



**HAL**  
open science

## Production de terpènes fonctionnalisés par les cytochromes P450 de plantes recombinants

Carole Gavira

► **To cite this version:**

Carole Gavira. Production de terpènes fonctionnalisés par les cytochromes P450 de plantes recombinants. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ009 . tel-01124093

**HAL Id: tel-01124093**

**<https://theses.hal.science/tel-01124093>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.



Université de Strasbourg

**Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED 414)**

*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (CNRS, UPR2357)*

# THESE

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Biochimie et biologie moléculaire

par

Carole Gavira

---

**Production de terpènes fonctionnalisés  
par les cytochromes P450 de plantes recombinants**

---

*Soutenue le 26 février 2013 à Strasbourg devant le jury composé de :*

Dr. D. Werck-Reichhart	Directeur de Recherche au CNRS, IBMP, Strasbourg	Directeur de thèse
Pr. F. Bourgaud	Professeur à l'ENSAIA de Nancy	Rapporteur
Pr. A. Tissier	Professeur à l'IPB Leibniz Institut, Halle, Allemagne	Rapporteur
Pr. T. Bach	Professeur à l'Université de Strasbourg	Examineur
Dr. R. Feyereisen	Directeur de Recherche à l'INRA, Sophia-Antipolis	Examineur

---



## Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme Danièle Werck-Reichhart, ma Directrice de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux et pour la confiance et la liberté qu'elle m'a accordée. Je remercie également M. Joseph Zucca, mon co-Directeur, et Mme Fanny Lambert, sa Collaboratrice, de la Société V. MANE Fils, qui ont été les initiateurs de ce projet réalisé en harmonie sous convention CIFRE, et qui m'ont permis de participer à deux congrès de renommée internationale.

Je souhaite, d'une part, remercier vivement M. Thomas Bach, M. Frédéric Bourgaud, M. Alain Tissier et M. René Feyereisen d'avoir accepté d'être membres de mon jury.

Je voudrais, d'autre part, remercier M. Christophe Crocoll, pour son aide précieuse et sa disponibilité, M. Erich Glawischnig et Mme Laurence Miesch pour leur collaboration.

Je tiens également à remercier mes deux précédents Directeurs de laboratoire de l'Université de Reims-Champagne-Ardenne où j'ai effectué mes stages de Master, M. Christophe Clément et M. Francis Duchiron. Ils m'ont fortement soutenue, conseillée et donnée l'envie de poursuivre vers une thèse. Merci à vous aussi, Eric Courot et David Donnez.

Je remercie l'Université de Strasbourg. C'est un régal de pouvoir bénéficier du statut d'étudiant dans cette ville. Mes pieds pourtant bucoliques ne demandent qu'à rester sur ses parquets citadins.

Je remercie enfin, l'équipe 'terpènes' ainsi que tous les membres des 5<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> étages de l'Institut Botanique que j'ai pu côtoyer au cours de ces 3 années. Un grand merci à Jean-François Ginglinger, qui m'a chaleureusement accueillie dans son bureau et qui a sans cesse le sourire, René Höfer, pour son encadrement et son avis toujours pertinent. Un merci tout particulier à Juliana Iglesias, pour son amitié et à qui je souhaite une très belle réussite. Thank you, Zenhua Liu, for our climbing and tea breaks. Un grand merci également à Pascaline Ullmann et Franck Pinot pour leurs conseils avisés et leur agréable compagnie, Agnès Lesot, sans qui je ne serais pas venue à bout de toutes ces préparations de microsomes, mais surtout, pour ses chaleureuses attentions, Fabienne Philippon, Dimitri Heintz, Raphaël Lugan, Nicolas Navrot, Jean-Etienne Bassard, Benoît Boachon et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce projet.

Enfin, j'ai une pensée pleine d'affection pour mes proches qui sont d'un soutien inestimable.



## Table des matières

Remerciements .....	III
Liste des figures .....	X
Liste des tableaux .....	XII
Liste des abréviations, sigles, acronymes et de leurs définitions .....	XIII
Liste des noms vernaculaires des espèces végétales .....	XIV
Chapitre 1: Introduction .....	3
I. Les composés volatils utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum .....	3
A. Les composés volatils : définition, structures et propriétés organoleptiques.....	3
B. Les composés volatils des plantes.....	5
C. Les composés volatils des animaux et des micro-organismes .....	14
D. Evolution des composés volatils utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum : le marché des produits naturels .....	16
II. Les cytochromes P450.....	18
A. Caractérisation des cytochromes P450 .....	18
B. Mécanisme enzymatique.....	20
C. Diversification et fonction chez les plantes .....	21
III. Production de composés volatils fonctionnalisés par des cytochromes P450 recombinants: état de l'art.....	22
A. Identification de cytochromes P450 de plantes .....	22
B. Identification de cytochromes P450 microbiens.....	32
C. Ingénierie des cytochromes P450 .....	33
D. Production de composés volatils fonctionnalisés par ingénierie métabolique à l'aide de cytochromes P450 .....	34
IV. Objectifs de la thèse : production de composés volatils fonctionnalisés par bioconversion avec la levure exprimant un P450 de plante .....	42
A. Objectifs de la thèse .....	42
B. La voie métabolique des mono- et sesquiterpènes chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
C. Production de composés volatils fonctionnalisés .....	44
D. Les différentes étapes du projet .....	44
Chapitre 2: Matériel et Méthodes.....	49
I. Matériel .....	49
A. Substrats et standards.....	49
B. Séquences nucléiques des cytochromes P450.....	49
C. Vecteur d'expression pYeDP60 et pYeDP60u2 .....	51
D. Souche bactérienne et souche de levure.....	52
E. Plantes .....	53
II. Tampons et Milieux de culture.....	53

A.	Tampons.....	53
B.	Milieux de culture .....	55
III.	Méthodes : système d'expression hétérologue dans la levure.....	56
A.	Clonage USER <sup>TM</sup> .....	56
B.	Expression hétérologue des P450s dans la levure.....	60
C.	Préparation de microsomes et quantification des P450s.....	60
D.	Activité enzymatique <i>in vitro</i> avec des composés volatils oléfiniques comme substrat 61	
E.	Activité enzymatique <i>in vitro</i> avec des composés volatils oxygénés comme substrat .....	62
F.	Cinétique enzymatique des CYP76s avec la framboisone.....	62
G.	Bioconversion dans 1 mL .....	63
IV.	Méthodes : analyses dans <i>A. thaliana</i> .....	64
A.	Culture et croissance des plantes .....	64
B.	Quantification de l'expression .....	64
C.	Génotypage des mutants d'insertion.....	66
D.	Analyse des composés volatils émis par les fleurs .....	67
V.	Méthodes : chromatographie analytiques .....	68
A.	CPG-DIF .....	68
B.	TD-CPG-SM.....	69
Chapitre 3: Criblage de cytochromes P450 exprimés dans <i>S. cerevisiae</i> pour la bioconversion de composés volatils.....		
		73
I.	Sélection des molécules à fonctionnaliser.....	73
II.	Sélection des cytochromes P450 candidats .....	77
A.	En provenance d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	77
B.	Candidats sélectionnés chez d'autres espèces végétales.....	83
III.	Expression hétérologue de P450s et conditions de criblage <i>in vitro</i> .....	86
A.	Expression hétérologue de P450s .....	86
B.	Conditions de criblage <i>in vitro</i> .....	87
IV.	Résultats du criblage d'activités enzymatiques <i>in vitro</i> .....	91
A.	Résultats du criblage .....	91
B.	Couple P450-substrat sélectionné pour la production de frambinone .....	95
C.	Couples P450-substrat sélectionnés pour la production de nootkatone.....	96
D.	Couple P450-substrat sélectionné pour une forte activité catalytique.....	98
V.	Résultats des essais enzymatiques <i>in vivo</i> : bioconversion dans 1mL .....	99
A.	Bioconversion de la framboisone.....	99
B.	Bioconversion du valencène et du nootkatène.....	100
C.	Bioconversion du limonène .....	101

VI.	Discussion et perspectives .....	102
A.	Efficacité du criblage .....	102
B.	Difficultés rencontrées lors de la bioconversion de composés volatils .....	103
Chapitre 4: Etude de la bioconversion du valencène par <i>S. cerevisiae</i> exprimant CYP71D51v2 .....		
I.	Présentation de l'article .....	109
II.	Article intitulé : challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	110
III.	Conclusion et perspectives .....	111
Chapitre 5: Bifonctionnalité de CYP71As dans le métabolisme des terpénoïdes et de la camalexine chez <i>A. thaliana</i> .....		
I.	Activité enzymatique <i>in vitro</i> de CYP71A12 avec le limonène .....	179
A.	Résultats.....	179
B.	Discussion.....	184
II.	Analyse fonctionnelle des enzymes paralogues recombinantes .....	187
A.	Expression dans la levure.....	188
B.	Activités enzymatiques <i>in vitro</i> .....	190
III.	Activité enzymatique <i>in vitro</i> des P450s appartenant à la clade CYP71A12 avec des alcaloïdes indoliques .....	192
IV.	Le limonène est-il un substrat de CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 <i>in planta</i> ? 194	
A.	Expression constitutive de <i>CYP71A12</i> , <i>CYP71A13</i> et <i>CYP71A18</i> .....	194
B.	Comparaison des profils de métabolites volatils émis par les mutants <i>cyp71a12</i> , <i>cyp71a13</i> ou <i>cyp71a18</i> et par les plantes sauvages.....	197
V.	Discussion et perspectives .....	199
A.	Implication de CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 dans le métabolisme des monoterpènes .....	199
B.	Co-évolution du métabolisme des terpénoïdes et de la camalexine .....	201
Chapitre 6: Conclusion Générale .....		
Références bibliographiques .....		213
Annexes 229		
I.	Liste des séquences nucléotidiques de cytochromes P450 synthétisés.....	229
Séquence nucléotidique codant pour CYP706A7.....		229
Séquence nucléotidique codant pour CYP71A13.....		230
Séquence nucléotidique codant pour CYP71A14.....		230
Séquence nucléotidique codant pour CYP71A15.....		231
Séquence nucléotidique codant pour CYP71A16.....		231
Séquence nucléotidique codant pour CYP71A18.....		232
Séquence nucléotidique codant pour CYP71A19.....		232



Séquence nucléotidique codant pour CYP71A20.....	233
Séquence nucléotidique codant pour CYP71A27.....	233
Séquence nucléotidique codant pour CYP71D14.....	234
Séquence nucléotidique codant pour CYP71D48v1.....	234
Séquence nucléotidique codant pour CYP71D98.....	235
Séquence nucléotidique codant pour CYP71D177.....	235
Séquence nucléotidique codant pour CYP71AS4v2.....	236
Séquence nucléotidique codant pour CYP71AU4.....	236
Séquence nucléotidique codant pour CYP71BE5.....	237
Séquence nucléotidique codant pour CYP71BC1.....	237
II. Amorces utilisées pour le clonage USER, le séquençage et la RT-qPCR.....	238
III. Brevets revendiquant un P450 homologue aux P450s candidats .....	239
IV. Spectres différentiels au monoxyde de carbone des microsomes de levures exprimant les P450s candidats.....	240
Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP71s candidats issus d' <i>Arabidopsis thaliana</i> pour lesquels une différence d'absorbance à 450 nm est observée.....	240
Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP71s candidats non issus d' <i>Arabidopsis thaliana</i> pour lesquels une différence d'absorbance à 450 nm est observée.....	241
Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP73s candidats.....	242
Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP76s candidats pour lesquels une différence d'absorbance à 450 nm est observée.....	243
V. Résultats du criblage enzymatique <i>in vitro</i> .....	244
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec le camphène.....	246
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec le <i>p</i> -cymène .....	247
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec le lavandulol.....	249
Analyses CPG des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec le limonène qui n'ont pas été sélectionnées .....	250
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec l' $\alpha$ -phéllandène .....	252
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec le $\beta$ -caryophyllène .....	253
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec le $\alpha$ -cédrène .....	254
Analyses CPG de l'activité enzymatique <i>in vitro</i> de CYP71D326 avec le $\beta$ -farnésène	255

Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec le $\alpha$ -humulène .....	256
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec l'isolongifolène.....	257
Analyse CPG de l'activité enzymatique <i>in vitro</i> de CYP71D14 avec la nootkatène.....	258
Analyses CPG des plus faibles activités enzymatiques <i>in vitro</i> de P450s candidats avec le valencène.....	259
Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats avec l'aldéhyde anisique.....	260
VI. Annexes du chapitre 5 .....	261
Schéma de la localisation chromosomique des <i>P450s</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Bak et al. (2011) .....	261
Cladogramme de CYP71As appartenant à la même clade que CYP71A12 chez <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Arabidopsis lyrata</i> et <i>Thellungiella halophila</i> .....	262
Analyse et correction de la séquence protéique AlyCYP71A27.....	263

## Liste des figures

Figure 1 : Exemples de structure moléculaires de composés volatils utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum, associés aux odeurs et aux organes végétaux dont ils sont issus .....	4
Figure 2 : Diversité des isoprénoïdes et classification selon le nombre d'unité isoprénique (en rouge) .....	6
Figure 3 (ci-contre) : Schéma de la voie métabolique des terpénoïdes reproduit avec la permission de Jean-François Ginglinger (2010) .....	8
Figure 4 (ci-contre) : Schéma de la voie métabolique des phénylpropanoïdes volatils et floraux .....	10
Figure 5 : Réaction d'oxydation catalysée par les cytochromes P450 .....	18
Figure 6 : Modèle de la structure tertiaire conservée de cytochromes P450 d'après Urlacher et Eiben (2006) .....	19
Figure 7 : Mécanisme réactionnel des cytochromes P450 d'après Werck-Reichhart et Feyereisen (2000) .....	20
Figure 8 (au dos) : Exemples de réactions enzymatiques catalysées par des P450s (Tableau 1) impliqués dans la biosynthèse de monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, phytoalexines et iridoïdes monoterpéniques ou de lactones sesquiterpéniques .....	25
Figure 9 (au dos) : Voie de biosynthèse de la camalexine et de l'auxine via l'IAN chez <i>arabidopsis</i> .....	29
Figure 10 : Schéma de la voie de biosynthèse de l'acide artémisinique reconstituée chez <i>S. cerevisiae</i> EPY224 exprimant ADS, CYP71AV1 et AaCPR d'après Ro et al. (2006b) ..	39
Figure 11 : Schéma du vecteur d'expression dans la levure pYeDP60 d'après Pompon et al. (1996) .....	52
Figure 12 : Schéma du principe de la technique de clonage USER d'après Nour-Eldin et al. (2006) .....	57
Figure 13 : Schéma du principe du génotypage des mutants d'insertion d' <i>arabidopsis</i> .....	67
Figure 14 : Voie métabolique de la frambinone dans le fruit du framboisier proposée par Borejsza-Wysocki et Hrazdina (1994) .....	75
Figure 15 : Schéma des réactions enzymatiques envisagées pour la production de frambinone naturelle .....	76
Figure 16 : Cladogramme des 244 P450s d' <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Bak et al. (2011) ..	80
Figure 17 : Schéma des réactions catalysées <i>in vitro</i> par la cinnamate hydroxylase (CYP73) (d'après Pierrel et al., 1994) .....	84
Figure 18 : Pourcentage des différentes qualités d'expression des P450s candidats dans <i>S. cerevisiae</i> WAT11 .....	87
Figure 19 : Dosage du limonène dans l'essai enzymatique <i>in vitro</i> sans NADPH avec un tube à essai ouvert ou fermé en fonction du temps d'incubation à 28°C .....	89
Figure 20 : Co-élution du glycérol avec des monoterpènes oléfiniques lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle de l'essai enzymatique <i>in vitro</i> .....	91
Figure 21 : Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> de CYP76C4 et CYP76B6 avec la framboisone .....	95
Figure 22 : Représentation Lineweaver-Burk des cinétiques enzymatiques de la conversion de la framboisone en frambinone par CYP76C4 et CYP76B6 et valeurs des paramètres catalytiques déduits .....	96

Figure 23 (au dos) : Analyses CPG-SM des activités enzymatiques <i>in vitro</i> des P450s candidats catalysant la formation de nootkatone à partir du nootkatène.....	98
Figure 24 : Analyse CPG de la conversion <i>in vitro</i> d'un extrait végétal contenant du $\beta$ -farnésène par CYP71D177.....	98
Figure 25 : Analyses CPG de la bioconversion de la framboisone par la levure exprimant CYP76C4.....	99
Figure 26 : Sélection du meilleur couple P450-substrat pour la production de nootkatone en comparant les quantités de nootkatone formées par les microsomes de levure (A) ou par la levure (B) exprimant CYP71D51v2 ou CYP71D4 en présence de valencène ou de nootkatène.....	100
Figure 27 : Analyses CPG-SM de la bioconversion du limonène par la levure exprimant CYP71A12 ou CYP71A18.....	101
Figure 28 : Analyses CPG-SM des produits de la conversion <i>in vitro</i> du limonène par CYP71A12.....	180
Figure 29 : Analyses CPG des produits de la conversion <i>in vitro</i> de l'alcool de périllyle par CYP71A12.....	183
Figure 30 : Proposition de schéma réactionnel expliquant la formation des produits de métabolisation du limonène par les microsomes de levures exprimant CYP71A12.....	184
Figure 31 : Cladogramme de la famille CYP71A chez <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Bak et Paquette (2010).....	185
Figure 32 : Profil d'expression de CYP71A18, CYP71A12 et CYP71A13 dans les différents organes d' <i>A. thaliana</i> d'après les analyses des données publiques de transcriptome provenant du site Arabidopsis Efp Browser ( <a href="http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi">http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi</a> ).....	186
Figure 33 : Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP71s appartenant à la clade CYP71A12.....	189
Figure 34 : Analyses CPG des produits de la conversion <i>in vitro</i> du limonène par les CYP71As.....	191
Figure 35 : Voie métabolique de la camalexine et de dérivés indoliques proposée à partir des activités enzymatiques obtenues <i>in vitro</i> (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle).....	193
Figure 36 : Expression relative de <i>CYP71A12</i> , <i>CYP71A13</i> et <i>CYP71A18</i> dans les différents organes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	195
Figure 37 : Expression relative de <i>CYP71A12</i> , <i>CYP71A13</i> et <i>CYP71A18</i> dans les différentes pièces florales.....	196
Figure 38 : Comparaison du limonène émis par les inflorescences des plantes mutantes <i>cyp71a12</i> et des plantes sauvages.....	198

## Liste des tableaux

Tableau 1 (ci-contre) : Liste récapitulative des P450s ayant une activité mono- ou sesquiterpénoïde oxygénase/oxydase chez les plantes et des résultats de leurs applications pour la production de terpènes fonctionnalisés.....	22
Tableau 2 (ci-contre) : Liste des P450s sélectionnés pour le criblage d'activités enzymatiques avec une série de monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et phénylpropanoïdes .....	51
Tableau 3 : Composition des milieux de culture pour la levure.....	56
Tableau 4 : Conditions expérimentales de la linéarisation du vecteur pYeDP60u2 .....	58
Tableau 5 : Conditions des cinétiques de CYP76B6 et CYP76C4 avec la framboisone.....	63
Tableau 6 : Gradient de température du four de la CPG-DIF en fonction du substrat analysé 68	
Tableau 7 (au dos): Liste des substrats à fonctionnaliser qui ont été sélectionnés, des plantes dont ils sont issus (base ésotérique) et de leur degré de pureté (sur la base des pics observés en CPG) .....	73
Tableau 8 : Liste des substrats sélectionnés pour le criblage qui sont émis par différents organes d' <i>A. thaliana</i> .....	78
Tableau 9 : Liste des monoterpènes et sesquiterpènes mono-oxygénés détectés dans les différents organes d' <i>A. thaliana</i> .....	79
Tableau 10 : Liste des 13 mono/sesquiterpènes synthèses identifiées ou présumées et des P450s d' <i>A. thaliana</i> co-exprimés avec un coefficient de corrélation de Pearson supérieur ou égale à 0,6.....	81
Tableau 11 : Liste des cytochromes P450s candidats sélectionnés par homologues de séquences avec des mono- ou sesquiterpènes hydroxylases caractérisées.....	85
Tableau 12 : Comparaison des conditions d'essai enzymatique utilisées en fonction des propriétés physico-chimiques des substrats (molécules oxygénées ou oléfines volatiles) .....	88
Tableau 13 : Solubilité dans l'eau et coefficient de partage (Log P) prédictifs des substrats sélectionnés d'après l'agence de protection environnementale des Etats-Unis (logiciel EPISuite <sup>TM</sup> , modèles KowWin v1.67 et v1.01 est) (US-EPA, 2011). .....	90
Tableau 14 : Comparaison de la solubilité dans l'eau et de la polarité des solvants d'extraction utilisés pour le criblage d'activité enzymatique <i>in vitro</i> (O'Neil, 2006). .....	90
Tableau 15 (ci-contre) : Résultats du criblage fonctionnel réalisé sur les microsomes de levure exprimant les P450s candidats avec les substrats sélectionnés pour la production de composés volatils fonctionnalisés. ....	93
Tableau 16 : Comparaison des données SM de la littérature avec celles des produits 1 et 2 obtenus lors de la conversion du limonène <i>in vitro</i> par CYP71A12.....	182
Tableau 17 : Conversion de monoterpènes (au laboratoire) et d'alcaloïdes indoliques (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle) par les microsomes de levure exprimant les P450s de la clade CYP71A12.....	192

## Liste des abréviations, sigles, acronymes et de leurs définitions

CPG-DIF	Chromatographie en Phase Gazeuse avec un Détecteur à Ionisateur de Flamme
CPG-SM	Chromatographie en Phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse
CAS	Division de la société américaine de chimie (Chemical Abstract Service)
CD	CycloDextrine
CoA	Co-enzyme A
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
EC	Commission de nomenclature des enzymes (Enzyme Commission numbers)
EST	Marqueur de séquence exprimée (Expressed Sequence Tag)
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FMN	Flavine Adénine Mononucléotide
LB	Luria-Bertani (milieu de culture)
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NCBI	Institut national américain pour l'information sur les biotechnologies (National Center for Biotechnology Information)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)
P450	Cytochrome P450
RT-qPCR	PCR quantitative après Réverse Transcriptase
SM	Spectrométrie de Masse
SRS	Site de Reconnaissance du Substrat
TPS	Terpène synthase
CLUP	Chromatographie Liquide à Ultra Performance
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

## Liste des noms vernaculaires des espèces végétales

<i>Alpinia galanga</i>	Galanga	<i>Lactuca sativa</i>	Laitue
<i>Ammi majus</i>	Ammi élevé	<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavande vraie
<i>Anethum graveolens</i>	Aneth	<i>Lavandula intermedia</i>	Lavandin
<i>Angelica archangelica</i>	Angélique officinale	<i>Lavandula latifolia</i>	Lavande aspic
<i>Aquilaria crassna</i>	Bois de géluse	<i>Lonicera japonica</i>	Chèvrefeuille du Japon
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabette des dames	<i>Lotus japonicus</i>	Lotier corniculé
<i>Arabidopsis lyrata</i>	Arabette à feuilles lyrées	<i>Magnolia grandiflora</i>	Magnolia à grandes fleurs
<i>Artemisia annua</i>	Armoise annuelle	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Arbre à thé
<i>Barnadesia spinosa</i>	Barnadésie épineuse	<i>Mentha x piperita</i>	Menthe poivrée
<i>Brassica oleracea</i>	Chou	<i>Mentha spicata</i>	Menthe verte
<i>Camellia sinensis</i>	Théier	<i>Nepeta racemosa</i>	Chataire à grappes
<i>Carum carvi</i>	Cumin des prés ou carvi	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabac
<i>Catharantus roseus</i>	Pervenche de Madagascar	<i>Origanum vulgare</i>	Origan commun
<i>Chamaecyparis nootkatensis</i>	Cèdre jaune d'Alaska	<i>Pelargonium fragrans</i>	Géranium odorant
<i>Cichorium intybus</i>	Chicorée	<i>Perilla frutescens</i>	Pérille
<i>Citrus lemon</i>	Citron	<i>Persea americana</i>	Avocatier
<i>Citrus sinensis</i>	Oranger	<i>Petunia x hybrida</i>	Pétunia
<i>Clarkia breweri</i>	Clarkie du brasseur	<i>Piper nigrum</i>	Poivre
<i>Cucumis melo</i>	Melon	<i>Pimpinella anisum</i>	Anis vert
<i>Cucumis sativus</i>	Concombre	<i>Pistacia terebinthus</i>	Pistachier térébinthe
<i>Cupressus lusitanica</i>	Cyprès du Portugal	<i>Ricinus communis</i>	Ricin commun
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus commun	<i>Rosa damascena</i>	Rosier de Damas
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Giroflier	<i>Rosa rugosa</i>	Rosier du Japon
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fenouil commun	<i>Rubus idaeus</i>	Framboisier
<i>Fragaria vesca</i>	Fraisier des bois	<i>Salvia officinalis</i>	Sauge officinale
<i>Gossypium arboreum</i>	Cotonnier en arbre	<i>Salvia sclarea</i>	Sauge sclarée
<i>Helianthus annuus</i>	Tournesol	<i>Santalum album</i>	Santal népalais
<i>Helianthus tuberosus</i>	Topinambour	<i>Saussurea lappa</i>	Costus
<i>Hibiscus Abelmoschus</i>	Ambrette	<i>Scoparia dulcis</i>	Balai doux
<i>Humulus lupulus</i>	Houblon	<i>Solanum tuberosum</i>	Pomme de terre
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Jusquiame d'Egypte	<i>Swertia mussotii</i>	Swertie
<i>Hyssopus officinalis</i>	Hysope officinale	<i>Thellungiella halophila</i>	Sel de cresson
<i>Juniperus communis</i>	Genévrier commun	<i>Thymus vulgaris</i>	Thym commun
<i>Juniperus virginiana</i>	Genévrier de Virginie	<i>Valeriana officinalis</i>	Valériane officinale

<i>Vanilla planifolia</i>	Vanille	<i>Zea mays</i>	Maïs
<i>Vetiveria zizanioides</i>	Vétiver	<i>Zingiber officinalis</i>	Gingembre cultivé
<i>Vitis vinifera</i>	Vigne	<i>Zingiber zerumbet</i>	Amome sauvage





**Chapitre I**

**Introduction**



## Chapitre 1: Introduction

### I. Les composés volatils utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum

#### A. Les composés volatils : définition, structures et propriétés organoleptiques

L'industrie des arômes et du parfum utilise des molécules dites volatiles, c'est-à-dire des molécules ayant la capacité de passer significativement dans l'air en condition atmosphérique normale. Ces composés ont une faible masse moléculaire comprise entre 30 et 300 g/mol, sont lipophiles, apolaires, et contiennent parfois une fonction alcool, cétone, époxyde, acide ou peroxyde. Au-delà d'une fonction oxygénée, la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires fait perdre en partie ou totalement le caractère volatil d'une substance chimique.

Il existe, principalement, 3 catégories de structures moléculaires utilisées en parfumerie. La classe des terpénoïdes est la plus largement représentée. Les monoterpénoïdes ( $C_{10}$ ) et les sesquiterpénoïdes ( $C_{15}$ ) en particulier ont une chaîne carbonée suffisamment courte pour être volatils (Figure 1). C'est également le cas des apocaroténoïdes, dérivés de tétraterpénoïdes ( $C_{40}$ ) comme les caroténoïdes chez les plantes (Winterhalter and Rouseff, 2002). Par exemple, la  $\beta$ -ionone ( $C_{13}$ ), qui a une odeur fruitée<sup>1</sup> et boisée de cèdre et de framboise, provient du clivage du  $\beta$ -carotène chez le melon (Ibdah et al., 2006).

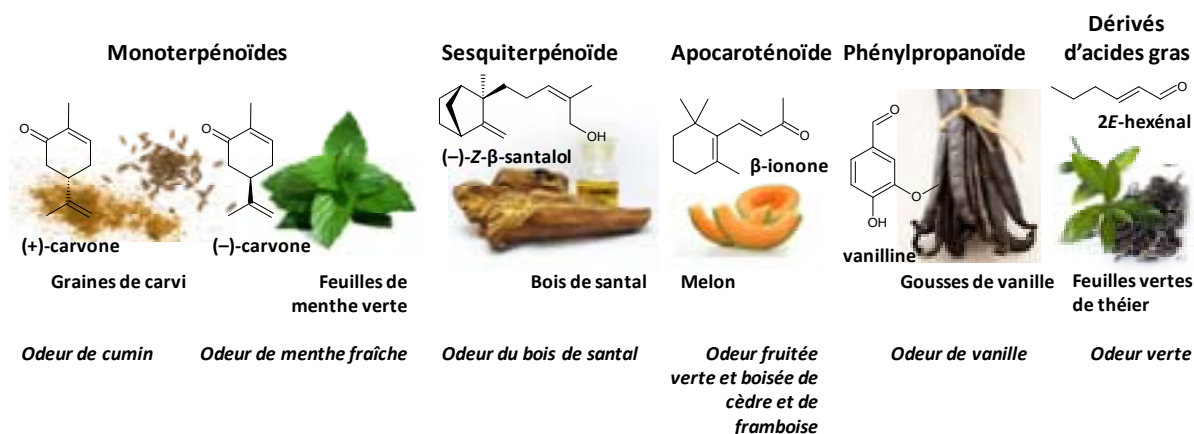
La deuxième catégorie est représentée par des molécules phénoliques issues de la voie de biosynthèse des phenylpropanoïdes chez les plantes comme la vanilline (Figure 1). Cette dernière est contenue dans les gousses de vanille et participe à lui donner sa saveur caractéristique (Walton et al., 2003). C'est l'une des molécules aromatiques les plus importantes en termes de consommation.

---

<sup>1</sup> L'ouvrage de la Société Française des Parfumeurs (1998) propose une classification des parfums et définit la terminologie utilisée en parfumerie.

Enfin, certains dérivés d'acides gras sont également utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum. Par exemple, une série d'alcools et d'aldéhydes en C<sub>6</sub>, comprenant le (2*E*)-hexénal, dérivant des acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique, est responsable de l'odeur verte caractéristique des feuilles vertes de différentes espèces végétales comme le théier (Hatanaka, 1993).

Dans cet ouvrage, une place prépondérante sera laissée aux mono- et sesquiterpénoïdes, même si nous aborderons parfois le cas de composés dérivant de la voie métabolique des phénylpropanoïdes.



**Figure 1 : Exemples de structure moléculaire de composés volatils utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum, associés aux odeurs et aux organes végétaux dont ils sont issus**

Les propriétés physico-chimiques d'une molécule sont souvent déterminées par leur structure moléculaire (masse moléculaire, pH, pouvoir rotatoire...). Cependant, il est impossible de prédire l'odeur exacte d'une molécule à partir de sa structure. Ses propriétés gustatives et olfactives dépendent non seulement de sa formule chimique et de son isomérisation, mais également de sa chiralité. Par exemple, la (+)-carvone (Figure 1), issue des graines de carvi, a une odeur de cumin alors que la (-)-carvone, issue de *Mentha spicata*, a une odeur de menthe (Boelens et al., 1993). Le (-)-Z- $\beta$ -santalol a une odeur typique du bois de santal (Figure 1) alors que son énantiomère, le (+)-Z- $\beta$ -santalol, n'a pas d'odeur (Krotz and Helmchen, 1990, 1994). Des analyses sensorielles vont permettre de caractériser les propriétés organoleptiques d'une nouvelle molécule, à condition que celle-ci soit isolée ou produite en quantité suffisante. La découverte de nouvelles molécules odorantes dans la nature et de leurs voies de biosynthèse joue un rôle important pour l'industrie des arômes et du parfum.

## B. Les composés volatils des plantes

Les plantes sont utilisées depuis des siècles par l'Homme pour leurs propriétés odorantes. Des espèces aromatiques et médicinales sont connues pour stocker des composés volatils dans toutes sortes d'organes : fruit, graine, fleur, feuille, bourgeon, tige, bois, écorce, rhizome, racine... Par exemple, *Angelica archangelica* est utilisée depuis le Moyen-âge pour ses racines à partir de laquelle on extrait une huile essentielle aux vertus médicinales, qui rentre dans la composition de certains parfums (Klouwen and Ter Heide, 1965).

### 1. La découverte des composés volatils des plantes

L'extraction des composés aromatiques des plantes remonte à l'Antiquité (Le Guéret et al., 1999). Les Egyptiens et les Perses pilaient, broyaient, imprégnaient de graisses et cuisaient les matières premières pour en extraire les fragrances. Avec la mise au point de l'alambic et du serpentín par les Arabes, les huiles essentielles sont obtenues par distillation. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau et recueillis par condensation dans un réfrigérant à serpentín. L'huile essentielle est alors séparée de l'eau par différence de densité. La composition de ces huiles a commencé à être analysée au 19<sup>ème</sup> siècle avec l'émergence de la chimie analytique (Croteau, 1998). Les premiers terpènes furent ainsi, isolés de la résine du conifère *Pistacia terebinthus* appelée térébenthine (ou "terpentin" en allemand d'où dérive leur nom). Le chimiste, Wallach (1887), discerna une structure de base, formée de 5 carbones, commune aux composés constituant les huiles essentielles : l'unité isoprène (Figure 2). Il en émergea la "règle de l'isoprène biogénétique", selon laquelle, la biosynthèse des isoprénoïdes résulte d'une condensation de plusieurs unités isoprènes (Ružička, 1953).

Les terpénoïdes (ou isoprénoïdes) forment ainsi la famille de produits naturels la plus large et variée, avec des structures où le nombre d'unité diphosphate d'isopentényle (IPP), équivalent biologique de l'isoprène, varie de 1 (le pré-nol) à plusieurs centaines (le caoutchouc naturel). Ils sont classés dans les catégories suivantes (Figure 2) selon le nombre d'unités condensées : les hémiterpénoïdes (C<sub>5</sub>), monoterpénoïdes (C<sub>10</sub>), sesquiterpénoïdes (C<sub>15</sub>), diterpénoïdes (C<sub>20</sub>), triterpénoïdes (C<sub>30</sub>), tétarterpénoïdes (C<sub>40</sub>) ou les polyterpénoïdes (nombre de carbones supérieur à C<sub>40</sub>). Des réarrangements et des modifications participent à leurs diversifications. La voie de biosynthèse sera approfondie dans la partie 2 ci-dessous.

L'analyse de la composition des huiles essentielles s'est intensifiée avec le développement de nouvelles techniques comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la spectrométrie de masse (SM). Les progrès effectués dans ce domaine sont régulièrement recensés depuis 1976 par Lawrence B. M. dans le journal intitulé "Perfumer and Flavorist". D'une manière générale, les huiles essentielles sont principalement formées d'un mélange complexe de mono- et sesquiterpénoïdes, et peuvent également contenir des phénylpropanoïdes. Par exemple, l'huile essentielle de lavande (*Lavandula angustifolia*, *Lavandula latifolia*, *Lavandula intermedia*) renferme plus de 300 composés dont 95% d'entre eux sont des monoterpénoïdes (Ohloff, 1994). Variant suivant les espèces et l'environnement, les principaux composés de cette huile sont le plus souvent du linalol, de l'acétate de linalyle, du 1,8-cinéol et du camphre. Les résines des conifères contiennent, elles, autant de diterpénoïdes ( $C_{20}$ ), moins volatils, que de mono- et sesquiterpénoïdes (Norin, 1972).

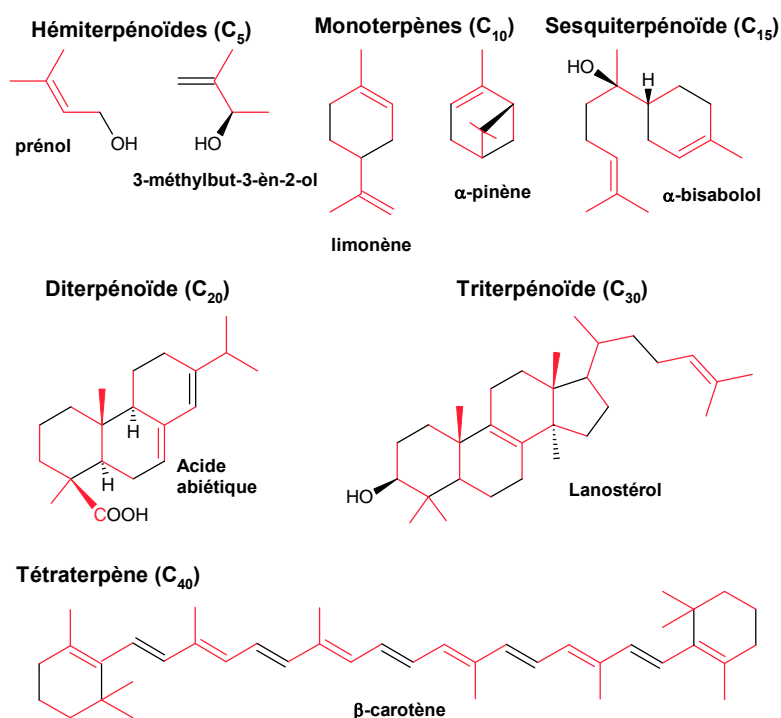


Figure 2 : Diversité des isoprénoïdes et classification selon le nombre d'unité isoprénique (en rouge)

L'amélioration des techniques de détection a permis de s'intéresser également aux composés volatils émis par les plantes qui ne les stockent pas. Par exemple, la méthode de "head space" permet de collecter les molécules volatiles dans l'air environnant pour les

analyser en CPG. Une étude a ainsi identifiées plus de 700 composés émis par les fleurs de 441 taxa sur plus de 25 années (recensés par Knudsen et al., 1993). Parmi les composés volatils émis par les plantes, certains ne sont pas détectés par l'homme, mais ont un rôle physiologique pour la plante. Un exemple représentatif de ce type de composés est l'éthylène qui est une phytohormone qui contrôle divers processus fondamentaux pour la plante comme la maturation des fruits ou l'abscission des feuilles. Parallèlement à la découverte des composés volatils des plantes, de nombreuses recherches portent sur l'élucidation de leurs voies de biosynthèse, de leurs régulations et de leurs fonctions physiologiques.

2. La biosynthèse des composés volatils chez les plantes

a. *La biosynthèse des terpénoïdes*

La découverte des précurseurs de l'IPP a été initiée par des expériences de traçage isotopiques. L'incorporation d'acétate de sodium chez la souris et le rat a permis la formation de cholestérol deutéré (Bloch and Rittenberg, 1942). Chez les plantes, l'IPP et son isomère allylique, le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) sont générés à partir de la voie métabolique du mévalonate dans le cytosol (MVA) ou de la voie métabolique du phosphate de méthylérythritol dans le plaste (MEP).

Dans un premier temps, le DMAPP est condensé en "tête-à-queue" avec 1, 2 ou 3 unités d'IPP par des prényl transférases pour former, respectivement : le diphosphate de géranyle (GPP), précurseur des monoterpénoïdes ( $C_{10}$ ), le diphosphate de farnésyle (FPP), précurseur des sesquiterpénoïdes ( $C_{15}$ ), ou le diphosphate de géranylgeranyle (GGPP), précurseur des diterpénoïdes ( $C_{20}$ ). Il est historiquement admis que l'IPP cytosolique provenant de la voie métabolique MVA est le précurseur du FPP et des sesquiterpénoïdes, alors que la voie métabolique du MEP fournit l'IPP pour former le GPP et le GGPP précurseurs des monoterpénoïdes et des diterpénoïdes dans le plaste. Cependant, plusieurs études ont démontré l'existence d'échanges d'IPP ou de DMADP entre les 2 voies métaboliques MVA et MEP, rendant ainsi, difficilement identifiable l'origine de la biosynthèse des mono-, sesqui- et diterpénoïdes (Dudareva et al., 2005; Hemmerlin et al., 2003; Laule et al., 2003). Le squalène, précurseurs des triterpénoïdes ( $C_{30}$ ) et le phytoène, précurseurs des tétraterpénoïdes ( $C_{40}$ ), sont obtenus par condensation de 2 FPP et 2 GGPP, respectivement.

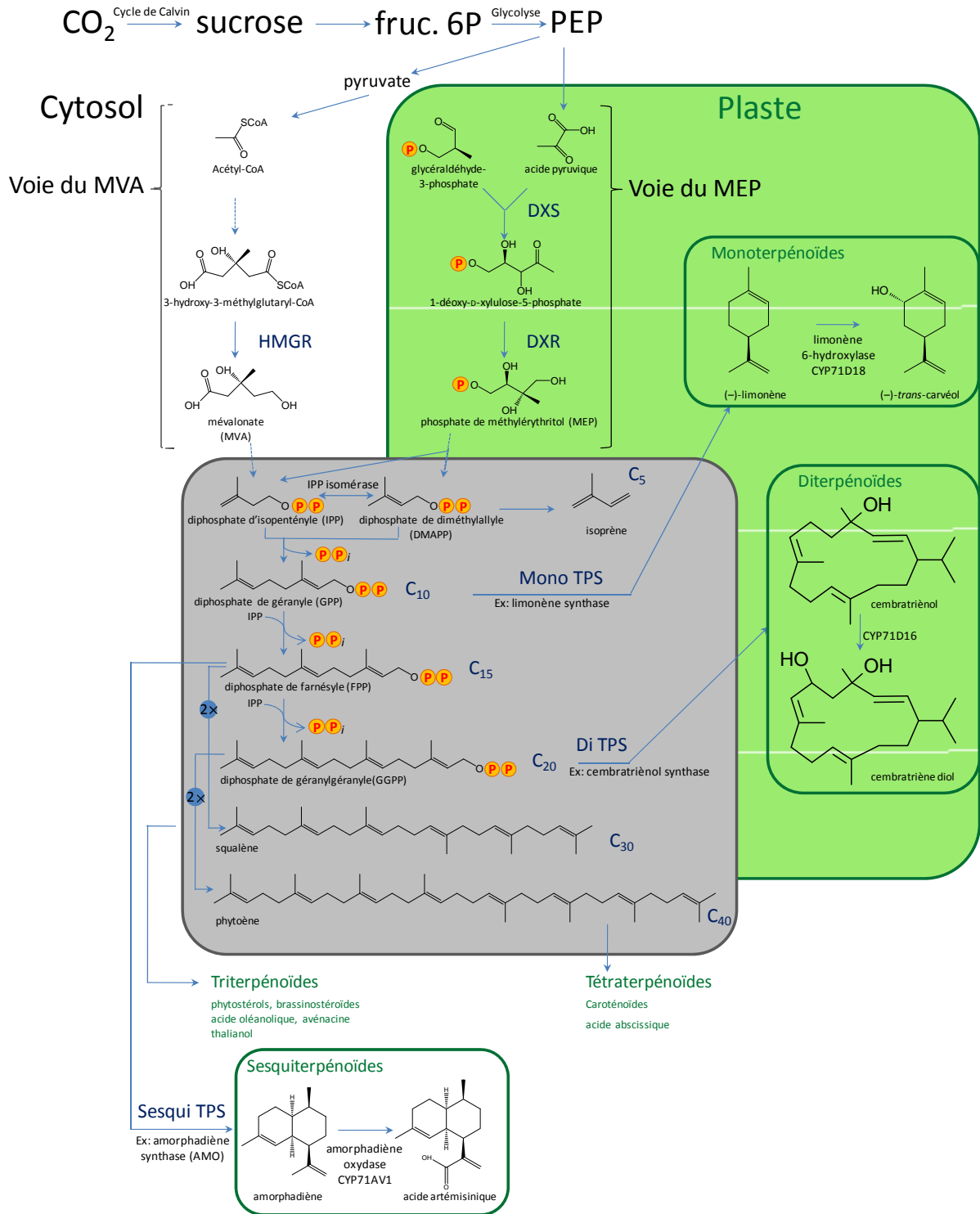


Dans un deuxième temps, les terpènes synthases métabolisent le GPP, FPP, GGPP, le squalène ou le phytoène pour former les squelettes terpéniques des mono-, sesqui-, di-, tri- et tétraterpènes, respectivement. Elles peuvent également former des homoterpènes (C<sub>16</sub> ou C<sub>11</sub>, par exemple) qui sont des terpènes irréguliers ayant gagnés ou perdus 1 carbone.

Ces derniers peuvent être, dans un troisième temps, réarrangés et/ou modifiés par différents types d'enzymes que sont les cytochromes P450 (P450s), les déshydrogénases, réductases, glycosyltransférases, acyltransférases et méthyltransférases.

**Figure 3 (ci-contre) : Schéma de la voie métabolique des terpénoïdes reproduit avec la permission de Jean-François Ginglinger (2010)**

Un exemple de terpène synthase et de terpène oxydase est donné pour les classes des monoterpènes et des sesquiterpènes. Le carré gris représente la voie métabolique commune au cytosol et au plaste. L'isoprène, le GPP, GGPP et le phytoène sont synthétisés dans le plaste ; le FPP et le squalène sont synthétisés dans le cytosol. Les flèches en pointillés représentent des étapes multiples. DXS : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate ; DXR : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase ; HMGR : 3-hydroxy-3-méthylglutarylCoA réductase ; TPS : terpène synthase.



b. *La biosynthèse des phénylpropanoïdes*

Les phénylpropanoïdes dérivent de la voie de biosynthèse du shikimate. Ce dernier est le précurseur des 3 acides aminés aromatiques qui sont formés dans les plastes : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. L'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) catalyse la réaction de conversion de la phénylalanine en cinnamate dans le cytosol (Figure 4). Le cinnamate est ensuite converti en *p*-coumarate par une réaction d'hydroxylation catalysée par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) qui appartient à la famille enzymatique des cytochromes P450. Le *p*-coumarate peut également être formé à partir de la tyrosine par l'action d'une tyrosine ammonia-lyase (TAL) chez les Monocotylédones. Un co-enzyme A est ajouté par la *p*-coumarate-CoA ligase (4CL) pour former du *p*-coumaroyl-CoA, composé précurseur des voies de biosynthèse de la lignine et des flavonoïdes. Les 3 molécules que sont la phénylalanine, le cinnamate et le *p*-coumarate sont les précurseurs de l'ensemble des phénylpropanoïdes volatils. Ces derniers peuvent être regroupés en 3 groupes principaux :

- les phénylpropènes et leurs dérivés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, dont le squelette de base est constitué d'un noyau benzénique (C<sub>6</sub>) et d'un groupe propényle (C<sub>3</sub>).
- Les benzénoïdes en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, dont le squelette est constitué d'un noyau benzénique (C<sub>6</sub>) et d'un carbone avec un groupe fonctionnel aldéhyde, alcool ou acide (C<sub>1</sub>).
- Les benzoates de phényléthyle et de benzyle qui ont deux noyaux benzéniques.

