments of LOXs have also shown that the counterpart of the olive LOX1 Phe277 is Tyr179 in coral 8R-LOX. Neau et al. [41] reported recently a positively charged residue, Arg183, located at the entrance site of the coral 8R-LOX and propose that this residue

is more likely the residue neutralizing the carboxylate of the substrate (arachidonic acid) that positions the substrate in 8R-LOX for attack to carbon 10. The amino acid sequence and the three-dimensional structure of coral 8R-LOX show the presence of Tyr179 residue with its side chain located near the Arg183 at the entrance site of the enzyme. The involvement of Tyr179 in the penetration of the substrate into the active site of the enzyme was previously discussed. Indeed, simultaneous movement of the side chain of Tyr179, rotamer change of Leu386 and shift of Leu628 would be required to facilitate the entering of arachidonic acid into the active site [42,43]. Phe277, highly conserved in mammalian LOXs and replaced by the aromatic bulky residue Tyr179 in coral 8R-LOX, could act in the same way. Thus, we propose that conserved Phe might be considered as primary determinant of substrate accessibility to the active site.

Conclusion

Using a combined three-dimensional molecular modeling and site-directed mutagenesis approach, we present the first structure–function relationships study of the entrance of the active site of LOX. The findings of this work highlight the importance of the movement of the side chains of residues located at the entrance of the active site and involved in the substrate penetration. We suggest that the Phe277 residue of olive LOX1, highly conserved in the amino acids sequences of many LOXs from different sources could perturb the movements of the side chains of some residues of the $\alpha 2$ helix involved in the penetration of different substrates into the active site and particularly those of Tyr280, which may play a key role in the penetration of linoleic and linolenic acids into the active site of olive LOX1. The high conservation of these two residues, Phe and Tyr, among plant LOXs allows us to suggest they could therefore be considered as primary determinant of the accessibility of the substrate-binding site of plant LOXs. This thinking could be extended to the entire lipoxygenase family for the Phe residue located at the position 277 of olive LOX1.

Acknowledgments

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] J.N. Siedow, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 (1991) 145–188.
- [2] A. Liavonchanka, I. Feussner, *J. Plant Physiol.* 163 (2006) 348–357.
- [3] I. Feussner, C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (2002) 275–297.
- [4] M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 5336–5343.
- [5] M.R. Egmond, G.A. Veldink, J.F. Vliegthart, J. Boldingh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54 (1973) 1178–1184.
- [6] D.L. Sloane, R. Leung, C.S. Craik, E. Sigal, *Nature* 354 (1991) 149–152.
- [7] S. Borngräber, R.J. Kuban, M. Anton, H. Kuhn, *J. Mol. Biol.* 264 (1996) 1145–1153.
- [8] E. Hornung, M. Walther, H. Kühn Feussner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 4192–4197.
- [9] I. Feussner, H. Kühn, in: U. Bornscheuer, *Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (Eds.), Enzymes in Lipid Modification*, Wiley-VCH, Weinheim; New York, 2000.
- [10] H. Kühn, J. Saam, S. Eibach, H.-G. Holzhütter, I. Ivanov, M. Walther, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 93–101.
- [11] G. Coffa Brash, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 15579–15584.
- [12] G. Coffa, A.N. Imber, B.C. Maguire, G. Laxmikanthan, C. Schneider, B.J. Gaffney, A.R. Brash, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38756–38766.
- [13] C. Palmieri-Thiers, S. Canaan, V. Brunini, V. Lorenzi, F. Tomi, J.L. Dessey, U. Garscha, E.H. Oliw, L. Berti, J. Maury, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 339–346.
- [14] J.C. Andre, M.O. Funk, *Anal. Biochem.* 158 (1986) 316–321.
- [15] H.W. Gardner, *Biochim. Biophys. Acta* 1001 (1989) 274–281.
- [16] W. Minor, J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, J.T. Bolin, R. Walter, B. Axelrod, *Biochemistry* 35 (1996) 10687–10701.
- [17] Q.F. Gan, M.F. Browner, D.L. Sloane, E. Sigal, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 25412–25418.
- [18] R.K. Hughes, D.M. Lawson, A.R. Hornostaj, S.A. Fairhurst, R. Casey, *Eur. J. Biochem./FEBS* 268 (2001) 1030–1040.
- [19] S. Khanna, S. Roy, H. Ryu, P. Bahadduri, P.W. Swaan, R.R. Ratan, C.K. Sen, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43508–43515.
- [20] V. Kenyon, I. Chorny, W.J. Carvajal, T.R. Holman, M.P. Jacobson, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 1356–1363.
- [21] M.V. Reddy, V.K. Billa, V.R. Pallela, M.R. Mallireddigari, R. Boominathan, J.L. Gabriel, E.P. Reddy, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 3907–3916.
- [22] P. Aparoy, T. Leela, R.N. Reddy, P. Reddanna, *J. Mol. Graphics Modell.* 27 (2009) 744–750.
- [23] V. Lorenzi, J. Maury, J. Casanova, L. Berti, *Plant Physiol. Biochem.* 44 (2006) 450–454.
- [24] H. Edelhoch, *Biochemistry* 6 (1967) 1948–1954.
- [25] S.C. Gill, P.H. von Hippel, *Anal. Biochem.* 182 (1989) 319–326.
- [26] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [27] M.D. Percival, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10058–10061.
- [28] V. Izzo, G. Leo, R. Scognamiglio, L. Troncone, L. Birolo, A. Di Donato, *Arch. Biochem. Biophys.* 505 (2011) 48–59.
- [29] B. Axelrod, T.M. Cheesbrough, S. Laakso, M.L. John, *Lipids Part C, Academic Press*, 1981, pp. 441–451.
- [30] B.A. Vick, D.C. Zimmerman, *Plant Physiol.* 85 (1987) 1073–1078.
- [31] C. Schneider, K. Niisuke, W.E. Boeglin, M. Voehler, D.F. Stec, N.A. Porter, A.R. Brash, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 18941–18945.
- [32] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [33] B. Morgenstern, *Bioinformatics* 15 (1999) 211–218.
- [34] A. Rousset, C. Cambillau, TURBO-FRODO, in *Silicon graphics geometry partners directory*, Silicon Graphics, Mountain view, CA, 1989.
- [35] M. Petrek, P. Kosinova, J. Koca, M. Otyepka, *Structure* 15 (2007) 1357–1363.
- [36] E. Skrzypczak-Jankun, R.A. Bross, R.T. Carroll, W.R. Dunham, M.O. Funk, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 10814–10820.
- [37] A.S. Mildvan, D.J. Weber, A. Kuliopulos, *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992) 327–340.
- [38] A.S. Mildvan, *Biochemistry* 43 (2004) 14517–14520.
- [39] C. May, M. Höhne, P. Gnau, K. Schwennesen, H. Kindl, *Eur. J. Biochem./FEBS* 267 (2000) 1100–1109.
- [40] J. Choi, J.K. Chon, S. Kim, W. Shin, *Proteins* 70 (2008) 1023–1032.
- [41] D.B. Neau, N.C. Gilbert, S.G. Bartlett, W. Boeglin, A.R. Brash, M.E. Newcomer, *Biochemistry* 48 (2009) 7906–7915.
- [42] M.L. Oldham, A.R. Brash, M.E. Newcomer, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39545–39552.
- [43] I. Ivanov, D. Heydeck, K. Hofheinz, J. Roffeis, V.B. O'Donnell, H. Kuhn, M. Walther, *Arch. Biochem. Biophys.* 503 (2010) 161–174.