**Figure 4 (ci-contre) : Schéma de la voie métabolique des phénylpropanoïdes volatils et floraux.**

Ce schéma rassemble les réactions et les enzymes découvertes à partir de fleurs de différentes plantes modèles pour l'étude des composés volatils floraux (pétunia, clarkie du brasseur) d'après la revue de Pichersky et Dudareva (2007). Les flèches multiples en trait continu représentent de multiples étapes. Les flèches simples en trait continu représentent les réactions caractérisées. Les flèches en pointillés représentent les étapes possibles pour lesquelles les enzymes n'ont pas été caractérisées. 4CL : *p*-coumarate-CoA ligase ; BA2H : benzoate 2-hydroxylase ; BPBT : benzoyl-CoA : benzyl alcool/phényléthanol benzoyltransférase ; BSMT : benzoate/salicylate carboxyle méthyltransférase ; C3'H : coumaroyl-shikimate/quinatate 3'-hydroxylase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; CA5H : conyféraldéhyde 5-hydroxylase (F5H : ferulate 5-hydroxylase) ; CFAT : coniféryl alcool transférase ; EGS : eugénol synthase ; IGS : isoeugénol synthase ; PAAS : phénylacétaldéhyde synthase ; PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; TAL : tyrosine ammonia-lyase.



La formation des phénylpropènes débute par la réduction du groupe carboxyle du *p*-coumarate en alcool. Une acyltransférase ajoute alors un groupe acétate qui est réduit par une phénylpropène synthase. Chez le pétunia, la coniféryl alcool acyltransférase (CFAT) catalyse la formation d'acétate de conyférile (Dexter et al., 2006). Ce dernier est le précurseur de l'isoeugénol et de l'eugénol formés par une isoeugénol et une eugénol synthase (IGS et EGS), respectivement.

Le groupe carboxyle du cinnamate est réduit de la même façon que les phénylpropènes pour former les benzénoïdes. Le groupe prényle subit auparavant une  $\beta$ -oxydation suivie d'une décarboxylation oxydative. Ces composés peuvent être ensuite modifiés par des hydroxylases, méthyltransférases, acétyltransférases et des ligases. Par exemple, la benzoate/salicylate carboxyle méthyltransférase (BSMT) du pétunia est responsable de la formation de benzoate de méthyle dans les fleurs (Negre et al., 2003).

Une benzoyltransférase réalise la condensation de 2 benzénoïdes ou 1 benzénoïde et 1 phényléthanol pour former des molécules à deux noyaux benzéniques. Chez le pétunia, la benzoyltransférase de benzyl alcool/phényléthanol (BPBT) est à l'origine de la formation de benzoate de phényléthyle et de benzyle (Boatright et al., 2004). Le phényléthanol proviendrait de la réduction du groupe aldéhyde du phénylacétaldéhyde, lui-même formé par une phénylacétaldéhyde synthase (PAAS) à partir de la phénylalanine.

On notera que le salicylate de méthyle, dérivé volatil du salicylate, pourrait être obtenu à partir de l'isochorismate (Wildermuth et al., 2001), précurseur de la phénylalanine, ou à partir de l'acide benzoïque.

### 3. Fonction physiologique des composés volatils chez les plantes

Le rôle physiologique que jouent les composés volatils dans la plante est encore mal connu. Alors qu'il est communément admis que les composés volatils émis par la fleur, le fruit et la graine, jouent un rôle d'attraction d'insectes pollinisateurs et d'animaux disséminateurs de semences, très peu d'études démontrent la capacité d'une substance émise par une plante à attirer un organisme spécifique. Parmi ces tentatives, Raguso et Light (1998) ont mis en évidence la capacité d'un papillon nocturne (*Sphinx perelegans*) à percevoir des terpénoïdes émis par des plantes à floraisons nocturnes.

Certaines molécules volatiles émises par la fleur ainsi que par des parties végétatives ont des propriétés antimicrobiennes, et pourraient donc jouer également un rôle de défense

des différents organes de la plante. Ainsi, Friedman et al. (2002) ont démontré l'activité antibactérienne de 96 huiles essentielles extraites de différentes plantes et Hammer et al. (2003), l'activité fongicide de 6 terpénoïdes présents dans *Melaleuca alternifolia*.

Alors que certains composés volatils sont à l'état de traces, leur synthèse peut être induite par l'attaque de pathogènes ou d'herbivores dans des diverses plantes telles que le maïs, le *Lotus japonicus* (Arimura et al., 2004), le chou (Vuorinen et al., 2004) ou le concombre (Mercke et al., 2004). Chez le maïs, par exemple, la synthèse du  $\beta$ -farnésène, avec celle d'autres molécules volatiles, est induite après l'infestation de la plante par des pucerons. Ce terpène a une action directement répulsive contre le puceron herbivore (*Rhopalosiphum maidis*), car il est une phéromone d'alarme chez cet organisme (Bernasconi et al., 1998).

Ces molécules anti-herbivores peuvent également avoir une action indirectement répulsive en attirant les organismes ennemis des herbivores. C'est le cas des terpénoïdes émis par les semis de maïs endommagés par l'attaque de chenilles herbivores qui attirent les guêpes femelles parasite de l'hôte herbivore (Turlings et al., 1990).

Les plantes voisines non-attaquées peuvent être sensibles à ces molécules volatiles agissant alors comme un signal d'alerte. Une amélioration de la réponse de défense à l'attaque ultérieure par des chenilles a été ainsi observée chez le tabac (Kessler et al., 2006).

Enfin, certains mono- et sesquiterpènes induits par les herbivores sont également susceptibles d'avoir des actions physiologiques internes à la plante comme, par exemple, la protection contre le stress oxydatif (Delfine et al., 2000; Loreto et al., 2004) en se combinant avec des radicaux d'oxygène libre (Bonn and Moortgat, 2003; Hoffmann et al., 1997).

Comme il a été précédemment mentionné, certaines molécules volatiles ont des rôles physiologiques fondamentaux comme les phytohormones telles que l'éthylène ou le méthyljasmonate. Le jasmonate est une molécule signal impliquée dans la réponse au stress et le développement. Les fleurs de jasmin convertissent le jasmonate en *cis*-jasmone, molécule à l'odeur caractéristique de ces fleurs, lorsqu'elles sont traitées au jasmonate. Cette molécule pourrait alors être une forme inactive du jasmonate relarguée directement dans l'atmosphère (Koch et al., 1997).

#### 4. Distribution des composés volatils chez les plantes

Du fait de leur toxicité vis-à-vis des micro-organismes, les composés volatils sont également susceptibles d'être toxiques pour la plante. L'accumulation intracellulaire de monoterpènes dans des cellules de plantes (*Pelargonium fragrans*) en suspension s'est révélée être toxique pour la culture cellulaire (Brown et al., 1987). Chez certaines plantes, il existe des structures spécialisées qui sont le lieu de synthèse de ces molécules et qui permettent à la plante de les accumuler. Par exemple, chez la famille des Lamiacées, la menthe possède des trichomes glandulaires peltés sur toute la surface de la partie aérienne de la plante, qui renferment l'huile essentielle riche en monoterpénoïdes (Hallahan, 2000). Chez certains conifères, les résines et les gommés sont synthétisés dans des canaux résinifères constitués de cellules épithéliales (Trapp and Croteau, 2001). Bien souvent, les plantes qui ne possèdent pas de structures secondaires, n'accumulent des composés volatils qu'à l'état de traces. Dans la majorité des cas, ils sont alors synthétisés dans les cellules épidermiques à partir desquelles ils diffusent librement dans l'environnement (Dudareva, 2004).

#### C. Les composés volatils des animaux et des micro-organismes

##### 1. Les composés volatils des animaux

Comme les végétaux, les animaux ont historiquement été exploités par l'homme pour leurs capacités à produire des molécules odorantes. Par exemple, le musc extrait des glandes abdominales du chevreton porte-musc d'Asie centrale (*Moschus moschiferus*) en période de reproduction a longtemps été utilisé comme source naturelle pour la composition de parfum (Falbe and Regitz, 1991; Fey and Otte, 1985). Menacée d'extinction, l'espèce animale est aujourd'hui protégée. Les matières d'origines animales sont presque systématiquement remplacées par des produits de synthèse. Des odeurs musquées sont également présentes chez les plantes comme l'ambrette, qui est principalement due à l'ambrettolide contenue dans ses graines (Kerschbaum, 1927).

##### 2. Les composés volatils des micro-organismes

###### a. La découverte des composés volatils chez les micro-organismes

L'utilisation des micro-organismes par l'homme pour la production de molécules odorantes trouve ses origines dans la fabrication d'aliments fermentés comme la bière, le

fromage, le vin... Le roquefort, par exemple, est confectionné à l'aide de la moisissure *Penicillium roquefortii* dont le métabolisme lipidique produit des méthylcétones responsables de la qualité de l'arôme du fromage (Kinsella et al., 1976). Au début des années vingt du siècle dernier, apparaît la première revue sur ces micro-organismes producteurs d'arômes (Omelianski, 1923). Les recherches initiales sont focalisées sur leur criblage et sur l'identification des composés émis. De nombreux procédés de biotechnologies voient alors le jour et les micro-organismes deviennent une nouvelle source de production de molécules aromatiques pour l'industrie des arômes et du parfum.

Plusieurs revues mentionnent les principaux micro-organismes producteurs de composés odorants *de novo* découverts (Gounaris, 2010; Janssens et al., 1992; Krings and Berger, 1998; Longo and Sanromán, 2006; Salim-ur-Rehman et al., 2006). Ce sont essentiellement les champignons, notamment les basidiomycètes, qui produisent un très large spectre de composés volatils odorants dont certains ont une structure moléculaire identique à celle des composés volatils émis par les plantes. On retrouve ainsi des monoterpénoïdes, des sesquiterpénoïdes et des phénylpropanoïdes. Par exemple, l'ascomycète *Ceratocystis moniliformis* produit de l'acétate d'isoamyle, de la  $\gamma$ -décylactone et du géraniol à l'origine d'arôme fruité de banane, de pêche ou de rose, respectivement (Lanza et al., 1976; Lanza and Palmer, 1977).

Ainsi, des composés volatils communs sont produits par des organismes phylogénétiquement éloignés appartenant au règne végétal et microbien dans le même but de se défendre contre les organismes concurrents, pathogènes ou prédateurs et d'interagir avec l'environnement (Gershenzon and Dudareva, 2007).

*b. Le catabolisme des composés volatils chez les micro-organismes*

Certains micro-organismes sont capables d'utiliser les composés volatils comme source de carbone. Des monoterpénoïdes comme le citronellol, le camphre ou le limonène sont catabolisés en métabolites assimilables, essentiellement par des souches de *Pseudomonas* (Trudgill, 1990). Au cours du catabolisme de la lignine des végétaux par des champignons responsables de pourritures blanches, des alcools aromatiques sont formés (De Jong et al., 1994). En conclusion, ces micro-organismes expriment un système enzymatique capable de métaboliser des molécules chimiquement inertes.



## D. Evolution des composés volatils utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum : le marché des produits naturels

### 1. De la découverte des composés volatils dans la nature à la synthèse chimique

Parallèlement à la découverte des composés volatils présents dans la nature, les chimistes ont entrepris la synthèse de ces molécules. Les produits synthétiques ont permis de répondre à la forte demande en composés aromatiques par l'industrie des arômes et du parfum (Le Guéret et al., 1999). Ce mode d'approvisionnement a également permis de s'affranchir des matières premières animales, de la dépendance aux huiles essentielles et des conditions climatiques et environnementales dont dépend la production des matières végétales. De plus, de nouveaux composés artificiels aux odeurs inédites ont considérablement enrichis la palette de matières premières disponibles pour les créateurs de parfums. De nos jours, une grande majorité des molécules utilisées en parfumerie sont de nature synthétique.

### 2. De la synthèse chimique aux biotechnologies

Il existe à l'heure actuelle un regain d'intérêt pour les produits dits "naturels". L'industrie chimique utilise des produits nuisibles pour l'environnement comme les métaux lourds. Les normes, de plus en plus restrictives, qui sont imposées aux industriels pour réduire leur impact sur l'environnement, poussent ces derniers à se tourner vers des alternatives. D'autre part, sensibilisé par les enjeux environnementaux et soucieux de sa santé, le consommateur se tourne de plus en plus vers des produits labellisés "naturels", les produits synthétiques étant de plus en plus perçus par le grand public comme des produits nocifs. Enfin, la synthèse chimique permet rarement d'être régio-sélectif et stéréo-sélectif dans le cas d'une hydroxylation. Par exemple, l'oxydation allylique du limonène avec du dioxyde de sélénium conduit à la formation d'un mélange de limonène-4-ol, de *trans*- et *cis*- carvéol, d'alcool de périllyle et de limonène-10-ol (Jensen and Sharpless, 1975; Sakuda, 1969).

Entre 1997 et 2007, le marché européen des composés aromatiques naturels a progressivement accru sa part de marché de 16.6 à 30.0%. En Europe, on s'attend à ce que cette croissance continue à un rythme autour de 10%, alors que la croissance du marché global des arômes est de seulement 2.9% (Mane, communication personnelle, 2009).

Certains composés volatils naturels peuvent être obtenus en grande quantité et à des coûts réduits. 50 000 tonnes de limonène sont produits chaque année par l'industrie du jus d'orange à partir des résidus d'écorce d'orange (Lerner, 2003) qui renferment une huile essentielle constituée à plus de 90 % de limonène. Ce dernier est ainsi le monoterpène le plus abondant et son prix sur le marché est estimé entre 68 € (Aldrich, 2013) (Mazzaro, 2000).

Les composés volatils comme le limonène sont des précurseurs intéressants pour produire des dérivés oxygénés à haute valeur ajoutée. C'est le cas de l'alcool de périllyle, limonène hydroxylé qui peut être utilisé comme fragrance et comme agent anti-cancéreux (Belanger, 1998) dont le prix est estimé environ à 588 € (Aldrich, 2013) (Duetz et al., 2003).

Du point de vue de la juridiction européenne (C.E. N°1334/2008) et américaine (C.F.R., 1985 21), une molécule peut être labellisée "naturelle" dès lors qu'elle provient de matière végétale, animale ou microbienne, qu'elle résulte d'un nombre limité et défini de transformations incluant la transformation par un organisme vivant entier ou d'une partie de celui-ci (dont les enzymes) et qu'elle est identique à une molécule identifiée et présente dans la nature.

Par conséquent, les biotechnologies sont d'excellents outils pour transformer un composé naturel à faible coût en produit à haute valeur ajoutée pouvant être labellisé "naturel". De nombreux efforts ont été consacrés à la recherche de procédés de biotransformation de molécules volatiles par les micro-organismes. Avec la découverte des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des composés volatils chez les plantes, les biotechnologies végétales offrent de nouvelles opportunités. Notamment, l'utilisation des cytochromes P450 du métabolisme des plantes apparaît intéressante pour produire des molécules volatiles oxygénées à haute valeur ajoutée à partir de squelettes moléculaires disponibles à faible coût.

## II. Les cytochromes P450

### A. Caractérisation des cytochromes P450

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines enzymatiques (EC 1.14.14.1) qui catalysent des réactions d'oxygénation (Figure 5). Dans la plupart des cas, l'activation et le clivage du dioxygène O<sub>2</sub> qui requièrent un apport d'électrons du NAD(P)H via une cytochrome P450 réductase, conduisent à l'insertion d'une molécule d'oxygène dans le substrat et la formation d'une molécule d'eau (Meunier et al., 2004; Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000).



**Figure 5 : Réaction d'oxydation catalysée par les cytochromes P450**

S : substrat.

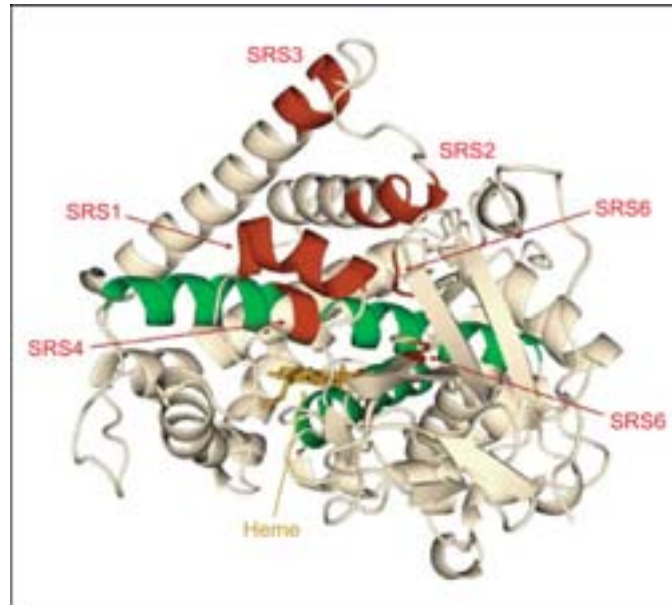
Les P450s ont pour caractéristique commune de présenter un déplacement du maximum d'absorption de la lumière (bande de Soret) à 450 nm, lorsque le fer de l'hème sous forme réduite (ion ferreux Fe (II)), lié aux 4 atomes d'azotes de l'hème et au groupement thiolate d'une cystéine (5<sup>ème</sup> ligand), se lie aussi au monoxyde de carbone comme 6<sup>ème</sup> ligand (Omura and Sato, 1964a). Le nom de "P-450" est ainsi donné à ces protéines pour **P**igment absorbant à **450** nm.

La superfamille des P450s est représentée dans le génome de presque tous les organismes vivants (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). En dépit d'une grande diversité de séquences protéiques, les P450s présentent une forte conservation de structure tertiaire qui est illustrée par la Figure 6 (Graham and Peterson, 1999; Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Il existe plusieurs motifs consensus :

- la séquence (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly) située au niveau de l'hélice L et incluant la cystéine servant de 5<sup>ème</sup> ligand au fer de l'hème.
- la séquence (Glu-X-X-Arg) localisée au niveau de l'hélice K susceptible de stabiliser la structure du noyau en maintenant la poche de l'hème dans sa position.

- la séquence (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser) de l'hélice I impliquée dans le transfert de proton vers l'oxygène pour son activation.

La position des Sites de Reconnaissance du Substrat (SRS) est relativement bien conservée d'un P450 à l'autre.



**Figure 6 : Modèle de la structure tertiaire conservée de cytochromes P450 d'après Urlacher et Eiben (2006)**

Il a été généré par le logiciel Pymol (Schrodinger, 2010) à partir de la structure cristallographique 1jz du cytochrome bactérien P450<sub>BM3</sub> de *Bacillus megaterium* (Haines et al., 2001). Orange : hème ; Vert : hélices I et L ; Rouge : sites de reconnaissance du substrat (SRS1-6).

Les P450s sont répartis en 4 classes selon leur partenaire rédox (Schuler and Werck-Reichhart, 2003). La majorité des P450s de plantes appartiennent à la classe II regroupant les P450 qui sont associés à une P450 réductase NADPH dépendante (EC 1.6.2.4) membranaire. Cette dernière contient une flavine adénine dinucléotide (FAD) et une mononucléotide (FMN) responsables du transfert d'électrons un à un vers le site actif du P450.

Rarement exprimés dans le plaste, les P450s sont le plus souvent localisés sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique chez les plantes. Une hélice N-terminale transmembranaire sert alors d'ancrage dans la membrane du réticulum. En revanche, les P450s bactériens sont solubles.

## B. Mécanisme enzymatique

Les structures conservées du site actif dénotent un mécanisme réactionnel commun à ces enzymes qui est représenté sur la Figure 7 (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Dans une première étape (A), la fixation du substrat dans le site actif du P450 provoque le départ d'une molécule d'eau, dont le groupe hydroxyle formait une 6<sup>ème</sup> liaison avec le fer de l'hème. Cette perturbation provoque un changement de l'état de spin de l'atome de fer pentacoordiné (Schenkman et al., 1967), observable en spectrométrie par un déplacement du maximum d'absorption de l'enzyme de 420 nm à 390 nm (passage de l'état de bas spin à haut spin) (Jefcoate, 1978). Le spectre différentiel résultant porte le nom de spectre de type I. L'étape suivante est la réduction du fer ferrique Fe(III) en fer ferreux Fe(II) par transfert d'un électron (B). Une molécule de dioxygène vient alors se lier au Fe(II) pour former un complexe intermédiaire Fe(II)-O<sub>2</sub> (C). Un second électron réduit ensuite ce complexe et active le dioxygène (D). Une double protonation suivie du départ d'une molécule d'eau après clivage du dioxygène aboutit à la formation d'un ion oxoferryle (E et F). Enfin, ce dernier insère un atome d'oxygène dans le produit (G). Le produit formé est libéré en-dehors du site actif et le fer retrouve son état initial (H).

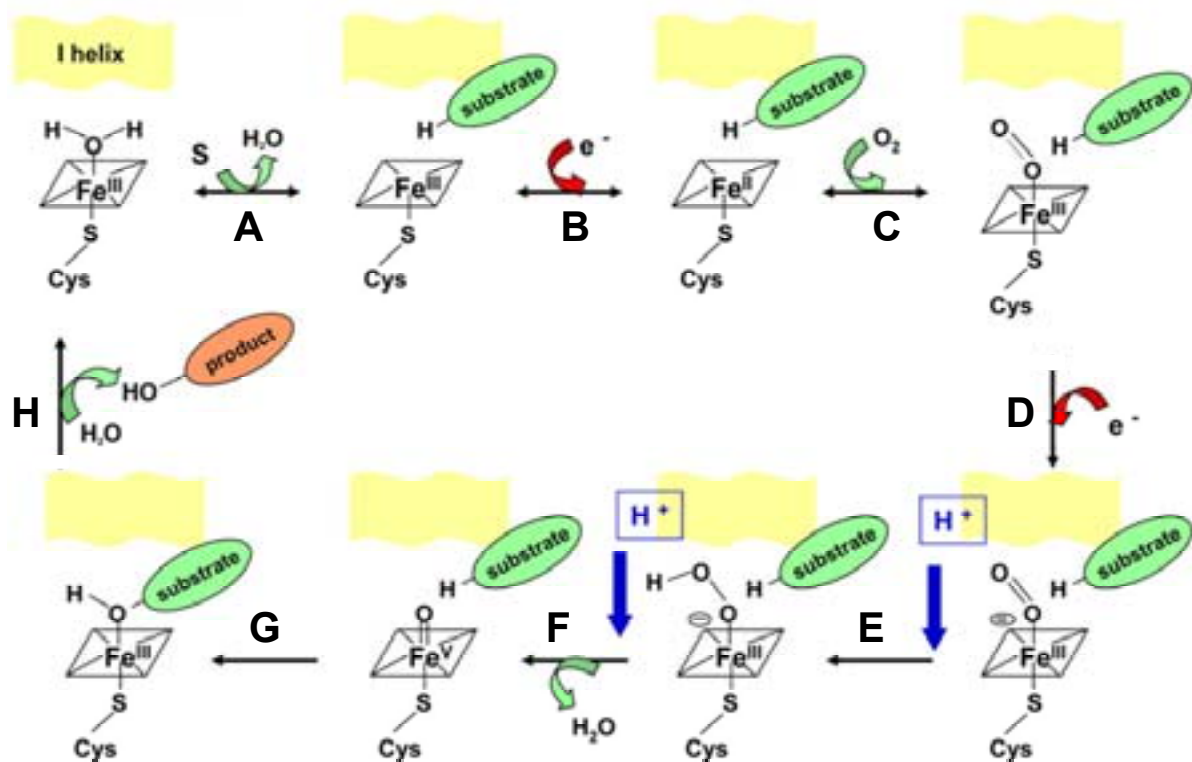


Figure 7 : Mécanisme réactionnel des cytochromes P450 d'après Werck-Reichhart et Feyereisen (2000)

Par ce mécanisme, les P450s sont capable de catalyser des réactions d'oxygénation de façon régiospécifique et stéréospécifique, sur une molécule hydrocarbonée non activée. Bien que ce soit le plus souvent des hydroxylations qui sont observées, il existe une diversité de réactions possibles : époxydation, dealkylation, clivage carbone-carbone, isomérisation, dimérisation, désaturation, et parfois, déshydrogénation ou réduction (Isin and Guengerich, 2007; Mansuy, 1998). Les réactions enzymatiques les plus atypiques qui ont été identifiées dans le métabolisme secondaire des plantes sont recensées par Mizutani et Sato (2011).

### C. Diversification et fonction chez les plantes

Les cytochromes P450 forment une large superfamille diversifiée avec environ 18 000 séquences nucléiques codant pour un P450 connues fin 2010 (Nelson, 2011). Ce nombre a considérablement augmenté ces dernières années en raison de l'accélération du séquençage de génomes. Chaque enzyme est classée et nommée par un comité de nomenclature (Nelson, 2006, 2009), selon son identité de séquence protéique et ses liens de phylogénie avec l'ensemble des P450s. Ils sont ainsi regroupés dans des familles où les membres contiennent plus de 40% d'identité protéique et des sous-familles où les membres contiennent plus de 55% d'identité protéique. Par exemple, le cytochrome annoté CYP71D13 appartient à la famille 71 et la sous-famille D. La classification sur la base d'une identité de séquence peut parfois être modulée sur la base de phylogénie.

Chez les plantes, les P450s peuvent intervenir dans le métabolisme primaire pour la biosynthèse des stérols membranaires, mais ils sont le plus souvent impliqués dans le métabolisme secondaire pour la biosynthèse d'hormones, de biopolymères ou de métabolites de défenses. Ils participent aussi au catabolisme de composés endogènes (hormones) ou exogènes, notamment à la détoxification de xénobiotiques (Mizutani and Ohta, 2010). Leur nombre peut être faible comme chez les nématodes, les insectes ou *Saccharomyces cerevisiae*, alors qu'il explose chez les plantes. Par exemple, la levure de boulangerie contient 3 gènes codant des P450s (Nelson et al., 2004b) et *Arabidopsis thaliana* en contient 244 plus 28 pseudogènes (Bak et al., 2011).

Cette spectaculaire diversification chez les plantes peut s'expliquer par la nécessité de produire de nouvelles molécules permettant aux plantes une adaptation au milieu environnant.

Les terpénoïdes sont typiquement des métabolites secondaires jouant ce rôle adaptatif (Cheng et al., 2007).

L'attribution d'une fonction pour un P450 donné devient alors un véritable challenge et nécessite la mise en place de stratégies, grâce auxquelles, nous allons voir, les activités enzymatiques de mono- et sesquiterpénoïdes oxydases d'une trentaine de P450s ont pu être caractérisées jusqu'ici.

### III. Production de composés volatils fonctionnalisés par des cytochromes P450 recombinants: état de l'art

#### A. Identification de cytochromes P450 de plantes

1. P450s potentiellement impliqués dans la biosynthèse des mono- et sesquiterpénoïdes<sup>2</sup>

##### a. Inventaire

Une trentaine de P450s de plantes ayant une activité mono- ou sesquiterpénoïde oxygénase/oxydase ont été identifiés (Tableau 1).

**Tableau 1 (ci-contre) : Liste récapitulative des P450s ayant une activité mono- ou sesquiterpénoïde oxygénase/oxydase chez les plantes et des résultats de leurs applications pour la production de terpènes fonctionnalisés.**

La fonction physiologique *in planta* pour chaque P450 n'a pas été systématiquement déterminée. n.d : non déterminé.

---

<sup>2</sup> Se reporter aux références bibliographiques du Tableau 1 dans cette partie.

Activité enzymatique	Nom	Plante source	Famille de plante	Références bibliographiques publication / brevet	Organisme transgénique	Résultat et quantité de produit
(+)-Camphre 6-exo-hydroxylase	n.d.	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiacées	Funk and Croteau, 1993		
7-Déoxylaganine 7-hydroxylase (7DLH)	n.d.	<i>Lonicera japonica</i>	Caprifoliacées	Katano et al., 2001		
Géranol 10-hydroxylase (G10H)	CYP76B6	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynacées	Madyastha et al., 1976; Collu et al., 2001 / Ohta and Mizutani, 1998	Plante	
Géranol 10-hydroxylase (G10H)	CYP76B10	<i>Swerthia mussoitii</i>	Gentianacées	Wang et al., 2010		
Géranol, nérol, citronellol 10-hydroxylase	n.d.	<i>Nepeta racemosa</i>	Lamiacées	Hallahan et al., 1992a, 1994; Hallahan and West 1995		
Géranol, nérol 2,3-or 6,7-époxydase	CYP71A1	<i>Persea americana</i>	Lauracées	O'Keefe and Leto 1989; Bozak et al., 1990; Hallahan et al., 1992b, 1994		
(-)-Limonène 3-hydroxylase	CYP71D13/D15	<i>Mentha x piperita</i>	Lamiacées	Karp et al., 1990; Lupien et al., 1999; Mahmoud et al., 2004 / Croteau et al., 2001	Plante	80% de limonène au lieu de 2% dans l'huile après co-suppression
(-)-Limonène 3-hydroxylase	n.d.	<i>Mentha spicata</i>	Lamiacées	Lücker et al., 2004		
(-)-Limonène 6-hydroxylase	CYP71D18	<i>Mentha spicata</i>	Lamiacées	Karp et al., 1990; Lupien et al., 1999 / Croteau et al., 2001	Plante	(+)-trans-isopipitenol dans <i>N. tabacum</i>
(-)-Limonène 6-hydroxylase	CYP71D18	<i>Mentha gracilis</i>	Lamiacées	Berteau et al., 2003		
(+)-Limonène 6-hydroxylase	n.d.	<i>Carum carvi</i>	Apiacées	Bouwmeester et al., 1999		
(-)-Limonène 7-hydroxylase	CYP71D174	<i>Perilla frutescens</i>	Lamiacées	Karp et al., 1990; Mau et al., 2010 / Lange et al., 2012	Plante à trichomes glandulaires	2% de perillyl alcool dans l'huile de <i>Mentha x piperita</i> (L3H20)
(-)- $\alpha$ - and $\beta$ -Pinène 6-hydroxylase	n.d.	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiacées	Karp and Croteau, 1992		
$\alpha$ -Pinène 10-hydroxylase	n.d.	<i>Fragaria vesca</i>	Rosacées	Aharoni et al., 2004 / Aharoni et al., 2009	Plante et micro-organisme	Myrtenol et autres dérivés oxygénés de monoterpènes
(+)-Pulégone 9-hydroxylase	n.d.	<i>Mentha x piperita</i>	Lamiacées	Berteau et al., 2001		
(+)-Sabinène 3-hydroxylase	n.d.	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiacées	Karp et al., 1987		
Sécologanine synthase (SLS)	CYP72A1	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynacées	Irmeler et al., 2000; Vetter et al., 1992		
Sécologanine synthase (SLS)	n.d.	<i>Lonicera japonica</i>	Caprifoliacées	Yamamoto et al., 2000		
Terpinolène oxydase	n.d.	<i>Cupressus lusitanica</i>	Cupressacées	Harada et al., 2012		
Amorphadiène oxydase (AMO)	CYP71AV1	<i>Artemisia annua</i>	Astéracées	Ro et al., 2006; Teoh et al., 2006; Chang et al., 2007; Lenihan et al., 2008 / Ro et al., 2010; Chang et al., 2012	Micro-organisme	105 mg/L d'acide artemisinique avec <i>E. coli</i> et 2,5 g/L avec <i>S. cerevisiae</i>
5-epi-aristolochène $\beta$ -3 $\alpha$ -hydroxylase (EAH)	CYP71D20	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanacées	Ralston et al., 2001; Takahashi et al., 2007 / Chappell and Ralston, 2011	Plante et micro-organisme	50 mg/L de capsidol avec <i>S. cerevisiae</i>
(+)- $\delta$ -cadinène hydroxylase	CYP706B1	<i>Gossypium arboreum</i>	Malvacées	Luo et al., 2001; Chang et al., 2007 / Rathore et al., 2011; Chang et al., 2012	Plante et micro-organisme	100 mg/L de 8-hydroxy- $\delta$ -cadinène avec <i>E. coli</i>
Germaerène A acide 6 $\alpha$ -hydroxylation	CYP71BL2	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	Ikezawa et al., 2011		
Germaerène A acide 8 $\beta$ -hydroxylation	CYP71BL1	<i>Helianthus annuus</i>	Astéracées	Ikezawa et al., 2011		
Germaerène A et amorphadiène 12-hydroxylase, valencène 2-oxydase	CYP71AV8	<i>Cichorium intybus</i>	Astéracées	De Kraker et al., 2003; Cankar et al., 2011 / Bouwmeester et al., 2007	Extrait de plante	50 à 100% de conversion de sesquiterpènes oléfinés en dérivés oxygénés
Germaerène A oxydase (GAO)	n.d.	<i>Lactuca sativa</i>	Astéracées	Nguyen et al., 2010		
Germaerène A oxydase (GAO)	n.d.	<i>Cichorium intybus</i>	Astéracées	De Kraker et al., 2001; Nguyen et al., 2010		
Germaerène A oxydase (GAO)	n.d.	<i>Helianthus annuus</i>	Astéracées	Nguyen et al., 2010		
Germaerène A oxydase (GAO)	n.d.	<i>Saussurea lappa</i>	Astéracées	Nguyen et al., 2010		
Germaerène A oxydase (GAO)	n.d.	<i>Barnadesia spinosa</i>	Astéracées	Nguyen et al., 2010		
$\alpha$ -humulène 8-hydroxylase	CYP71BA1	<i>Zingiber zerumbet</i>	Zingiberacées	Yu et al., 2011		
Prémassinolène oxydase (HPO)	CYP71D55	<i>Hyoscyamus muticus</i>	Solanacées	Takahashi et al., 2007 / Chappell et al., 2006	Micro-organisme	Sesquiterpènes oxygénés

CYP450 monoterpénoïdes oxygénases

CYP450 sesquiterpénoïdes oxygénases



Ces P450s ont été isolés à partir de plantes connues pour produire des métabolites secondaires. Ces plantes et métabolites sont les suivants :

**(i)** des mono- et sesquiterpénoïdes accumulés dans des plantes aromatiques et médicinales : des plantes de la famille des Lamiacées (menthes verte et poivrée, pérille, sauge officinale, chataire à grappes, hysope officinale), l'amome sauvage, le cotonnier en arbre et le carvi. La grande famille des Lamiacées contient environ 5000 espèces réparties dans plus de 200 genres (Hedge, 1992; Mabberley, 1987). On estime qu'environ 40 % de ces genres contiennent des espèces aromatiques et beaucoup de ces espèces produisent des huiles essentielles riches en monoterpénoïdes (Lawrence et al., 1992). L'amome sauvage accumule majoritairement dans ces rhizomes le sesquiterpène zérumbone (Damodaran and Dev, 1968) (Figure 8), agent anticancéreux, luttant également contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Dai et al., 1997). L'huile essentielle des fruits du carvi renferme de la carvone et du limonène, 2 monoterpénoïdes aromatiques. Certaines variétés de cotonnier en arbre possèdent des glandes à gossypol à l'intérieur des graines (Bell, 1986). Le gossypol est un polyphénol, dérivé de la voie métabolique des sesquiterpènes, décrit comme ayant des propriétés contraceptives et anticancéreuses (Wang et al., 2009).

**(ii)** des phytoalexines mono- et sesquiterpénoïdes essentiellement produites en conditions de stress : le capsidiol chez le tabac (sesquiterpénoïde, Figure 8), la solavétivone chez la Jusquiame d'Egypte (sesquiterpénoïde), la  $\beta$ -thujaplicine chez le cyprès du Portugal (monoterpénoïde).

**(iii)** des alcaloïdes dérivant des iridoïdes monoterpéniques. La pervenche de Madagascar est une plante ornementale, connue des scientifiques pour les alcaloïdes qu'elle renferme comme la vincristine et la vinblastine qui sont de puissants agents anti-tumoraux (van der Heijden et al., 2004). L'un des intermédiaires, dans leurs voies de biosynthèse, est la loganine (Figure 8), un iridoïdes glycosylé présent en tant que principal produit final chez le chèvrefeuille du Japon (Kawai et al., 1988).

**(iv)** des lactones sesquiterpéniques comme la lactucopicrine (Figure 8) principalement présents chez la famille des Astéracées (Herz, 1977) et responsables de leurs goûts amers

comme chez : la laitue, le tournesol, la chicorée, le costus, la barnadésie épineuse et l'armoise annuelle. Chez la laitue, ces lactones sesquiterpéniques sont produites dans des canaux laticifères. Ces molécules ont de nombreuses propriétés médicinales importantes, notamment l'artémisinine qui est un agent antipaludéen (Bosman and Mendis, 2007).

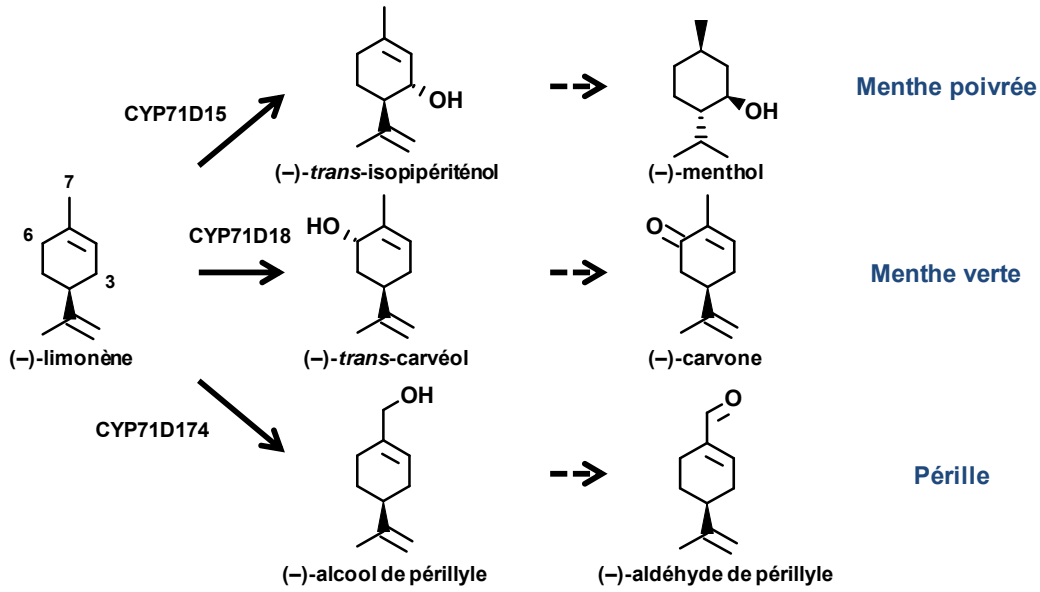
(v) des terpénoïdes émis par certains fruits responsables de leurs parfums et de leur goût : la fraise (linalol, nérolidol).

(vi) l'avocat est un cas non résolu. C'est un fruit dont la chair est riche en dérivés phénoliques issus de la voie des phénylpropanoïdes comme le *p*-coumarate (Golan et al., 1977; Ramírez-Martínez and Luh, 1973). Le CYP71A1, premier P450 végétal caractérisé, a été isolé de l'avocat. Il présente une activité de géraniol et nérol époxydase lorsqu'il est exprimé dans la levure, mais la présence de géraniol, de nérol ou des époxydes correspondants n'a pas été détectées dans les fruits. Ces monoterpénols ne sont donc probablement pas les substrats physiologiques de ce P450.

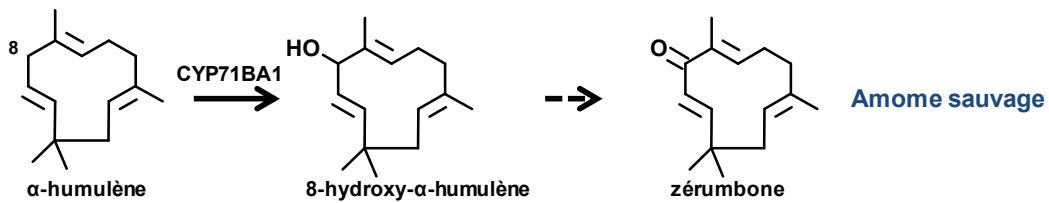
**Figure 8 (au dos) : Exemples de réactions enzymatiques catalysées par des P450s (Tableau 1) impliqués dans la biosynthèse de monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, phytoalexines et iridoïdes monoterpéniques ou de lactones sesquiterpéniques.**

Les étapes simples et multiples sont représentées par des flèches en trait continu et non continu, respectivement. 7DLH : 7-déoxyloganique acide hydroxylase ; GAO : germacrène A oxydase ; LAMT : loganique acide *O*-méthyltransférase.

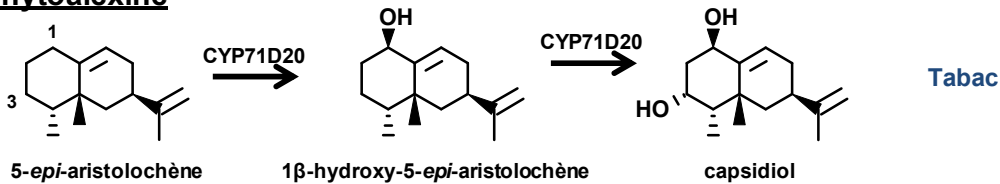
**Monoterpénoïde d'huile essentielle**



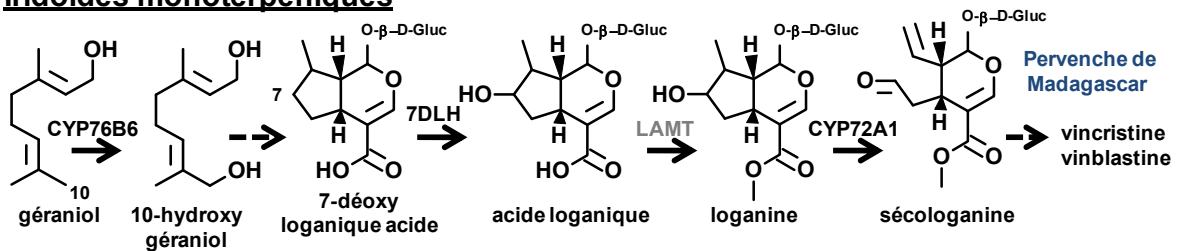
**Sesquiterpénoïde d'huile essentielle**



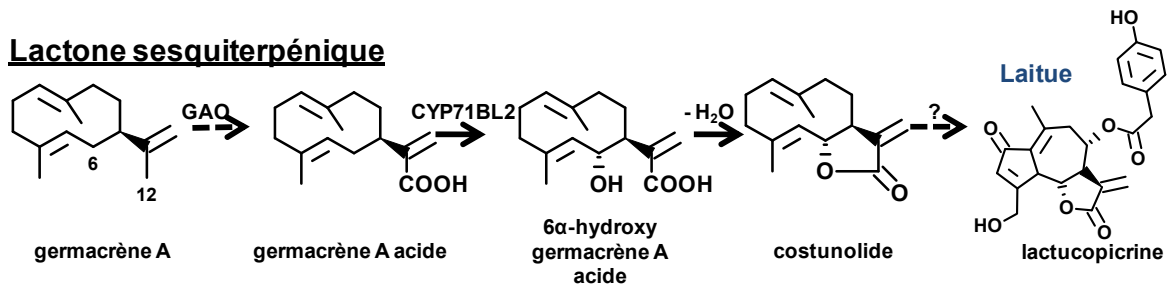
**Phytoalexine**



**Iridoïdes monoterpéniques**



**Lactone sesquiterpénique**



b. Caractérisation

La caractérisation des P450s listés dans le Tableau 1 a le plus souvent été réalisée avant le développement des nouvelles techniques de séquençage des génomes. Elles ont fait intervenir différentes approches.

Chez les plantes accumulant des terpénoïdes, leur lieu de stockage est généralement leur lieu de biosynthèse. Dans le cas des espèces de la famille des Lamiacées, ils sont produits et stockés dans les trichomes glandulaires (cellules épidermiques spécialisées, Tissier, 2012) situés sur la surface des parties aériennes, notamment la face abaxiale des feuilles. Des techniques d'isolement de trichomes glandulaires ont été mises au point permettant de recueillir une fraction de tissu enrichie en protéines enzymatiques spécifiquement impliquées dans la voie de biosynthèse des terpénoïdes (Gershenzon et al., 1987; Yerger et al., 1992). Chez des espèces végétales de familles différentes, des trichomes glandulaires peuvent être également présents comme sur les bourgeons des fleurs de l'armoise annuelle ou les anthères des inflorescences du tournesol (Astéracées). Les tissus enrichis en P450 d'intérêt sont plus faciles d'accès lorsque les métabolites sont accumulés dans des organes comme le fruit (carvi, avocat), la feuille (canaux laticifères de la laitue), la racine (chicorée) ou le rhizome (amome sauvage). Enfin, les cultures cellulaires *in vitro* produisant les terpénoïdes, en condition de stress ou non, sont des modèles d'étude pratiques pour étudier la voie de biosynthèse de ces composés.

Lorsque les terpènes synthases étaient connues, ainsi que leur lieu d'expression, il a été possible de cibler le lieu d'expression du P450 associé. C'est ainsi, que chez la laitue, l'expression d'une germacrène A synthase s'est avérée être 150 fois plus importante dans les cellules de la tige que dans celles des canaux laticifères (Ikezawa et al., 2011).

Les tissus ou cellules exprimant le P450 ont ensuite été testés pour leurs activités enzymatiques avant l'identification du gène responsable. La préparation de microsomes à partir de ces tissus a permis de réaliser des essais enzymatiques sur une large palette de substrats.

Lorsque l'activité enzymatique était bien détectée dans un tissu défini, la séquence codante du P450 correspondant a été isolée à partir d'une collection d'ADNc générée à partir de ces tissus ou cellules enrichis en transcrits. Dans certains cas, l'ADNc a été identifié par

hybridation différentielle de colonies provenant d'une collection d'ADNc similaire mais appauvrie en transcrit (Bozak et al., 1990; Luo et al., 2001; Teoh et al., 2006). C'est ainsi que *CYP71A1*, exprimé dans les fruits matures de l'avocat et non-exprimé dans les fruits immatures, fut le premier gène de P450, impliqué dans la biosynthèse des mono- et sesquiterpènes, à être identifié (Bozak et al., 1990). L'amplification par PCR de l'ADNc correspondant au P450 d'intérêt a aussi pu être réalisée à l'aide d'amorces dégénérées dessinées à partir des motifs conservés de P450 de plantes déjà caractérisés (Cankar et al., 2011; Ikezawa et al., 2011; Luo et al., 2001; Lupien et al., 1999; Mau et al., 2010; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2011), ou à partir de la séquence protéique purifiée et séquencée (Collu et al., 2001; Lupien et al., 1999).

On notera que la majorité des P450s ayant une activité de mono- ou sesquiterpénoïdes oxydases décrit jusqu'ici, appartiennent à la famille CYP71 (Tableau 1).

## 2. P450s impliqués dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes (volatils)

Trois P450s impliqués dans l'hydroxylation de composés intermédiaires dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes volatils de diverses plantes (Figure 4, page 10) ont principalement été caractérisés. La cinnamate 4-hydroxylase (C4H), appartenant à la famille des CYP73s, catalyse l'hydroxylation en *para* du cinnamate pour former du *p*-coumarate (Nair and Vining, 1965; Russell and Conn, 1967). La *p*-coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase (C3'H), de la famille CYP98, catalyse l'hydroxylation en *meta* du *p*-coumaroyl-shikimate pour former du cafféoyl-shikimate (Schoch et al., 2001). Enfin, la coniféryl alcool 5-hydroxylase (CA5H), appartenant à la famille des CYP84s, catalyse l'hydroxylation du coniféryl alcool en *meta* (Humphreys et al., 1999; Osakabe et al., 1999). Les autres P450s, comme la benzoate 2-hydroxylase (BA2H) qui n'a pas été confirmée pour le moment, sont décrits dans la revue de Ehltng et al. (2006).

L'hydroxylation des composés phénoliques en position *méta* est une étape clé de la biosynthèse des saveurs et parfums tels que la vanilline, le gingérol, l'eugénol ou le saffrole. CYP98A13 a été caractérisé comme une enzyme à l'activité de 3'-hydroxylase dans la voie de biosynthèse de l'eugénol (Figure 4, page 10) chez le basilic (Gang et al., 2002).

## 3. P450s impliqués dans la voie de biosynthèse de la camalexine

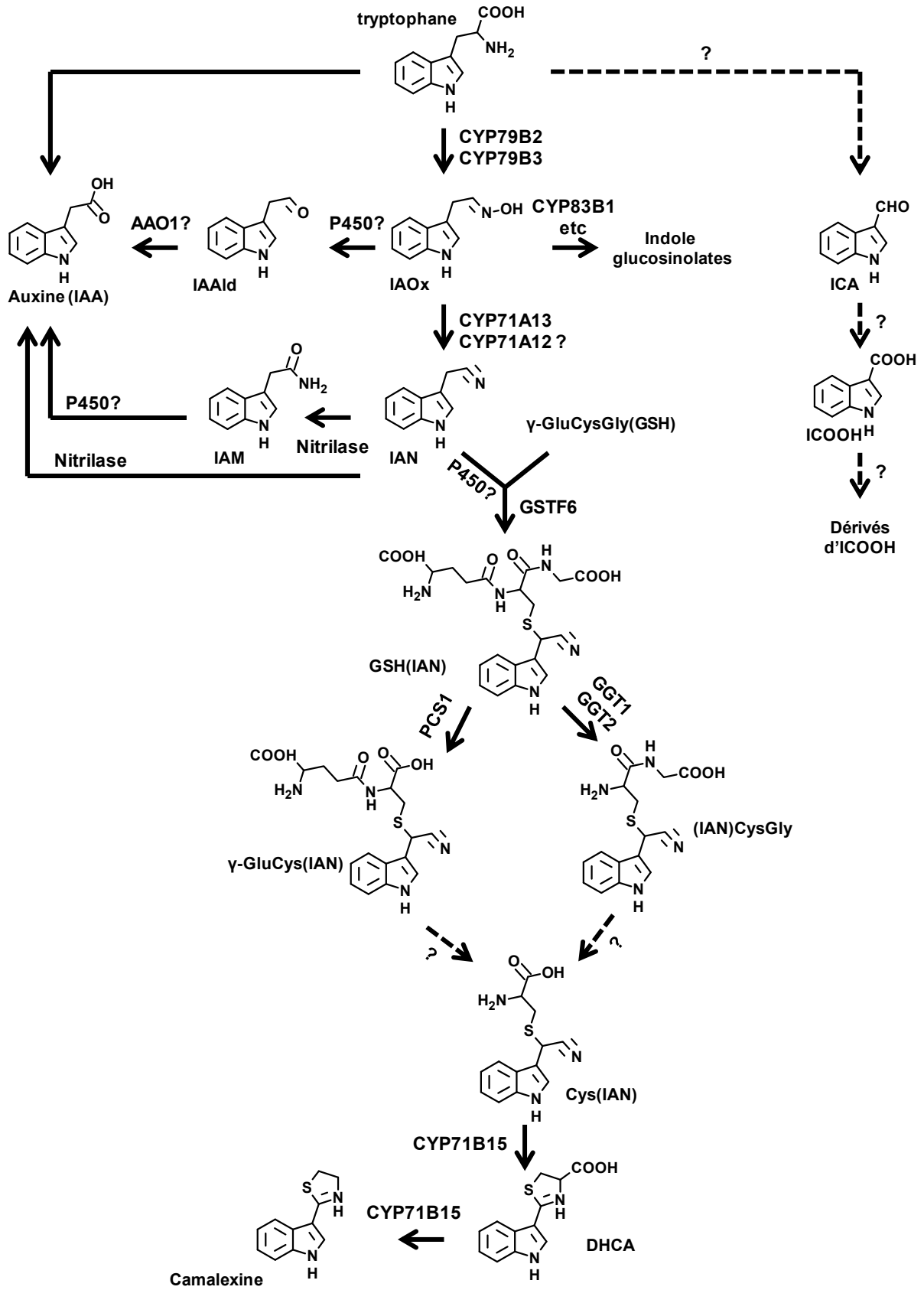
La camalexine est la principale phytoalexine d'*Arabidopsis thaliana*. Elle est produite en réponse à l'attaque d'un pathogène comme la bactérie *Pseudomonas syringae* ou le

champignon *Botrytis cinerea*. Certains précurseurs comme l'indole 3-acétaldoxime (IAOx) et l'indole 3-acétonitrile (IAN) sont des composés volatils.

La biosynthèse de cet alcaloïde indolique se fait à partir du tryptophane et implique plusieurs P450s (Figure 9). CYP79B2 et CYP79B3 oxydent le tryptophane sur l'amine de la chaîne latérale pour former de l'IAOx (Glawischnig et al., 2004; Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000). CYP71A13 catalyse *in vitro* la déshydratation de l'IAOx en IAN (Nafisi et al., 2007). Le mutant d'insertion *cyp71a13* perd sa capacité à produire d'importantes quantités de camalexine en réponse à une infection. L'apport d'IAN permet la restauration d'un phénotype comparable à celui des plantes contrôles. CYP71A13 est donc responsable de la métabolisation de l'IAOx en IAN. Une étude récente démontre que le glutathion (GSH) se conjugue avec l'IAN lors d'une réaction catalysée par la glutathion *S*-transférase F6 (Su et al., 2011). Elle démontre également que des  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases (GGT1 et 2) et une phytochélatine synthase (PCS1) formeraient ensuite des dérivés d'IAN ( $\gamma$ -GluCys(IAN) et (IAN)CysGly). Les étapes ultérieures n'ont pas été caractérisées, excepté la dernière. Celle-ci fait intervenir CYP71B15 (ou PAD3), un P450 multifonctionnel, capable de catalyser la conversion de la cystéine indole 3-acétonitrile (Cys(IAN)) en acide dihydrocamalexique (DHCA), puis en camalexine (Böttcher et al., 2009; Schuegger et al., 2006). Le mécanisme réactionnel par lequel CYP71B15 et CYP71A13 réalisent ces réactions atypiques est encore mal connu. Mizutani et Sato (2011) soulignent une éventuelle corrélation avec la présence d'une substitution dans le motif conservé (D/E)T situé sur l'hélice I de ces deux P450s.

#### Figure 9 (au dos) : Voie de biosynthèse de la camalexine et de l'auxine via l'IAN chez *Arabidopsis*

La voie de biosynthèse de la camalexine est reproduite d'après Su et al., 2011 et Böttcher et al., 2009. Les flèches discontinues représentent des étapes inconnues. AAO1 : aldéhyde oxydase 1 d'*Arabidopsis* ; Cys(IAN) : cystéine indole 3-acétonitrile ; DHCA : acide dihydrocamalexique ; GGT1 et 2 :  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases 1 et 2 ; GSH : glutathion ou  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine ;  $\gamma$ -GluCys(IAN) :  $\gamma$ -glutamyl,cystéinyl indole 3-acétonitrile, GSH(IAN) : glutathion indole 3-acétonitrile, GSTF6 : glutathion *S*-transférase F6 ; IAA : acide indole 3-acétique ; IAAld : indole 3-acétaldéhyde ; IAM : indole 3-acétamide ; IAN : indole 3-acétonitrile, (IAN)CysGly : cystéinyl glyciny indole 3-acétonitrile ; IAOx : indole 3-acétaldoxime ; ICA : indole 3-carbaldéhyde ; ICOOH : indole 3-carboxylate ; PCS1 : phytochélatine synthase.



L'IAOx est une molécule intermédiaire clé, commune à la biosynthèse de la camalexine, des indole glucosinolates et de l'auxine (Glawischnig et al., 2004). La conversion d'IAOx en acide indole 3-acétique (IAA), principale forme de l'auxine chez les plantes, pourrait se faire par l'intermédiaire indole 3-acétaldéhyde (IAAld) d'après Glawischnig et al. (2004). Il a été démontré que l'aldéhyde oxydase 1 d'Arabidopsis (AAO1) convertit l'IAAld en IAA (Seo et al., 1998). Cependant, l'implication de cette enzyme dans la voie de biosynthèse de l'auxine a récemment été réfutée par Mashiguchi et al. (2011). De plus, l'indole 3-acétamide (IAM) est un intermédiaire de la biosynthèse de l'IAA à partir d'IAOx (Sugawara et al., 2009).

D'autres dérivés indoliques ont également été détectés en plus de la camalexine et des indole glucosinolates après l'attaque d'un pathogène. L'indole 3-carbaldéhyde (ICA) et des dérivés d'indole 3-carboxylate (ICOOH) s'accumulent dans la feuille et la racine ainsi que dans l'exudat racinaire après l'infection de la plante par un micro-organisme pathogène (Bednarek et al., 2005; Hagemeyer et al., 2001; Tan et al., 2004). Ces composés seraient donc des précurseurs ou des produits de dégradation de la voie de biosynthèse de la camalexine. Cependant, l'origine de ces molécules n'a pas été élucidée.

CYP71A12 est également impliqué dans la production et/ou l'exsudation de la camalexine des racines d'Arabidopsis (Millet et al., 2010). Son expression est fortement induite en présence de molécules émises par les microbes et reconnus par la plante ("microbe-associated molecular patterns" en anglais ou MAMPS) comme le peptide flagellaire de bactérie Flg22. Les plantes transformées par une construction promoteur *CYP71A12::GUS* montrent que cette expression est surtout localisée au niveau de la zone d'élongation de la racine des jeunes plantules élicitées. La quantité de camalexine présente dans l'exsudat des racines élicitées des mutants *cyp71a12*, est significativement plus faible que celle présente dans l'exsudat des racines de plantes contrôles élicitées. Ceci est également observé chez les mutants *cyp71b15* et les mutants *cyp79b2* et *cyp79b3*. L'activité catalytique de CYP71A12, prédite comme étant la même que celle de CYP71A13 à raison de forte identité de séquence (89 %), n'a pas été validée sur une enzyme recombinante *in vitro*.



## B. Identification de cytochromes P450 microbiens

Une première stratégie employée pour identifier des enzymes oxygénant les composés volatils consiste à étudier la voie catabolique des micro-organismes qui sont capables d'utiliser les composés volatils comme source de carbone. Des monoterpénoïdes comme le citronellol, le camphre ou le limonène sont catabolisés en métabolites assimilables par des souches de *Pseudomonas* essentiellement (Trudgill, 1990). Le CYP101 de *Pseudomonas putida* (P450<sub>cam</sub>) catalyse la première étape de dégradation du camphre qui est l'introduction d'un groupe hydroxyle dans la molécule chimiquement inerte. Ce P450 a fait l'objet de nombreuses études et a été le premier P450 dont la structure a été résolue (Gunsalus and Wagner, 1978; Hasemann et al., 1995; Mueller et al., 1995; Poulos et al., 1995).

Une deuxième stratégie repose sur l'identification de souches microbiennes capables de dégrader en partie un composé volatil et d'accumuler le produit dérivé oxygéné. Les oxygénases impliquées dans le métabolisme propre au micro-organisme vont être capables de métaboliser le composé volatil xénobiotique. Par exemple, le P450 de *Xanthobacter* sp. C20 impliqué dans la minéralisation du cyclohexane, converti le D-limonène en (4*R*,8*R*)-limonène-8,9-époxyde (van der Werf et al., 2000). Ce dernier est le seul produit qui s'accumule dans le milieu lorsque la souche est cultivée en présence de cyclohexane comme unique source de carbone. La bioconversion microbienne des composés volatils a largement été étudiée ces dernières années et n'implique pas obligatoirement un P450.

Enfin, une dernière stratégie consiste à cribler l'activité enzymatique d'une collection de P450s provenant de l'annotation de différents génomes microbiens. 1105 séquences de P450s bactériens ont été recensées en 2011 et sont publiquement disponibles (Nelson, 2009). Girhard et al. (2009) ont, par exemple, sélectionné 125 P450s sur une collection de 250 P450s bactériens susceptibles de catalyser des réactions d'oxygénation sur des stéroïdes. Après co-expression de ces P450s avec la putidarédoxine réductase et la putidarédoxine de *Pseudomonas putida* dans *E. coli*, le criblage d'activités enzymatiques en présence de valencène a permis d'identifier un nouveau P450 bactérien (CYP109B1 de *Bacillus subtilis*) capable d'oxyder le valencène en nootkatone.

### C. Ingénierie des cytochromes P450

Une stratégie d'ingénierie protéique, consistant à construire un P450 métabolisant efficacement un substrat non naturel, peut être également envisagée pour fonctionnaliser une molécule hydrocarbonée. Ainsi, par mutagenèse aléatoire et/ou ciblée d'un P450, on peut modifier ses propriétés enzymatiques.

De nombreuses études ont porté sur le P450<sub>BM3</sub> (CYP102A1) issu de *Bacillus megaterium* car il présente l'avantage d'être fusionné à son partenaire rédox et car il a la plus forte activité enzymatique jamais mesurée pour un P450 :  $k_{cat}$  de 17 000 par minute avec l'acide arachidonique (Warman et al., 2005). De plus, les P450s bactériens ont l'avantage d'être soluble ce qui facilite les expériences de mutagenèse aléatoire.

Ces dernières consistent à induire des mutations au hasard pour modifier les propriétés enzymatiques du P450. Un criblage à haut débit de la collection de protéines obtenues permet de sélectionner l'activité enzymatique désirée. On parle également d'évolution dirigée pour désigner ces expériences. Ainsi, l'efficacité catalytique d'un triple mutant du cytochrome P450<sub>BM3</sub> (A74E/F87V/P386S) convertissant la  $\beta$ -ionone en un produit odorant (4-hydroxy- $\beta$ -ionone) a été augmentée de 80 fois par rapport à l'efficacité catalytique de la protéine non-mutée (Urlacher et al., 2006). L'utilisation d'une réaction en chaîne par polymérase permettant l'introduction d'erreurs de façon aléatoire ("error-prone PCR" en anglais) sur le mutant F87V a révélée l'importance de la proline en position 386 située sur la surface de la protéine et non pas dans le site actif.

La modification dirigée d'un P450 consiste à modifier ponctuellement son site actif à partir de l'étude de sa structure et de son mécanisme enzymatique. Une analyse *in silico* basée sur l'étude de la structure cristallographique de 29 P450s et 6379 séquences codant des P450s a mis en évidence l'importance de 2 acides aminés positionnés à proximité de l'hème interagissant potentiellement avec le substrat (Seifert and Pleiss, 2009). Dans le cas du P450<sub>BM3</sub>, ces 2 positions correspondent aux acides aminés F87 et A328. Une collection de mutants a été générée pour ces deux positions (24 mutants avec 5 acides aminés apolaires) et testée pour la métabolisation de 4 substrats terpéniques (géranylacétone, nérylacétone, (4R)-limonène, (+)-valencène). Onze d'entre eux ont montré un important changement ou une amélioration dans la régiospécificité ou la stéréospécificité vis-à-vis des terpènes testés (Seifert et al., 2009).

Sauf exceptions, la majorité des P450s bactériens naturels ont une faible efficacité catalytique identifiés dans la nature, et/ou une faible régiospécificité et/ou stéréosélectivité vis-à-vis des terpénoïdes, sans doute le plus souvent car il ne s'agit pas de leurs substrats naturels ou de substrats opportunistes. Une optimisation par ingénierie métabolique permet d'optimiser les propriétés catalytiques du P450. Les derniers résultats sont rassemblés dans la revue de Urlacher et Girhard (2012).

#### D. Production de composés volatils fonctionnalisés par ingénierie métabolique à l'aide de cytochromes P450

Une fois qu'un P450 biocatalyseur a été identifié et optimisé, la production de composés volatils fonctionnalisés peut se faire soit par ingénierie métabolique de plantes, soit par ingénierie métabolique de micro-organismes, soit encore par utilisation d'extraits enzymatiques ou de l'enzyme isolée.

Seulement 7% des études menées sur les biocatalyseurs sur une période de 10 ans, utilisent des enzymes isolées pour la production de métabolites (De Carvalho and Da Fonseca, 2006). Ce système a pourtant l'avantage de minimiser les coproduits pouvant être formés par la cellule-hôte et le taux de biotransformation obtenu est souvent meilleur (Schreier, 1997). Les principaux facteurs limitant son utilisation sont le coût nécessaire pour isoler l'enzyme, la faible stabilité de l'enzyme isolée et la nécessité d'utiliser un partenaire rédox et des cofacteurs onéreux (Chefson and Auclair, 2006). Différents procédés pour l'immobilisation, l'encapsulation, l'ancrage des P450 dans des nanodisques membranaires ont été proposés et parfois brevetés. Par exemple, le procédé convertissant la  $\beta$ -ionone utilise un mutant de P450<sub>BM-3</sub> de *Bacillus megaterium* immobilisé dans une matrice de type sol-gel qui permet d'améliorer la stabilité du P450 (Hauer et al., 2008). Le système de régénération du NADPH est assuré par une formate déhydrogénase NADP<sup>+</sup>-dépendante de *Pseudomonas putida* également immobilisée dans la matrice. Divers systèmes de réduction faisant intervenir des électrodes (Schneider and Clark, 2013) ou des complexes photosynthétiques (Jensen et al., 2012) ont aussi été proposés comme donneurs d'électrons. Mais pour le moment aucun procédé viable n'a été mis en œuvre. On notera que l'exploitation d'extrait brut de racines de chicorée pour la biotransformation de sesquiterpènes pouvant impliquer l'activité d'un cytochrome P450 est protégée par un brevet (Bouwmeester et al., 2007).

## 1. Plantes génétiquement modifiées

L'ingénierie métabolique de plantes permet soit une production de nouveaux composés volatils *in planta*, soit une amélioration de la production existante. L'expression hétérologue de 3 terpènes synthases de citron produisant du limonène, du  $\gamma$ -terpinène et du  $\beta$ -pinène ainsi qu'une limonène 3-hydroxylase de menthe verte chez le tabac ont permis l'émission de *trans*-isopipériténol et de ses dérivés qui sont le 1,3,8-*p*-menthatriène, 1,5,8-*p*-menthatriène, *p*-cymène et l'isopipériténone (Lücker et al., 2004). Il devient possible de modifier la composition de l'huile essentielle utilisée en parfumerie. Par exemple, la teneur en limonène a pu être augmentée de 2 à 80% dans l'huile essentielle de *Mentha x piperita*, en supprimant l'expression d'une limonène hydroxylase, sans modifier le rendement de l'huile obtenue (Mahmoud et al., 2004). D'autre part, la modification de la voie de biosynthèse des terpénoïdes qui s'accumulent dans les trichomes glandulaires de certaines plantes, permettrait d'obtenir des plantes transgéniques servant de véritable plateforme de production de terpènes fonctionnalisés (Lange et al., 2012).

On notera que la modification du métabolisme des terpénoïdes chez les plantes a parallèlement des applications agronomiques. Les plantes transgéniques obtenues peuvent potentiellement présenter une modification de leur profil odorant et gustatif ou une meilleure résistance aux pathogènes.

## 2. Micro-organismes génétiquement modifiés

Les micro-organismes sont particulièrement bien adaptés à des procédés de culture. La production de composés volatils en quantité commercialement exploitable par modification du métabolisme des micro-organismes serait un progrès en matière de biotechnologies. Jusqu'ici, la majorité des procédés étudiés ont des rendements de l'ordre du mg/L alors que le rendement théorique d'un procédé économiquement viable est estimé à 1 g/L (Gounaris, 2010). L'utilisation d'oxygénases appartenant à la famille des P450s dans un procédé industriel de bioconversion est également assez rare. Toutefois, la production d'environ 100 tonnes par an d'hydrocortisone, par hydroxylation du cortexolone par un P450 chez *Curvularia* sp. montre que cela peut-être possible et efficace (Petzoldt et al., 1982). Un certain nombre de facteurs récurrents limitent la faisabilité des procédés de bioconversion de

composés volatils fonctionnalisés (notamment les terpènes) par l'expression d'un P450 dans un micro-organisme.

a. *Facteurs limitants et solutions envisagées*

**(i)** L'expression du P450. L'expression fonctionnelle de P450s dans un micro-organisme peut s'avérer être un facteur limitant.

Elle dépend du micro-organisme utilisé. *E. coli*, *S. cerevisiae* et *Pseudomonas* sp sont les micro-organismes les plus étudiés pour exprimer un P450. Ils sont compatibles avec un procédé de culture industriel. Le criblage de différentes souches peut permettre une amélioration de l'expression du P450. Par exemple, l'expression fonctionnelle d'une cinnamate 4-hydroxylase de *Catharanthus roseus* fusionnée à une réductase a été possible uniquement dans la souche DS410 d'*E.coli* et pas dans les souches M15, DH5 $\alpha$  et JM109 pourtant capables d'exprimer correctement d'autres P450s (Hotze et al., 1995). L'utilisation de la souche DH1 d'*E. coli* plutôt que la souche DH10B a permis d'augmenter d'un facteur 1000 l'oxydation de l'amorphadiène en acide artémisinique par CYP71AV1 de l'armoise annuelle (Chang et al., 2007).

Chez *E. coli*, dont le génome ne contient pas de gène codant pour un P450, la protéine est tronquée dans sa partie N-terminale pour favoriser sa solubilité dans le cytosol et une optimisation des codons pour l'expression bactérienne est souvent effectuée. C'est le cas pour CYP71AV1 issu de l'armoise annuelle et exprimé dans la bactérie *E. coli* où aucune activité ne pouvait être détectée auparavant (Chang et al., 2007).

L'expression du P450 dépend également du vecteur d'expression utilisé et du contexte de l'initiation de la traduction. Le simple changement de vecteur d'expression de CYP71AV1 chez *E. coli* par exemple (pETDUET-1 remplacé par pCWori), a permis d'améliorer l'expression de l'enzyme ainsi que la production d'acide artémisinique, alors que seuls l'alcool et l'aldéhyde correspondants étaient détectés auparavant (Chang et al., 2007).

**(ii)** L'expression d'une réductase associée au cytochrome P450. La régénération du cofacteur enzymatique (le NADPH pour la majorité des P450s), peut se faire par le métabolisme de la cellule hôte. Cependant, l'expression du système de transfert d'électron associé au P450 dans le micro-organisme améliore l'efficacité catalytique du P450. Ainsi, l'expression de la putidarédoxine et de la putidarédoxine réductase a permis d'augmenter de 25 fois l'efficacité catalytique de P450<sub>cam</sub> dans *E. coli* (Mouri et al., 2006). La réductase d'*Arabidopsis thaliana*

est le plus souvent co-exprimée avec un P450 de plante pour obtenir une bonne activité enzymatique dans la levure (Pompon et al., 1996; Urban et al., 1997). L'activité enzymatique de CYP71AV1 issu de l'armoise annuelle a pu être augmentée d'un facteur 12 en remplaçant la réductase d'*A. thaliana* par la réductase de l'armoise annuelle (Chang et al., 2007).

**(iii)** Formation de multiples coproduits. De multiples coproduits non désirés peuvent se former si le P450 a une faible régiospécificité et une faible stéréosélectivité. Ils peuvent également se former à partir du métabolisme de la souche hôte. Comme il a été précédemment mentionné, l'ingénierie métabolique du P450 peut permettre une amélioration de la sélectivité (partie Chapitre 1:III.C, page 33). Il arrive également que le P450 métabolise le premier produit formé (Girhard et al., 2009; Sowden et al., 2005). Girhard et al. ont limité ce phénomène en utilisant un procédé dit "biphasique" avec une phase aqueuse constituée du milieu de culture (90 %) et une phase organique constituée d'un solvant organique (10 % de dodécane). La phase organique agit alors comme un réservoir accumulant les produits formés et les protégeant d'une suroxydation par le P450. La sélection du solvant aux propriétés physico-chimiques adéquates et biocompatible avec la souche microbienne utilisée peut être une étape compliquée (Leon et al., 1998).

**(iv)** La solubilité et la volatilité du substrat et/ou des produits. Les composés volatils ont, par définition, une faible solubilité en milieu aqueux et une forte volatilité. Le substrat et les produits ont ainsi l'avantage de diffuser librement à travers les membranes du micro-organisme biocatalyseur. En revanche, ils forment une deuxième phase lorsqu'ils sont à fortes concentrations dans le milieu de culture aqueux. Le substrat devient alors moins disponible pour le cytochrome P450. Une première solution consiste à utiliser un agent surfactant comme le tween pour augmenter leurs solubilités. Les cyclodextrines sont également très utilisées comme agents solubilisants de molécules pharmaceutiques, alimentaires ou aromatiques (Astray et al., 2009; Brewster and Loftsson, 2007). Ce sont des oligomères cycliques creux, capables de former un complexe d'inclusion non-covalent avec des molécules hydrophobes de taille et de géométrie appropriées. Les  $\beta$ -cyclodextrines forment des complexes d'inclusions stables avec les mono- et sesquiterpènes (Szente and Szejtli, 1988). Enfin, une autre solution consiste à introduire le substrat dans une phase organique où il est soluble. La phase organique des procédés biphasiques présente l'avantage de solubiliser le substrat et de piéger les produits volatils après leurs formations.

(v) La cytotoxicité du substrat et/ou des produits. Comme il a été mentionné précédemment, les composés volatils peuvent avoir un rôle de défense pour la plante et présenter des propriétés antimicrobiennes (partie Chapitre 1:I.B.3, page 12). Ces propriétés antimicrobiennes sont largement dues à leur impact sur les membranes. Tels des solvants organiques, les hydrocarbures oléfiniques, dont les mono- et les sesquiterpènes, se dissolvent dans les membranes, les perméabilisent et perturbent leur intégrité (Heipieper et al., 1994; Knobloch et al., 1986; Sikkema et al., 1994, 1995). Afin d'y remédier, le substrat peut être ajouté après la phase de croissance du micro-organisme de manière continue à une concentration tolérée. Les produits peuvent être retirés au cours de leurs formations dans une phase non miscible au milieu de culture aqueux, cette phase pouvant être liquide ou solide. De cette manière, les procédés biphasiques diminuent la toxicité du substrat et des produits. Jusqu'à 2,3 g/L d'alcool périllique ont été obtenus au cours de la bioconversion du limonène par un P450 de *Mycobacterium* sp. exprimé dans *Pseudomonas putida*, grâce à un procédé biphasique où le milieu réactionnel est constitué de 30 % de bis(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP) (Van Beilen et al., 2005). Van der Werf et al. (2000), n'ont cependant pas réussi à trouver un solvant permettant de limiter la toxicité du produit formé (limonène-8,9-époxyde) sans affecter l'activité de limonène hydroxylase de la souche *Xanthobacter*. Le recours à des souches tolérant les hydrocarbures peut alors être une solution. Certaines souches "solvant-tolérantes" identifiées peuvent supporter jusqu'à 50 % (v/v) d'hydrocarbures (Inoue and Horikoshi, 1989).

*b. Exemple d'un procédé de production d'un composé volatil fonctionnalisé par un P450 de plante exprimé dans un micro-organisme*

La découverte de P450s de plantes oxydant les composés volatils hydrocarbures permet d'envisager la production de composés volatils fonctionnalisés par ingénierie métabolique de micro-organismes. Plusieurs brevets protègent l'exploitation des P450s découverts pour cette application (Tableau 1). Cependant, les quantités obtenues restent encore de l'ordre du mg/L.

Une exception est l'utilisation de l'enzyme native CYP71AV1 oxydant l'amorphadiène, pour obtenir un précurseur de la synthèse de l'artémisinine, agent anti-malarial. De gros moyens et de nombreux efforts de recherche ont permis de produire 2,5 g/L d'acide artémisinique dans *S. cerevisiae* (Lenihan et al., 2008).

Une première étape d'ingénierie métabolique de la levure *S. cerevisiae* a permis d'obtenir 100 mg/L d'acide artémisinique (Ro et al., 2006b). Cela correspond à une productivité volumétrique de 0,026 g/L/jour (Lenihan et al., 2008) en condition de fermentation en bioréacteur d'un litre après 5 jours. Dans un volume de culture de 25 mL, la productivité volumétrique est égale à 0,006 g/L/jour.

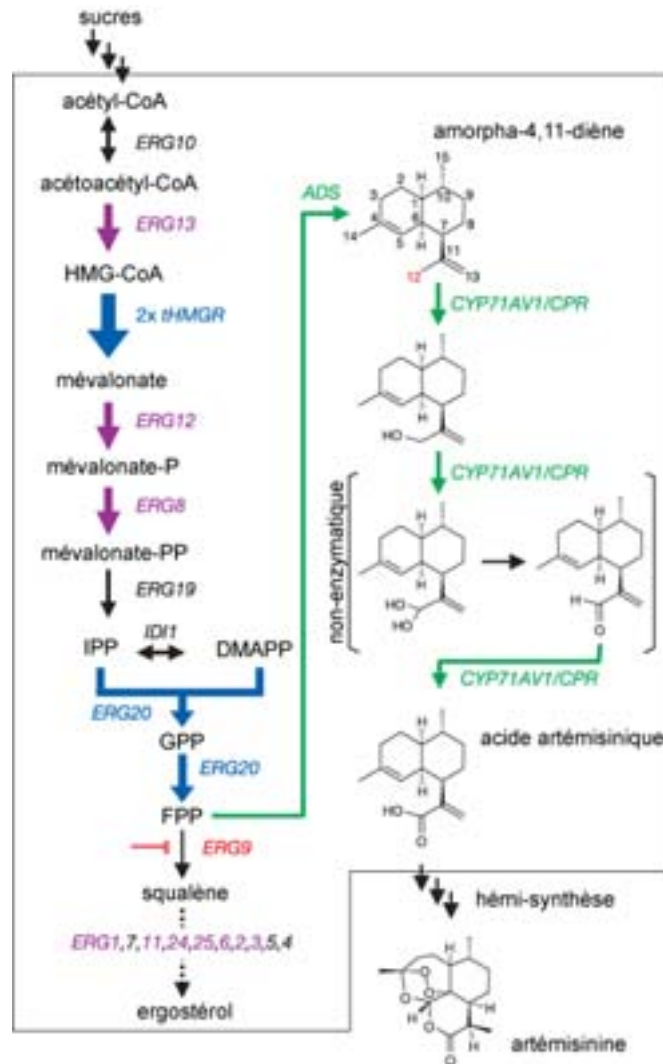


Figure 10 : Schéma de la voie de biosynthèse de l'acide artémisinique reconstituée chez *S. cerevisiae* EPY224 exprimant ADS, CYP71AV1 et AaCPR d'après Ro et al. (2006b)

Les flèches bleues correspondent aux réactions impliquant un gène directement surexprimé. Les flèches violettes correspondent aux réactions indirectement amplifiées par la surexpression de l'allèle mutant *upc2-1*. La ligne rouge représente la répression du gène *ERG9*. Les flèches vertes indiquent les réactions catalysées par des enzymes de l'armoise annuelle introduites dans la souche EPY224. IPP : diphosphate d'isopentényle ; DMAPP : diphosphate de diméthylallyle ; FPP : diphosphate de farnésyle ; HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A.



Pour ce faire, la production intracellulaire de FPP a été augmentée. Les gènes impliqués en amont et responsables de sa biosynthèse ont été surexprimés (Figure 10). L'utilisation du FPP en aval pour la biosynthèse de stérols a été diminuée en supprimant l'expression de la squalène synthase (Erg9). La surexpression de l'allèle mutant *upc2-1*, améliore l'activité du facteur de transcription Upc2, responsable de l'amplification globale de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (flèches violettes sur la Figure 10) (Vik and Rine, 2001). La HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase), enzyme clé de la régulation de la voie de biosynthèse du mévalonate, a été surexprimée sous une forme soluble et une deuxième copie du gène correspondant a été introduite. De plus, l'expression de la FPP synthase (Erg20) a aussi été directement amplifiée.

Enfin, les 3 gènes provenant de l'armoise annuelle et codant pour l'amorphadiène synthase (ADS), l'amorphadiène oxydase (CYP71AV1) et sa P450 réductase associée (AaCPR) ont été introduits afin de convertir le FPP produit en acide artémisinique. L'ADS est responsable de la formation de l'amorphadiène à partir de FPP. Les 3 étapes d'oxydation de l'amorphadiène en alcool, en aldéhyde, puis en acide artémisinique sont catalysées par CYP71AV1 et AaCPR.

Dans une seconde étape, l'optimisation d'un procédé semi-continu en bioréacteur a permis d'améliorer de 25 fois le rendement en acide artémisinique avec une production atteignant 2,5 g/L en 5 jours (Lenihan et al., 2008). La productivité volumétrique a été augmentée de 17 fois en étant égale à 0,43 g/L/jour.

Dans ces expériences, la souche Y51, auxotrophe pour la lysine et l'uracile et dérivée de la souche EPY224 (*ura-*), a été utilisée. Les plasmides pRS425ADS et pESCURA::*AaCPR/CYP71AV1* ont été remplacés par le plasmide pAM179 exprimant les 3 gènes de l'armoise annuelle ADS, CYP71AV1 et AaCPR. Un rendement et une productivité volumétrique inférieure ont été obtenus avec cette souche dans un volume de culture de 50 mL : 76 mg/L et 0,013 g/L/jour.

Un premier rendement de 1,3 g/L d'acide artémisinique est obtenu dans un procédé semi-continu utilisant un milieu de culture (pH 5, tampon succinate à 50 mM et 20 g/L de galactose) adapté au procédé de fermentation en bioréacteur. L'unique source de carbone utilisée est le galactose ajouté continuellement dans le milieu pour permettre, d'une part, la croissance cellulaire et, d'autre part, l'induction simultanée des gènes provenant de l'armoise annuelle et autorisant la production d'acide artémisinique. *ERG9* étant sous le contrôle du

promoteur *Pmet3* dans cette souche, la méthionine réprime la biosynthèse des stérols et, en conséquence, permet une meilleure accumulation du précurseur FPP. L'ajout de méthionine fait augmenter le rendement à 1,8 g/L. Il a été observé que la consommation du galactose était variable pendant le procédé. Cela pourrait être dû à la réduction de la biosynthèse des stérols qui pourrait affecter la croissance et par conséquent, la consommation en galactose. Afin de réguler et de maintenir cette dernière relativement constante et basse, un algorithme basé sur les statistiques des quantités d'oxygène dissoutes dans le milieu a été développé. Il a permis de contrôler à la fois la quantité de galactose à ajouter au milieu et l'agitation du milieu. Le procédé de fermentation ainsi développé a permis d'atteindre le rendement de 2,5 g/L d'acide artémisinique. On notera que la croissance cellulaire était meilleure lorsque le glucose a été utilisé plutôt que le galactose. Cependant, l'utilisation du glucose suivie du galactose dans un procédé à deux sources de carbones, n'a pas permis d'augmenter la production en acide artémisinique.

Alors que l'optimisation du procédé de production de l'acide artémisinique permet d'atteindre au maximum 2,5 g/L, Westfall et al. (2012) ont pu produire plus de 40 g/L d'amorphadiène, le sesquiterpène correspondant non fonctionnalisé. Il a été montré que la synthèse ou l'accumulation de la forme fonctionnalisée était responsable d'une diminution de la stabilité du plasmide et d'une induction des gènes de résistance de la levure par rapport à la synthèse uniquement de la forme non fonctionnalisée (Ro et al., 2008). En effet, la souche de levure synthétisant seulement l'amorphadiène maintient le plasmide portant les gènes de l'armoise annuelle dans plus de 80 % des cellules alors que la souche de levure synthétisant l'acide artémisinique maintient le plasmide dans moins de 60 % des cellules. La stabilité du plasmide est restaurée lorsque *CYP71AV1* est ponctuellement muté. L'expression massive de gènes de résistance pléiotropique aux drogues (gènes PDR) appartenant à la famille des transporteurs ABC (en anglais : ATP-Binding Cassette Transporters) est induite chez la souche produisant l'acide artémisinique par rapport à la souche produisant l'amorphadiène. Une analyse globale du transcriptome a démontré que la modification transcriptomique associée à la production d'acide artémisinique était la réponse cellulaire à un stress oxydatif et osmotique.

Westfall et al. (2012) se sont donc tournés vers un procédé d'hémi-synthèse à partir du précurseur oléfine au lieu du terpène fonctionnalisé.

En conclusion, un sesquiterpène fonctionnalisé a été produit à des concentrations de l'ordre du gramme par litre à partir de l'ingénierie métabolique de *S. cerevisiae* exprimant les gènes responsables de sa biosynthèse *in planta* (terpène synthase, P450 oxydase et P450 réductase). Cette souche présente l'avantage d'obtenir un procédé indépendant de tout substrat et de constituer une véritable plateforme de production de divers composés issus de la voie métabolique des terpénoïdes. L'optimisation du procédé de fermentation a considérablement augmenté le rendement de production. Cependant, le stress oxydatif et/ou la toxicité du terpène fonctionnalisé envers la levure limite la production de plus grande quantité. Cet exemple illustre la difficulté à produire efficacement un terpène fonctionnalisé.

#### IV. Objectifs de la thèse : production de composés volatils fonctionnalisés par bioconversion avec la levure exprimant un P450 de plante

##### A. Objectifs de la thèse

Cette thèse, réalisée dans le cadre d'une convention CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la REcherche), en partenariat avec un industriel du domaine des arômes et du parfum (V. MANE Fils), a été définie en 2 objectifs successifs :

- Identifier des P450s de plantes capables d'oxygéner des composés volatils hydrocarbonés appartenant principalement aux familles des mono- et sesquiterpènes. Le cas de molécules appartenant à la famille des phénylpropanoïdes sera également envisagé.
- Produire des composés volatils fonctionnalisés aux propriétés organoleptiques connus pouvant être labellisés naturels, et/ou produire des composés volatils fonctionnalisés aux nouvelles propriétés organoleptiques inconnues jusqu'ici.

B. La voie métabolique des mono- et sesquiterpènes chez *Arabidopsis thaliana*

L'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) possède une collection de P450s provenant essentiellement d'*Arabidopsis thaliana*. La voie de biosynthèse des terpènes chez cette plante modèle suscite un récent intérêt car il a longtemps été considéré qu'elle ne produisait pas de terpénoïdes volatils. Leur émission n'a été recherchée qu'après le séquençage de son génome qui a révélé la présence de 40 gènes de terpènes synthases dont 8 pseudogènes (Aubourg et al., 2002).

Des composés volatils ont ainsi été détectée à partir des fleurs et des racines de la plante (Chen et al., 2003; Steeghs et al., 2004). Un mélange complexe de molécules est émis par les inflorescences qui contient plus de 20 sesquiterpènes différents (Rohloff and Bones, 2005), tandis que des terpènes comme le 1,8-cinéol sont spécifiquement présents dans la racine (Steeghs et al., 2004). Des mono- et sesquiterpènes oxygénés ont également été détectés comme l'aldéhyde de lilas, le *p*-cymèn-8-ol, l' $\alpha$ -terpinéol, la verbénone et le longibornéol (Chen et al., 2004; Rohloff and Bones, 2005).

*A. thaliana* étant essentiellement autogame (cela n'est peut-être pas toujours vrai en conditions naturelles), sa production de composés volatils auraient probablement un rôle plus important dans l'interaction de la plante avec les pathogènes ou les insectes ravageurs et les organismes bénéfiques que dans l'attraction d'insectes pollinisateurs. Ceci a été confirmé récemment par le rôle antibactérien *in planta* du (*E*)- $\beta$ -caryophyllène, majoritairement émis par les inflorescences d'*A. thaliana* (Huang et al., 2012). De plus, les feuilles produisent des mono- et sesquiterpènes en réponse à un stress biotique comme une attaque par des herbivores (Huang et al., 2010; Snoeren et al., 2010; Van Poecke et al., 2001).

Alors que 7 monoterpènes synthases et 4 sesquiterpènes synthases ont été caractérisées (Bohlmann and J., 2000; Chen et al., 2004; Chen et al., 2003; Huang et al., 2010; Ro et al., 2006b; Tholl et al., 2005; Tholl and Lee, 2011), seulement 1 P450 impliqué dans la biosynthèse des composés volatils a été identifié jusqu'ici. CYP82G1 est une homoterpène synthase exprimée de façon constitutive dans la tige et l'inflorescence (Lee et al., 2010). Son expression est fortement induite dans la feuille par l'attaque d'herbivores et permet la synthèse de TMTT ((*E,E*)-4,8,12-triméthyltridéca-1,3,7,11-tétraène) et de DMNT ((*E*)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène) responsables de l'attraction d'insectes parasites d'herbivores. De récentes investigations permettent de prédire une fonction pour un certains nombre d'entre

eux (Ehltng et al., 2008). Par exemple, *CYP71A19* est co-localisé, et son expression est co-régulée, avec le gène *At4g13280*, exprimant une sesquiterpène synthase, ce qui laisse suggérer que *CYP71A19* est impliqué dans le métabolisme de dérivés sesquiterpénoïdes (Ro et al., 2006a).

Une stratégie basée sur une analyse *in silico* de l'expression de gènes d'*A. thaliana* a été choisie pour sélectionner les P450s candidats potentiellement capables de métaboliser des mono- ou sesquiterpènes parmi la collection disponible à l'IBMP. La liste sera complétée par des P450s provenant d'autres sources végétales qui seront sélectionnés *in silico*, par homologie de séquences protéiques. Les séquences codantes de ces derniers seront synthétisées.

### C. Production de composés volatils fonctionnalisés

Le laboratoire de recherche en biotechnologie de V. MANE Fils met au point des procédés de fermentation afin de produire une large gamme de produits naturels. Il a à sa disposition un certain nombre de composés volatils hydrocarbonés naturels peu onéreux, obtenus par extraction de plantes, qui peuvent servir de précurseurs pour la biosynthèse de composés volatils fonctionnalisés à haute valeur ajoutée. L'IBMP dispose d'une souche *Saccharomyces cerevisiae* optimisée pour l'expression de P450. Un procédé de bioconversion de la levure surexprimant un P450 de plantes capable d'oxyder un composé volatil hydrocarbure sera mis au point pour produire un composé volatil fonctionnalisé aux propriétés organoleptiques valorisables.

### D. Les différentes étapes du projet

Pour mener à bien ces objectifs, plusieurs étapes ont été définies :

- Sélectionner des composés volatils à fonctionnaliser et des cytochromes P450 candidats susceptibles de les métaboliser.
- Exprimer les enzymes dans une souche de levure optimisée à cet effet et réaliser un criblage fonctionnel.
- Identifier les produits formés et déterminer les paramètres catalytiques de la réaction.

- Produire les molécules fonctionnalisées par bioconversion et évaluer leurs propriétés organoleptiques.

Dans un premier temps, les résultats du criblage par essai enzymatique *in vitro* et *in vivo* seront décrits et discutés (Chapitre 3:). Dans un second temps, l'étude plus détaillée du cas de l'activité enzymatique la plus intéressante est présentée sous forme d'un article soumis à publication (Chapitre 4:). Enfin, l'activité de monoterpène oxydase d'un P450 déjà caractérisé comme étant impliqué dans une voie métabolique totalement différente, nous amène, dans un troisième temps, à nous intéresser à la double fonction physiologique de ce P450 et aux mécanismes évolutifs ayant conduit à cette double fonction (Chapitre 5:).



## **Chapitre II**

# **Matériel et Méthodes**





## Chapitre 2: Matériel et Méthodes

### I. Matériel

#### A. Substrats et standards

Les monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et phénylpropanoïdes utilisés comme substrats enzymatiques proviennent de V. MANE Fils (Le Bar-sur-Loup, France), excepté le (+/-)-lavandulol qui a été fourni par Extrasynthese (Genay, France). V. MANE Fils a obtenu ces molécules par distillation d'huile essentielle de plantes.

Les standards de nootkatone et de frambinone ont été synthétisés par V. MANE Fils. L'aldéhyde de périllyle nous a été gracieusement donné par Nippon Terpene Chemicals (Tokyo, Japon). L'alcool de périllyle provient de Sigma-Aldrich.

Les standards des molécules impliquées dans la voie de biosynthèse de la camalexine et de l'auxine proviennent de l'équipe du Dr Erich Glawischnig (Université Technique de Munich, Allemagne) : l'indole 3-acétaldoxime (IAOx), l'indole 3-acétaldéhyde (IAAld) et l'indole 3-acétonitrile (IAN). L'IAOx a été synthétisé à partir de l'IAAld comme précédemment décrit (Rausch et al., 1985).

#### B. Séquences nucléiques des cytochromes P450

Les P450s sélectionnés pour le criblage d'activités enzymatiques avec les substrats terpéniques sont listés dans le Tableau 2. Une partie des gènes correspondants a été précédemment clonés et sont disponibles au laboratoire de l'IBMP. Leurs séquences nucléiques sont accessibles sur les bases de données "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) ou "GenBank Nucleotide Databases" ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Les autres séquences nucléiques ont été synthétisées par GeneCust Europe (Dudelange, Luxembourg) après optimisation pour l'expression dans la levure et sont répertoriées en annexe (page 229).

Nom P450	Plante source	Code (AGI ou NCBI ou phytozome)	Isolement	Auteur de l'isolement	Vecteur d'expression
CYP71A12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g30750	Clonage	R. Larbat	pYeDP60u
CYP71A13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g30770	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71A14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g24960	Synthèse	MANE	pYeDP60u2
CYP71A15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g24950	Synthèse	MANE	pYeDP60u2
CYP71A16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g42590	Synthèse	MANE	pYeDP60u2
CYP71A18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g11610	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71A19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g13290	Synthèse	MANE	pYeDP60u2
CYP71A20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g13310	Synthèse	MANE	pYeDP60u2
CYP71A24	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g48290	Clonage	R. Larbat	<a href="#">pYeDP60u2</a>
ThhCYP71A27	<i>Thellungiella halophila</i>	Thhalvoo24976m	Synthèse	MANE	pYeDP60u2
CYP71B6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g24180	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g25180	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g26830	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g26170	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B22	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g26200	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B23	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g26210	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B24	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g26230	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g26290	Clonage	R. Larbat	pYeDP60
CYP71B31	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g53300	Clonage	J.-F. Ginglinger	pYeDP60u2
CYP71D1	<i>Catharanthus roseus</i>	EU541505	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71D4	<i>Solanum tuberosum</i>	AJ296346	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71D14	<i>Petunia x hybrida</i>	AB028462	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71D48v1	<i>Nicotiana tabacum</i>	DQ350338	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71D51v2	<i>Nicotiana tabacum</i>	DQ350345	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71D98	<i>Ammi majus</i>	EF127865	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71D177	<i>Scoparia dulcis</i>	GU205276	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71D326	<i>Ricinus communis</i>	XM_002522675	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71AS4v2	<i>Vitis vinifera</i>	AM439953	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71AU4	<i>Vitis vinifera</i>	XM_002276776	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71BE5	<i>Vitis vinifera</i>	XM_002264111	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP71BC1	<i>Vitis vinifera</i>	XM_002279236	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP73A1	<i>Helianthus tuberosus</i>	Z17369	Clonage	Teutsch et al., 1993	pYeDP60
CYP73A85	<i>Nicotiana tabacum</i>	AB236952	Clonage	Galis et al., unpublished	pYeDP60
CYP73A27	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF368378	Clonage	Ralston et al., 2001	pYeDP60
CYP76C1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g45560	Clonage	S. Grec	pYeDP60
CYP76C2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g45570	Clonage	S. Grec	pYeDP60
CYP76C3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g45580	Clonage	S. Grec	pYeDP60u2
CYP76C4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g45550	Clonage	S. Grec	pYeDP60u2
CYP76C5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g33730	Clonage	S. Grec	pYeDP60
CYP76C6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g33720	Clonage	S. Grec	pYeDP60u2
CYP76C7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g61040	Clonage	S. Grec	pYeDP60
CYP76G1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g52970	Clonage	S. Grec	pYeDP60
CYP76B1	<i>Helianthus tuberosus</i>	Y09920	Clonage	Robineau et al., 1998	pYeDP60
CYP76B6	<i>Catharanthus roseus</i>	AJ251269	Clonage	Collu et al., 2001	pYeDP60u2
CYP706A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g22690	Clonage	IBMP	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP706A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g22710	Clonage	IBMP	<a href="#">pYeDP60u2</a>
CYP706A3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g44620	Clonage	S. Mathieu	pYeDP60u2
CYP706A7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g12330	Synthèse	MANE	<a href="#">pYeDP60u2</a>

**Tableau 2 (ci-contre) : Liste des P450s sélectionnés pour le criblage d'activités enzymatiques avec une série de monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et phénylpropanoïdes**

Les P450s proviennent de différentes plantes. Leurs séquences nucléiques ont été synthétisées ou isolées par clonage puis exprimées dans le vecteur d'expression pYeDP60 ou pYeDP60u2. Elles sont disponibles sur la base de données NCBI ou GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ou celle de phytozome ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)) pour la séquence nucléique de *ThhCYP71A27*. En bleu, j'ai réalisé le sous-clonage des séquences P450s correspondantes dans le vecteur pYeDP60u2.

C. Vecteur d'expression pYeDP60 et pYeDP60u2

Le vecteur répliatif pYeDP60u2 (Höfer et al., manuscrit en préparation) a été utilisé pour exprimer dans la levure les séquences nucléotidiques synthétisées ainsi que celles qui ont été précédemment clonées à l'IBMP dans un vecteur différent du vecteur pYeDP60 (Figure 11). Cette série de plasmides, initialement décrite par Pompon et al. (1996), est dotée d'une origine de répliation  $2\mu$  de levure, d'un polylinker *Bam*HI/*Sma*I/*Kpn*I/*Sac*I/*Eco*RI encadré en amont par un promoteur *GAL10-CYC1* inductible par le galactose et réprimé par le glucose, et en aval par un terminateur *PGK*. Une origine de répliation *E. coli* et un gène de résistance à l'ampicilline autorisent les sous-clonages et deux gènes *URA3* et *ADE2* permettent la complémentation pour l'auxotrophie à l'uracile et à l'adénine. Ce sont des plasmides très stables dans des milieux riches et à de fortes densités cellulaires. Ils ont été conçus spécialement pour l'expression de P450s dans une série de souches de *Saccharomyces cerevisiae*, dont la souche WAT11 décrite ci-après.

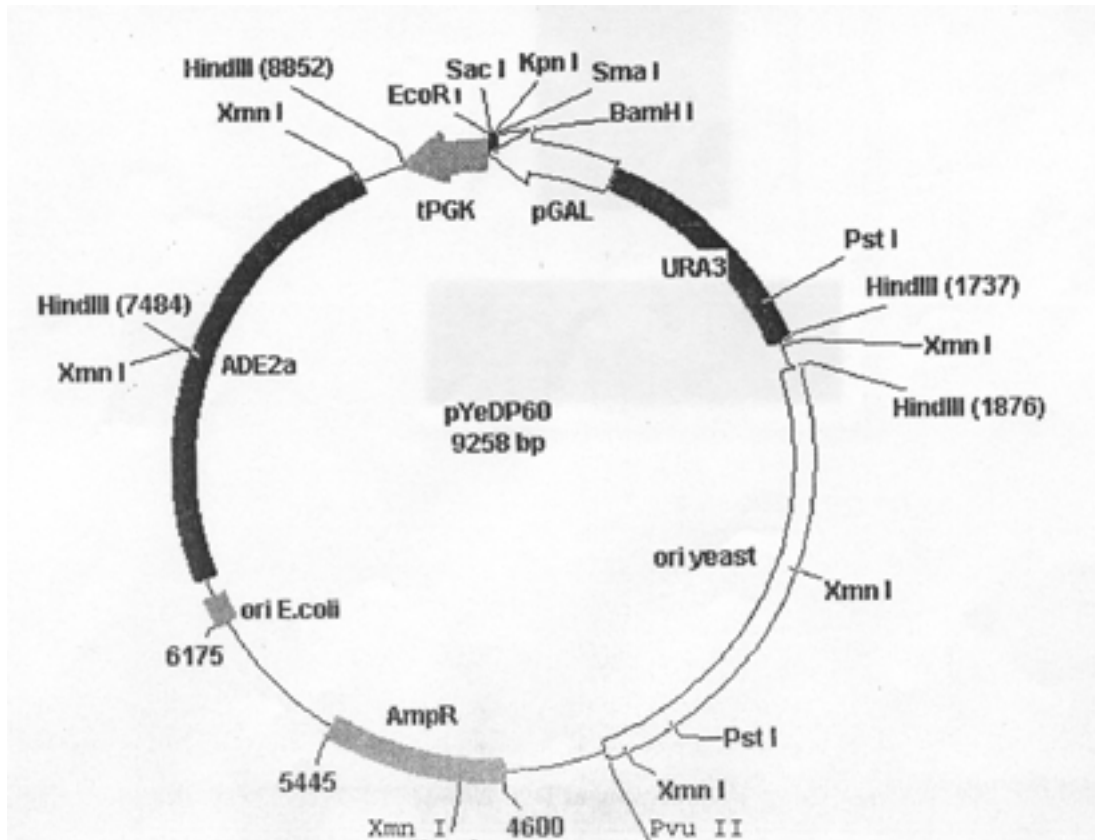


Figure 11 : Schéma du vecteur d'expression dans la levure pYeDP60 d'après Pompon et al. (1996)

Les différents sites de restrictions sont indiqués ainsi que la position en paire de base. ori E.coli : origine de répllication bactérienne ; ori yeast : origine de répllication dans la levure ; pGAL : promoteur *GAL10-CYC1* ; tPGK : terminateur *PGK* ; ADE2a : marqueur de sélection pour l'auxotrophie à l'adénine ; URA3 : marqueur de sélection pour l'auxotrophie à l'uracile ; AmpR : marqueur de sélection à l'ampicilline.

Le vecteur pYeDP60u2 contient en plus une cassette autorisant un clonage de type USER.

#### D. Souche bactérienne et souche de levure

##### 1. Souche bactérienne *E. coli*

La bactérie *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) a été utilisée pour le sous-clonage et la propagation de plasmide.

## 2. Souche de levure *S. cerevisiae*

La souche *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 a été construite par Pompon et al. (1996) pour l'expression spécifique de P450s de plantes. Elle dérive de la souche W303-1B et exprime la P450 réductase ATR1 d'*A. thaliana* à la place de la réductase endogène à la levure (Urban et al., 1997). *ATR1* est sous le contrôle du promoteur *GAL10-CYC1* réprimé par le glucose et induit par le galactose. Lorsque cette souche est transformée avec le plasmide pYeDP60 ou pYeDP60u2, l'expression d'ATR1 et du P450 peut être induite par le galactose. La souche WAT11 exprime aussi le cytochrome *b5* endogène à la levure, qui peut participer à l'activité du P450.

### E. Plantes

*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia (Col-0) a été utilisée pour étudier l'expression de *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* dans les différents organes de la plante ainsi que l'émission des composés volatils par les inflorescences.

Les mutants d'insertion pour ces 3 gènes ont également été étudiés. Les mutants *cyp71a12* et *cyp71a13* proviennent de l'équipe du Dr Yves Millet (Harvard Medical School à Boston, Etats-Unis) et sont les lignées suivantes : GABI-KAT 127HO3 et SALK 105136, respectivement. L'ADN de transfert (ADN-T) est inséré au niveau du deuxième et du troisième exon (sens 5' vers 3'), respectivement. Les mutants *cyp71a18* de lignée WiscDsLox297300\_18A proviennent du Centre de Ressource Biologique d'*Arabidopsis* (ABCR, Université de l'Etat d'Ohio, Etats-Unis) où l'ADN-T est inséré au niveau du deuxième exon.

## II. Tampons et Milieux de culture

### A. Tampons

#### Tampon phosphate PBS (Phosphate Buffered Saline)

Ce tampon est utilisé essentiellement pour l'essai enzymatique à partir des microsomes de levure exprimant le P450. Les solutions-stock de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 0,5 M sont préparées par dissolution de 14,2 g et 12 g, respectivement, dans 200 mL d'eau distillée. La

solution de phosphate disodique est versée dans la solution de phosphate de monosodium jusqu'à ce que le pH soit égal à 7.4. La solution de PBS est alors diluée à 20 mM.

#### Tampon TEK (pour 1 L)

Ce tampon est utilisé pour laver les levures avant l'extraction de microsomes. Il contient du Tris-HCl à 50 mM pH 7.5 (soit 25 mL de Tris-HCl 2 M pH 7.5), de l'EDTA à 1 mM (2 mL d'EDTA à 0,5 M) et du KCl à 100 mM (soit 7,4 g). Le tampon est complété à 1 L avec de l'eau distillée.

#### Tampon TES (pour 1 L)

C'est un tampon d'extraction utilisé pour la préparation de microsomes. Il contient du Tris-HCl à 50 mM pH 7.5 (25 mL de Tris-HCl à 2 M pH 7.5), EDTA à 1 mM (2 mL d'EDTA à 0,5 M) et du sorbitol à 600 mM (soit 109 g). Le tampon est complété à 1 L avec de l'eau distillée.

#### Tampon TG (pour 100 mL)

C'est un tampon de reprise finale des microsomes et de leur stockage à -20 °C. Il contient du Tris-HCl à 50 mM pH 7.5 (2,5 mL de Tris-HCl à 2 M pH 7.5) et du glycérol à 30 % (soit 30 mL). Le tampon est complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

#### Tampon citrate phosphate 0,5 M pH 7.0

Ce tampon est utilisé dans la réaction de bioconversion des terpènes par la levure entière dans un volume de 1 mL. Une solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 0,5 M est préparée par dissolution de 35,5 g dans 500 mL d'eau distillée en chauffant 1 min au micro-onde à pleine puissance. Une solution d'acide citrique à 0,5 M est parallèlement préparée par dissolution de 10,5 g dans 50 mL d'eau distillée. La solution d'acide citrique est versée dans la solution de phosphate disodique jusqu'à ce que le pH soit égal à 7.0. La solution est ensuite autoclavée à 1 bar pendant 15 minutes.

#### Tampon TrisHCl pH 7-8.5 à 1 M

Une solution HCl à 12 N est versée dans une solution de Tris à 1 M jusqu'au pH désiré.

### Tampon d'extraction d'ADN génomique (pour 100 mL)

Ce tampon est utilisé pour extraire l'ADN génomique d'une feuille afin de réaliser le génotypage des mutants d'insertion d'Arabidopsis. Il est constitué de 20 mL de tampon TrisHCl à 1 M pH 8, 5 mL d'EDTA à 0,5 M, 5 mL de NaCl à 5 M et 5 mL de SDS à 10 %. Le tampon est complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

### Tampon d'élution

C'est un tampon de reprise de l'ADN génomique ou plasmidique. Il est constitué de TrisHCl à 5 mM pH 8.5.

## B. Milieux de culture

### Milieu de culture pour bactérie LB (Luria-Bertani)

Ce milieu est utilisé pour la culture d'*E. coli*. 20 g de milieu LB Broth (Lennox) ou de milieu LB Agar (Lennox) dans le cas d'un milieu solide, sont dissous dans 1 L d'eau distillée. Le milieu est ensuite autoclavé à 1 bar pendant 15 minutes.

### Milieu de culture pour levure (pour 1 L)

Quatre milieux sont utilisés pour la culture de la souche de levure WAT11 (tableau ci-dessous). Le milieu YPGA est un milieu complété en adénine, utilisé pour la croissance des souches de levures non transformées. L'introduction dans les levures du plasmide pYeDP60 ou pYeDP60u2 rend la souche prototrophe pour l'adénine. Les transformants sont ainsi sélectionnés sur milieu SGI. Le milieu YPGE est un milieu complet utilisé pour la croissance de la levure transformée. Enfin, le milieu YPI est, quand à lui, utilisé pour induire l'expression du P450.



	<b>YPGA</b>	<b>SGI</b>	<b>YPGE</b>	<b>YPI</b>
Extrait de levure	10 g		10 g	10 g
Bacto™ peptone	10 g		10 g	10 g
Acide Bacto casamino		1 g		
Base nitrogène de levure		7 g		
Glucose	20 g	20 g	15 g	
Galactose				20 g
Adénine	30 mg			
Tryptophane		40 mg		
Ethanol			3 %	

**Tableau 3 : Composition des milieux de culture pour la levure**

20 g/L d'agar sont ajoutés avant autoclave pour les milieux solides. Une solution-stock de galactose est dissous à 50°C pendant 15 minutes. Les solutions d'adénine et de tryptophane sont préparées à 10 mg/mL et 2 mg/mL, respectivement, et filtrées stérilement sur une membrane 0,22 µm (Millipore) avant d'être ajoutées aux milieux autoclavés.

### III. Méthodes : système d'expression hétérologue dans la levure

#### A. Clonage USER™

Les gènes synthétisés et les gènes précédemment clonés à l'IBMP dans un vecteur différent du pYeDP60, ont été intégrés dans le vecteur pYeDP60u2 pour une expression dans la levure WAT11 en utilisant la technique du clonage USER™ (Nour-Eldin et al., 2006). En une seule étape (Réaction USER de la Figure 12), le fragment PCR du gène d'intérêt allongé de 8 paires de base est inséré dans le vecteur préalablement linéarisé par hybridation complémentaire sans utiliser de ligase.

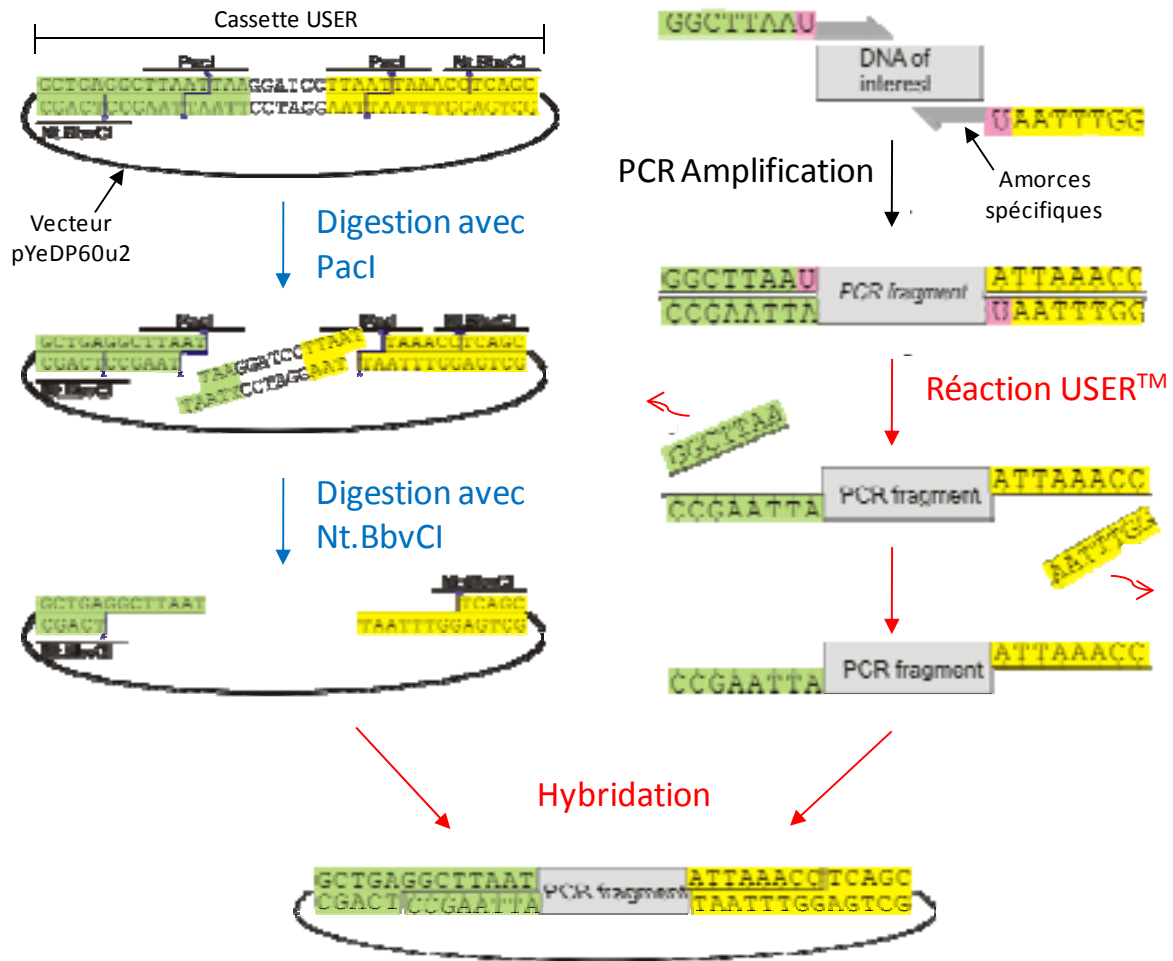


Figure 12 : Schéma du principe de la technique de clonage USER d'après Nour-Eldin et al. (2006).

Les flèches bleues indiquent l'étape de linéarisation du vecteur. Les flèches rouges indiquent l'étape de la réaction USER permettant l'hybridation du fragment PCR amplifié et du vecteur linéarisé. Les sites de restriction reconnus par les endonucléases *PacI* et *Nt.BbvCI* au cours de la linéarisation du vecteur sont indiqués sur la cassette USER du vecteur. Les 2 extrémités complémentaires du vecteur et du fragment PCR amplifié sont chacune surlignées en vert et en jaune. Les amorces spécifiques de l'ADN d'intérêt sont représentées par des flèches grises. Les uraciles reconnus et excisés par l'enzyme USER™ sont surlignés en roses.

1. Linéarisation du vecteur pYeDP60u2

Le vecteur est d'abord linéarisé en utilisant les enzymes de restriction *PacI* et *Nt.BbvCI* comme indiqué dans le Tableau 4. Ces dernières vont digérer le vecteur au niveau de la cassette USER et générer des extrémités cohésives (partie gauche de la Figure 12).

ETAPE 1	
<b>pYeDP60u2</b>	10 µg
<b><i>PacI</i></b>	70 U
<b>Tampon NEB4 (x1)</b>	20 µL
<b>Albumine de sérum bovin (BSA) (x1)</b>	2 µL
<b>Eau milli-Q</b>	Complété jusqu'à 200 µL
<b>Incubation</b>	12 h à 37 °C
ETAPE 2	
<b>Mélange de l'étape 1</b>	200 µL
<b><i>PacI</i></b>	20 U
<b><i>Nt.BbvCI</i></b>	40 U
<b>Incubation</b>	2 h à 37 °C

**Tableau 4 : Conditions expérimentales de la linéarisation du vecteur pYeDP60u2**

Les produits de la digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (m/v) et le vecteur linéarisé est extrait en utilisant le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel).

Après élution avec 15 µL du tampon fournit, une étape de dessalement est réalisée. L'ADN est précipité à l'acétate de sodium à 3 M pH 5.2 et à l'éthanol à 96 % (2,5/0,1, v/v) pendant 30 min à -20 °C. Après centrifugation à 20 000 g pendant 30 min, le culot est lavé avec de l'éthanol à 70 % à 4 °C. Après une deuxième centrifugation, le culot est séché 10 min à 60 °C et repris dans 10 µL d'eau Milli-Q.

Le vecteur linéarisé est stocké à -20 °C jusqu'à son utilisation.

## 2. Amplification par PCR du gène *P450*

Le gène d'intérêt est d'abord amplifié par PCR (Figure 12 en haut à droite) en utilisant des amorces spécifiques du gène qui possèdent une extension de 8 nucléotides dont 1 base uracile. Les séquences nucléiques des amorces utilisées sont listées en annexe (page 238). L'amplification a été réalisée avec l'ADN polymérase Pfu Turbo Cx Hotstart (Stratagene) suivant les recommandations du fabricant et dans un volume total de 20 µL.

Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (m/v). La bande d'intérêt est excisée et filtrée à l'aide du kit GeneElute™ Agarose Spin Columns (Sigma-Aldrich) afin de séparer l'ADN du gel d'agarose et d'éliminer le bromure d'éthidium.

3. Réaction USER : insertion du gène *P450* dans le vecteur pYeDP60u2

La réaction utilisant le mix USER™ permet en une seule et même étape de générer des extrémités cohésives au fragment PCR amplifiée et de l'assembler au vecteur préalablement linéarisé (flèches rouges de la Figure 12). Les amorces utilisées au cours de l'amplification du gène d'intérêt ont permis de générer des extensions contenant une base uracile. Cette dernière est reconnue par le mélange enzymatique USER™ qui va dénaturer l'extension. L'assemblage de l'amplicon avec le vecteur linéarisé se fait par liaison hydrogène. L'hybridation de 8 paires de bases nucléotidiques est suffisamment stable pour le clonage.

La réaction PCR a lieu dans un volume total de 12 µL avec 1 unité du mélange enzymatique USER™ (NEB), 400 ng du vecteur linéarisé, 8 µL du produit PCR du gène d'intérêt et le volume est complété avec le tampon incolore de l'enzyme GoTaq polymérase (Invitrogen). Le mélange est incubé en 2 étapes successives : une étape d'excision à 37 °C pendant 20 minutes et une étape d'hybridation à 25 °C pendant 20 minutes. Le produit de la réaction USER est ensuite dialysé pendant 20 minutes sur une membrane de nitrocellulose de 0,05 µm (Millipore) déposée sur de l'eau Milli-Q, avant d'être utilisé pour la transformation d'*E. coli*.

4. Propagation du *P450* inséré dans pYeDP60u2 par *E. coli*

La bactérie *E. coli* est transformée par le *P450* inséré dans le vecteur pYeDP60u2 par la méthode chimique basée sur celle de Bergmans et al. (1981). Il est important d'éviter la méthode de transformation par électroporation qui pourrait déstabiliser l'insert du vecteur hybridé par des liaisons hydrogènes.

4 µL du produit de la réaction USER dialysé sont incubés 30 min sur la glace avec 50 µL de bactérie chimiocompétentes TOP10 ayant une efficacité de transformation entre  $1.10^4$  et  $1.10^6$  UFC/µg d'ADN. Un choc thermique est réalisé par incubation à 42 °C pendant 2 min suivie d'une incubation sur la glace pendant 2 min. Les bactéries sont ensuite incubées dans 150 µL de milieu LB non sélectif pendant 20 min à 37 °C afin que les transformants acquièrent la résistance à l'antibiotique apportée par le plasmide. Puis, les bactéries sont étalées sur milieu LB solide enrichi en ampicilline (100 µg/mL) et incubées 1 nuit à 37 °C. Une dizaine de colonies sont étalées de nouveau sur le milieu sélectif (LB enrichi en ampicilline). La présence de l'insert est confirmée par PCR en utilisant les mêmes amorces

que celles utilisées pour l'amplification du gène d'intérêt avant la réaction USER (Annexe en page 238).

Les bactéries transformées sont mises en culture liquide dans 50 mL de milieu sélectif pendant 1 nuit à 37 °C avant extraction de l'ADN plasmidique avec le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) suivant les recommandations du fabricant. Une étape de dessalement est réalisée dans les mêmes conditions décrites pour le vecteur linéarisé (Chapitre 2:III.A.1 en page 57). La construction est vérifiée par séquençage nucléique à l'aide des amorces listées en annexe (page 238).

## B. Expression hétérologue des P450s dans la levure

### 1. Transformation de la levure

La levure WAT11 est transformée avec le vecteur pYeDP60u2 ou pYeDP60 contenant la séquence du *P450* d'intérêt, en utilisant la méthode décrite par Gietz et al. (1992). Les colonies obtenues sont testées par PCR en utilisant les amorces spécifiques du vecteur pYeDP60 (page 238).

### 2. Culture et induction de l'expression des P450s

Une colonie de levure transformée est utilisée pour ensemer 30 mL de milieu minimum SGI. La culture est incubée 17 h à 28 °C. 10 mL de cette culture sont ensuite prélevés pour ensemer 100 mL de milieu YPGE. Après 30 h de culture à 28 °C sous agitation, l'expression du P450 est induite en remplaçant le milieu de culture par du YPI. Les levures sont incubées pendant 17 h à 28 °C avant les tests de bioconversion ou la préparation de microsomes.

## C. Préparation de microsomes et quantification des P450s

### 1. Préparation de microsomes

Ce protocole est adapté de la méthode mise au point par Pompon (1996). Toute la procédure est réalisée à 4 °C afin de limiter la dégradation des protéines. Les levures en culture de 200 mL sont centrifugées pendant 15 min à 7 500 g puis lavées dans 10 mL de TEK. Après une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions, le TEK est éliminé et le

culot de levures est repris dans 2 mL de tampon d'extraction froid contenant 300 mL de TES, 3 g d'albumine de sérum bovin et 100  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Après transfert dans un tube falcon de 50 mL, des billes de verre (400-625  $\mu$ m, Sigma-Aldrich) sont ajoutées jusqu'à ce qu'elles affleurent la surface du mélange, puis les levures sont broyées en agitant énergiquement les tubes du haut vers le bas pendant 1 min à 5 reprises. Entre-temps, les tubes sont placés dans la glace pour éviter la dégradation des protéines. A l'issue de ce broyage, les billes sont lavées 2 fois avec 40 ml du tampon d'extraction froid. Ce dernier est collecté et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Le surnageant est filtré sur papier Miracloth (Calbiochem). Les microsomes sont culotés par centrifugation à 100 000 g pendant 45 min à 4 °C. Ils sont repris et homogénéisés dans du tampon TG à l'aide d'un Potter-Elvehjem, puis stockés à -20 °C.

## 2. Quantification des P450s

Le niveau d'expression des P450s est vérifié et leur concentration est déterminée par spectrophotométrie différentielle. La technique utilisée est celle décrite par Omura et Sato (1964a, 1964b) qui repose sur la forte affinité du fer réduit de l'hème envers le monoxyde de carbone (CO). La liaison de coordination entre le fer et le CO provoque un déplacement de la bande de Soret de 390 nm à 450 nm. Il en résulte une différence d'absorbance mesurée entre 390 nm et 450 nm par spectrophotométrie différentielle. En utilisant le coefficient d'extinction molaire égale à 91 mM/cm, on peut alors calculer la quantité de P450s présente.

Les mesures sont réalisées à température ambiante avec un spectrophotomètre Cary 300 UV-Vis (Varian). Une solution de 2 mL de microsomes dilués 10 fois dans du tampon TG est réduite par ajout de dithionite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Après la répartition égale de la solution dans 2 cuvettes de spectrophotomètre, la ligne de base est mesurée et corrigée. La cuvette test est alors saturée en CO par bullage pendant 30 s avant la mesure de l'absorbance entre 400 et 500 nm dans les 2 cuvettes.

## D. Activité enzymatique *in vitro* avec des composés volatils oléfinés comme substrat

Les activités enzymatiques sont criblées par incubation de microsomes de levures exprimant le P450 candidat avec un des substrats listés dans le Tableau 7.

Les substrats qui possèdent un squelette sans groupe fonctionnel, sont moins solubles en milieu aqueux, plus volatils et plus apolaires que les substrats possédant un atome d'oxygène. Une nouvelle méthode différente de celle utilisée pour les substrats oxygénés a été adaptée de celle décrite par Christoph Crocoll (2011). Les principales différences entre les 2 méthodes sont résumées dans le Tableau 12 (page88).

Les essais enzymatiques *in vitro* avec les substrats hydrocarbures sont réalisés dans un volume réactionnel de 300  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate PBS à 75 mM pH 6.8, contenant 30  $\mu\text{L}$  de microsomes, 200  $\mu\text{M}$  de substrat dissous dans l'éthanol (0,8 % d'éthanol dans le volume final de la réaction) et en présence ou en absence de NADPH à 1 mM. Le mélange réactionnel est introduit dans un tube en verre fermé de 2 mL et incubé 20 min à 28 °C dans un thermomixer (Eppendorf) sous agitation à 700 rpm. Le mélange réactionnel est ensuite extrait 1 fois avec 500  $\mu\text{L}$  de pentane. Après agitation pendant 5 min à 1 400 rpm et centrifugation pendant 10 min à 3 000 g, la phase organique est analysée en CPG-DIF et CPG-SM.

#### E. Activité enzymatique *in vitro* avec des composés volatils oxygénés comme substrat

Les essais enzymatiques *in vitro* avec les substrats oxygénés sont réalisés dans un volume réactionnel de 100  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate PBS à 20 mM pH 7.4, contenant 10  $\mu\text{L}$  de microsomes et 200  $\mu\text{M}$  de substrat dissous dans un mélange éthanol/PBS (0,4% d'éthanol dans le volume final de la réaction). Le mélange réactionnel est introduit dans un tube à hémolyse en verre non fermé de 7 mL et incubé 20 min à 27 °C au bain marie agitant. La réaction est initiée par ajout de 1 mM de NADPH et stoppée avec de l'acide chlorhydrique à 1 N. Un contrôle négatif sans NADPH est parallèlement incubé. Le mélange réactionnel est ensuite extrait 2 fois à l'acétate d'éthyle (2 fois 500  $\mu\text{L}$ ). Après mélange au vortex et centrifugation pendant 2 min à 3000 g, la phase organique est déshydratée sur une colonne de 1 cm x 0,6 cm de sodium sulfate. Elle est ensuite concentrée sous flux d'argon pour atteindre un volume final de 200  $\mu\text{L}$ , puis analysée en CPG-DIF et CPG-SM.

#### F. Cinétique enzymatique des CYP76s avec la framboisone

Les paramètres catalytiques de la réaction de conversion de la framboisone par CYP76C4 et CYP76B6 ont été déterminés à partir d'une cinétique enzymatique réalisée en

triplicat dans les conditions indiquées dans le Tableau 5 et en utilisant 6 concentrations différentes en substrat.

P450	[Substrat] ( $\mu\text{M}$ )	Temps d'incubation (min)	Quantité de P450 (pmole)	Conversion maximum (%)
CYP76B6	130 - 1300	20	22	7
CYP76C4	20 - 1000	10	23	15

**Tableau 5 : Conditions des cinétiques de CYP76B6 et CYP76C4 avec la framboisone**

Le standard de frambinone ayant été obtenu tardivement, la quantité de produits formés n'a pas été mesurée à l'aide d'une gamme étalon. Elle a été calculée à partir de la quantité de substrat introduite dans le milieu réactionnel représentée par l'ensemble des surfaces des réactifs observables en CPG. Les valeurs des constantes apparentes de Michaëlis ( $K_{m,app}$ ) et de la vitesse maximale apparente de la réaction ( $V_{max,app}$ ) ont été calculées à partir de la représentation de Lineweaver-Burk.

#### G. Bioconversion dans 1 mL

Les activités enzymatiques *in vitro* les plus intéressantes ont été testées en bioconversion avec la levure entière dans un volume de 1 mL. La bioconversion du substrat par la levure exprimant le P450 recombinant a été comparée avec celle obtenue par la levure transformée avec le vecteur pYeDP60u2 sans insert. Les essais ont été réalisés à partir d'une culture de 50 mL de levure induite pour l'expression du P450 recombinant. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 5 mL de tampon de réaction (tampon phosphate citrate à 100 mM pH 7 avec 2 % de glucose (m/v)). Des aliquotes de 1 mL sont placés dans des tubes à hémolyse en verre de 7 mL contenant le substrat à 200 ou 400  $\mu\text{M}$  solubilisé dans l'éthanol (2 % du volume au maximum). Les tubes ouverts sont incubés à 25 °C pendant 5 h sous agitation.

Puis, les cellules sont lysées par ajout de 1 mL d'acétone mélangé par vortex. Après incubation pendant 15 min à température ambiante, le mélange est extrait avec 2 mL de pentane/acétate d'éthyle 85 :15 (v/v). La phase organique est déshydratée sur une colonne de 1 cm x 0,6 cm de sulfate de sodium, concentrée sous flux d'argon pour atteindre un volume final de 200  $\mu\text{L}$ , puis analysée en CPG-DIF et CPG-SM.



#### IV. Méthodes : analyses dans *A. thaliana*

##### A. Culture et croissance des plantes

###### 1. Conditions de culture

Les graines des différentes lignées d'*Arabidopsis* ont été semées dans un terreau de composition standard et les semis ont été repiqués et cultivés en conditions artificielles dans une chambre de culture. La température fut réglée à 22 °C en présence de lumière avec une humidité relative de 70 % et 19 °C à l'obscurité avec une humidité relative de 85 %. Avec une photopériode de 12 h, l'intensité lumineuse fut d'environ 40 à 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  au stade rosette et de 70 à 90  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  au stade tige.

###### 2. Stade de croissance

Le matériel végétal a été prélevé à différents stades de croissances des organes de la plante qui sont définis comme suit :

- Stade rosette : feuilles en rosette avant l'émergence de la hampe florale
- Stade tige : hampe florale de 20 à 30 cm au-dessus des feuilles
- Stade de la fleur F1 : boutons floraux visibles et minuscules
- Stade de la fleur F2 : boutons floraux avant l'anthèse
- Stade de la fleur F3 : fleurs venant de s'ouvrir
- Stade de la fleur F4 : fleurs complètement ouvertes

##### B. Quantification de l'expression

La quantification de l'expression de *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* dans les différents organes d'*A. thaliana* a été réalisée par Benoît Boachon.

###### 1. Extraction d'ARN totaux

Le matériel végétal a été fraîchement prélevé à partir d'au moins 3 plantes différentes et introduit directement dans l'azote liquide avant l'extraction des ARN totaux. Après broyage dans l'azote liquide, les ARNs sont précipités et extraits par la technique classique

utilisant le phénol et le chlorure de lithium. L'ADN est éliminé par traitement avec une désoxyribonucléase ou ADNase I (Fermentas) suivant les recommandations du fabricant. Les ARNs totaux ont ensuite été purifiés à l'aide du mini kit RNeasy plant (Qiagen).

2. Synthèse d'ADNc par reverse transcription (RT-PCR)

L'ADNc est synthétisé à partir de 2 µg d'ARN totaux purifiés en utilisant la reverse transcriptase SuperScript III (Invitrogen) en présence d'amorces composés de 23 nucléotides désoxythymidine ou Oligo(dT)<sub>23</sub> (Sigma-Aldrich) suivant les recommandations des fabricants.

3. PCR quantitative (Q-PCR)

L'expression relative des gènes d'intérêts a été mesurée par PCR quantitative. Les gènes *SAND*, *TIP41*, *PP2A* et *EXP* ont un niveau d'expression stable chez *Arabidopsis* (Czechowski et al., 2005) dans les conditions utilisées, et ont donc été choisis comme gènes de référence pour normaliser l'expression des P450s d'intérêt.

Les amorces spécifiques des gènes d'intérêt ont été conçues avec le logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) et sont listées en annexe (page 238).

La méthode utilisant une sonde fluorescente (SYBR Green) a été choisie et permet de mesurer la quantité d'ADN double brin formé. Les plaques de Q-PCR ont été préparées avec la station automatique Biomek 3000 (Beckman Coulter) et les réactions ont été analysées à l'aide du LightCycler 480 II (Roche). Chaque réaction contenait 2 µL d'ADNc dilués 10 fois, 5 µL de LightCycler SYBR Green I Master (Roche), et 250 nM d'amorces sens et antisens, dans un volume total de 10 µL. Les réactions ont été réalisées en triplicat, excepté pour l'échantillon de jeunes racines traité en duplicat. Le programme PCR utilisé fut le suivant : 10 min à 95 °C suivit de 45 cycles avec 10 s de dénaturation à 95 °C, 15 s d'hybridation des amorces à 60 °C et 15 s de polymérisation à 72 °C. Une courbe de dissociation est réalisée pour chaque réaction en réalisant un cycle de 55 °C à 95 °C afin de vérifier la spécificité de l'amplification. L'efficacité de l'ensemble des réactions a été calculée à  $1.945 \pm 0.015$ .

### C. Génotypage des mutants d'insertion

Les mutants homozygotes *cyp71a12* (GABI-KAT 127HO3), *cyp71a13* (SALK 105136) et *cyp71a18* (WiscDsLox297300\_18A) ont été identifiées par génotypage. Ces expériences ont été réalisées par Jean-François Ginglinger.

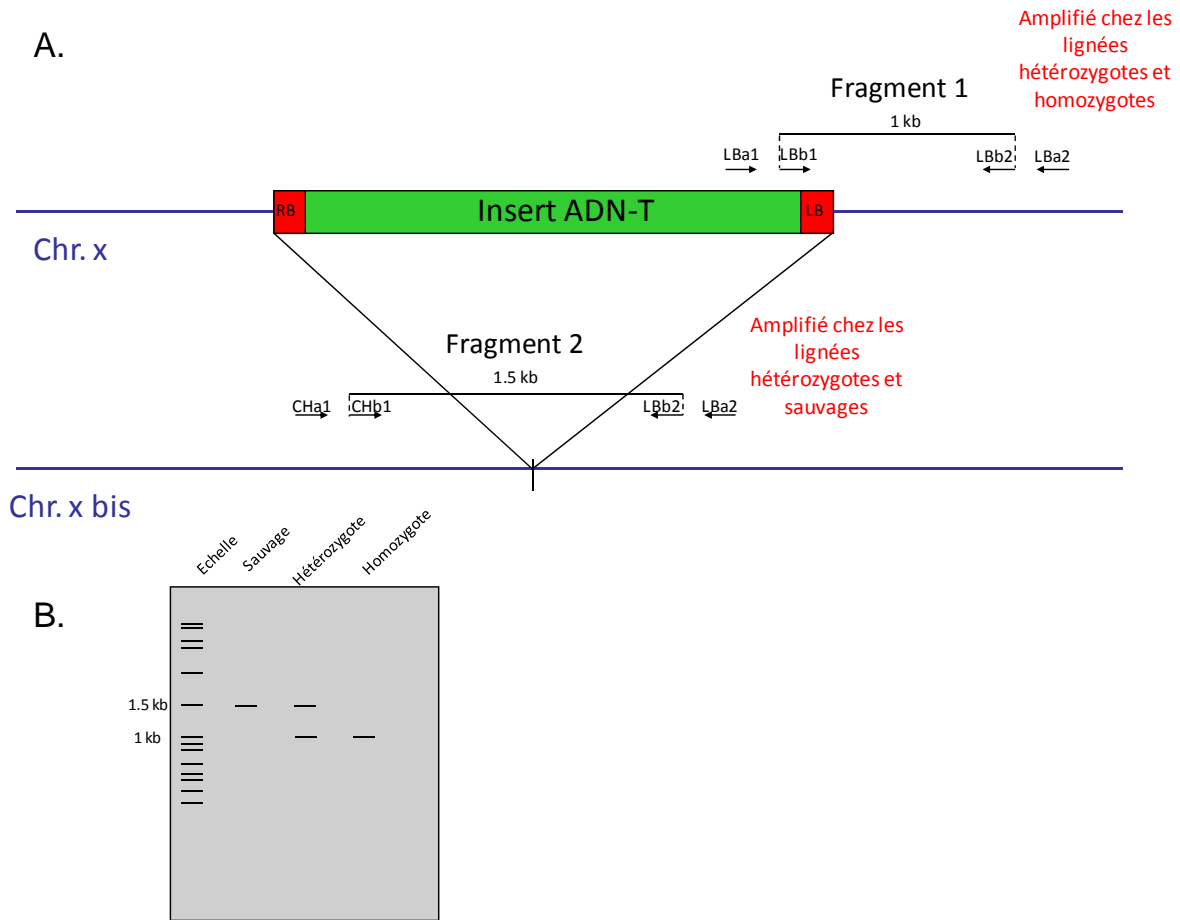
#### 1. Extraction d'ADN génomique

Pour chaque lignée mutante, l'ADN génomique d'une dizaine de plantes au stade rosette a été extrait à partir d'une feuille. Celle-ci a été broyée en présence de 400 µL de tampon d'extraction génomique. Après centrifugation à 12 000 g pendant 5 min à température ambiante, l'ADN présent dans 300 µL du surnageant a été précipité avec 300 µL d'isopropanol. Le culot obtenu après centrifugation de 30 min à 21 000 g à 4 °C, a été lavé avec 1 mL d'éthanol à 70 %. Après centrifugation de 15 min à 21 000 g à 21 °C, l'éthanol a été évaporé à 60 °C pendant 10 min. L'ADN génomique a été repris dans un tampon d'élution.

#### 2. Amplification par PCRs de l'ADN de transfert

Le génotype des mutants d'insertion (hétérozygote ou homozygote) a été discriminé par amplification de deux fragments génomiques de tailles différentes incluant en partie (fragment 1) ou totalement (fragment 2) l'ADNT-T (Figure 13A).

Dans un premier temps, deux amplifications de l'ADN génomique à l'aide d'amorces complémentaires aux bords extérieurs des fragments 1 et 2 (LbA1 et LbA2, et CHA1 et LbA2) ont été réalisées. Dans un deuxième temps, deux amplifications ont été réalisées à partir des produits PCR obtenu et à l'aide d'amorces complémentaires aux bords intérieurs des fragments 1 et 2 (LbB1 et LbB2, et CHB1 et LbB2) afin d'augmenter la spécificité de l'ADN augmenté et la quantité de produits PCR obtenus. Seules les amorces LbA1 et LbB1 sont complémentaires à l'ADN de transfert, les autres amorces étant spécifiques du gène d'intérêt. Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Le profil théorique de ce gel pour les 3 types de génotypes possibles est représenté sur la Figure 13B.



**Figure 13 : Schéma du principe du génotypage des mutants d'insertion d'Arabidopsis**

Les allèles d'un gène d'intérêt muté d'une plante hétérozygote sont représentés par un trait bleu (A). L'ADN de transfert est représenté par un rectangle avec une bordure gauche (LB) et une bordure droite (RB). Les fragments 1 et 2 amplifiés ainsi que les couples d'amorces internes (Lbb1 et Lbb2, et CHb1 et Lbb2) et externes (Lba1 et Lba2, et CHa1 et Lba2) à ces fragments sont localisés par rapport à l'ADN de transfert. Le profil théorique du gel d'agarose obtenu par électrophorèse (B) est indiqué pour les 3 types de génotypes possibles (sauvage, mutant hétérozygote, mutant homozygote).

#### D. Analyse des composés volatils émis par les fleurs

Les composés volatils émis par les fleurs des mutants d'insertion homozygotes pour *cyp71A12*, *cyp71A13* et *cyp71A18* ainsi que par les fleurs des lignées sauvages ont été analysées. La méthode utilisée est adaptée de celle décrite par Aharoni et al. (2003).

Pour chaque lignée, une soixantaine de fleurs ouvertes, fraîchement récoltées à partir de 5 plantes différentes, ont été placées dans un pot en verre d'1 L hermétiquement fermé en présence de lumière. L'ensemble des tiges du bouquet de fleur sont rassemblées dans un tube rempli d'eau du robinet. De l'air est mis en circulation dans le pot de fleur avec un débit

d'environ 100 mL/min. Cet air est filtré à l'entrée et à la sortie du pot de fleur par des cartouches en métal de 140 x 4 mm contenant 200 mg de Tenax TA (20/35, Grace Scientific) pendant 24 h. Les composés volatils émis par les fleurs et adsorbés par la cartouche de Tenax en sortie du pot de fleur, ont été analysés en TD-CPG-SM. Les composés volatils de chaque lignée ont été collectés et analysés à des temps variables en fonction des conditions expérimentales.

## V. Méthodes : chromatographie analytiques

Les composés volatils extraits des échantillons biologiques (levure ou plante) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

### A. CPG-DIF

Les échantillons issus d'une extraction liquide ont été analysés sur une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF) Varian 3900. Les composés sont séparés sur une colonne DB-5 (Agilent Technologies) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m. Le débit du gaz porteur, l'hélium, a été ajusté à 1,2 mL/min. 1  $\mu$ L d'extrait est injecté avec une division d'un ratio de 50. Le four est d'abord maintenu à 50 °C pendant 5 min puis un gradient de température a été appliqué en fonction de la molécule substrat analysé (Tableau 6) pour, enfin, maintenir le four 5 min à 320 °C.

Substrat analysé	Température (°C)	Gradient de température (°C/min)
monoterpène oxygéné et phénylpropanoïdes	50 – 320	10
monoterpène oléfine	50 – 120	4
	120 – 320	20
sesquiterpène oléfine	50 – 100	20
	100 – 320	4

Tableau 6 : Gradient de température du four de la CPG-DIF en fonction du substrat analysé

## B. TD-CPG-SM

Après adsorption des composés volatils émis par les fleurs des différentes lignées d'*Arabidopsis* sur une cartouche en métal de 140 x 4 mm contenant 200 mg de Tenax TA (20/35, Grace Scientific), les cartouches ont été soumises à un flux de 100 mL/min d'hélium pendant 5 min afin de les purger d'éventuelles traces d'eau dans un thermodésorbeur (TD100-Perkin). Les composés volatils sont ensuite thermodesorbés à 250 °C pendant 5 min avec un flux de 100 mL/min d'hélium et cryo-concentrés sur un piège à froid maintenu à -30 °C. Ils sont ensuite désorbés du piège à froid pendant 3 min à l'aide d'une pression constante de 10 psi et un dixième est envoyé dans une CPG-SM (CPG Clarus 680T-Perkin couplé à un SM Clarus 600T-Perkin) au travers une colonne HP-5MS (Agilent Technologies). Le programme de température de CPG est de 0,5 min à 50 °C, suivit d'une rampe de 15 °C/min pendant 20 min jusqu'à 320 °C, puis la température est ensuite maintenue pendant 5-10 min à 320 °C pour purger la colonne. L'acquisition des fragments moléculaires a été réalisée en 0,25 s sur une gamme de 50 à 500 m/z avec un flux électronique de 70 eV.

L'identification des produits obtenus a été réalisée par comparaison des temps de rétention et des spectres de masse avec ceux des standards authentiques lorsqu'ils étaient disponibles, de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) ou encore avec ceux de la littérature.



## **Chapitre III**

# **Criblage de cytochromes P450 exprimés dans *S. cerevisiae* pour la bioconversion de composés volatils**





## Chapitre 3: Criblage de cytochromes P450 exprimés dans *S. cerevisiae* pour la bioconversion de composés volatils

### I. Sélection des molécules à fonctionnaliser

V. MANE Fils dispose de composés volatils naturels obtenus par distillation d'huile essentielle de plantes. Une quinzaine d'entre eux ont été sélectionnés comme substrat pour le criblage d'activité enzymatique de cytochromes P450 (Tableau 7). Le choix s'est fait d'une part, par rapport à leurs faibles coûts de revient, et d'autre part, par rapport à leurs degré de pureté. Le  $\beta$ -myrcène n'a cependant pas pu être inclus dans le criblage pour des problèmes de solubilité (cf. Chapitre 3:III.B ci-dessous).

**Tableau 7 (au dos): Liste des substrats à fonctionnaliser qui ont été sélectionnés, des plantes dont ils sont issus (base ésotérique) et de leur degré de pureté (sur la base des pics observés en CPG)**



Certains substrats ont également été sélectionnés dans le but de les convertir en produits naturels connus pour leur importance commerciale. Deux molécules sont particulièrement ciblées : la nootkatone et la frambinone.

(i) La nootkatone est un sesquiterpène cétonique généralement présent en faibles quantités, notamment chez le genre *Citrus* (MacLeod JR and Buigues, 1964). Cette molécule est prisée en parfumerie pour son odeur de pamplemousse. Le valencène et le nootkatène ont des squelettes carbonés proches de celui de la nootkatone. Une oxydation sur le groupe allylique du valencène conduit directement à la formation de nootkatone. Le valencène, également présent chez le genre *Citrus*, est probablement le précurseur naturel de la nootkatone, mais cela n'a pas encore été validé *in planta* (Sharon-Asa et al., 2003).

(ii) La frambinone est un composé phénolique présent dans le fruit du framboisier qui participe à lui donner son goût caractéristique. C'est un des ingrédients naturels de l'industrie des arômes et du parfum les plus chers, avec un prix pouvant atteindre 20 000 dollars US/kg (Beekwilder et al., 2007). Des expériences de traçage isotopique ont permis de proposer une voie de biosynthèse à partir du *p*-coumaroyl-CoA (Borejsza-Wysocki and Hrazdina, 1994). Une benzalacétone synthase (BAS) condense le *p*-coumaroyl-CoA avec une molécule de malonyl-CoA pour former du *p*-hydroxybenzalacétone (Figure 14). Puis, une benzalacétone réductase (BAR) forme la frambinone par réduction de la double liaison alcénique. Cette voie métabolique ne fait donc pas intervenir de P450.

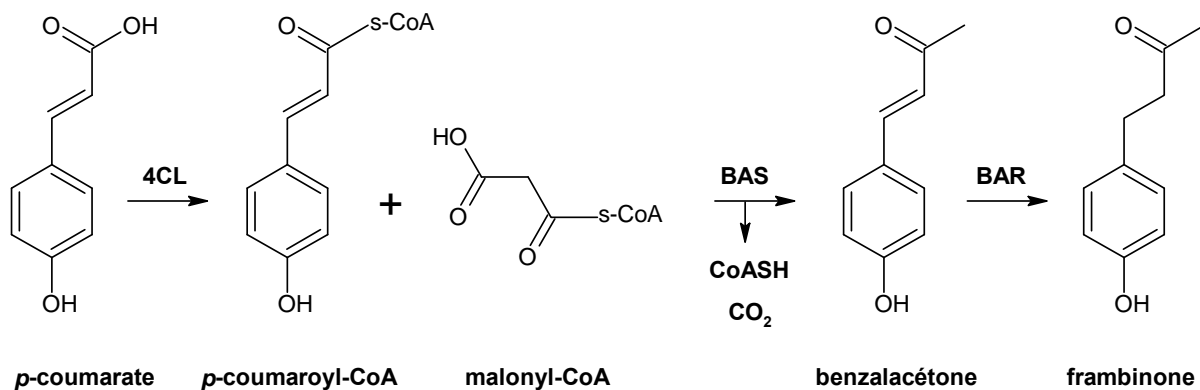


Figure 14 : Voie métabolique de la frambinone dans le fruit du framboisier proposée par Borejsza-Wysocki et Hrazdina (1994)

4CL : *p*-coumarate-CoA ligase. BAS : benzalacétone synthase. BAR : benzalacétone réductase.

Plusieurs stratégies pouvant impliquer des P450s sont envisageables pour produire la frambinone (Figure 15) : soit à partir de la framboisone, soit à partir d'aldéhyde d'anisique, soit à partir du cinnamate. L'hydroxylation du cinnamate en position *para* pour former du coumarate correspond à l'une des premières étapes bien connues de la voie métabolique des phénylpropanoïdes (Figure 4, page 10). La cinnamate 4-hydroxylase en provenance du topinambour (CYP73A1) a été caractérisée de façon détaillée à l'IBMP, et depuis, plus d'une centaine de gènes orthologues ont été identifiés (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) et certains caractérisés (Pierrel et al., 1994; Schalk et al., 1997). Le cinnamate ne fera donc pas partie des substrats sélectionnés pour le criblage.

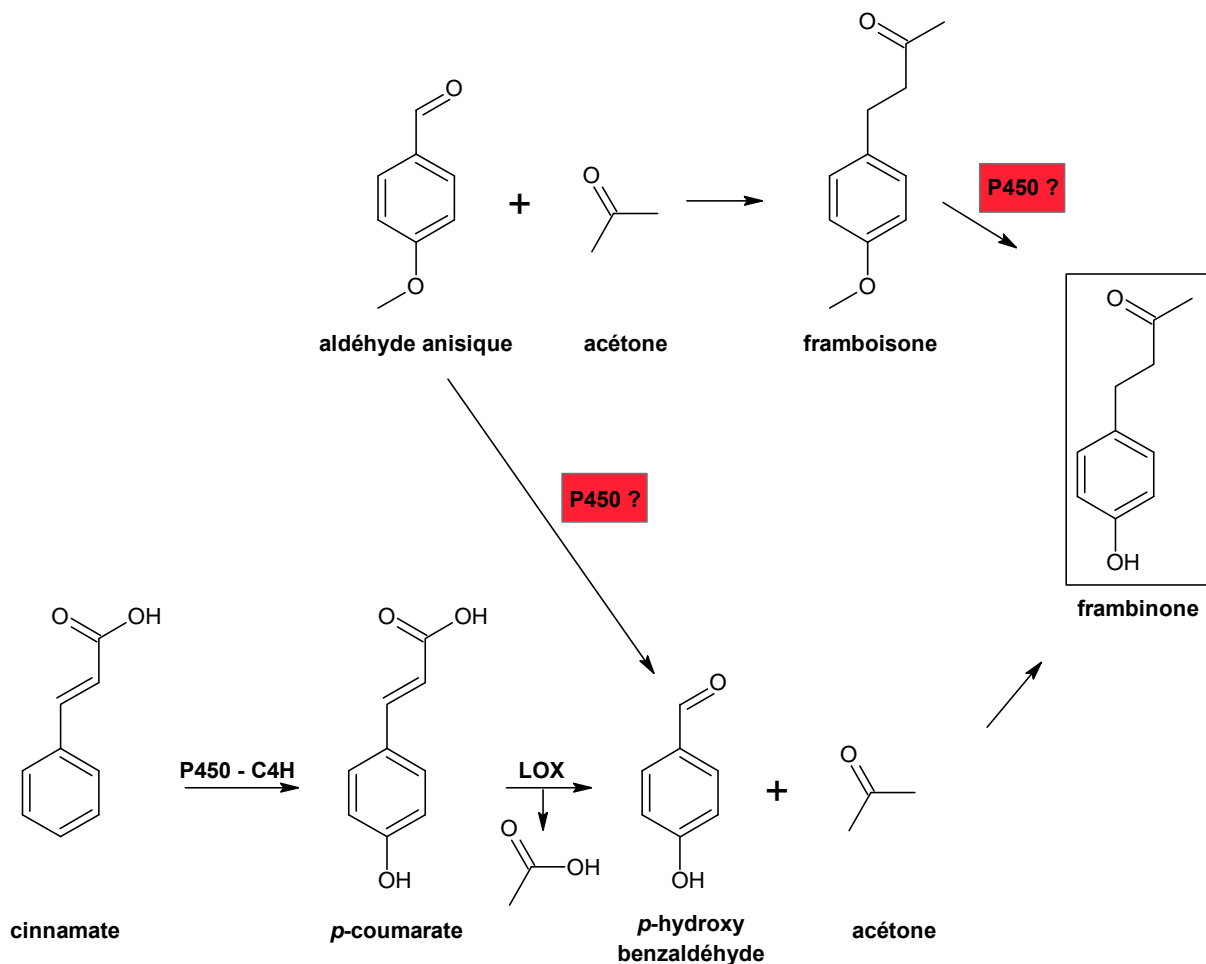


Figure 15 : Schéma des réactions enzymatiques envisagées pour la production de frambinone naturelle

Les étapes surlignées en rouge sont les réactions recherchées. LOX : lipoxygénase. C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

Ainsi, 3 produits de réaction plus particulièrement ciblés seront donc : la nootkatone, la frambinone et le *p*-hydroxybenzaldéhyde.


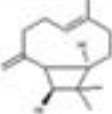

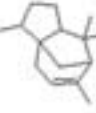

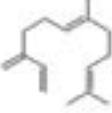

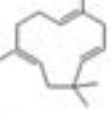

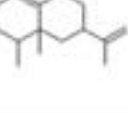
## II. Sélection des cytochromes P450 candidats

### A. En provenance d'*Arabidopsis thaliana*

Les substrats sélectionnés et les produits attendus sont présents chez diverses espèces végétales. *Arabidopsis thaliana* présente l'intérêt d'être une plante modèle et, par conséquent, un grand nombre de données génétiques et génomiques sont disponibles. Une approche de génomique fonctionnelle pouvait donc être envisagée pour identifier des terpènes oxydases.

#### 1. Substrats sélectionnés et produits correspondants chez *Arabidopsis*

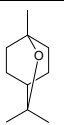
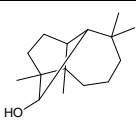
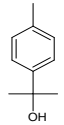
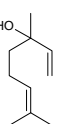
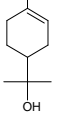
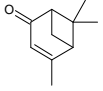
La majorité des substrats sélectionnés sont présents chez *A. thaliana* (Tableau 8). Le lavandulol, l'isolongifolène, le nootkatène, l'aldéhyde anisique et la framboisone n'ont pas été détectés. En revanche, un seul produit oxygéné correspondant a été décelé (Tableau 9): le *p*-cymèn-8-ol est émis par les inflorescences (Rohloff and Bones, 2005). Certains sesquiterpènes hydrocarbonés sont spécifiquement présents dans les fleurs. L'absence de détection de leurs dérivés mono-oxygénés peut signifier qu'ils sont soit absents, soit mal détectés, soit conjugués et non volatils, ou encore métabolisés en produits plus complexes.

Nom	Structure	Organe	Références	Nom	Structure	Organe	Références
monoterpènes		Tige, feuille, fleur	Robloff and Bones, 2005	sesquiterpènes		Tige, fleur	Chen et al., 2003; Robloff and Bones, 2005
		Tige, feuille, fleur	Robloff and Bones, 2005			Tige, fleur	Robloff and Bones, 2005
		Tige, feuille, fleur	Van Poecke et al., 2001			Fleur	Chen et al., 2003; Robloff and Bones, 2005
		Tige, feuille, fleur	Boldmann et al., 2000; Robloff and Bones, 2005			Fleur	Chen et al., 2003; Robloff and Bones, 2005
		Tige, feuille, fleur	Robloff and Bones, 2005			Tige, fleur	Robloff and Bones, 2005

**Tableau 8** : Liste des substrats sélectionnés pour le criblage qui sont émis par différents organes d'*A. thaliana*

Le lavandulol, l'isolongifolène, le nootkatène, l'aldéhyde anisique et la framboisone n'ont pas été détectés.

Des monoterpènes mono-oxygénés présentant un squelette carboné différent des substrats sélectionnés (1,8-cinéol,  $\alpha$ -terpinéol et linalol) ont également été détectés. Ils sont les produits directs des terpènes synthases AtTPS-Cin (1,8-cinéol,  $\alpha$ -terpinéol ; Chen et al., 2004) et At1g61680 (linalol ; Chen et al., 2003) après expression hétérologue dans *E. coli*. Par conséquent, leur biosynthèse *in planta* n'implique pas nécessairement un cytochrome P450. On notera qu'il aurait été intéressant de cribler le pinène, présent chez *A. thaliana* et potentiel précurseur de la verbénone qui est également présente. Cette dernière est utilisée comme fragrance dans l'industrie du parfum.

Nom	Structure	Organe	Références	Nom	Structure	Organe	Références
1,8-cinéol		Racine, Tige, feuille	Steeghs et al., 2004; Rohloff and Bones, 2005	longibornéol		Tige, feuille, fleur	Rohloff and Bones, 2005
<i>p</i> -Cymèn-8-ol		Fleur	Rohloff and Bones, 2005				
linalol		Fleur	Chen et al., 2003; Rohloff and Bones, 2005				
$\alpha$ -terpinéol		Tige, feuille, fleur	Chen et al., 2004; Rohloff and Bones, 2005				
verbénone		Tige, feuille, fleur	Rohloff and Bones, 2005				

**Tableau 9 : Liste des monoterpènes et sesquiterpènes mono-oxygénés détectés dans les différents organes d'*A. thaliana***

## 2. Sélection de cytochromes P450 à l'aide de l'outil CYPedia

*Arabidopsis thaliana* possède 244 gènes codant pour des P450s, à l'exclusion des 30 pseudogènes (Figure 16), dont moins de 30 % sont associés à une fonction biochimique (Bak et al., 2011). Le développement d'outils s'avèrait indispensable pour identifier la fonction des gènes orphelins, notamment ceux impliqués dans le métabolisme des mono- et sesquiterpènes. C'est pourquoi, des analyses *in silico* de co-expression mettant à profit les résultats obtenus sur les puces à ADN Affymetrix ATH1 disponibles dans les bases de données publiques, ont été entreprises au laboratoire (Ehltling et al., 2008). Elles ont permis de générer la base de données CYPedia (<http://www-ibmp.u-strasbg.fr/~CYPedia/>) qui vise à prédire la voie métabolique dans laquelle chaque P450 serait impliqué.



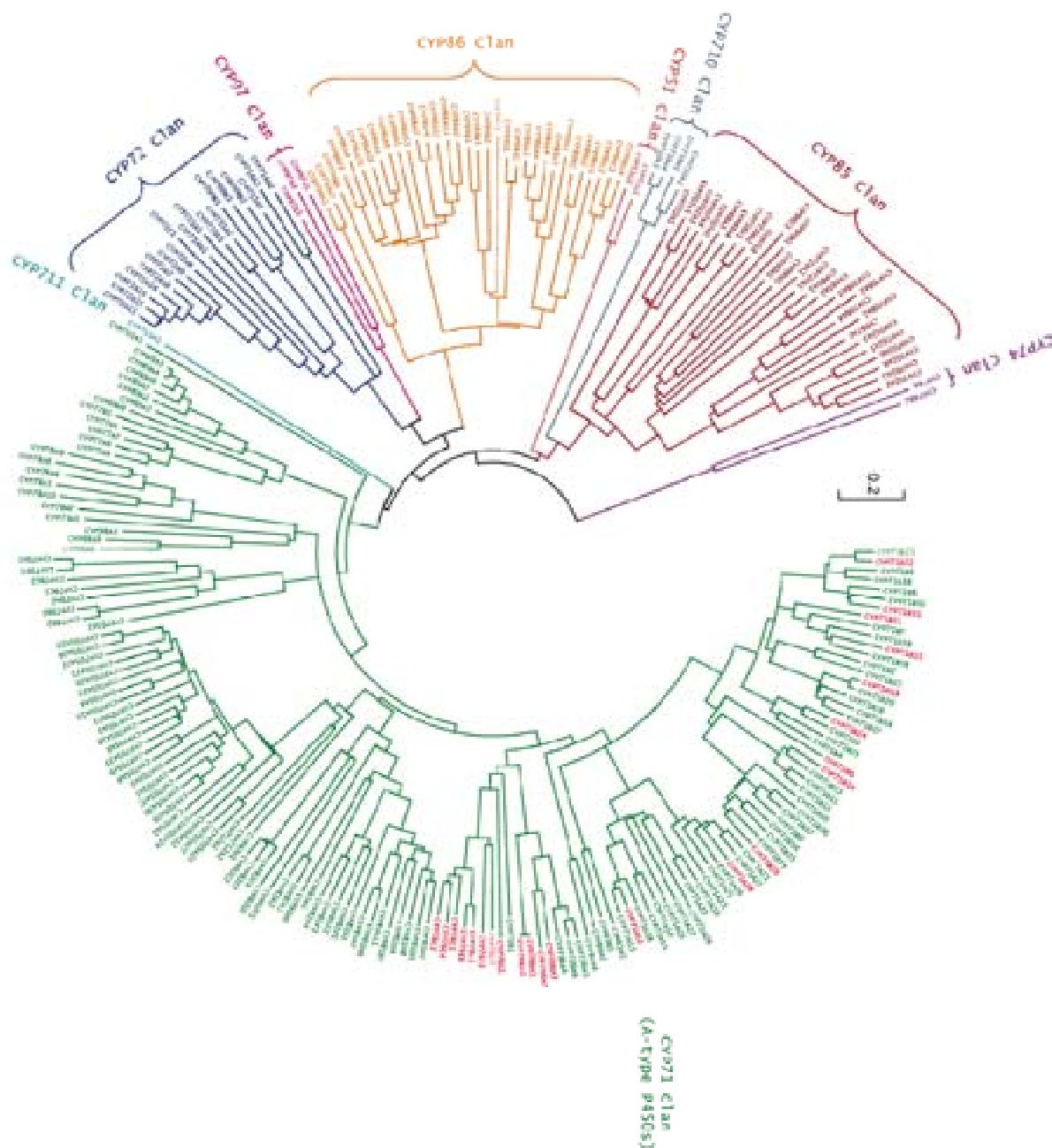


Figure 16 : Cladogramme des 244 P450s d'*Arabidopsis thaliana* d'après Bak et al. (2011)

Les P450s sélectionnés pour le criblage sont indiqués en rouge.

Parmi les 32 terpènes synthases (TPS) découvertes dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Aubourg et al., 2002), 10 ont été caractérisées comme des mono- et/ou sesquiterpènes synthases et 3 sont prédites être des sesquiterpènes synthases sur une base phylogénétique (Tableau 10). 26 P450s sont co-exprimés avec ces terpènes synthases avec un coefficient de corrélation de Pearson supérieur ou égale à 0,6.

Référence TPS	Fonction TPS	AGI code	Nom TPS*	Nom P450	r	AGI code	Fonction P450	Référence P450
Huang et al., 2010	Ocimène/Farnésène synthase	At4g16730	TPS02	CYP71B31	0,60	At3g53300		
Huang et al., 2010	Ocimène/Farnésène synthase	At4g16740	TPS03					
Bohlmann et al., 2000	Myrcène/Ocimène synthase	At2g24210	TPS10	<b>CYP71B31</b>	<b>0,90</b>	At3g53300		
				<b>CYP76C3</b>	<b>0,89</b>	At2g45580		
				CYP71B38	0,84	At3g44250		
				CYP96A9	0,78	At4g39480		
				CYP71B2	0,69	At1g13080		
Tholl et al., 2005	Plurisesquiterpènes synthase	At5g44630	TPS11	<b>CYP706A3</b>	<b>0,94</b>	At5g44620		
				CYP77A6	0,79	At3g10570		
				CYP96A9	0,75	At4g39480		
				CYP96A15	0,65	At1g57750	Alcane hydroxylase	Greer et al., 2007
				CYP78A8	0,69	At1g01190		
Ro et al., 2006	Bisabolène synthase	At4g13280	TPS12	CYP71A19	0,67	At4g13290		
Ro et al., 2006	Bisabolène synthase	At4g13300	TPS13					
Chen et al., 2003	Linalol synthase	At1g61680	TPS14	CYP76C3	0,85	At2g45580		
				CYP71B31	0,83	At3g53300		
				CYP96A9	0,83	At4g39480		
				CYP71B38	0,76	At3g44250		
				CYP71B2	0,62	At1g13080		
Tholl et al., 2005	Caryophyllène synthase	At5g23960	TPS21	CYP96A9	0,62	At4g39480		
				CYP96A15	0,61	At1g57750	Alcane hydroxylase	Greer et al., 2007
				CYP86C1	0,61	At1g24540		
Tholl and Lee, 2011	Putative plurisesquiterpènes synthase	At1g33750	TPS22					
Chen et al., 2003	Plurimonoterpènes synthase	At3g25810	TPS24	CYP71B31	0,76	At3g53300		
				CYP71B5	0,64	At3g53280		
				CYP71B38	0,62	At3g44250		
Tholl and Lee, 2011	Putative plurisesquiterpènes synthase	At3g29410	TPS25	CYP705A22	0,83	At3g20130		
				CYP705A13	0,79	At2g14100		
				CYP71B29	0,79	At1g13100		
				CYP705A8	0,74	At2g27000		
				CYP705A25	0,74	At1g50560		
				CYP76C4	0,62	At2g45550		
				CYP86A1	0,83	At5g58860	Acides gras C12 à C18 $\omega$ -hydroxylase	Benveniste et al., 1998; Duan and Schuler, 2005
Chen et al., 2004	1,8-cinéole synthase	At3g25820	TPS27	CYP708A2	0,74	At5g48000	Thalianol hydroxylase	Field and Osbourn, 2008
				CYP706A7	0,72	At4g12330		
				CYP716A2	0,71	At5g36140		
				CYP705A5	0,71	At5g47990	Thalianol-diol désaturase	Field and Osbourn, 2008
				CYP71A16	0,68	At5g42590	Marnéral oxydase	Field et al., 2011
				CYP708A1	0,67	At1g55940		
				CYP86B1	0,61	At5g23190	Voie de biosynthèse de la subérine	Compagnon et al., 2009
CYPedia	Putative sesquiterpène synthase	At1g31950	TPS29	CYP705A8	0,75	At2g27000		
				CYP705A13	0,74	At2g14100		

**Tableau 10 : Liste des 13 mono/sesquiterpènes synthases identifiées ou présumées et des P450s d'*A. thaliana* co-exprimés avec un coefficient de corrélation de Pearson supérieur ou égale à 0,6**

Les TPS sont nommées selon Aubourg et al. (2002). CYP71B31 et CYP71B8 ont la même sonde Affymetrix ainsi que CYP71A19 et CYP71A20. Il n'y a pas de sonde pour TPS03 et TPS13.

Trois P450s présentant les plus forts coefficients de corrélation (autour de 0,9), seront criblés en priorité : CYP71B31, CYP76C3 et CYP706A3. Les terpènes synthases associées, TPS10 et TPS11, produisent *in vitro* du  $\beta$ -myrcène et un mélange de sesquiterpènes, respectivement. Elles sont exprimées dans la fleur (Bohlmann and J., 2000; Tholl et al., 2005), lieu de production d'une partie des substrats sélectionnés pour le criblage et du *p*-cymèn-8-ol (page 77).

Les familles CYP71 et CYP705 sont majoritairement représentées dans le Tableau 10. Ce sont les 2 plus grandes familles de P450s chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 16). La famille CYP705, appartenant au clan des CYP71s, est spécifique des Brassicacées (Nelson et al., 2004a). CYP705A5 est impliqué dans le métabolisme du triterpène thalianol (Field and Osbourn, 2008). CYP705A12 est impliqué dans le métabolisme du triterpène marnéral (Field et al., 2011). Chez d'autres espèces végétales, les P450s décrits jusqu'ici comme des mono- et sesquiterpène oxydases appartiennent essentiellement à la famille CYP71 (Tableau 1). La famille CYP71 a donc été privilégiée. Parmi les 49 CYP71s d'*Arabidopsis*, 4 ont été fonctionnellement caractérisés. CYP71A12 (Millet et al., 2010), CYP71A13 (Nafisi et al., 2007) et CYP71B15 (Böttcher et al., 2009; Zhou et al., 1999), sont impliqués dans la voie de biosynthèse de la camalexine. *CYP71A16* colocalise sur le chromosome 5 avec un groupe de gènes impliqués dans le métabolisme du marnéral, un triterpène, et code pour une protéine à l'activité de marnéral oxydase (Field et al., 2011).

La stratégie de criblage fonctionnel des CYP71s d'*Arabidopsis* dans mon projet de thèse a été la suivante : un CYP71 représentatif de chaque branche de cette famille et disponible dans la collection de l'IBMP a été testé pour son activité enzymatique avec les substrats sélectionnés (Tableau 2). Puis l'ensemble des enzymes de la branche a été testé après synthèse de gène et expression dans la levure lorsqu'une activité intéressante a été détectée dans l'une d'entre elles.

CYP706A3 est fortement co-exprimé avec la TPS11 (Tableau 10). L'activité sesquiterpène hydroxylase de CYP706B1 chez le cotonnier conforte l'hypothèse d'une implication de la famille CYP706 dans le métabolisme des terpènes (Luo et al., 2001). Les 3 CYP706s d'*A. thaliana* disponibles à l'IBMP ont donc été sélectionnés comme candidats pour le criblage : CYP706A1, CYP706A2 et CYP706A3. La séquence nucléique de CYP706A7, le

plus proche parent de CYP706A3 (Figure 16), a également été synthétisée pour une expression dans la levure.

Plusieurs P450s appartenant à la famille CYP76 apparaissent dans la sélection de co-expression avec les terpène synthases (Tableau 10). CYP76B6 de *Catharanthus roseus* est décrit comme géraniol hydroxylase (Collu et al., 2001). CYP76C1 d'Arabidopsis est, d'autre part, décrit dans un brevet comme géraniol hydroxylase (Ohta and Mizutani, 1998). Cette activité a cependant été réfutée par notre équipe (Höfer et al., manuscrit en préparation). En revanche, une activité géraniol hydroxylase a été détectée pour CYP76C4 comme géraniol hydroxylase. D'autre part, certains CYP76s, notamment CYP76C1 et CYP76C2, sont également capables de métaboliser par déméthylation des herbicides dont la structure se rapproche de celle de la framboisone et de l'aldéhyde anisique (R. Larbart, au laboratoire). Les 8 gènes appartenant à la famille CYP76 chez Arabidopsis ont donc été sélectionnés comme candidats pour le criblage (Figure 16). Ce criblage participe à l'analyse fonctionnelle des CYP76s d'Arabidopsis menée par des approches génétiques au laboratoire.

## B. Candidats sélectionnés chez d'autres espèces végétales

Afin d'augmenter les chances d'identifier des P450s capables de métaboliser les substrats d'intérêt, notamment les composés absents chez Arabidopsis, des P450s ont été sélectionnés chez d'autres espèces.

### 1. Sélection sur la base d'une homologie des substrats

Malgré une forte affinité pour le cinnamate, les C4Hs sont capables de métaboliser divers composés xénobiotiques de structures proches (Pierrel et al., 1994; Robineau et al., 1998) comme l'herbicide chlorotoluron (Figure 17). Parmi les réactions obtenues, on observe des déméthylations. La framboisone et l'aldéhyde anisique sont, comme le cinnamate, des molécules aromatiques planes de petite taille. Trois C4Hs, issues du topinambour (CYP73A1) et du tabac (CYP73A85 et CYP73A27), disponibles à l'IBMP, ont été choisis pour tester la déméthylation de la framboisone et de l'aldéhyde anisique.

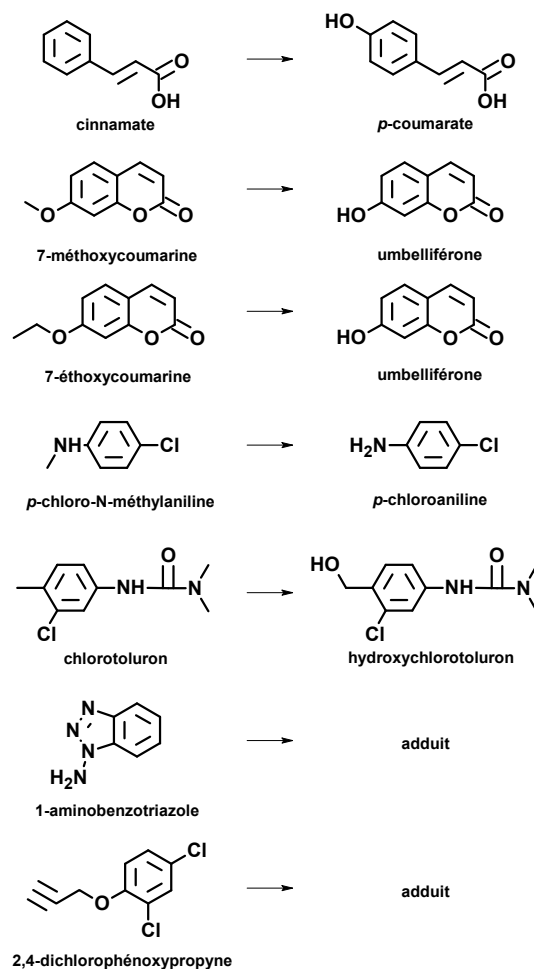


Figure 17 : Schéma des réactions catalysées *in vitro* par la cinnamate hydroxylase (CYP73) (d'après Pierrel et al., 1994)

## 2. Sélection par homologie de séquences avec des P450s caractérisés

Huit P450s (Tableau 11) ont été sélectionnés *in silico* par homologie de séquence protéique avec principalement des P450s qui ont une activité de sesquiterpène oxydase connue (Tableau 1) et en ayant pour cible principale le valencène. Les homologues provenant de la famille des Astéracées n'ont pas été sélectionnés pour nos criblages car la bioconversion de terpènes oléfiniques par ces enzymes est protégée par un large brevet (Bouwmeester et al., 2007). On remarquera également que le brevet protégeant l'hydroxylation de l'amorphadiène par un CYP71 d'Astéracées (CYP71AV1) pour la production d'artémisinine protège toute séquence ayant au moins 45 % d'identité protéique (Ro et al., 2010). Par définition, une famille de P450 regroupe tous les P450s ayant 40% d'identité protéique (Nelson, 2006). Autrement dit, ce brevet protège quasiment l'ensemble des P450s de la famille CYP71 chez les plantes. Cependant, ce brevet n'étant qu'en phase A1, il est probable que cette

revendication soit restreinte. CYP71D55, issu de *Hyoscyamus muticus* qui appartient à la famille des Solanacées, est capable de convertir le valencène en nootkatol. Ce P450 ainsi que ses éventuels homologues sont protégés par un brevet pour la production de nootkatone, mais les quantités produites ne sont pas renseignées. Mon objectif a donc été de sélectionner un P450 ayant la même activité et d'optimiser la production de nootkatone pour pouvoir breveter un procédé original produisant de fortes concentrations de nootkatone naturelle. Les brevets revendiquant l'activité d'un P450 pour la conversion du valencène en nootkatone sont répertoriés en annexe (page 239).

Les séquences nucléiques des P450s sélectionnés ont été synthétisées après optimisation des codons pour une expression dans la levure.

P450	Plante	Famille	% d'identité avec des P450s caractérisés
CYP71D51v2	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanacées	88 % avec CYP71D55
CYP71D4	<i>Solanum tuberosum</i>	Solanacées	93 % avec CYP71D55
CYP71D1	<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynacées	55 % avec CYP71D55
CYP71D326	<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiacées	53 % avec CYP71D55
CYP71D48v1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanacées	59 % avec CYP71D20
CYP71D98	<i>Ammi majus</i>	Apiacées	48 % avec CYP71AV1
CYP71D14	<i>Petunia hybrida</i>	Solanacées	58 % avec CYP71D20
CYP71D177	<i>Scoparia dulcis</i>	Plantaginacées	54 % avec CYP71D174

**Tableau 11 : Liste des cytochromes P450s candidats sélectionnés par homologies de séquences avec des mono- ou sesquiterpènes hydroxylases caractérisées**

L'alignement des séquences protéiques a été réalisé par Clustal W en utilisant le logiciel BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999). Se reporter au Tableau 1 (page 22) pour les références bibliographiques des P450s caractérisés.

### 3. En provenance de *Vitis vinifera*

La vigne est connue et utilisée depuis des siècles pour ses propriétés aromatiques. Les terpénoïdes produits jouent un rôle crucial dans le développement de la plante, de son fruit et dans la qualité du vin fabriqué. Parmi les principaux composés volatils émis par les fleurs, on trouve le valencène, l' $\alpha$ -humulène et l' $\alpha$ - et  $\beta$ -farnésène (Buchbauer et al., 1994). Plus de 50 monoterpènes participent à la production de l'arôme et du parfum des baies de certaines variétés aromatiques et du vin (Mateo and Jiménez, 2000). Des mono- et sesquiterpènes mono-oxygénés comme le linalol, l'oxyde de rose ou le rotundone sont également d'importants marqueurs d'arômes (Rapp and Mandery, 1986; Siebert et al., 2008).

Son génome venant d'être récemment séquencé (Velasco et al., 2007), une étude approfondie de la famille génique des terpènes synthases a pu être réalisée (Martin et al., 2010). Le nombre de terpènes synthase potentiellement fonctionnelles est de 69, reflétant l'importance de cette voie métabolique dans la plante. De plus, pas moins de 39 d'entre elles ont été caractérisées.

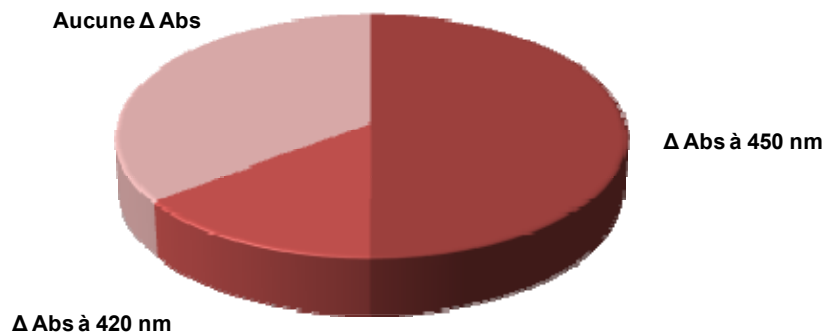
Chez d'autres espèces végétales, les P450s décrits jusqu'ici comme des mono- et sesquiterpène oxydases appartiennent essentiellement à la famille CYP71 (Tableau 1). Le génome de *Vitis vinifera* compte 24 gènes (et 28 pseudogènes) codant pour un CYP71, répartis en 8 sous-familles : AH, AP, AS, AT, AU, BC, BE et BG (Nelson, 2009). Quatre d'entre eux ont été sélectionnées dans des sous-familles différentes: CYP71BE5, CYP71AS4v2, CYP71AU4 et CYP71BC1. Leurs séquences nucléiques ont été synthétisées après optimisation des codons pour une expression dans la levure.

Toutes les synthèses de gènes ont été réalisées après optimisation de codons pour une expression dans la levure.

### III. Expression hétérologue de P450s et conditions de criblage *in vitro*

#### A. Expression hétérologue de P450s

Les cytochromes P450 candidats ont été insérés dans le vecteur pYeDP60u2 sous le promoteur *GAL10-CYCI* inductible au galactose, et exprimés dans la levure WAT11 exprimant la réductase ATR1 d'*Arabidopsis thaliana* (Urban et al., 1997). Après préparation de microsomes de levures, l'expression fonctionnelle du P450 est vérifiée par spectrophotométrie différentielle après fixation du monoxyde de carbone (CO). Lorsque le cytochrome P450 est exprimé sous une forme fonctionnelle, on peut observer une différence d'absorbance à 450 nm. Un pic d'absorbance à 420 nm indique que le ligand thiolate ne coordine pas avec l'atome de fer (Martinis et al., 1996). Cela peut être dû à un mauvais repliement de la protéine enzymatique ou à une dénaturation partielle.



**Figure 18 :** Pourcentage des différentes qualités d'expression des P450s candidats dans *S. cerevisiae* WAT11.

La qualité de l'expression est évaluée sur la base de la différence d'absorbance ( $\Delta$  Abs) observée ou pas, à 450 nm ou à 420 nm, lors de la mesure du spectre différentiel : microsomes réduits saturé par le monoxyde de carbone/ microsomes réduits. 48 P450s de plantes (dont 63 % sont issus d'*Arabidopsis*) ont été exprimés et évalués dans la levure.

Sur les 48 P450s sélectionnés, la moitié est exprimée de façon fonctionnelle dans *S. cerevisiae* sur la base des mesures de spectrophotométrie différentielle (Figure 18). Leurs spectres d'absorption différentielle sont reportés en annexe (page 238). Les autres P450s seraient peu exprimés ou pas exprimés de façon fonctionnelle. La qualité d'expression des P450s provenant uniquement d'*Arabidopsis thaliana* suit la même proportion. Malgré ce résultat, l'ensemble des P450s ont été testés pour leurs activités enzymatiques vis-à-vis des substrats sélectionnés.

## B. Conditions de criblage *in vitro*

Le criblage a été réalisé par incubation *in vitro* de microsomes de levure avec chaque substrat. L'essai enzymatique en présence de NADPH est comparé avec celui réalisé sans NADPH, coenzyme associé au fonctionnement du cytochrome P450. Un premier protocole d'essai enzymatique *in vitro* (page 61), précédemment validé à l'IBMP, a permis de détecter des activités enzymatiques avec le lavandulol, la framboisone et l'aldéhyde anisique (cf. annexe page 244) mais aucune activité enzymatique n'a été détectée avec les substrats oléfiniques. CYP71D181, issu de l'origan, catalyse la conversion du limonène en carvéol



(Crocoll, 2011). Cette activité enzymatique a été reproduite avec succès dans les conditions recommandées par Christoph Crocoll. Ces conditions (Chapitre 2:III.D, page 61) ont été appliquées au criblage des molécules hydrocarbonées et ont permis de détecter des activités enzymatiques avec les terpènes oléfiniques.

	<b>Conditions de criblage des substrats oxygénés</b>	<b>Conditions de criblage des substrats oléfiniques</b>
<b>Contenant réactionnel</b>	Tube ouvert de 7 mL	Tube fermé de 2 mL
<b>Volume réactionnel</b>	100 µL	300 µL
<b>Solvant de solubilité du substrat</b>	Ethanol/Tampon PBS (4:96, v/v)	Ethanol 100 %
<b>Concentration du substrat</b>	200 µM	200 µM
<b>Tampon de réaction</b>	PBS à 25 mM pH 7.4	PBS à 75 mM pH 6.8
<b>Volume de microsomes</b>	10 % du volume réactionnel	10 % du volume réactionnel
<b>Initiation de la réaction</b>	1 mM NADPH	1 mM NADPH
<b>Incubation</b>	20 min à 27 °C au bain marie	20 min à 28 °C dans un thermomixer
<b>Arrêt de la réaction</b>	10 µL de HCl à 1 N	4 °C
<b>Solvant d'extraction</b>	2 x 500 µL d'acétate d'éthyle	1 x 500 µL de pentane
<b>Mélange des phases</b>	Vortex	Thermomixer 5 min à 1400 rpm
<b>Séparation des phases</b>	2 min à 4000 rpm	10 min à 4000 rpm puis la phase aqueuse est solidifiée à -80°C
<b>Déshydratation</b>	Sur colonne de sulfate de sodium	Aucune
<b>Concentration</b>	Evaporation du solvant sous flux d'argon jusqu'à 200 µL	Aucune

**Tableau 12 : Comparaison des conditions d'essai enzymatique utilisées en fonction des propriétés physico-chimiques des substrats (molécules oxygénées ou oléfiniques volatiles)**

L'absence d'atomes d'oxygène modifie les propriétés physico-chimiques d'une molécule : elle est plus apolaire, plus volatile et moins soluble en milieu aqueux qu'une molécule oxygénée. Cela a des conséquences sur l'essai enzymatique et nécessite une adaptation des conditions de criblage (Tableau 12) qui prend en compte les facteurs suivants :

(i) La volatilité du substrat et des produits : celle-ci est limitée lorsque le volume d'air au-dessus de la surface du mélange réactionnel est réduit en fermant le tube à essai, en diminuant

le volume du tube et en augmentant le volume du mélange réactionnel. Par exemple, la quantité de limonène mesurée après 20 minutes d'incubation enzymatique sans NADPH est 27 fois plus forte lorsque le tube est fermé que lorsque le tube est ouvert (Figure 19).

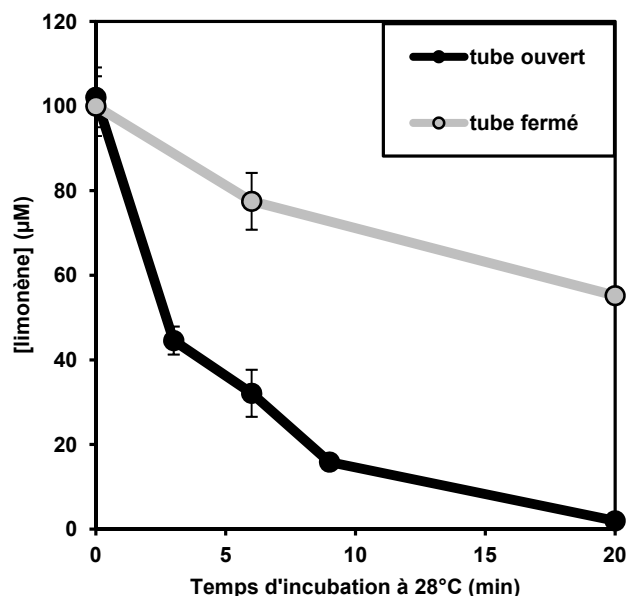


Figure 19 : Dosage du limonène dans l'essai enzymatique *in vitro* sans NADPH avec un tube à essai ouvert ou fermé en fonction du temps d'incubation à 28°C

(ii) La solubilité des substrats : les molécules peu ou pas solubles en milieu aqueux peuvent être introduites dans le milieu réactionnel à partir d'une solution dans l'éthanol (en maintenant une quantité d'éthanol inférieure à 1 % dans l'essai). Parmi les substrats sélectionnés, ce sont les oléfines avec un coefficient de partage entre l'octanol et l'eau ( $\log P$ ) estimé supérieur ou égale à 4 qui sont peu solubles dans l'eau, tandis que les molécules oxygénés ont un  $\log P$  estimé entre 2 et 4 (Tableau 13). Contrairement à ce qui est indiqué dans la littérature (O'Neil, 2006), le  $\beta$ -myrcène n'est pas non plus soluble dans l'alcool (éthanol et méthanol). Il précipite également dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et des solutions contenant de l' $\alpha$ - ou  $\beta$ -cyclodextrines (CD), avant ou après sonication. En revanche, il est soluble dans des solvants plus apolaires tels que l'hexane qui ne sont pas compatibles avec un milieu réactionnel enzymatique. L'évaporation totale du solvant apolaire provoque le départ dans le milieu atmosphérique du  $\beta$ -myrcène. Ce dernier n'a donc pas pu être inclus dans le criblage.

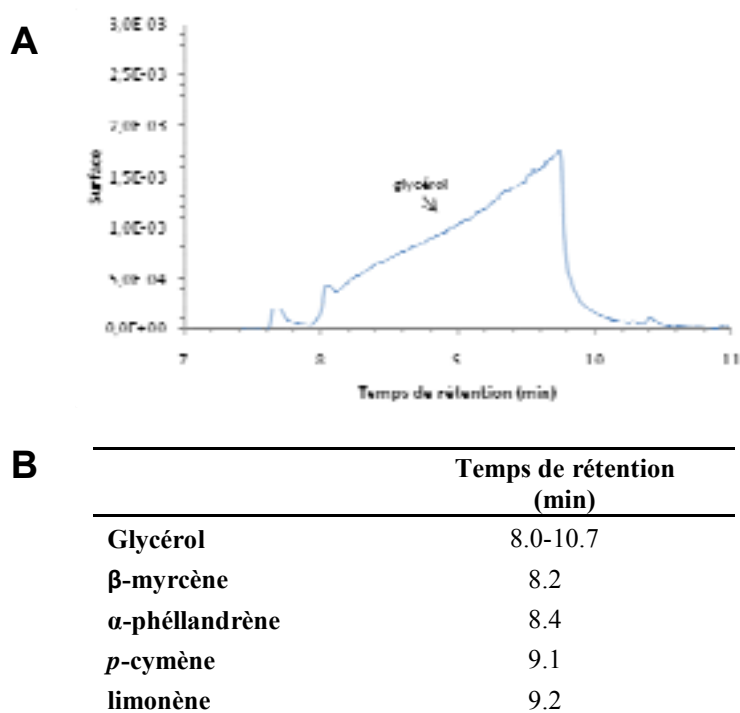
	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Log P
framboisone	412	2.04
aldéhyde anisique		
lavandulol	793	3.48
linalol	709	3.38
camphène	2.6	4.35
<i>p</i> -cymène	29	4.00
limonène	44	4.83
$\beta$ -myrcène	18	4.88
$\alpha$ -phéllandrène	37	4.62
$\beta$ -caryophyllène	0.6	6.30
$\alpha$ -cédrène	0.02	6.43
$\beta$ -farnésène	0.2	7.17
$\alpha$ -humulène	1.5	6.95
isolongifolène	0.02	6.12
nootkatène		
valencène	0.6	6.30

Tableau 13 : Solubilité dans l'eau et coefficient de partage (Log P) prédictifs des substrats sélectionnés d'après l'agence de protection environnementale des Etats-Unis (logiciel EPISuite™, modèles KowWin v1.67 et v1.01 est) (US-EPA, 2011).

(iii) Les propriétés des solvants d'extractions : la différence de polarité entre les oléfines apolaires et les molécules oxygénées plus polaires explique l'utilisation de solvants d'extraction aux index de polarités différents (Tableau 14). Le pentane n'étant pas soluble dans l'eau, son utilisation présente l'avantage d'éviter une étape de déshydratation et de concentration de la phase organique. D'autre part, le glycérol du tampon de conservation des microsomes (tampon TG), co-élue avec les monoterpènes oléfiniques sélectionnés (à l'exception du camphène) lorsqu'il est extrait à l'acétate d'éthyle (Figure 20) dans nos conditions d'analyses CPG.

	Solubilité dans l'eau (% w/w)	Index de polarité
Acétate d'éthyle	8.7	4.4
Pentane	0.004	0.0

Tableau 14 : Comparaison de la solubilité dans l'eau et de la polarité des solvants d'extraction utilisés pour le criblage d'activité enzymatique *in vitro* (O'Neil, 2006).



**Figure 20 : Co-élution du glycérol avec des monoterpènes oléfiniques lors de l'extraction à l'acétate d'éthyle de l'essai enzymatique *in vitro*.**

Le glycérol élué sous forme de plateau en CPG-SM après extraction à l'acétate d'éthyle de l'essai enzymatique *in vitro* (A). Les monoterpènes oléfiniques ont les mêmes temps de rétention que celui du glycérol dans nos conditions d'analyse (B).

L'influence des autres paramètres qui diffèrent entre les 2 protocoles de criblage tel que la concentration du tampon de réaction ou l'acidification en fin de réaction, n'a pas été testée. Dans chacune des conditions, des activités enzymatiques ont pu être détectées.

#### IV. Résultats du criblage d'activités enzymatiques *in vitro*

##### A. Résultats du criblage

Les résultats du criblage pour chaque couple P450-substrat sont résumés dans le Tableau 15.

P450s	Plante	Monoterpénoides						Sesquiterpénoides						Phénylpropanoïdes		Expression P450
		camphène	p-cymène	lavandulol	limonène	$\alpha$ -phélandrène	$\beta$ -caryophyllène	$\alpha$ -cédrene	$\beta$ -farnésène	$\alpha$ -humulène	isolongifolène	nootkatène	valencène	aldéhyde anisique	framboïsons	
CYP71A12	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A13	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A14	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A15	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A16	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A18	arabidopsis	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A19	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A20	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A24	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A27	Sel de cresson	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B6	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B14	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B15	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B19	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B22	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B23	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B24	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B26	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71B31	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D1	Pervenche de M.	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D4	Pomme de terre	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D14	Pétunia	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D48v1	Tabac	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D51v2	Tabac	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D98	Ammi élevé	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D177	Baki doux	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71D326	Ricin	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A54v2	Vigne	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71A104	Vigne	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71BE5	Vigne	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP71BC1	Vigne	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP73A1	Topinambour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP73A85	Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP73A27	Tabac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76C1	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76C2	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76C3	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76C4	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76C5	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76C6	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76C7	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76G1	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76B1	Topinambour	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP76B6	Pervenche de M.	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP706A1	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP706A2	arabidopsis	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP706A3	arabidopsis	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
CYP706A7	arabidopsis	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓

**Tableau 15 (ci-contre) : Résultats du criblage fonctionnel réalisé sur les microsomes de levure exprimant les P450s candidats avec les substrats sélectionnés pour la production de composés volatils fonctionnalisés.**

✓: activité enzymatique détectée pour un couple P450-substrat avec une conversion du substrat inférieure à 30 % (d'après les surfaces de pics observées en CPG) et expression fonctionnelle du P450 (d'après le spectre différentiel au CO). ✓: activité enzymatique détectée avec une conversion du substrat entre 30 % et 45 % (d'après les surfaces de pics observées en CPG). ✓: activité enzymatique détectée avec une conversion du substrat supérieure ou égale à 45 % (d'après les surfaces de pics observées en CPG). ! : différence d'absorbance observée à 420 nm lors de la mesure du spectre différentiel. - : aucune activité enzymatique détectée ou aucune différence d'absorbance lors de la mesure du spectre différentiel au CO détectée. Les fonds grisés représentent les couples P450s-substrat qui n'ont pas été criblés.

Sur 376 essais enzymatiques *in vitro* réalisés, la formation NADPH-dépendante de produit(s) a été détectée pour 105 essais (soit environ 28 %). De la majorité des activités enzymatiques résulte une faible conversion du substrat (encoches vertes et oranges dans le Tableau 15). Les couples enzyme-substrat correspondants n'ont donc pas été sélectionnés pour un essai enzymatique *in vivo*, excepté lorsque le produit attendu présentait un fort intérêt commercial.

Les analyses CPG-SM des activités enzymatiques non sélectionnées ne formant pas de produit attendu sont reportées en annexes (page 244). L'identification des produits par spectrométrie de masse (SM) est possible lorsqu'ils sont détectés en quantité suffisante et lorsqu'ils sont référencés dans la littérature ou dans les bases de données de SM, ou mieux lorsqu'un standard de référence est disponible.

Parmi les activités enzymatiques non sélectionnées, des produits utilisés dans l'industrie des arômes et du parfum comme le caryophyllène oxyde ou l'aldéhyde cumique ont été obtenus en faible quantité (pages 253 et 247, respectivement). Des produits inconnus, comme ceux résultant de l'incubation avec le camphène ou l' $\alpha$ -cédrène, sont susceptibles d'être de nouvelles molécules pour l'industrie des arômes et du parfum. Cependant, le pourcentage de conversion n'a pas été suffisant pour que les activités enzymatiques soient sélectionnées (pages 246 et 254, respectivement).

Le lavandulol est converti en hydroxylavandulol par des P450s de la famille CYP76s (page 249). Ce produit ne présente a priori aucun intérêt car son hydrophilicité est trop forte. En revanche, avec le recul des résultats récents obtenus au laboratoire (Höfer et al., manuscrit en préparation), l'hydroxylavandulol pourrait être converti en aldéhydes et dérivés cycliques volatils. La formation de ces composés n'a pas été explorée.

Le *p*-hydroxybenzaldéhyde n'a pas été obtenu par déméthylation de l'aldéhyde anisique. L'incubation des 4 P450s candidats (CYP73A1, CYP76C4, CYP76B1 et CYP76B6) avec l'aldéhyde anisique forme l'alcool anisique par réduction (page 260). Si certains P450s sont capables de réduire un aldéhyde en alcool (Amunom et al., 2011), il est possible que la réduction NADPH-dépendante soit catalysée par des enzymes propres à la levure. Une incubation de l'aldéhyde anisique avec des microsomes de levure non transformées permettrait de conclure.

Les 3 P450s d'Arabidopsis (CYP71B31, CYP76C3 et CYP706A3) qui présentent les plus forts coefficients de corrélation d'expression avec une terpène synthase, n'ont pas présenté de fortes activités enzymatiques avec les terpènes testés. Aucune différence d'absorption n'a été mesurée par spectrométrie différentielle au CO pour chacun d'entre eux, ce qui signifie qu'ils ne sont pas exprimés dans la levure ou qu'ils sont très faiblement exprimés. CYP76C3 et CYP71B31 n'ont pas montré d'activité enzymatique significative (page 247) et leurs activités enzymatiques mériteraient d'être testées dans un autre système d'expression. CYP706A3 catalyse la conversion de plusieurs mono- et sesquiterpènes. Ce P450 est co-exprimé avec la TPS11 responsable de l'émission d'une quinzaine de sesquiterpènes par les fleurs d'Arabidopsis, dont le (+)-thujopsène, le (+)- $\beta$ -chamigrene et le (+)- $\alpha$ -barabatène, principalement (Tholl et al., 2005). Ces substrats n'ont pas été testés au cours du criblage car ils ne sont pas disponibles dans le commerce. En revanche, la TPS11 forme de façon plus minoritaire du *E*- $\beta$ -farnésène, mais aucune activité enzymatique n'a été détecté lors de l'incubation de ce substrat avec CYP706A3.

Les deux molécules plus particulièrement ciblées ont été obtenues au cours du criblage. La frambinone a été formée en faible quantité en présence de CYP76s par déméthylation de la framboisone, comme nous allons le voir ci-dessous. La nootkatone a également été obtenue en faible quantité à partir du valencène et du nootkatène.

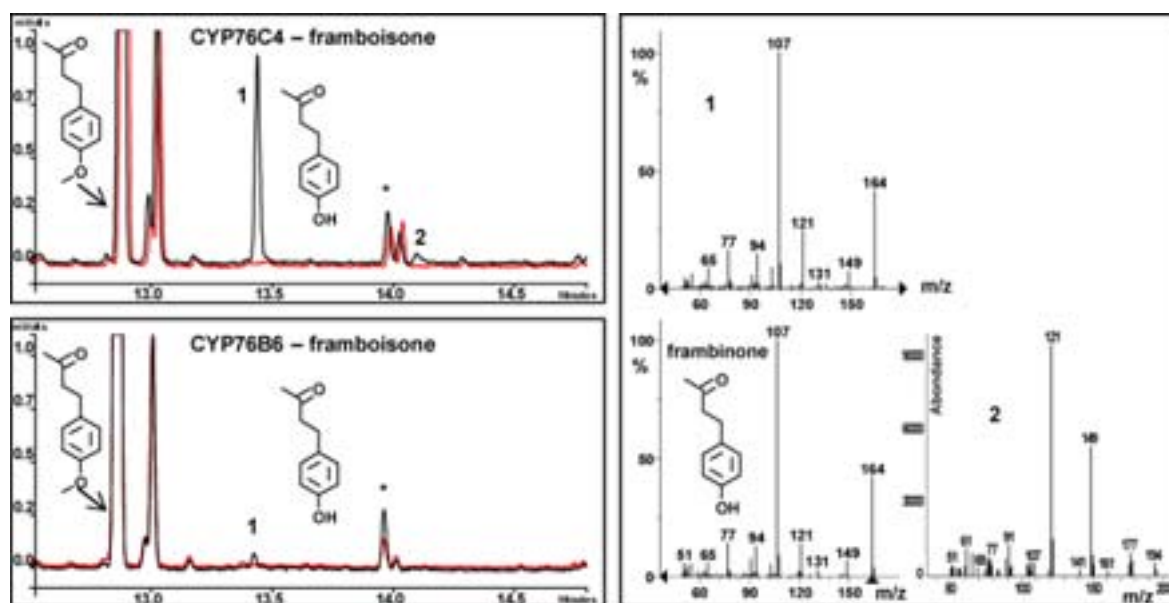
En tout, 5 couples P450-substrat ont montré une conversion supérieure ou égale à 45 % sur la base des surfaces de pics observées en CPG (encoches rouges dans le Tableau 15) : la conversion du limonène par CYP71A12 et CYP71A18, la conversion du valencène par CYP71D4 et CYP71D51v2, et la conversion du farnésène par CYP71D177.

Nous avons sélectionné les meilleurs couples P450-substrat pour la production de composés volatils sur la base d'un niveau élevé d'activité enzymatique et d'un nombre

(faible) de produits obtenus à partir des analyses CPG-SM et de la caractérisation des propriétés enzymatiques des plus fortes activités enzymatiques. Les faibles activités conduisant à la formation de frambinone et de nootkatone ont également fait l'objet d'investigations plus poussées.

## B. Couple P450-substrat sélectionné pour la production de frambinone

CYP76C4 et CYP76B6 convertissent 6,4 % et 0,5 % respectivement de framboisone en frambinone en 20 minutes, sur la base des surfaces de pics observées en CPG et dans les conditions du criblage (Figure 21). Un deuxième produit minoritaire (produit 2) avec une masse ionique de 194 m/z est également formé à partir de la framboisone (178 m/z). Ce composé pourrait être de la framboisone hydroxylée : un intermédiaire réactionnel hydroxylé est généralement formé avant déméthylation. Il est observé lors de la déméthylation des phénylurées par ces deux cytochromes (D. O'Keefe, communication personnelle).



**Figure 21 : Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* de CYP76C4 et CYP76B6 avec la framboisone**

Chromatogrammes CPG-DIF des essais enzymatiques avec NADPH en noir et sans NADPH en rouge. L'identification des produits s'est faite par comparaison du spectre de masse obtenu avec ceux de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) et ultérieurement avec celui d'un standard de référence (résultat non montré). 1 : frambinone ; 2 : produit inconnu pouvant être de la framboisone hydroxylé ; \* : produit potentiel non identifié.



Afin de déterminer l'efficacité catalytique de ces deux enzymes vis-à-vis de la framboisone, des cinétiques enzymatiques ont été réalisées en triplicat à partir d'une gamme de 6 concentrations différentes en framboisone. Alors que la représentation de Lineweaver-Burk est parfaitement linéaire dans le cas de CYP76B6, elle l'est moins dans le cas de CYP76C4 (Figure 22). La formation de frambinone catalysée par CYP76C4 semble ne pas se comporter de façon Michaelienne. Néanmoins, cette représentation permet d'obtenir un ordre de grandeur des constantes catalytiques de la réaction.

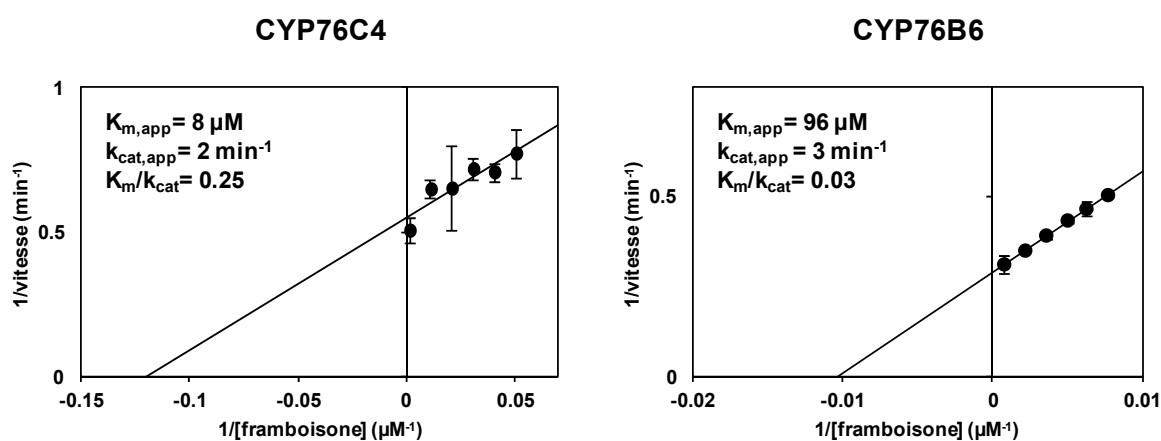


Figure 22 : Représentation Lineweaver-Burk des cinétiques enzymatiques de la conversion de la framboisone en frambinone par CYP76C4 et CYP76B6 et valeurs des paramètres catalytiques déduits

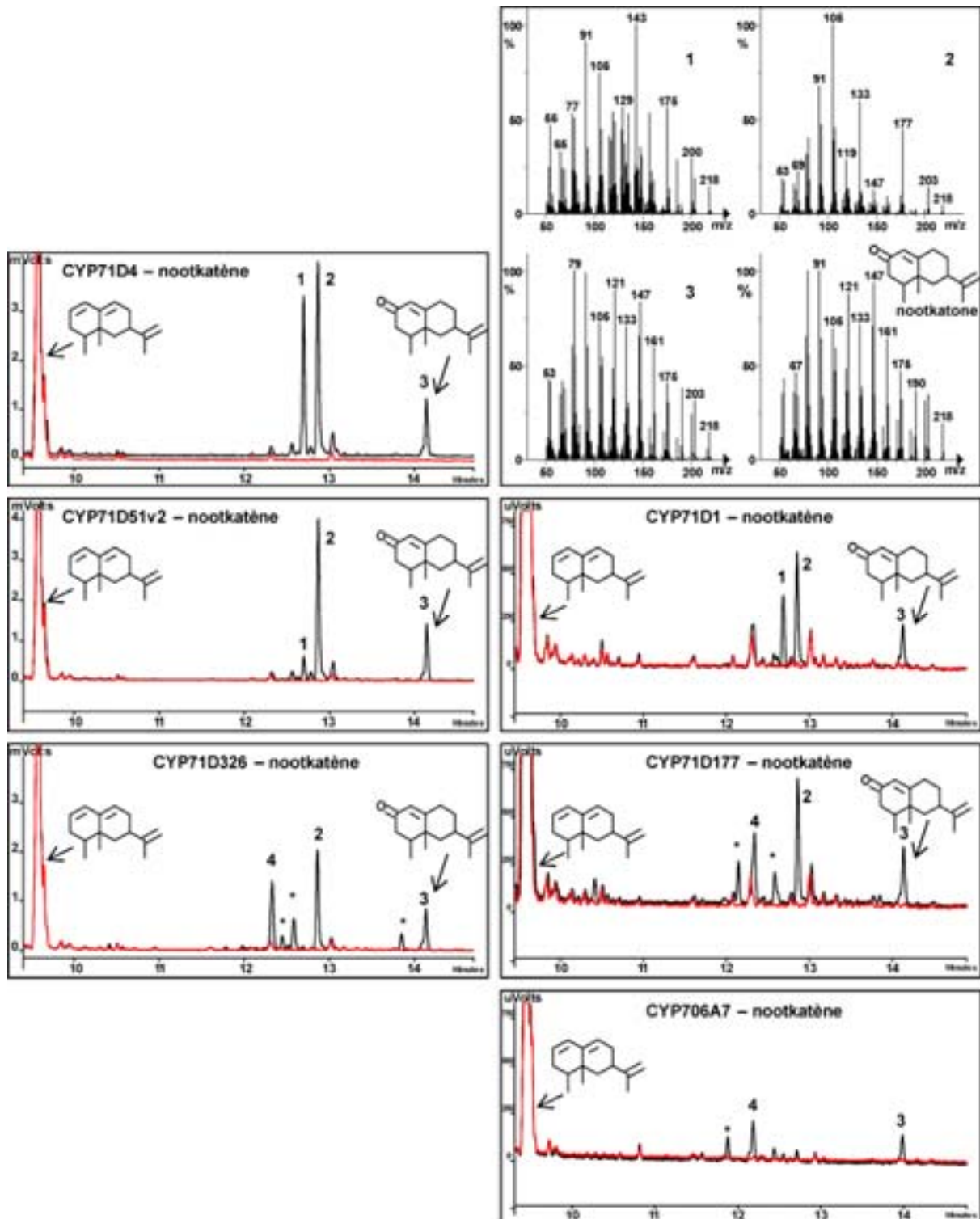
Malgré une vitesse de réaction lente ( $k_{cat,app} = 2 \text{ min}^{-1}$ ), l'activité enzymatique sera testée *in vivo* avec le candidat CYP76C4 qui présente la plus forte efficacité catalytique.

### C. Couples P450-substrat sélectionnés pour la production de nootkatone

La nootkatone est formée en faible quantité après incubation du valencène avec des microsomes exprimant CYP71D51v2, CYP71D4, CYP71D1 ou CYP71D326 (Chapitre 4 Figures 2 et S30, pages 132 et 170, respectivement). Plus de 70 % du valencène est converti de la même manière par CYP71D51v2 et CYP71D4 ce qui constitue la plus forte activité détectée au cours du criblage. Le produit principal de ces deux P450s a été identifié comme étant du  $\beta$ -nootkatol, l'alcool correspondant à la nootkatone, d'après la comparaison des temps de rétention et des spectres de masse avec ceux d'un standard de synthèse. De faibles quantités de nootkatone sont également obtenues (1,4 % avec CYP71D51v2 et 0,8 % avec CYP71D4, sur la base des surfaces de pics observées en CPG). Ces deux P450s ont été

sélectionnés pour la prochaine étape. Les propriétés catalytiques de CYP71D51v2 avec le valencène et le  $\beta$ -nootkatol sont détaillées dans le chapitre 4 (page 110).

CYP71D51v2, CYP71D4, CYP71D1 et CYP71D326 convertissent également la nootkatène en nootkatone, ainsi que CYP71D177 et CYP706A7 (Figure 23). Cette conversion est toutefois très faible.



**Figure 23 (au dos) : Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats catalysant la formation de nootkatone à partir du nootkatène**

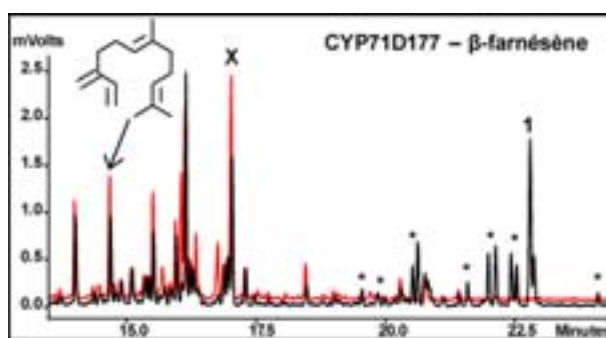
Chromatogrammes CPG-DIF des essais enzymatiques avec NADPH en noir et sans NADPH en rouge. Les produits les plus récurrents avec les mêmes temps de rétention sont numérotés et leurs spectres de masse sont représentés, à l'exception du spectre de masse du produit 4 qui n'a pas pu être obtenu. Les autres produits sont marqués d'une étoile. L'identification de la nootkatone s'est faite par comparaison du spectre de masse obtenu avec celui du standard de synthèse. Les produits 1 et 2 n'ont pas pu être identifiés.

CYP71D51v2 et CYP71D4 catalysent la formation de nootkatone en quantités comparables (2,6 % sur la base des surfaces de pics observées en CPG). Ces deux P450s ont donc été sélectionnés pour la bioconversion du nootkatène en nootkatone. Alors que CYP71D4 et CYP71D51v2 métabolisent le valencène de façon similaire, CYP71D51v2 est plus régiosélectif que CYP71D4 vis-à-vis du nootkatène. Les produits 1 et 2 ont une masse ionique de 218 m/z et peuvent être soit des cétones soit des époxydes.

**D. Couple P450-substrat sélectionné pour une forte activité catalytique**

Les conversions du limonène par CYP71A12 et CYP71A18 et du farnésène par CYP71D177 sont supérieures à 45 %.

Une multitude de produits sont formés après incubation de microsomes exprimant CYP71D177 en présence d'un extrait végétal contenant du  $\beta$ -farnésène fourni par MANE (Figure 24). Leurs formations sont NADPH-dépendantes.



**Figure 24 : Analyse CPG de la conversion *in vitro* d'un extrait végétal contenant du  $\beta$ -farnésène par CYP71D177**

Chromatogrammes CPG-DIF des essais enzymatiques avec NADPH en noir et sans NADPH en rouge. L'extrait de l'incubation sans NADPH est plus concentré que celui avec NADPH. 1 : produit principal ; \* : produits secondaires.

Le produit principalement obtenu n'a pas pu être identifié. Il est possible qu'il soit issu de la conversion de la molécule X qui est également inconnue et dont la surface du pic

correspondant en CPG diminue. Etant donné la pureté insuffisante du substrat et du produit, ce couple P450-substrat n'a pas été sélectionné.

Le limonène est converti par CYP71A12 et CYP71A18 en aldéhyde et alcool de périllyle, en *p*-menth-1-èn-9-al et en limonène-8,9-époxyde (Figure 28, page 180) avec un pourcentage de conversion égale à 42 % et 52 % respectivement (sur la base des surfaces de pics observées en CPG). Les paramètres catalytiques vont être déterminés très prochainement. Ces deux P450s ont été sélectionnés pour les essais enzymatiques *in vivo*.

## V. Résultats des essais enzymatiques *in vivo* : bioconversion dans 1 mL

Les activités enzymatiques suivantes ont été testées par incubation de levure entière exprimant le P450 : la conversion de la framboisone en frambinone par CYP76C4, la conversion du valencène et du nootkatène en nootkatone par CYP71D51v2 et CYP71D4 et la conversion du limonène par CYP71A12 et CYP71A18. Les essais ont été réalisés dans un volume de 1 mL de culture de levure en phase stationnaire concentrée 10 fois en levure pendant 5 h.

### A. Bioconversion de la framboisone

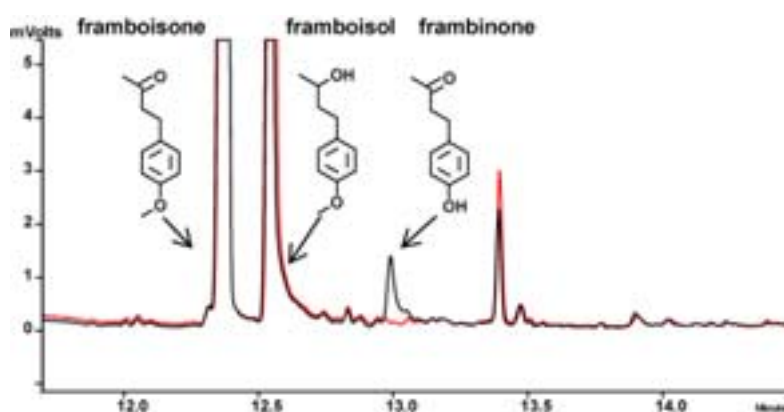


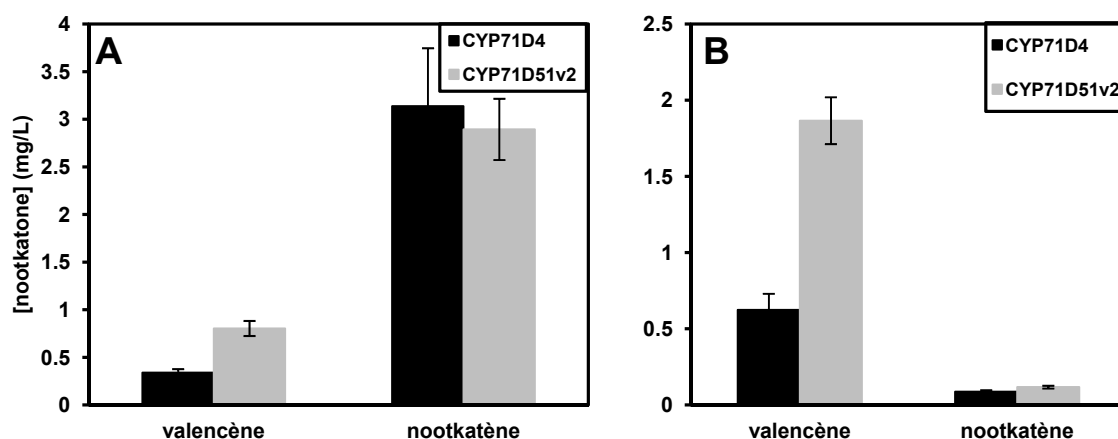
Figure 25 : Analyses CPG de la bioconversion de la framboisone par la levure exprimant CYP76C4

Chromatogrammes CPG des essais de bioconversion avec la levure exprimant CYP76C4 (en noir) ou le vecteur pYeDP60u2 (en rouge) après 5h d'incubation en présence de 200  $\mu$ M de framboisone dans un volume de 1 mL. La culture de levure a été concentrée 10 fois. L'identification des produits s'est faite par comparaison des spectres de masse obtenus et non montrés avec ceux de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) et du standard de frambinone.

Après 5 h d'incubation en présence de 200  $\mu\text{M}$  de framboisone, on observe une faible formation de frambinone en présence de levure exprimant CYP76C4. Le coproduit non-désiré framboisol est formé avec ou sans expression de CYP76C4. Une enzyme propre à la levure est donc responsable de la réduction du groupe cétone de la framboisone en alcool. Ainsi, seulement 1,4 % de la framboisone est convertit en frambinone et 26 % est convertit en framboisol par la levure exprimant CYP76C4, ce qui ne permet pas d'envisager une exploitation industrielle de cette souche de levure.

## B. Bioconversion du valencène et du nootkatène

La formation de nootkatone a été mesurée après 5 h d'incubation avec des levures exprimant CYP71D4 ou CYP71D51v2 en présence de 200  $\mu\text{M}$  (soit environ 40 mg/L) de valencène ou de nootkatène.



**Figure 26 : Sélection du meilleur couple P450-substrat pour la production de nootkatone en comparant les quantités de nootkatone formées par les microsomes de levure (A) ou par la levure (B) exprimant CYP71D51v2 ou CYP71D4 en présence de valencène ou de nootkatène**

La nootkatone est dosée après conversion de 100  $\mu\text{M}$  (soit environ 20 mg/L) de valencène ou de nootkatène en 20 min par les microsomes de levure exprimant CYP71D51v2 ou CYP71D4 (A). La nootkatone est dosée après conversion de 200  $\mu\text{M}$  (soit environ 40 mg/L) de valencène ou de nootkatène en 5 h par la levure exprimant CYP71D51v2 ou CYP71D4 dans un volume de 1 mL, après concentration de la levure 10 fois.

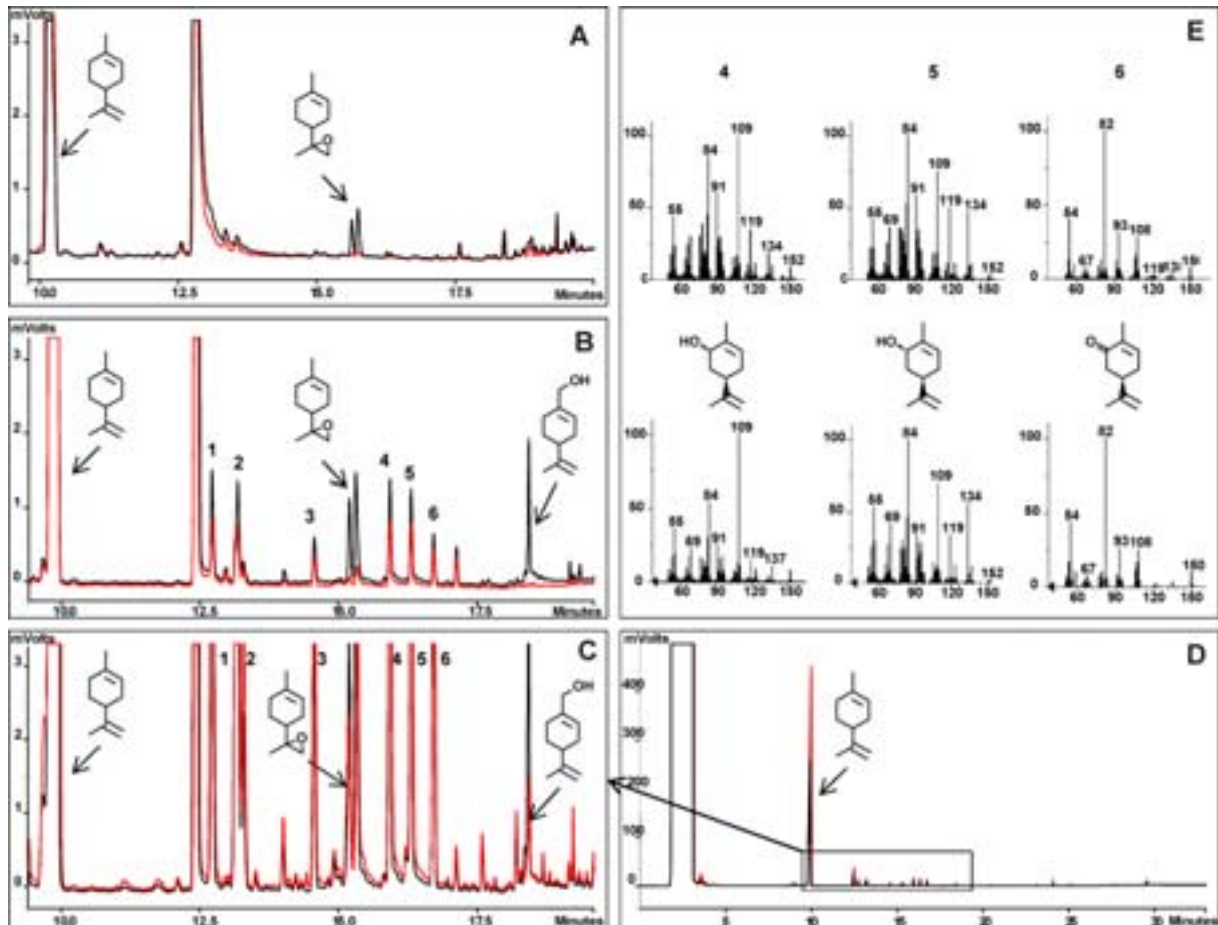
Alors que la formation de nootkatone est plus importante à partir du nootkatène qu'à partir du valencène dans un essai enzymatique *in vitro* (Figure 26A), c'est le valencène qui est convertit plus fortement en nootkatone lors d'un essai de bioconversion *in vivo* (Figure 26B). Les résultats obtenus ultérieurement ont montré que la production de nootkatone au cours de la bioconversion *in vivo* du valencène provient de la conversion du  $\beta$ -nootkatol en nootkatone

par des enzymes propres à la levure. Cela explique la plus faible quantité de nootkatone obtenue lors de la bioconversion du nootkatène qui dépendant uniquement du P450.

La production de nootkatone *in vivo* est plus importante en présence de CYP71D51v2. Cette différence correspond apparemment à la meilleure expression de CYP71D51v2 détectée par spectre différentiel au CO (Chapitre 4, Figure 1, page 131).

La bioconversion du valencène pour la production de nootkatone par la levure exprimant CYP71D51v2 a donc été sélectionnée pour faire l'objet d'un étude plus poussée et d'essais d'optimisation. Les résultats ont fait l'objet d'une publication reportée dans le chapitre 4 (page 109).

### C. Bioconversion du limonène



**Figure 27 : Analyses CPG-SM de la bioconversion du limonène par la levure exprimant CYP71A12 ou CYP71A18**

Chromatogrammes CPG des essais de bioconversion par la levure exprimant CYP71A12 ou CYP71A18 (en noir) ou le vecteur pYeDP60u2 (en rouge) après 5 h d'incubation en présence de 200  $\mu$ M (A), 1 mM (B) ou 10 mM (C et D) de limonène dans un volume de 1 mL. La culture de levure a été concentrée 10 fois. Le chromatogramme C

est un zoom du chromatogramme D. L'identification des produits s'est faite par comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011). Les spectres de masse des produits 1, 2 et 3 ne sont pas montrés. Les structures des produits obtenus en commun avec ceux obtenus lors des essais enzymatiques *in vitro* (limonène-8,9-époxyde et l'alcool de périllyle) sont représentées. 1 et 3 : inconnu ; 2 : *p*-menth-2,8-dièn-1-ol ; 4 et 5 : carvéol ; 6 : carvone.

Après 5 h d'incubation en présence de 200  $\mu$ M de limonène, on observe la formation de limonène-8,9-époxyde par la levure exprimant CYP71A12 (Figure 27A). Les autres produits formés au cours de l'essai enzymatique *in vitro* (Figure 28, page 180) ne sont pas détectés après bioconversion. Afin d'augmenter la quantité de limonène-8,9-époxyde produite, l'essai de bioconversion *in vivo* a été réalisé avec des concentrations plus fortes en limonène : 1 mM et 10 mM, soit environ 136 mg/L et 1,36 g/L (Figure 27B et Figure 27C, respectivement). Après extraction, on observe un ensemble de dérivés du limonène (produits 1, 2, 3, 4, 5 et 6) comprenant entre autre le carvéol et la carvone formés par la levure avec ou sans expression de P450. Ces produits sont en quantités d'autant plus fortes que la concentration initiale en limonène augmente. Une enzyme propre à la levure pourrait être responsable de leur formation. On notera que l'alcool de périllyle, produit formé lors de l'essai enzymatique *in vitro*, est détecté après bioconversion en présence de 1 mM et 10 mM de limonène. La bioconversion efficace du limonène par CYP71A12 et CYP71A18 en limonène-8,9-époxyde ne peut donc pas être réalisée avec la souche hôte *Saccharomyces cerevisiae* WAT11.

## VI. Discussion et perspectives

### A. Efficacité du criblage

L'ensemble des paramètres choisis pour le criblage (couples P450s-substrats candidats, système d'expression hétérologue et conditions de criblage) ont permis de détecter au moins une activité enzymatique pour 52 % des P450s candidats et un produit dérivé pour chaque substrat (excepté le  $\beta$ -myrcène). Cela valide la stratégie de sélection des P450s candidats et tend à conforter l'hypothèse que les P450s sélectionnés sont susceptibles d'être impliqués dans le métabolisme des terpènes *in planta*. Cependant, la quasi-totalité des activités enzymatiques détectées ne sont pas assez fortes pour envisager un procédé industriel de bioconversion.

La faible efficacité enzymatique peut s'expliquer par le choix de la molécule à fonctionnaliser qui n'est pas le substrat enzymatique naturel et/ou par le système d'expression de l'enzyme et les conditions de criblage qui ne sont pas optimisées pour chaque couple P450-substrat (microsomes de levure, température d'incubation, solvant d'extraction...). Le substrat naturel de P450s comme CYP71D177 et CYP71BC1, qui s'expriment correctement dans la levure et qui métabolisent *in vitro* des mono- et/ou des sesquiterpènes, pourrait être identifié par des analyses *in planta* (analyses de profils métaboliques pour identifier les constituants et composés volatils majeurs des lignées sauvage et mutante en utilisant par exemple la technique de "Virus-Induced Gene Silencing" (VIGS)).

En dépit d'une absence d'un pic d'absorption à 450 nm, la moitié des P450s présentent une activité enzymatique dans ces conditions de criblage et sont manifestement fonctionnels. L'absence de pic d'absorption à 450 nm peut s'expliquer par une très faible expression fonctionnelle du P450 dans la levure ou encore par une mauvaise affinité de certaines protéines pour le CO. L'activité enzymatique de ces P450s (P450s issus de la vigne, par exemple) mériterait d'être testée dans un système d'expression autre que la souche de levure *S. cerevisiae* WAT11.

## B. Difficultés rencontrées lors de la bioconversion de composés volatils

Les activités enzymatiques *in vitro* les plus intéressantes ont été testées par bioconversion avec la levure entière. Aucun essai n'a permis la production de quantités industriellement suffisantes de produits résultants de l'activité du P450 de plante. Les principales difficultés rencontrées sont la métabolisation du substrat par la souche hôte en coproduit non-désirés ou multiples, et le faible taux de bioconversion.

Dans le cas de la bioconversion de la framboisone, l'efficacité catalytique du P450 pourrait être optimisée par mutagenèse dirigée après l'étude de son site catalytique. L'identification de l'enzyme responsable de la formation du framboisol par la levure permettrait d'envisager une stratégie de suppression de l'expression du gène correspondant. On pourrait aussi envisager l'expression du P450 dans un microorganisme ne produisant pas de framboisol.



Malgré une importante conversion *in vitro*, le taux de bioconversion du limonène par la levure exprimant CYP71A12 et CYP71A18 reste faible. Cela peut s'expliquer par l'expression limitée du P450 dans la levure ou par un temps d'incubation trop court (5 h). Une optimisation du procédé de bioconversion pourrait permettre la production de plus grandes quantités de produits. Si les codons de la séquence génomiques de CYP71A18 ont été optimisés pour l'expression dans la levure, cela n'a pas été le cas pour CYP71A12 qui provient d'un clonage. Son expression est d'ailleurs 2 fois plus faible (4 nmol/ml pour CYP71A18 et 2 nmol/ml pour CYP71A12). L'expression stable du P450 par intégration chromosomique dans la levure pourrait également améliorer l'expression de l'enzyme. De plus, il a été démontré que la production d'acide artémisinique provoque un stress oxydatif chez la levure responsable de la diminution de la stabilité du plasmide exprimant les enzymes de biosynthèse de l'acide artémisinique (Ro et al., 2008).

Des effets cytotoxiques des monoterpènes ont été mesurés et peuvent aller jusqu'à provoquer la lyse cellulaire par interaction avec les membranes (Sikkema et al., 1994, 1995). L'apparition des dérivés du limonène en l'absence d'expression de CYP71A18 est probablement une réponse de la levure à un effet cytotoxique du limonène présent en forte concentration. Il est également possible que ces dérivés proviennent d'une instabilité du limonène. En effet, les monoterpènes sont des molécules instables capables de s'auto-oxyder de façon spontanée sous l'action de divers facteurs comme la lumière, la température ou le pH (Anandaraman and Reineccius, 1986; Van der Werf et al., 1997).

Le faible taux de bioconversion du limonène par la levure exprimant CYP71A12 et CYP71A18 pourrait également être dû à une inhibition par le produit. En effet, le limonène-8,9-époxyde inhibe la conversion du limonène dans le procédé utilisant la souche *Xanthobacter* sp. C20 (van der Werf et al., 2000). De plus, des résultats ultérieurs suggèrent une inhibition de la conversion de l'alcool de périllyle en aldhyde par le substrat (Figure 29, page 183). Des tests de toxicité sur la levure ainsi que l'étude de l'affinité de CYP71A12 pour chacun des produits (par spectrophotométrie différentielle selon la technique décrite par Jefcoate (1978) qui permet d'observer un pic d'absorption après formation du complexe enzyme-inhibiteur) permettraient de conclure.

L'utilisation d'une souche résistante au limonène et favorable à l'expression du P450 et de sa réductase est envisageable pour optimiser les rendements de conversion. Par exemple, l'optimisation de la production d'alcool de périllyle par un P450 issu de *Mycobacterium* sp. a

permis la production de plusieurs grammes par litre du composé volatil fonctionnalisé (Van Beilen et al., 2005). Le P450 bactérien a été exprimé dans une souche résistante aux alcanes, capable d'utiliser le *n*-octane comme source de carbone et présentant une plus forte expression du P450 que dans la souche initialement utilisée (*E. coli*). Certaines souches de levures, comme *Candida tropicalis* (Duvnjak et al., 1970), sont décrites comme pouvant utiliser les alcanes comme sources de carbone.



## Chapitre IV

# Etude de la bioconversion du valencène par *S. cerevisiae* exprimant CYP71D51v2



## Chapitre 4: Etude de la bioconversion du valencène par *S. cerevisiae* exprimant CYP71D51v2

### I. Présentation de l'article

Les potentialités du meilleur candidat résultant du criblage ciblé sur la production de nootkatone ont été étudiées plus en détail. Un premier essai de bioconversion dans un volume de 100 mL a été réalisé. Après 24 h d'incubation en présence de valencène à 400  $\mu$ M (soit environ 80 mg/L), 5 mg/L de  $\beta$ -nootkatol et 3 mg/L de nootkatone ont été obtenus. Pour un procédé industriellement viable, il est nécessaire d'en produire 1 g/L. La bioconversion de concentrations plus élevées de valencène a donc été testée. La quantité de produits obtenus n'a cependant pas pu être améliorée : celle-ci diminue avec l'augmentation de la concentration en substrat. Nous avons donc cherché à comprendre les raisons de cette faible conversion et plusieurs facteurs limitants ont été mis en évidence. Le premier facteur est la toxicité des produits pour la levure à partir de 100 mg/L. Le  $\beta$ -nootkatol piégé dans les membranes constitue le deuxième facteur limitant. L'inhibition de la réaction d'hydroxylation du valencène par les 2 produits est le dernier facteur limitant. Enfin, la formation de nootkatone s'est révélée être dépendante des enzymes propres à la levure.

Dans cet article, nous avons mis en évidence les facteurs limitant la production de nootkatone lors de la bioconversion du valencène par la levure exprimant CYP71D51v2. Ces facteurs sont susceptibles d'apparaître pour tout procédé de production de terpène fonctionnalisé par un P450 exprimé dans la levure ou un autre organisme. Des stratégies sont proposées pour obtenir un procédé industriellement viable.

II. Article intitulé : challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by *Saccharomyces cerevisiae*

L'article qui suit a été soumis le 9 novembre 2012 dans le journal intitulé "Metabolic Engineering" et il est actuellement en phase d'évaluation. Les références sont les suivantes :  
Gavira, C., Höfer, R., Lesot, A., Lambert, F., Zucca, J., 2013. Challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by *Saccharomyces cerevisiae*. Metab. Eng. submitted.

## **Challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by *Saccharomyces cerevisiae***

**Carole Gavira<sup>a</sup>, René Höfer<sup>a</sup>, Agnès Lesot<sup>a</sup>, Fanny Lambert<sup>b</sup>, Joseph Zucca<sup>b</sup> and Danièle Werck-Reichhart<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Plant Molecular Biology of CNRS UPR2357, University of Strasbourg, 28 rue Goethe, F-67083 Strasbourg Cedex, France.*

<sup>b</sup>*Laboratoire de Recherche en Biotechnologies, V. MANE & Fils, Bar-Sur-Loup, France.*

**Email addresses:** [carole.gavira@ibmp-cnrs.unistra.fr](mailto:carole.gavira@ibmp-cnrs.unistra.fr), [rene.hofer@ibmp-cnrs.unistra.fr](mailto:rene.hofer@ibmp-cnrs.unistra.fr), [Fanny.LAMBERT@MANE.com](mailto:Fanny.LAMBERT@MANE.com), [Joseph.ZUCCA@MANE.com](mailto:Joseph.ZUCCA@MANE.com), [daniele.werck@ibmp-cnrs.unistra.fr](mailto:daniele.werck@ibmp-cnrs.unistra.fr)

**\* Corresponding author. Tel: +33 368 851 854, Fax: +33 368 851 921**

### **Abstract**

Natural nootkatone is a high value ingredient for the flavor and fragrance industry because of its grapefruit flavor/odour, low sensorial threshold and low availability. Valencene conversion into nootkatol and nootkatone is known to be catalyzed by cytochrome P450 enzymes from both prokaryotic and eukaryotic organisms, but so far development of a viable bioconversion process using either native microorganisms or recombinant enzymes was not successful. Using an *in silico* gene-mining approach, we selected 4 potential candidate P450 enzymes from higher plants and identified two of them that selectively converted (+)-valencene into  $\beta$ -nootkatol with high efficiency when tested using recombinant yeast microsomes *in vitro*. Recombinant yeast expressing CYP71D51v2 from tobacco and a P450 reductase from *arabidopsis* was used for optimization of a bioconversion process. Bioconversion assays led to production of  $\beta$ -nootkatol and nootkatone, but with low yields that decreased upon increase of the substrate concentration. The reasons for this low bioconversion efficiency were further investigated and several factors potentially hampering industry-compatible valencene bioconversion were identified. One is the toxicity of the products for yeast at concentrations exceeding 100 mg.L<sup>-1</sup>. The second is the accumulation of  $\beta$ -nootkatol in yeast endomembranes. The third is the inhibition of the CYP71D51v2 hydroxylation reaction by the



products. Furthermore, we observed that the formation of nootkatone from  $\beta$ -nootkatol is not P450-dependent but catalyzed by a yeast component. Based on these data, we propose new strategies for implementation of a viable P450-based bioconversion process.

**Keywords:** (+)-valencene, nootkatone, oxidation, cytochrome P450, bioconversion, *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. Introduction

(+)-Nootkatone has organoleptic properties highly valuable for the flavor and fragrance industry. It is extensively used as ingredient, mainly for its grapefruit flavor and its low perception threshold (Haring et al., 1972). Present in trace amounts in plants, it is one of the constituents of Alaska cedar heartwood (*Chamaecyparis nootkatensis*; Barton, 1976), vetiver (*Vetiveria zizanioides*; Andersen, 1970) and of some citrus (Citrus; MacLeod JR and Buigues, 1964) oils. Industrial needs have currently to be met by chemical synthesis, mainly from the corresponding sesquiterpene hydrocarbon (+)-valencene, readily available from orange industry, using unsafe oxidizing agents like *tert*-butyl peracetate (Wilson III and Shaw, 1978) or *tert*-butyl hydroperoxide in combination with surface-functionalized silica-supported metal catalysts (Salvador and Clark, 2002). The resulting (+)-nootkatone thus cannot be marketed as a “natural” product and does not satisfy the increasing demand of natural aromatic compounds.

In order to match this demand, many efforts have been invested in biotechnological processes using bacteria, fungi or plants (reviewed in Fraatz et al., 2009). Several of these involve enzymes from the superfamily of cytochrome P450 monooxygenases, well documented for introducing an oxygen atom into an allyl group and prime candidates for converting (+)-valencene into (+)-nootkatone. The identification of efficient and regioselective P450 enzymes matching industrial requirements for achieving this task nevertheless remains a challenge. A screening of 125 bacterial P450 enzymes led to the selection of one best candidate, CYP109B1 from *Bacillus subtilis* (Girhard et al., 2009), but the reaction suffered of the formation of multiple over-oxidized products. Those are likely to appear when the active site allows different binding orientations for the substrate, as suggested for P450<sub>BM-3</sub> from *Bacillus megaterium* engineered to metabolize (+)-valencene (Sowden et al., 2005).

Conversely, P450<sub>cam</sub> mutants from *Pseudomonas putida* were more selective but less active. The use of P450 inhibitors also suggested P450-dependence of the (+)-valencene to  $\alpha$ -nootkatol and (+)-nootkatone conversion by cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*. In this case again, a large proportion of further oxygenated odorless compounds was obtained (Kaspera et al., 2005). Plant cytochromes P450, which are assumed to be involved in (+)-nootkatone biosynthesis *in planta* (Del Rio et al., 1992), seem to metabolize (+)-valencene with both regioselectivity and high efficiency. CYP71AV8 from chicory roots (*Cichorium intybus*) co-expressed with a valencene synthase from *Citrus sinensis* in yeast resulted in the formation of  $\beta$ -nootkatol as the main product (Cankar et al., 2011), whereas (+)-nootkatone was the major product from a chicory roots microsomes assay (De Kraker et al., 2003). Around 1 mg.L<sup>-1</sup> nootkatol and 0.04 mg.L<sup>-1</sup> (+)-nootkatone was obtained from a recombinant CYP71AV8-expressing yeast culture. CYP71D55, a prenaspirodiene oxygenase from *Hyoscyamus muticus*, was also found to catalyze the conversion of valencene to  $\beta$ -nootkatol more efficiently than prenaspirodiene oxidation. This efficiency has been further improved by targeted mutagenesis modifying amino acids located in regions of the active site involved in substrate recognition, but yields from recombinant yeast bioconversion were not reported (Takahashi et al., 2007).

Despite these encouraging results, no industrial process exploiting plant P450 enzymes has emerged so far. Our aim was to select a plant P450 catalyzing the conversion of (+)-valencene into nootkatol and (+)-nootkatone with good efficiency and regioselectivity, and to optimize the production of (+)-nootkatone in engineered yeast using a bioconversion process. By a gene mining approach, we selected among candidates a novel plant P450 catalyzing efficient conversion of (+)-valencene into  $\beta$ -nootkatol and dissected the factors limiting P450-dependent (+)-valencene bioconversion in recombinant yeast. Based on these data, we can propose further strategies that may lead to economically viable P450-catalyzed bioconversion of (+)-valencene into (+)-nootkatone.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Sesquiterpenoids*

(+)-Valencene,  $\beta$ -nootkatol, (+)-nootkatone, (-)-nootkatene and isolongifolene were provided by V. Mane Fils (Le Bar-sur-Loup, France). (+)-Valencene and (-)-nootkatene were obtained by distillation of Valencia orange peel (*Citrus sinensis*) and Alaska cedar heartwood

(*Chamaecyparis nootkatensis*) essence oil, respectively. (+)-Nootkatone was synthesized by (+)-valencene oxidation (Wilson III and Shaw, 1978).  $\beta$ -Nootkatol was synthesized by reduction of (+)-nootkatone with lithium aluminum hydride as previously described (Shaffer et al., 1975).

Structures and stereochemistry of (+)-valencene, (-)-nootkatene, (+)-nootkatone and  $\beta$ -nootkatol were confirmed by NMR (Supplementary information, Figs. S1 to S24 and Table S1 to S4). The spectra of (+)-valencene, (+)-nootkatone and (-)-nootkatene were recorded on a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer, at 14.09 Tesla, at the resonating frequencies of 600.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 150.90 MHz for  $^{13}\text{C}$ , using a BBI Bruker 5 mm gradient-probe. The temperature was regulated at 298 K and no spinning was applied to the NMR tube. The spectra of  $\beta$ -nootkatol were recorded on a Bruker Avance II 500 MHz spectrometer, at 11.75 Tesla, at the resonating frequencies of 500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.76 MHz for  $^{13}\text{C}$ , using a DCH Bruker 5 mm gradient - cryoprobe. The temperature was regulated at 300 K. Every compound was analyzed using the following series of experiments in  $\text{CDCl}_3$ : 1D  $^1\text{H}$  acquisition sequence, 1D  $^{13}\text{C}$  decoupled from  $^1\text{H}$  acquisition sequence, Double quantum 2D homonuclear shift correlation using gradient pulses for selection - COSY (Ancian et al., 1997), 2D homonuclear correlation via dipolar coupling – NOESY (Jeener et al., 1979), 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation via double INEPT transfer with decoupling during acquisition and with multiplicity editing - HSQC (Parella et al., 1997), 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation via heteronuclear zero and double quantum coherence with low-pass J filter - HMBC (Cicero et al., 2001).

## 2.2. Genes sequences, plasmid insertion and yeast strain

The complete cds sequences of *CYP71D51v2*, *CYP71D4*, *CYP71D1*, and *CYP71D326* are available from the NCBI or GenBank Nucleotide databases under the accession numbers DQ350345, AJ296346, EU541505 and XM\_002522675, respectively. They were optimized for yeast expression (Supplementary information, Figs. S25 to S28) and synthesized by GeneCust Europe (Dudelange, Luxembourg). Alignment of protein sequence with CYP71AV8 (GenBank ID: HQ166835) and CYP71D55 (GenBank ID: EF569601) was carried out using Clustal W with BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999). The USER<sup>TM</sup> cloning technique (Nour-Eldin et al., 2006) was used to insert *CYP71D51v2* into the USER compatible yeast expression vector pYeDP60u2 (Höfer et al., submitted). The *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 strain, expressing the ATR1 cytochrome P450 reductase from *Arabidopsis*

*thaliana* under the galactose-inducible and promoter *GAL10-CYC1*, is a gift from Dr. D. Pompon (Urban et al., 1997).

### *2.3. Heterologous expression in yeast and isolation of microsomal membranes*

The WAT11 yeast strain was transformed with pYeDP60u2 harboring *CYP71D51v2*, *CYP71D4*, *CYP71D1* or *CYP71D326* sequences as described (Gietz et al., 1992). A transformed colony was grown at 28 °C for 17 h in 30 mL of minimum SGI medium (1 g.L<sup>-1</sup> bactocasamino acids, 7 g.L<sup>-1</sup> yeast nitrogen base, 20 g.L<sup>-1</sup> glucose and 20 mg.L<sup>-1</sup> tryptophan). The culture was diluted 10 times in YPGE (10 g.L<sup>-1</sup> bactopectone, 10 g.L<sup>-1</sup> yeast extract, 15 g.L<sup>-1</sup> glucose and 3 % ethanol by volume). After 30 h at 28 °C, the medium was replaced by the same volume of YPI medium (10 g.L<sup>-1</sup> bactopectone, 10 g.L<sup>-1</sup> yeast extract, 20 g.L<sup>-1</sup> galactose) for galactose induction of gene expression at 28 °C for approximately 17 h.

Microsomes were prepared on ice. Yeast cells harvested from 200 mL culture by centrifugation at 7000 rpm for 10 min at 4 °C were washed with TEK buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, EDTA 1 mM, KCl 100 mM) and resuspended in 2 mL of TES (50 mM Tris-HCl pH 7.5, EDTA 1 mM, sorbitol 600 mM) supplemented with 4.7 mM of 2-mercaptoethanol and 10 g.L<sup>-1</sup> bovine serum albumin, fraction V (buffer A). In a 50 mL Falcon tube, glass beads (0.4 - 0.6 mm diameter, Sartorius, Germany) were added until skimming the top of the cell suspension. Cells were broken by handshaking 5 times for 1 min. Beads were washed twice with 25 mL of the buffer A. Cell debris and cell walls were removed by 10 min centrifugation of the pooled extract at 7,500 rpm and 4 °C. After filtration on Miracloth (22-25 µm pore size, Calbiochem, Maryland), the microsomal membranes were recovered by 45 min ultracentrifugation at 30,000 rpm and 4 °C. Pellets, corresponding to the microsomal fraction, were resuspended in TG buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 30 % glycerol by volume) with a Potter-Elvehjem homogenizer. Aliquots of 200 µl were stored at -20 °C.

### *2.4 Differential spectroscopy*

Measurements were carried out on a Cary 300 UV-Vis spectrophotometer (Varian, Les Ulis, France) at room temperature. Difference spectra were recorded from Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-reduced microsomes in TG buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 30 % glycerol by volume). A baseline was measured with reduced microsomes in the two cuvettes before saturation of the sample cuvette with CO. Differential absorbance was then recorded from 400 to 500 nm and P450 quantified using the absorption coefficient at 450 nm  $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  determined by Omura and Sato (1964).

Ligand binding spectra were obtained from recombinant yeast microsomes diluted to a final CYP71D51v2 concentration of 600 nM. A baseline was recorded from native oxidized microsomes.  $\beta$ -Nootkatol diluted in ethanol was then added to the sample cuvette to a final concentration ranging from 20  $\mu$ M to 400  $\mu$ M, and the same volume of solvent (maximum of 2 % by volume) was added to the reference. Differential absorbance was recorded between 370 and 500 nm. Dissociation constant ( $K_d$ ) was calculated from the linear equation resulting of the double reciprocal plot of the differential absorbance between 420 and 390 nm versus  $\beta$ -nootkatol concentration.

### *2.5 Enzyme assays*

Enzyme assays were incubated in closed 2 mL glass vials for 20 min at 28 °C using a thermo mixer (Eppendorf, Le Pecq, France) under a constant shaking at 700 rpm. In a final reaction volume of 300  $\mu$ L, 30  $\mu$ L of yeast microsomes were diluted in phosphate citrate buffer (75 mM pH 6.8 (PBS)) in the presence of 200  $\mu$ M of (+)-valencene or  $\beta$ -nootkatol (dissolved in ethanol not exceeding 0.8 % of assay volume) and 1 mM of NADPH. Assays without NADPH or with microsomes prepared from yeast transformed with an empty vector were incubated as negative controls. The reaction was quenched on ice and 100  $\mu$ M of isolongifolene in ethanol was added as internal standard. The mixture was extracted with 500  $\mu$ L of pentane in a thermo mixer at 1400 rpm during 5 min at 20 °C. After 10 min centrifugation at 4,400 rpm, the organic phase was recovered for GC-FID and GC-MS analysis.

For kinetic parameters determination, triplicate assays were incubated with (+)-valencene concentrations ranging from 50  $\mu$ M to 200  $\mu$ M. Formation of  $\beta$ -nootkatol was quantified after 5 min of incubation using an internal standard.  $K_{m, app}$  and  $V_{max, app}$  were deduced from Hanes-Woolf representation.

The inhibition of the reaction by (+)-nootkatone was determined for 20 min assays with 200  $\mu$ M of (+)-valencene in the presence of 200  $\mu$ M of (+)-nootkatone. NADPH oxidation resulting from (+)-valencene metabolism by CYP71D51v2 in presence or absence of  $\beta$ -nootkatol or (+)-nootkatone was evaluated by monitoring changes in NADPH absorption at 350 nm. Yeast microsomes were diluted in 1 mL TG buffer containing 50  $\mu$ M of NADPH to a 55 nM of CY71D51v2 and the mix was divided in two cuvettes of the spectrophotometer. After checking for constant differential absorbance, 100  $\mu$ M of valencene was added in the assay cuvette and a corresponding volume of solvent in the reference. NADPH oxidation was

calculated from the rate of absorbance decrease at room temperature (approx. 20 °C) using an  $\epsilon_{350\text{nm}} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Urban et al., 1994). To evaluate  $\beta$ -nootkatol or nootkatone inhibition, these compounds were added to both cuvettes at a 100  $\mu\text{M}$  concentration before initiation of the reaction. Using the same conditions, the turnover of (+)-valencene hydroxylation by CYP71D51v2 was also determined from  $\beta$ -nootkatol produced after addition of an internal standard, extraction with 500  $\mu\text{l}$  of pentane and analysis on GC-FID.

## 2.6. Bioconversion

(+)-Valencene bioconversion by yeast expressing CYP71D51v2 was compared to that obtained with a control transformed with the pYeDP60u2 empty vector.  $\beta$ -Nootkatol bioconversion by the control yeast was evaluated after 24 h of incubation. Tests were performed using 100 mL yeast culture. After induction of CYP71D51v2 expression, cells were transferred to fresh YPI and appropriate concentrations of (+)-valencene or  $\beta$ -nootkatol were supplied in ethanol (2 % by volume). The cultures were incubated for 24 h at 28 °C with shaking at 160 rpm. For quantification of the products accumulated in yeast cells and in the medium, 1 mL of acetone was added to 1 mL of the culture before vortexing and extraction. For quantification of products present in the medium, yeast cells were discarded by centrifugation at 7000 rpm for 10 min before extraction of 1 mL of the supernatant. In order to check if  $\beta$ -nootkatol was adsorbed to the yeast surface, the cell pellet was washed with alkaline buffer as previously described (Ro et al., 2006). 400  $\mu\text{M}$  of isolongifolene was added as internal standard. Then, substrate and products were extracted with 2 mL of a mixture of pentane/ethyl acetate (85:15, v/v). The organic layer was recovered and concentrated under argon to a volume of 200  $\mu\text{l}$  before GC-MS and GC-FID analysis.

## 2.7. Sesquiterpenoid partition

Partition of substrate and products between the culture medium and soluble and membrane fractions (cell wall, cytosol and internal membranes) of the yeast expressing CYP71D51v2 was measured after 24 h of bioconversion of 80  $\text{mg.L}^{-1}$  of valencene. The yeast and culture medium were separated by centrifugation at 7000 rpm for 10 min. Microsomes were prepared as described above, replacing TEK and TES with PBS. After cell disruption, yeast cell wall/debris and microsome pellets were washed and resuspended in PBS buffer before extraction. The cytosol fraction was recovered after ultracentrifugation. Isolongifolene (400  $\mu\text{M}$ ) was added to each fraction before extracting with a mixture of pentane/ethyl acetate

(85:15, v/v). The organic layer was recovered and concentrated under argon to a volume of 200  $\mu\text{l}$  before GC-MS and GC-FID analysis.

### 2.8. Viability assays

After 17 h of induction, control yeast cells (pYeDP60u2-transformed) were transferred to fresh YPI and aliquoted in 100 mL before addition of (+)-valencene (10, 80, 400 or 4000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\beta$ -nootkatol or (+)-nootkatone (10, 100 or 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in ethanol (2 % by volume) and incubated at 28 °C for 24 h. Control yeast culture was supplemented with the same volume of ethanol. Aliquots of 5 mL of culture were harvested, and cells were collected by centrifugation, washed in SGI before serial dilution of 1 mL in SGI and plating of two 100  $\mu\text{L}$  samples on YPI. After 3 days at 28 °C, the number of colony forming units (cfu) was recorded. Toxicity was evaluated by comparison with cultures incubated with ethanol only.

### 2.9. Quantification and identification of products

For quantitative analysis, 1  $\mu\text{L}$  of extract was injected in a 3900 GC-FID (Varian, Les Ulis, France) equipped with a DB-5 column (30 m, 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ; Agilent Technologies, Massy, France). The injector was used in the split mode with a ration of 50 and was set at 280 °C. Hydrogen gas flow was 1.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The oven temperature was maintained 0.5 min at 50 °C, increased 20  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  until 100 °C, then 4  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  until 300 °C and finally, held at this temperature for 5 min.  $\beta$ -nootkatol formed during enzyme assays was determined using isolongifolene as internal standard. Mixes of all components present in enzyme assay (with 50  $\mu\text{M}$  of isolongifolene) except NADPH and substrates, but supplemented with 25, 50, 75, 100, 200, 300 or 400  $\mu\text{M}$  of  $\beta$ -nootkatol were extracted in triplicate and analyzed in GC-FID. The ratios of peak areas for  $\beta$ -nootkatol to internal standard were plotted against ratios of  $\beta$ -nootkatol to isolongifolene concentrations to obtain a calibration curve. For quantification of bioconversion products, similar calibration curves were generated using extracts of either 1 mL of control yeast culture plus 1 mL of acetone or 1 mL of culture medium in bioconversion conditions, supplemented with isolongifolene and different concentrations of  $\beta$ -nootkatol or (+)-nootkatone. Calibration coefficients obtained for the acetone-free extraction of culture medium were also applied for quantification of substrate and products in yeast subcellular fractions (cell wall, cytosol and microsomes).

Products were identified on GC-FID and GC-MS by comparing retention times and mass spectra with those of authentic standards. Mass spectra were acquired on a Clarus 680 GC

coupled to a Clarus 600T mass spectrometer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). A scan range of 50-300 m/z acquiring in 0.25 sec at 70 eV was used.

### **3. Results**

#### *3.1. Selection of a plant P450 enzyme candidate for (+)-valencene C2 oxidation*

Two plant P450 enzymes were previously reported to regioselectively introduce an oxygen atom at the 2 position of (+)-valencene. Those are the premnaspirodiene oxygenase CYP71D55 from *Hyoscyamus muticus* (Takahashi et al., 2007) and CYP71AV8 from chicory (*Cichorium intybus*) (Cankar et al., 2011). They share 49 % amino acid identity and seem to result from convergent evolution in unrelated taxa. Assuming that they would bear the structural features required for supporting (+)-valencene regiospecific 2-oxygenation, a BLAST search using their amino acid sequences was used as a starting point to identify potential (+)-valencene 2-oxygenases from other plants. This led to a short list of four candidates from different plants: CYP71D4 from *Solanum tuberosum*, CYP71D51v2 from *Nicotiana tabacum*, CYP71D1 from *Catharanthus roseus* and CYP71D326 from *Ricinus communis*. Sequence alignments and identities with CYP71D55 and CYP71AV8 are provided in Supplemental Figure S29 and Table S5, respectively. All four coding sequences were synthesized, with codon optimization according to yeast codon usage, inserted into the pYeDP60u2 vector and expressed in the WAT11 yeast strain, which is transformed for stable expression of *Arabidopsis thaliana* P450 reductase ATR1 (Urban et al., 1997). Microsomes were extracted from yeast cells induced for P450 and P450-reductase expression, and successful P450 expression assessed by differential spectrophotometry. Differential CO spectra confirmed the expression of 0.9 nmoles.mL<sup>-1</sup> of microsomes for CYP71D4 and 6 nmoles.mL<sup>-1</sup> of microsomes for CYP71D51v2 (Fig. 1), but no differential absorbance was detected upon expression of CYP71D1 and CYP71D326. Nevertheless, all four enzymes were found to generate oxidized compounds when tested for (+)-valencene metabolism, compared to control microsomes extracted from yeast transformed with an empty pYeDP60u2 vector. Apparently poorly expressed in yeast, CYP71D1 and CYP71D326 generated also low amounts of products and showed a low regiospecificity (Supplementary information, Fig. S30). Higher activity and regioselectivity was observed with CYP71D51v2 and CYP71D4 that both generated the same products (Fig. 2A). The main product was identified as  $\beta$ -nootkatol based on comparison of retention time and mass spectrum with a synthetic standard,



and further confirmed by NMR (Fig. 2C, Supplementary information, Fig. S19 to S24 and Table S4). From the 3 minor products, one could be identified as (+)-nootkatone (Fig. 2C), and the two others with a  $m/z$  of 202 are valencene desaturation products, one of them with the mass spectrum and retention time of (-)-nootkatene (Supplementary information, Fig. S31). Formation of the latter compounds most likely results from P450-catalyzed hydrogen abstraction followed by electron transfer and formation of an allylic carbocation (Supplementary information, Fig. S32), a mechanism previously proposed for alkylbenzenes desaturation by a bacterial CYP102A1 (Whitehouse et al., 2008). The second unidentified desaturation product is thus likely to be 2,3-dihydro-valencene but could not be isolated in amounts large enough for confirmation via NMR. Two minor products with the same retention times and mass spectra are also formed after reduction of (+)-nootkatone with lithium aluminum hydride (17% of **4** and 15% of **5** as evaluated by GC). As a consequence, the same carbocations seem to be formed upon acidification.

Since CYP71D51v2 was showing the highest expression in yeast, swift conversion of (+)-valencene to  $\beta$ -nootkatol and a low formation of side products, it was selected for further studies. To evaluate its potential to catalyze the conversion of  $\beta$ -nootkatol into (+)-nootkatone, microsomes of recombinant yeast were incubated with  $\beta$ -nootkatol as a substrate. Only minor amounts of (+)-nootkatone were obtained in an NADPH-dependent manner (Fig. 2B). Evaluation of the kinetic constants indicated that (+)-valencene to  $\beta$ -nootkatol conversion proceeded with a  $K_{m,app}$  of 39  $\mu\text{M}$ , a  $k_{cat}$  of 6  $\text{s}^{-1}$  and a catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) of 0.15  $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$  (Fig. 3). The amounts of (+)-nootkatone formed from  $\beta$ -nootkatol were too low for determination of the kinetic parameters of the reaction.

### *3.3. Bioconversion of (+)-valencene in yeast by CYP71D51v2*

Given its high turnover, CYP71D51v2 was tested for its performance in bioconversion. The CYP71D51v2 transformed yeast was grown to high cell density, induced for expression and first incubated with 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (400  $\mu\text{M}$ ) of (+)-valencene supplied in ethanol (2 %) for 24h before extraction of the whole culture (medium plus yeast).  $\beta$ -nootkatol was the main product detected in the extract. It was formed only when yeast was expressing CYP71D51v2 (Fig. 4). The bioconversion yield in this initial assay was 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of  $\beta$ -nootkatol.

Surprisingly, whereas very minor amounts of (+)-nootkatone were obtained in the microsome assay, up to 3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (+)-nootkatone were obtained in the bioconversion extract, together with an unidentified product with a  $m/z$  of 220 (Fig. 3, Supplementary information, Fig. S33). To

test whether the production of (+)-nootkatone resulted from the activity of CYP71D51v2 or from a dehydrogenase or oxidative activity present in yeast, a  $\beta$ -nootkatol bioconversion assay was carried-out with the control WAT11 yeast transformed with the pYeDP60u2 empty vector. Interestingly, this assay demonstrated that the formation of (+)-nootkatone and of the unknown product from  $\beta$ -nootkatol was catalyzed by the control yeast, independently from the presence of CYP71D51v2 (Fig. 5).

To test if the CYP71D51v2-transformed yeast might be suitable for a viable industrial process, the induced culture was incubated in the presence of increasing concentrations of (+)-valencene. A maximum yield around 6 mg.L<sup>-1</sup> of  $\beta$ -nootkatol and (+)-nootkatone was obtained for a (+)-valencene concentration of 200 mg.L<sup>-1</sup>. The yield dropped to 4.5 mg.L<sup>-1</sup> for a (+)-valencene concentration of 400 mg.L<sup>-1</sup> of, and only trace amounts of products were obtained using a (+)-valencene concentration of 3 g.L<sup>-1</sup>. This suggested that substrate or products toxicity may limit the bioconversion process.

#### *3.4. Toxicity of the substrate and products*

Sesquiterpenoids have been reported to show antifungal activities (Engström et al., 1999; Manter et al., 2007; Yao et al., 2003; Yokose et al., 2004) and their biosynthesis is often induced upon fungal infection (Huffaker et al., 2011; Vögeli and Chappell, 1988). The first hypothesis we investigated to explain the low bioconversion efficiency was thus the possible toxicity of the substrate and products. Viability assays were carried out using yeast transformed with the empty pYeDP60u2 vector, cultivated for 24 h in the presence of increasing concentrations of (+)-valencene,  $\beta$ -nootkatol or (+)-nootkatone, and keeping a constant solvent concentration. For yeast grown in the presence of 10 mg.L<sup>-1</sup> of substrate or products, more than 80 % of viable cells were recovered compared to the control (Fig. 6). (+)-Valencene was tolerated at concentrations up to 4 g.L<sup>-1</sup>, with 73 % of viable cells recovery after 24 hours. On the other hand,  $\beta$ -nootkatol and (+)-nootkatone led to loss of cell viability at 1 g.L<sup>-1</sup>, with already 55 % viability loss at 100 mg.L<sup>-1</sup> in the case of  $\beta$ -nootkatol.

Based on these data, a bioconversion conducted with 80 mg.L<sup>-1</sup> of (+)-valencene should not result in more than 15 % yeast viability loss after 24 h. At higher (+)-valencene concentrations, the sum of products does not exceed much 10 mg.L<sup>-1</sup>. The toxicity of valencenoids is thus not sufficient to explain the low efficiency of bioconversion observed in our experiments.

#### *3.5. Subcellular localization of the substrate and products*

Nootkatone and especially nootkatol were previously reported to accumulate in the fungal biomass of *C. globosum* and to be poorly released in the culture medium (Kaspera et al., 2005). In addition, the antibacterial activity of monoterpenols such as carvacrol and thymol has been suggested to rely on a membrane permeation/destabilizing effect based on 1-*N*-phenyl-naphthylamine uptake, detergent sensitization and lipid and ATP release (Helander et al., 1998). This led us to investigate the substrate and product distribution in the yeast membranes and soluble fractions during bioconversion. (+)-Valencene was found accumulated in yeast, most of which was trapped in the cell wall (41 %) and microsomal membrane (21 %) fractions (Fig. 7). While a significant proportion (38 %) of (+)-nootkatone accumulated in the membranes, it was the most efficiently released in the culture medium or was possibly formed by enzymes such as laccases adsorbed on the outer surface of the cell wall. Conversely, a very minor proportion (2 %) of  $\beta$ -nootkatol was found in the culture medium, whereas (35 %) and (50 %), respectively, were found associated with the cell wall and the microsomal fractions. It has been previously shown that artemisinic acid produced by *CYP71AV1*-transformed yeast is adsorbed onto the external surface of the cell wall and is readily removed from the cell pellet by washing with an alkaline pH 9 buffer (Ro et al., 2006). Similar washes performed on *CYP71D51v2*-transformed yeast did not release any product.  $\beta$ -Nootkatol thus appears trapped and concentrated in the endomembranes.

### *3.6. Inhibition by the reaction products*

(+)-Nootkatone was previously described as an inhibitor of the human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes CYP2A6, CYP2C19 (Tassaneeyakul et al., 2000), CYP3A4 and CYP2C8 (Sime et al., 2000) at low concentrations, and drug formulation including valencenoids was patented for drug stabilizing effect via delayed metabolism and clearance. Product inhibition would also provide a reasonable explanation for the low yields observed in our experiments since significant amounts of nootkatone are obtained upon bioconversion. We consequently decided to investigate *CYP71D51v2* inhibition by (+)-nootkatone and  $\beta$ -nootkatol. The latter was included in these experiments since alcohols are documented ligands of P450 enzymes (Beyeler et al., 1988; Ortiz de Montellano and Correia, 1995).

Both alcohols and ketones have been reported to induce a shift of the Soret to approximately 415 nm when they form a coordination with the heme iron in the active site of P450 enzymes, giving rise to so-called modified type II or reverse type I differential spectra (Jefcoate, 1978; Schenkman et al., 1967). The capacity of (+)-nootkatone and  $\beta$ -nootkatol to bind

CYP71D51v2 was thus first investigated by recording the difference spectra the compounds induce when added to the yeast-expressed enzyme. Whereas no consistent modification in UV-visible absorbance was observed upon addition of (+)-nootkatone, a characteristic reverse type I spectral shift was obtained with  $\beta$ -nootkatol (Fig. 8A), with a maximum at 415 nm and a minimum at 383 nm. This shift is expected to reflect a high- to low-spin transition of the heme iron as a result of oxygen coordination (Ortiz de Montellano and Correia, 1995; Schenkman et al., 1967). This shift was saturable and proportional to the  $\beta$ -nootkatol concentration in the assay. The apparent dissociation constant of  $\beta$ -nootkatol deduced from the saturation curve was 47  $\mu$ M (Fig. 8B). Since the  $K_m$  for (+)-valencene to  $\beta$ -nootkatol conversion was estimated to be around 39  $\mu$ M, this implies a strong competition of substrate and product for the active site of CYP71D51v2.

In order to further check the capacity of (+)-nootkatone to inhibit CYP71D51v2, it was tested on enzyme activity. Added at the same concentration as (+)-valencene (200  $\mu$ M) in the assay, it inhibited the 2-hydroxylation reaction by 37 %.

For a more direct comparison of the inhibition of the reaction by  $\beta$ -nootkatol and (+)-nootkatone using the same assay, the CYP71D51v2 activity was evaluated by monitoring NADPH consumption resulting from (+)-valencene metabolism (Table 1). In the case of a well coupled reaction, one molecule of NADPH is expected to be oxidized for the formation of one molecule of oxygenated product. As shown in table 1, valencene 2-hydroxylation by CYP71D51v2 occurs with four molecules of NADPH oxidized for producing one molecule of  $\beta$ -nootkatol, implying significant uncoupling of the reaction. In the presence of  $\beta$ -nootkatol or (+)-nootkatone, the rate of the reaction estimated from NADPH consumption is decreased by 40 % and 28 %, respectively, implying stronger inhibition by  $\beta$ -nootkatol compared to (+)-nootkatone.

Accumulation of the products, in particular  $\beta$ -nootkatol, is thus likely to be an important factor limiting rates and yields of the CYP71D51v2-dependent (+)-valencene to  $\beta$ -nootkatol bioconversion.

#### **4. Discussion**

With the aim to identify an enzyme efficiently converting (+)-valencene into (+)-nootkatone, we selected four candidate genes from different plant species, which encoded proteins with 48 to 92 % identity with previously reported valencene 2-oxygenases (Supplementary

information, Table S5). While all four of them showed some valencene oxygenase activity, only two, both isolated from Solanaceae (tobacco and potato) with 88 and 92 % identity to the previously described CYP71D55 from henbane, were found well expressed in yeast and showed high and regioselective 2-oxygenase activity. Both of them converted valencene into  $\beta$ -nootkatol, but did not allow significant formation of nootkatone from  $\beta$ -nootkatol, as previously observed for the *H. muticus* premnaspirodiene oxygenase (HPO) (Takahashi et al., 2007). Potato, as henbane, accumulates solavetivone, the natural product of HPO, as a major compound upon elicitation, while capsidiol is the dominant elicitor-induced sesquiterpene in tobacco (Vögeli and Chappell, 1988). Capsidiol is the products of 5-*epi*-aristolochene oxidation by tobacco CYP71D20 that has only 80 % identity with CYP71D55 (Ralston et al., 2001). However, spirovetivone conjugated derivatives were recently isolated from the leaves of *N. tabacum* (Feng et al., 2009, 2010). CYP71D51v2 and CYP71D4 are thus likely to be orthologs of henbane CYP71D55 in tobacco and potato.

The best expressed of the two candidates, CYP71D51v2, was selected for full identification of products and determination of catalytic potential *in vitro* and in bioconversion assays. CYP71D51v2 produced  $\beta$ -nootkatol as a major product with only traces of the  $\alpha$  epimer (Fig. 9). This production occurred with a quite high uncoupling of the reaction (i.e. unproductive catalytical cycles leading the oxidation of NADPH without production of  $\beta$ -nootkatol), suggesting that the distance of the (+)-valencene 2-position to the heme ferryl-oxo in the active site is not optimal. This hypothesis is further supported by the production of the desaturated compounds **4** and **5**, that would be favored by ineffective rebound of hydroxyl radical from heme iron to the 2 position of valencene. In despite of this uncoupled reaction, CYP71D51v2 has the highest  $k_{cat}$  ( $6 \text{ s}^{-1}$ ) for (+)-valencene oxygenation so far reported for a native plant P450 enzyme (Table 2).

While high activity was detected *in vitro* with the recombinant enzyme, the performance of the native CYP71D51v2 in yeast-mediated bioconversion did not match the requirements for implementation of an industrial process. Our data point to several factors which concur to limit CYP71D51v2-dependent valencene bioconversion in *S. cerevisiae*. One is the toxicity of  $\beta$ -nootkatol and to a lesser extent of (+)-nootkatone for yeast. This toxicity is significant only at high concentration ( $\geq 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), but is a problem for production of nootkatone in the  $\text{g.L}^{-1}$  range, which would be required for an efficient industrial process. Another is the trapping of  $\beta$ -nootkatol in the yeast endomembranes and cell wall. Products can be recovered from the cultures by the extraction process, but the accumulation of large concentrations of  $\beta$ -nootkatol

in the membranes is expected to alter their permeability and integrity, as well as the function of integral proteins as previously reported for other hydrocarbons which concentrate in the membranes (Sikkema et al., 1994, 1995). Membrane accumulation is thus likely to strongly contribute to  $\beta$ -nootkatol toxicity. Sesquiterpene alcohols and ketones in this respect differ from the acids such as artemisinic acid which are trapped onto the yeast cell-wall outer surface under acidic fermentation conditions (Ro et al., 2006), but do not accumulate in the endomembranes and show minor yeast toxicity (Ro et al., 2008).  $\beta$ -Nootkatol not only accumulates in yeast membranes, it also binds the CYP71D51v2 active site via direct coordination with the heme iron, as revealed by differential spectrophotometry. CYP71D51v2 affinity for  $\beta$ -nootkatol is in the same range as its affinity for (+)-valencene. Combined with  $\beta$ -nootkatol accumulation in the ER, this is expected to lead to strong inhibition of the enzyme during the bioconversion process.

So far no effective P450-based process was developed for the production of (+)-nootkatone from natural microorganisms or recombinant enzymes. Whereas most of the interfering factors identified in this work may apply to other systems, based on our data, a strategy can be proposed for the development of a bioproduction process from CYP71D51v2. The first step would involve enzyme improvement by directed mutagenesis, with the aim to reduce the volume of the active site and to optimize the distance between the 2-position of the substrate and ferryl-oxo oxygen donor in the active site. Such a distance adjustment would be expected to improve the coupling of the reaction and to limit the binding of the  $\beta$ -nootkatol product. Takahashi et al. (2007), have previously reported a 8-fold increase in  $k_{cat}$  and 5-fold increase in catalytic efficiency for (+)-valencene to  $\beta$ -nootkatol by HPO upon exchange of two valine and alanine residues located in the roof of the active site for a larger isoleucine (V482I/A484I). Sequence alignment with HPO (Supplementary information, Fig.S29) indicates that a valine 494 and an alanine 496 of CYP71D51v2 correspond to the valine 482 and alanine 484 residues in the active site of HPO. Mutations leading to a change of both residues to isoleucine or to another bulky hydrophobic amino acid (e.g. phenylalanine) would thus be expected to reduce the size of the active site and to increase CYP71D51v2 activity.

A second and more critical bottleneck is the P450 inhibition and toxicity resulting from the production of  $\beta$ -nootkatol. A drastic improvement could be brought by the conversion of the  $\beta$ -nootkatol product into hydrophilic glycoside. Such a glucoside conjugate could not be trapped in the membranes and would no longer fit in the active site of CYP71D51v2. Identification of a suitable glycosyltransferase (preferably membrane-bound) for further

transformation of recombinant yeast can be achieved via screening of existing recombinant enzyme collections (Caputi et al., 2008; Williams and Thorson, 2008). Finally, for the conversion of  $\beta$ -nootkatol into (+)-nootkatone, product extraction, enzymatic deglycosylation and further fermentation with wild-type yeast would be required.

### **Acknowledgments**

CG is grateful to the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie for a Convention Industrielle de Formation par la Recherche funding her PhD. DWR and RH are grateful for the support of the European Union Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement number 222716 – SMARTCELL.

### **References**

- Ancian, B., Bourgeois, I., Dauphin, J. F., Shaw, A., 1997. Artifact-free pure absorption PFG-enhanced DQF-COSY spectra including a gradient pulse in the evolution period. *J. Magn. Reson. A.* 125, 348-354.
- Andersen, N. H., 1970. Biogenetic implications of the antipodal sesquiterpenes of vetiver oil. *Phytochemistry.* 9, 145-151.
- Barton, G. M., 1976. A review of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis* [D. Don] Spach) extractives and their importance to utilization. *Wood Fiber Sci.* 8, 172-176.
- Beyeler, S., Testa, B., Perrissoud, D., 1988. Flavonoids as inhibitors of rat liver monooxygenase activities. *Biochem. Pharmacol.* 37, 1971-1979.
- Cankar, K., van Houwelingen, A., Bosch, D., Sonke, T., Bouwmeester, H., Beekwilder, J., 2011. A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Lett.* 585, 178-182.
- Caputi, L., Lim, E.-K., Bowles, D. J., 2008. Discovery of new biocatalysts for the glycosylation of terpenoid scaffolds. *Chemistry-A European Journal.* 14, 6656-6662.
- Cicero, D. O., Barbato, G., Bazzo, R., 2001. Sensitivity enhancement of a two-dimensional experiment for the measurement of heteronuclear long-range coupling constants, by a new scheme of coherence selection by gradients. *J. Magn. Reson.* 148, 209-213.

- De Kraker, J. W., Schurink, M., Franssen, M. C. R., König, W. A., de Groot, A., Bouwmeester, H. J., 2003. Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Tetrahedron*. 59, 409-418.
- Del Rio, J. A., Ortuno, A., Garcia-Puig, D., Porrás, I., Garcia-Lidon, A., Sabater, F., 1992. Variations of nootkatone and valencene levels during the development of grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1488-1490.
- Engström, K., Widmark, A. K., Brishammar, S., Helmersson, S., 1999. Antifungal activity to *Phytophthora infestans* of sesquiterpenoids from infected potato tubers. *Potato Res.* 42, 43-50.
- Feng, X., Wang, J. S., Luo, J., Kong, L. Y., 2009. Two new sesquiterpene glucosides from the leaves of *Nicotiana tabacum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 11, 675-680.
- Feng, X., Wang, J. S., Luo, J., Kong, L. Y., 2010. A pair of sesquiterpene glucosides from the leaves of *Nicotiana tabacum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 12, 252-256.
- Fraatz, M. A., Berger, R. G., Zorn, H., 2009. Nootkatone—a biotechnological challenge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 35-41.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., Schiestl, R. H., 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
- Girhard, M., Machida, K., Itoh, M., Schmid, R. D., Arisawa, A., Urlacher, V. B., 2009. Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microb. Cell Fact.* 8, 36.
- Hall, T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Vol. 41, 1999, pp. 95-98.
- Haring, H. G., Rijkens, F., Boelens, H., Van der Gen, A., 1972. Olfactory studies on enantiomeric eremophilane sesquiterpenoids. *J. Agric. Food Chem.* 20, 1018-1021.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590-3595.

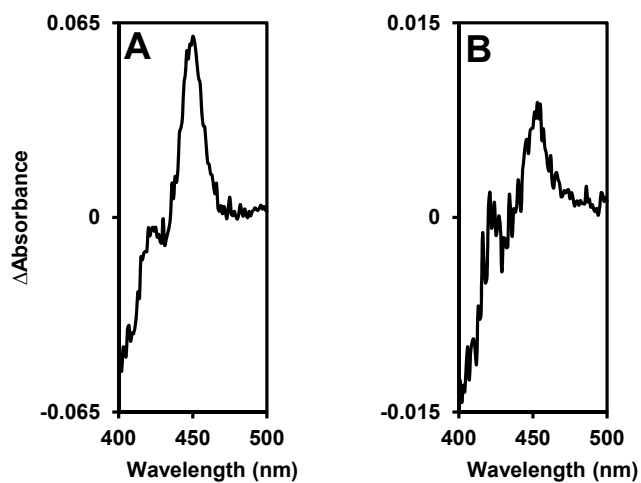


- Höfer, R., Boachon, B., Gavira, C., Ginglinger, J.-F., Larbat, R., Grec, S., Werck-Reichhart, D., Functional versatility of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes from *Arabidopsis thaliana*. submitted.
- Huffaker, A., Kaplan, F., Vaughan, M. M., Dafoe, N. J., Ni, X., Rocca, J. R., Alborn, H. T., Teal, P. E. A., Schmelz, E. A., 2011. Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. *Plant Physiol.* 156, 2082-2097.
- Jeener, J., Meier, B., Bachmann, P., Ernst, R. R., 1979. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. chem. phys.* 71, 4546.
- Jefcoate, C. R., 1978. Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods Enzymol.* 52, 258-279.
- Kaspera, R., Krings, U., Nanzad, T., Berger, R. G., 2005. Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 477-483.
- MacLeod JR, W. D., Buigues, N. M., 1964. Sesquiterpenes. I. Nootkatone, a new grapefruit flavor constituent. *J. Food Sci.* 29, 565-568.
- Manter, D. K., Kelsey, R. G., Karchesy, J. J., 2007. Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. *J. Chem. Ecol.* 33, 2133-2147.
- Nour-Eldin, H. H., Hansen, B. G., Norholm, M. H., Jensen, J. K., Halkier, B. A., 2006. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* 34, e122.
- Omura, T., Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.
- Ortiz de Montellano, P. R., Correia, M. A., 1995. Inhibition of cytochrome P450 enzymes, in: Ortiz de Montellano, P. (Ed.), *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry* (2nd ed.). Plenum, New York, pp. 305-364.
- Parella, T., Sánchez-Ferrando, F., Virgili, A., 1997. Improved sensitivity in gradient-based 1D and 2D multiplicity-edited HSQC experiments. *J. Magn. Reson.* 126, 274-277.

- Ralston, L., Kwon, S. T., Schoenbeck, M., Ralston, J., Schenk, D. J., Coates, R. M., Chappell, J., 2001. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-*epi*-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). Arch. Biochem. Biophys. 393, 222-235.
- Ro, D. K., Ouellet, M., Paradise, E. M., Burd, H., Eng, D., Paddon, C. J., Newman, J. D., Keasling, J. D., 2008. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. BMC Biotechnol. 8, 83.
- Ro, D. K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C. Y., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R., Keasling, J. D., 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature. 440, 940-943.
- Salvador, J. A. R., Clark, J. H., 2002. The allylic oxidation of unsaturated steroids by *tert*-butyl hydroperoxide using surface functionalised silica supported metal catalysts. Green Chem. 4, 352-356.
- Schenkman, J. B., Remmer, H., Estabrook, R. W., 1967. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol. Pharmacol. 3, 113-123.
- Shaffer, G. W., Eschinasi, E. H., Purzycki, K. L., Doerr, A. B., 1975. Oxidations of valencene. J. Org. Chem. 40, 2181-2185.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. Biol. Chem. 269, 8022-8028.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59, 201-222.
- Sime, J. T., Cheetham, P. S. J., Gradley, M. L., Banister, N. E., 2000. Use of sesquiterpenes for inhibiting oxidative enzymes. US Patent No. 6054490
- Sowden, R. J., Yasmin, S., Rees, N. H., Bell, S. G., Wong, L.-L., 2005. Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450<sub>cam</sub> and P450<sub>BM-3</sub>. Org. Biomol. Chem. 3, 57-64.
- Takahashi, S., Yeo, Y.-S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., Chappell, J., 2007. Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a

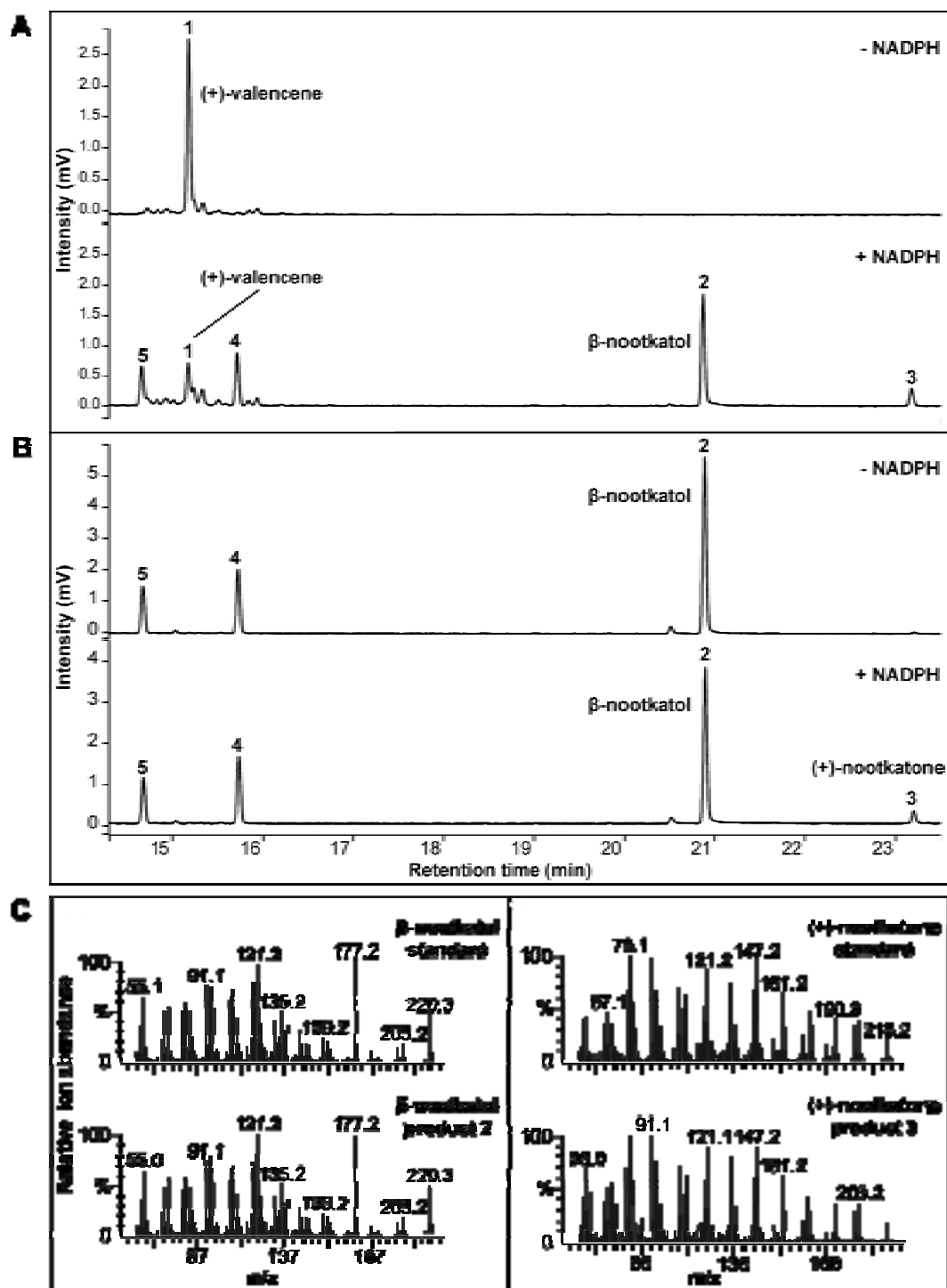
- cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *J. Biol. Chem.* 282, 31744-31754.
- Tassaneeyakul, W., Guo, L.-Q., Fukuda, K., Ohta, T., Yamazoe, Y., 2000. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 356-363.
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., Pompon, D., 1997. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* 272, 19176-19186.
- Urban, P., Werck-Reichhart, D., Teutsch, H. G., Durst, F., Regnier, S., Kazmaier, M., Pompon, D., 1994. Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. Kinetic and spectral properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. *Eur. J. Biochem.* 222, 843-850.
- Vögeli, U., Chappell, J., 1988. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* 88, 1291-1296.
- Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G., Wong, L.-L., 2008. Desaturation of alkylbenzenes by cytochrome P450<sub>BM3</sub> (CYP102A1). *Chem. Eur. J.* 14, 10905-10908.
- Williams, G. J., Thorson, J. S., 2008. A high-throughput fluorescence-based glycosyltransferase screen and its application in directed evolution. *Nat. Protoc.* 3, 357-362.
- Wilson III, C. W., Shaw, P. E., 1978. Synthesis of nootkatone from valencene. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1430-1432.
- Yao, M. K., Désilets, H., Charles, M. T., Boulanger, R., Tweddell, R. J., 2003. Effect of mycorrhization on the accumulation of rishitin and solavetivone in potato plantlets challenged with *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza.* 13, 333-336.
- Yokose, T., Katamoto, K., Park, S., Matsuura, H., Yoshihara, T., 2004. Anti-fungal sesquiterpenoid from the root exudate of *Solanum abutiloides*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2640-2642.

### Figures and Tables



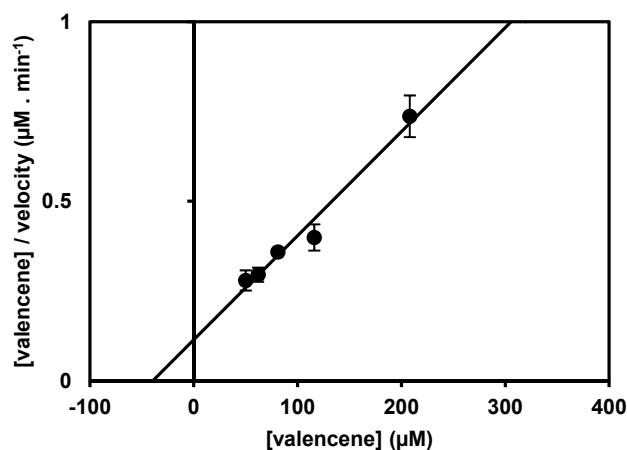
**Fig. 1. Carbon monoxide difference spectra recorded with microsomes prepared from yeast expressing CYP71D51v2 (A) or CYP71D4 (B)**

Microsomes diluted in TG buffer were reduced with an excess of solid sodium dithionite before recording a baseline. The sample was saturated with CO and the difference spectrum was recorded.



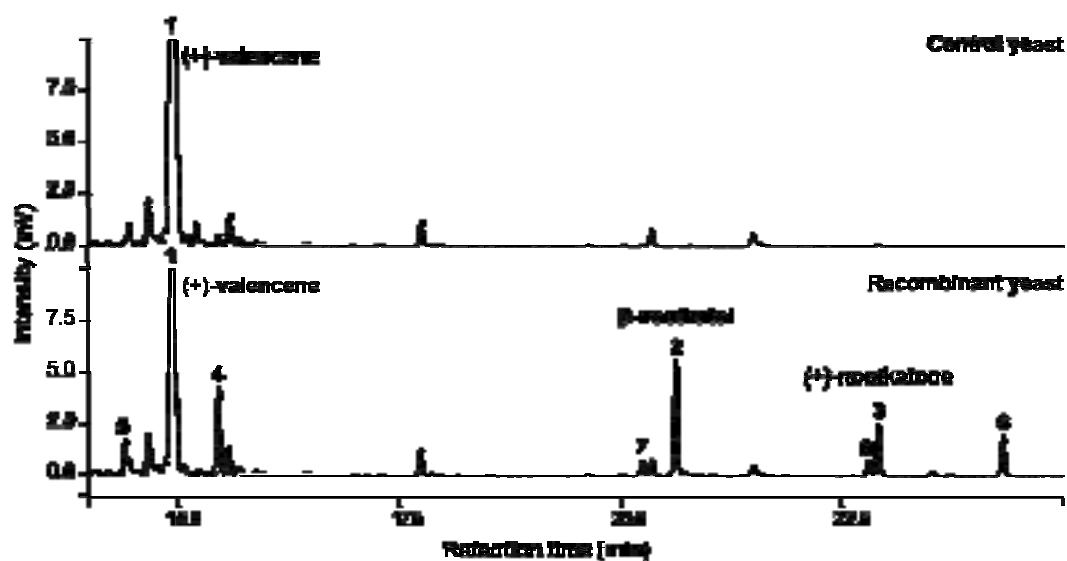
**Fig. 2.** Analysis and identification of the products of (+)-valencene and  $\beta$ -nootkatol conversion by microsomes prepared from yeast expressing CYP71D51v2.

GC-FID analysis of the products obtained after 20 min incubation at 28 °C of 66 nM of CYP71D51v2 in yeast microsomes with 200  $\mu$ M of (+)-valencene (A) or  $\beta$ -nootkatol (B) in the presence or absence of 1 mM NADPH. (C) Product identification by mass spectrometry. Mass spectra of the products are compared with mass spectra of authentic standards. 1 : (+)-valencene, 2 :  $\beta$ -nootkatol, 3 : (+)-nootkatone, 4 : (-)-nootkatone, 5 : unknown compound. A similar profile was obtained with CYP71D4 and (+)-valencene. The mass spectra of compounds 4 and 5 are shown in supplemental file S19.



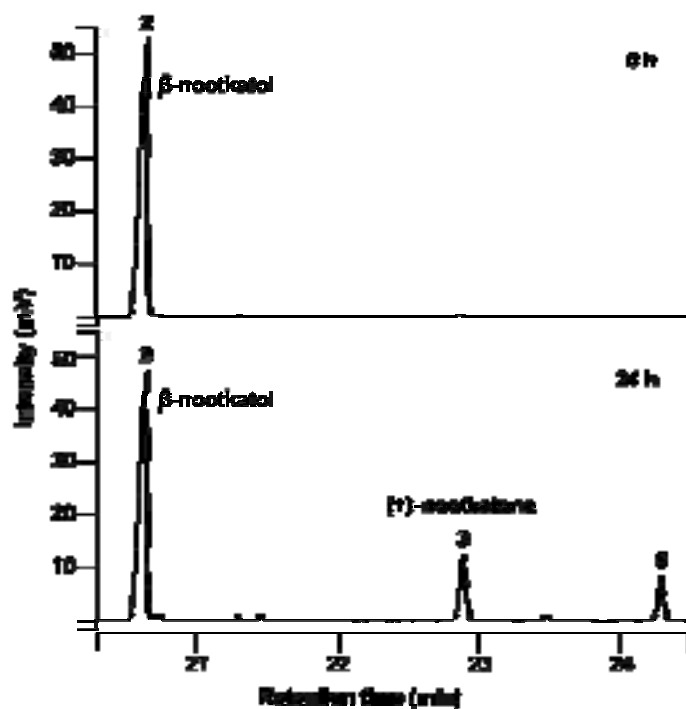
**Fig. 3. Kinetic of (+)-valencene conversion by CYP71D51v2.**

Assays were incubated 5 min with 700 nM of CYP71D51v2 and in triplicate for each concentration of substrate.



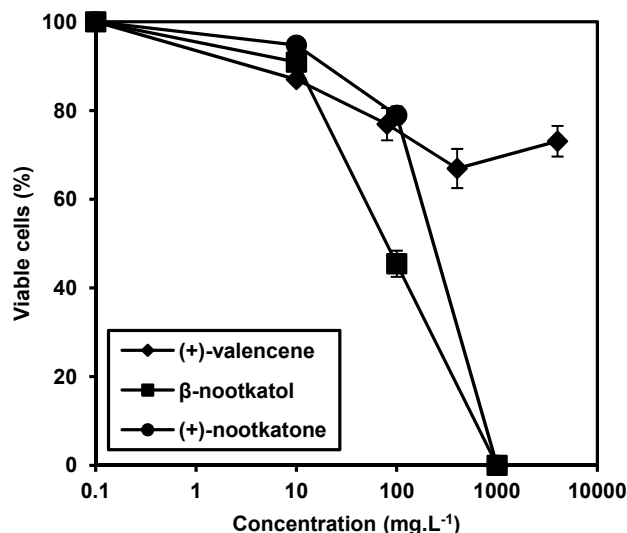
**Fig. 4. GC analysis of the bioconversion products of (+)-valencene by yeast overexpressing CYP71D51v2.**

Yeast was grown for 2 days, induced for expression for 17 h, before addition of 80 mg.L<sup>-1</sup> of (+)-valencene and further incubation for 24 h. Yeast cells and culture medium were simultaneously extracted with a mix of acetone, pentane and ethyl acetate (33:57:10, v/v). Products were identified in GC-MS. 1 : (+)-valencene, 2 : β-nootkatol, 3 : (+)-nootkatone, 4 : (-)-nootkatene, 5 and 6 : unknown compounds, 7 and 8 : minors unknown compounds.



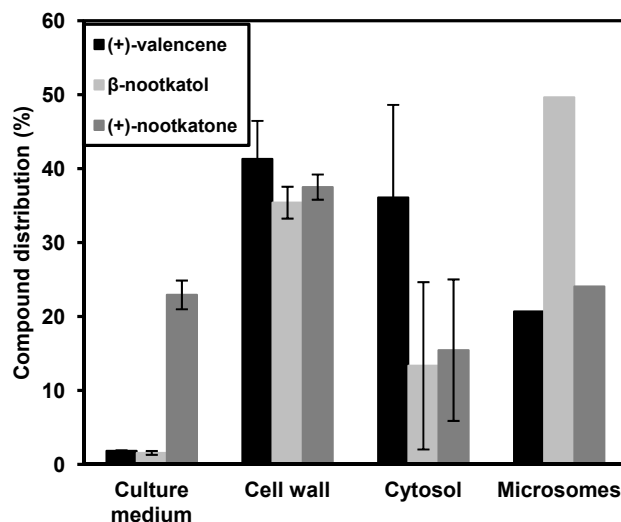
**Fig.5. GC analysis of the bioconversion products of  $\beta$ -nootkatol by the control yeast.**

Yeast was grown for 3 days before addition of  $80 \text{ mg.L}^{-1}$  of  $\beta$ -nootkatol and further incubation for 24 h. Yeast cells and culture medium were simultaneously extracted with a mix of acetone, pentane and ethyl acetate (33:57:10, v/v). Products were identified in GC-MS. 2 :  $\beta$ -nootkatol, 3 : (+)-nootkatone, 6 : unknown compound. The mass spectrum of the compound 6 is shown in supplemental file S21.



**Fig. 6.** Yeast viability after 24 h in the presence of (+)-valencene, β-nootkatol or (+)-nootkatone.

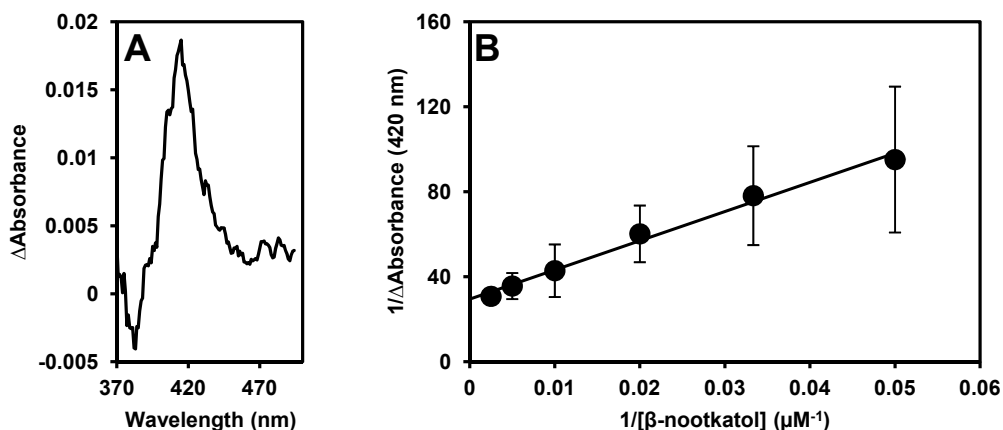
The control *S. cerevisiae* WAT11 strain transformed with the empty vector pYeDP60u2 was grown and incubated for 24 h with the substrate or products (added as ethanolic solution) in the same conditions as the bioconversion assay. The number of viable cells was estimated from the number of colonies growing on complete solid medium by comparison to a control incubated for 24 h with the solvent.



**Fig. 7.** Partition of (+)-valencene and products after 24 h of bioconversion by the CYP71D51v2-transformed yeast.

The initial concentration of (+)-valencene was 80 mg.L<sup>-1</sup>. Yeast cells were disrupted with glass beads and the fractions separated by differential centrifugation. Substrate and products were quantified after extraction with a mixture of pentane and ethyl acetate (85:15, v/v).





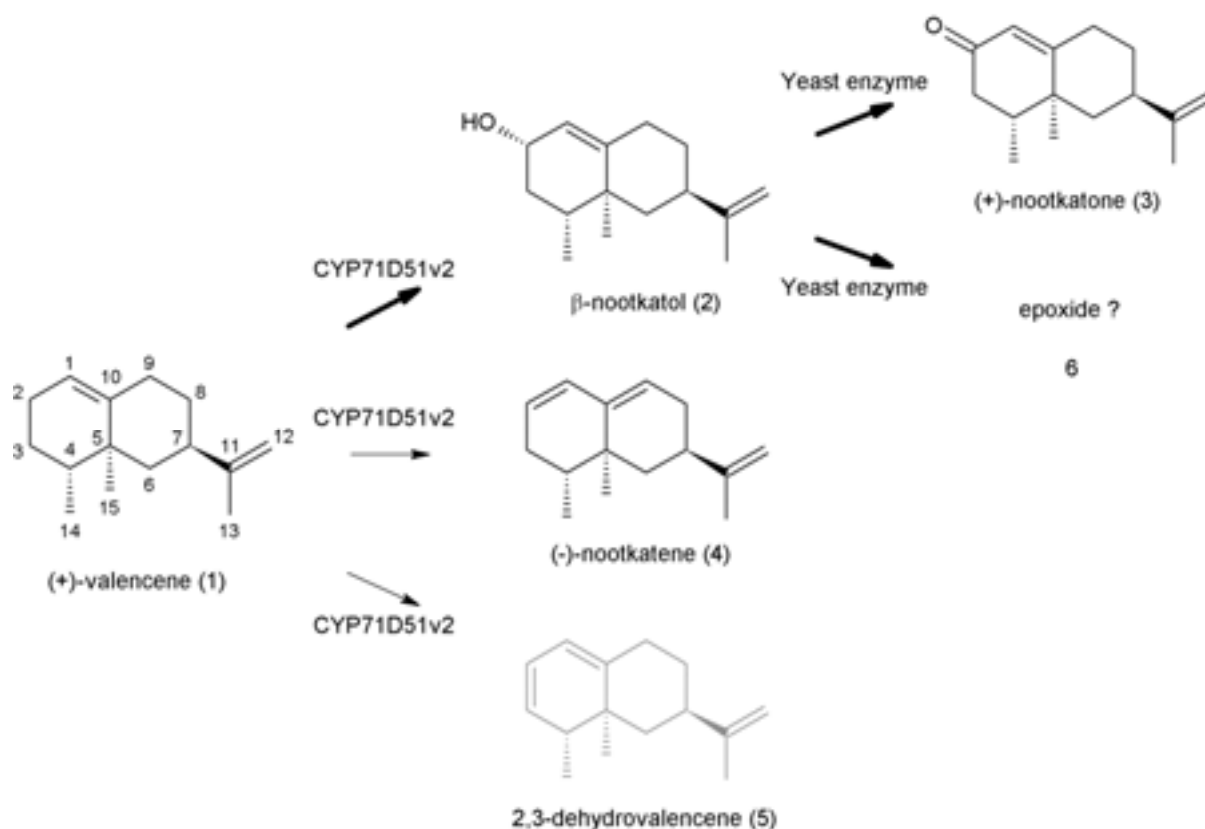
**Fig. 8.  $\beta$ -nootkatol binding-induced difference spectrum obtained with microsomes of yeast expressing CYP71D51v2.**

The two cuvettes contained 600 nM of CYP71D51v2 in TG buffer. A baseline was recorded before adding 200  $\mu\text{M}$  of  $\beta$ -nootkatol to the assay cuvette and an equivalent volume of the solvent to the reference (A). Different concentrations of  $\beta$ -nootkatol were added to plot the linear regression (B).

**Table 1: Comparison of the turnover of (+)-valencene hydroxylation by CYP71D51v2 evaluated from the rate of NADPH oxidation in absence or presence of  $\beta$ -nootkatol or (+)-nootkatone.**

NADPH oxidation was evaluated from the change in absorbance at 350 nm induced by the addition of (+)-valencene in the assay and is compared to the rate of  $\beta$ -nootkatol formation in the same reaction by GC-FID.

Monitoring	Substrate	Turnover ( $\text{min}^{-1}$ )
NADPH consumption	(+)-valencene	$58 \pm 2$
NADPH consumption	(+)-valencene + $\beta$ -nootkatol	$35 \pm 2$
NADPH consumption	(+)-valencene + (+)-nootkatone	$42 \pm 2$
$\beta$ -nootkatol production	(+)-valencene	$13 \pm 2$



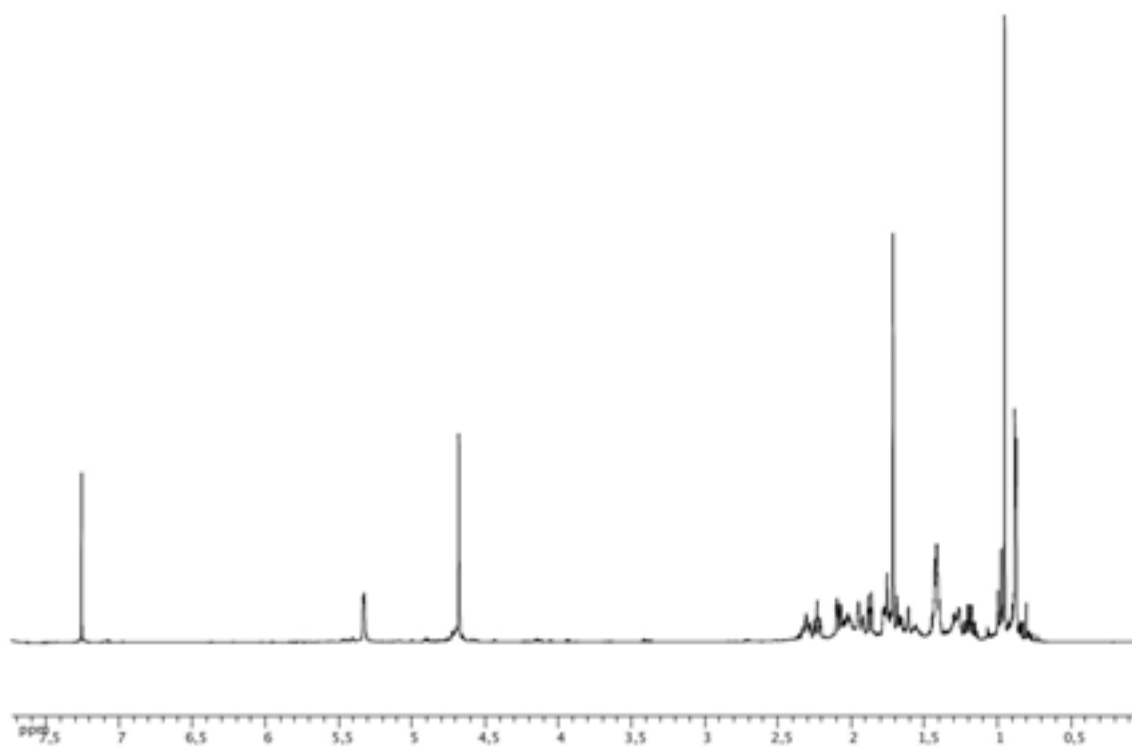
**Fig. 9. Reaction of (+)-valencene bioconversion into (+)-nootkatone via  $\beta$ -nootkatol by the yeast expressing CYP71D51v2.**

Thin arrows represent the minor reactions. The grey compound and compound number 6 are suspected to be the 2,3-dehydrovalencene and an epoxide, respectively.

**Table 2: Comparison of kinetic parameters of the hydroxylation of (+)-valencene by CYP71D51v2 with those reported for other sesquiterpene hydroxylases.**

Enzyme	Substrate	Product	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ )
CYP71D51v2	(+)-valencene	$\beta$ -nootkatol	39	6	0.15
CYP71D55	(+)-valencene	$\beta$ -nootkatol	7.4	1.9	0.26
CYP71D55	premnaspirodiene	solavetivol	14.0	2.1	0.15
CYP71D20	5- <i>epi</i> - aristolochene	capsidiol	19.2	0.5	0.03

**Supplemental file**



**Fig. S1. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) spectrum of (+)-valencene standard in CDCl<sub>3</sub>**

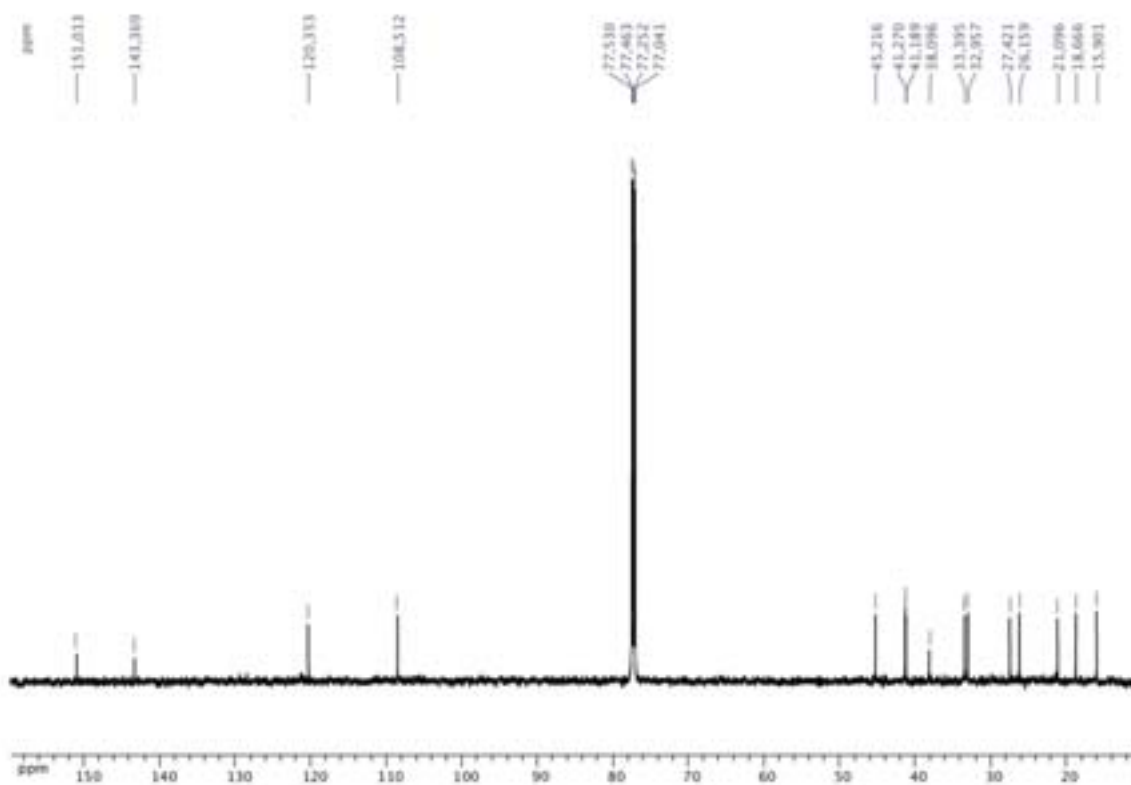
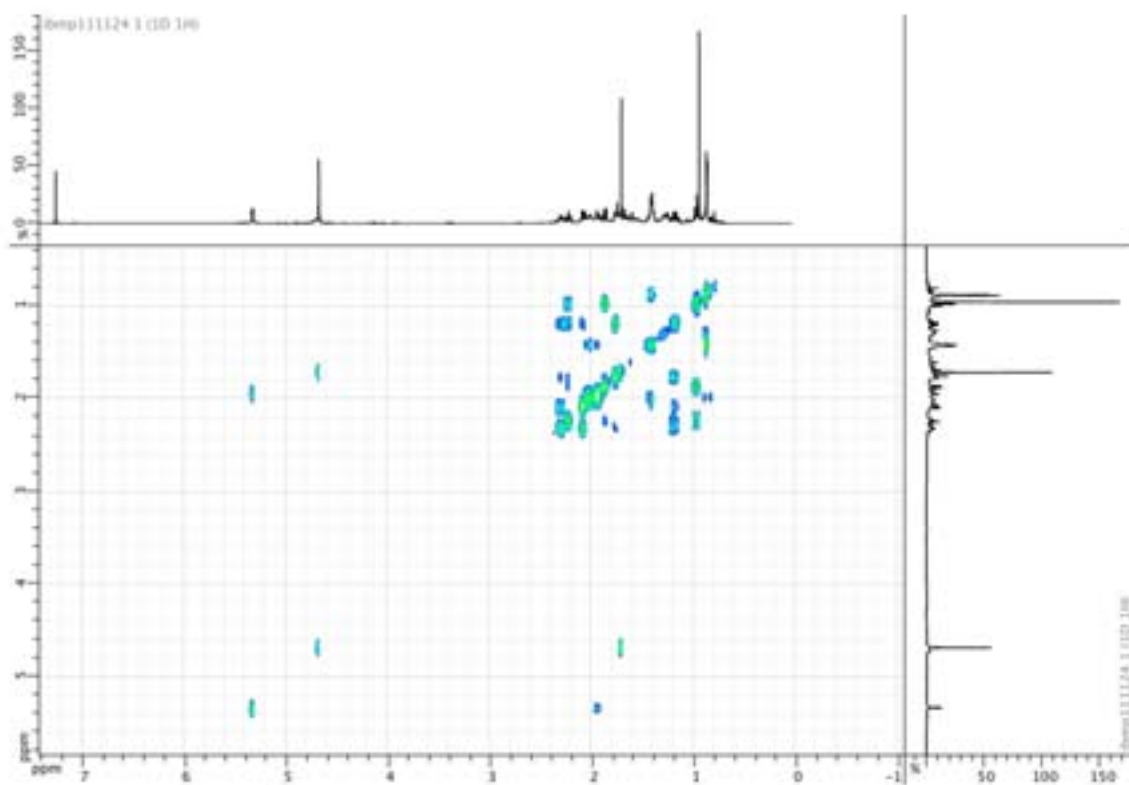
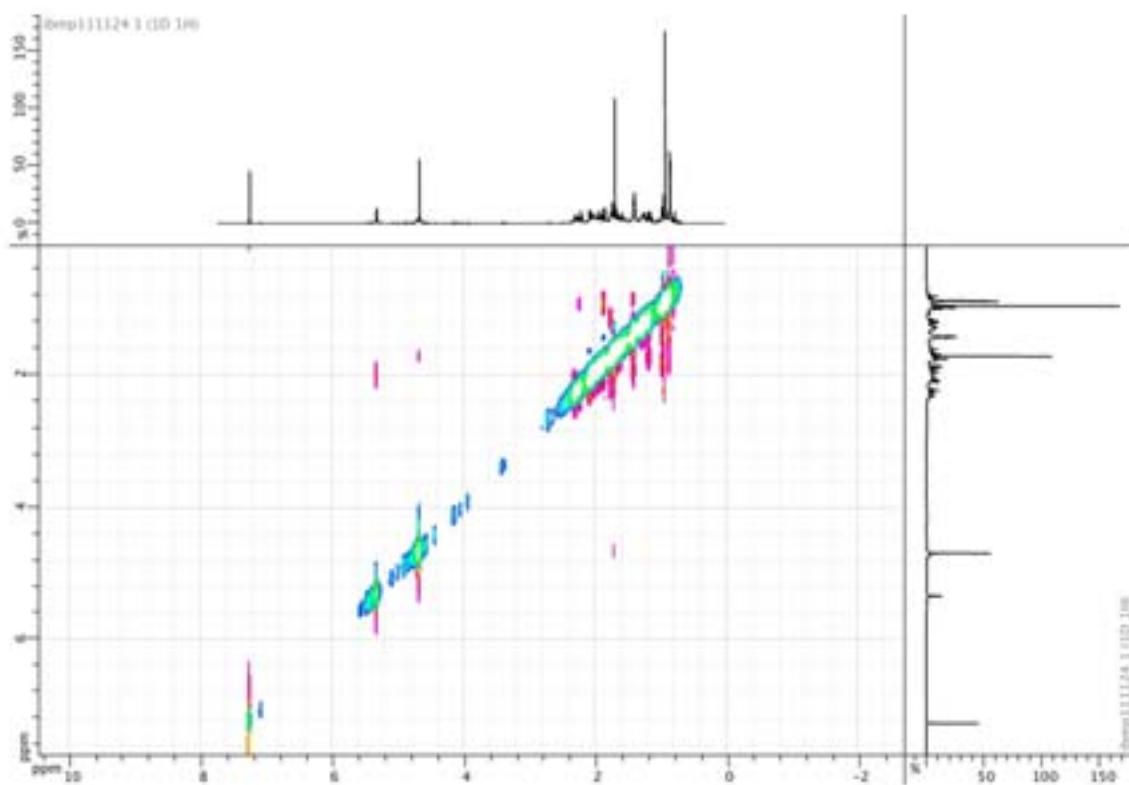


Fig. S2.  $^{13}\text{C}$ -NMR (600 MHz) spectrum of (+)-valencene standard in  $\text{CDCl}_3$



**Fig. S3. 2D  $^1\text{H}$ -COSY (600 MHz) spectrum of (+)-valencene standard in  $\text{CDCl}_3$**



**Fig. S4. 2D <sup>1</sup>H-NOESY (600 MHz) spectrum of (+)-valencene standard in CDCl<sub>3</sub>**

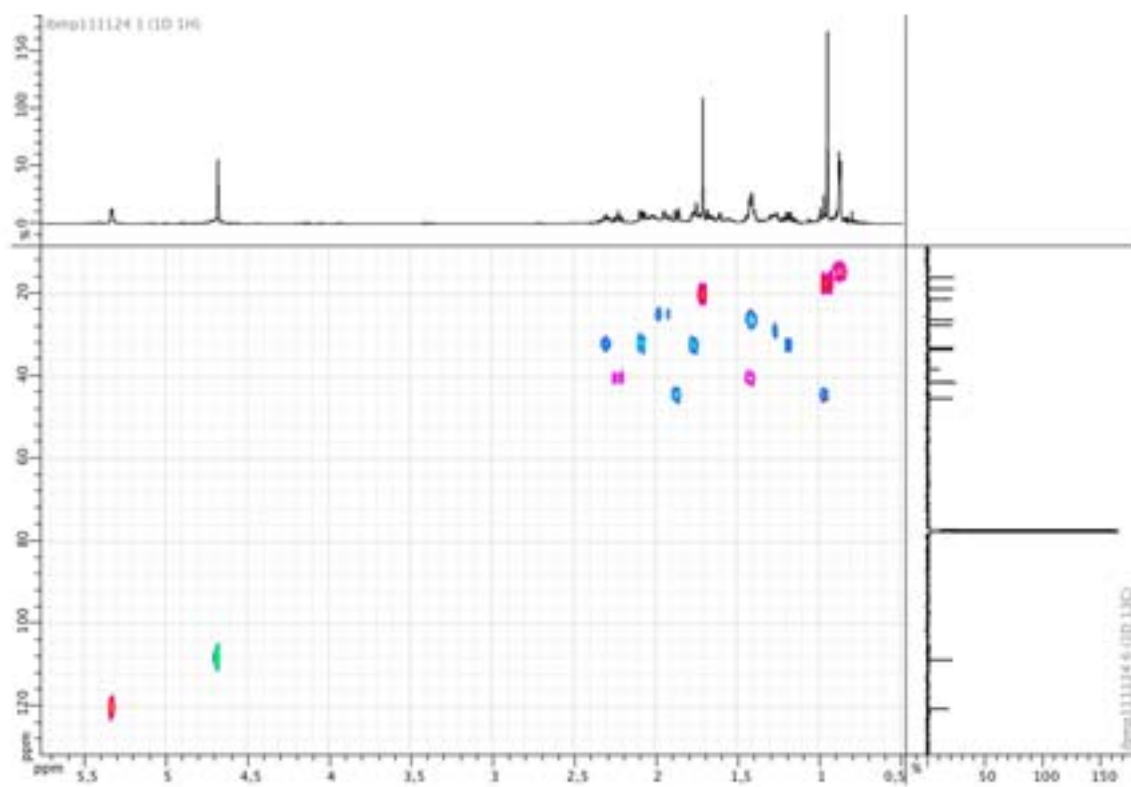


Fig. S5. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (600 MHz) spectrum of (+)-valencene standard in  $\text{CDCl}_3$

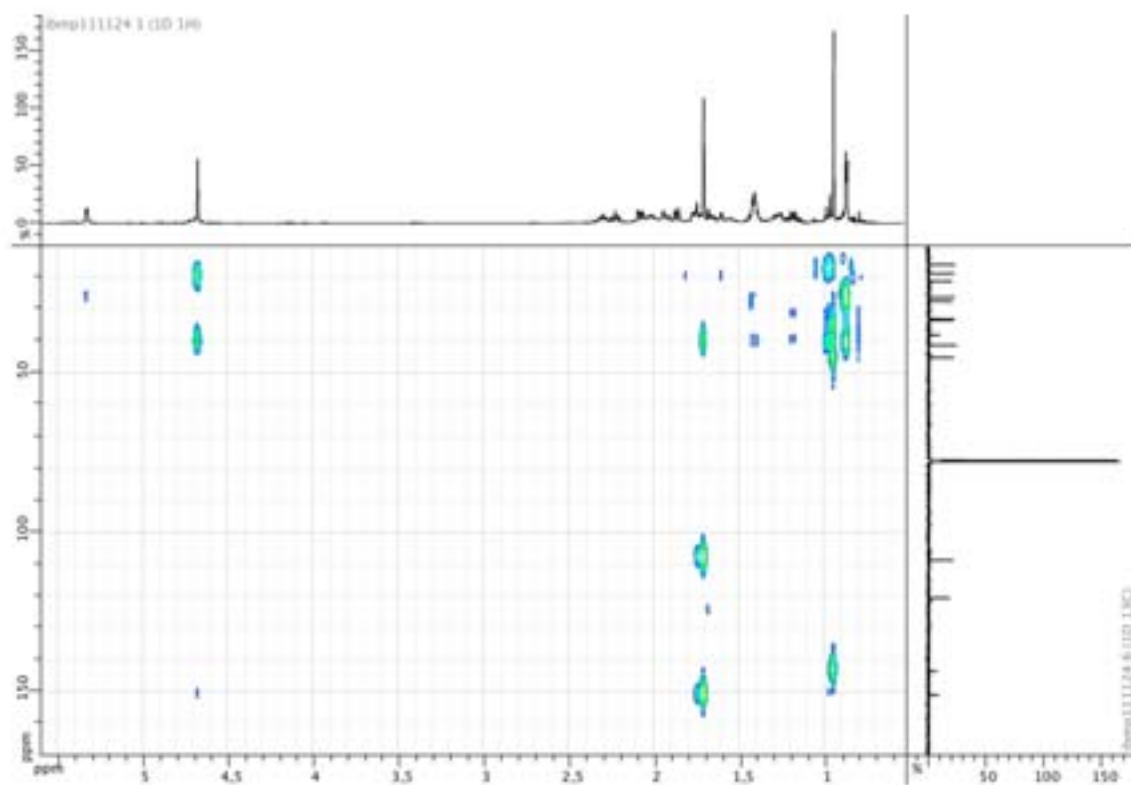
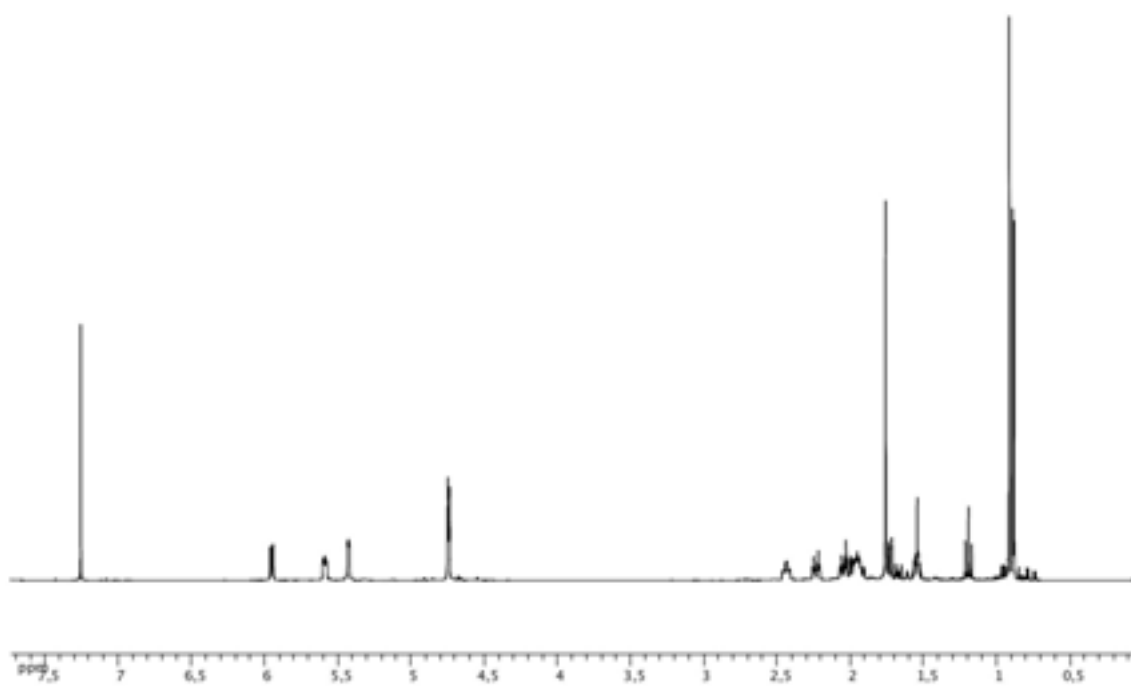


Fig. S6. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (600 MHz) spectrum of (+)-valencene standard in  $\text{CDCl}_3$





**Fig. S7.**  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) spectrum of (-)-nootkatene standard in  $\text{CDCl}_3$

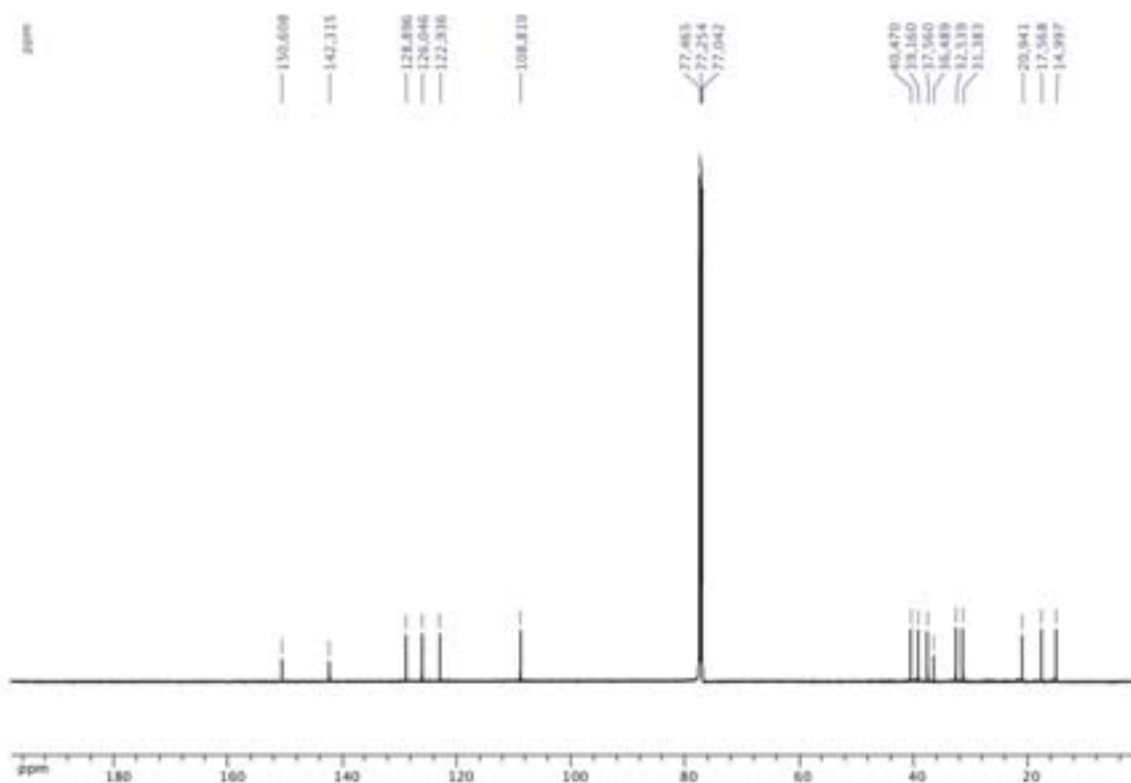


Fig. S8.  $^{13}\text{C}$ -NMR (600 MHz) spectrum of (-)-nootkatene standard in  $\text{CDCl}_3$

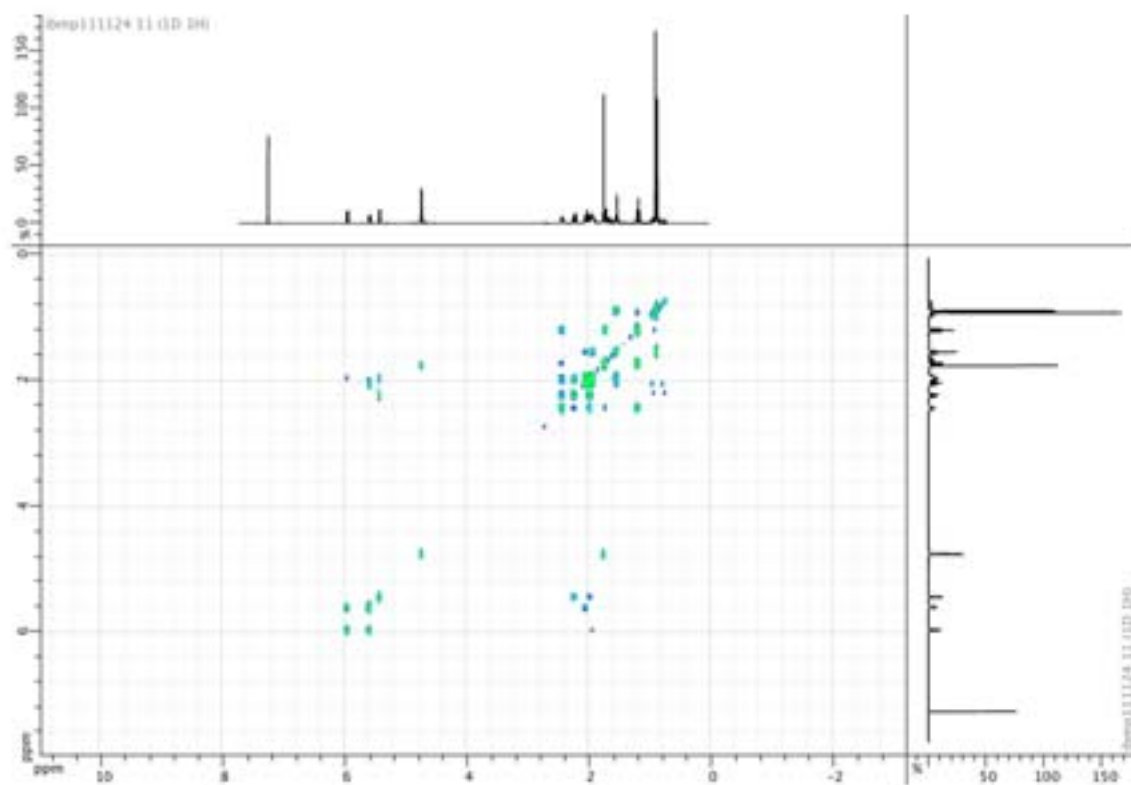


Fig. S9. 2D  $^1\text{H}$ -COSY (600 MHz) spectrum of (-)-nootkatene standard in  $\text{CDCl}_3$

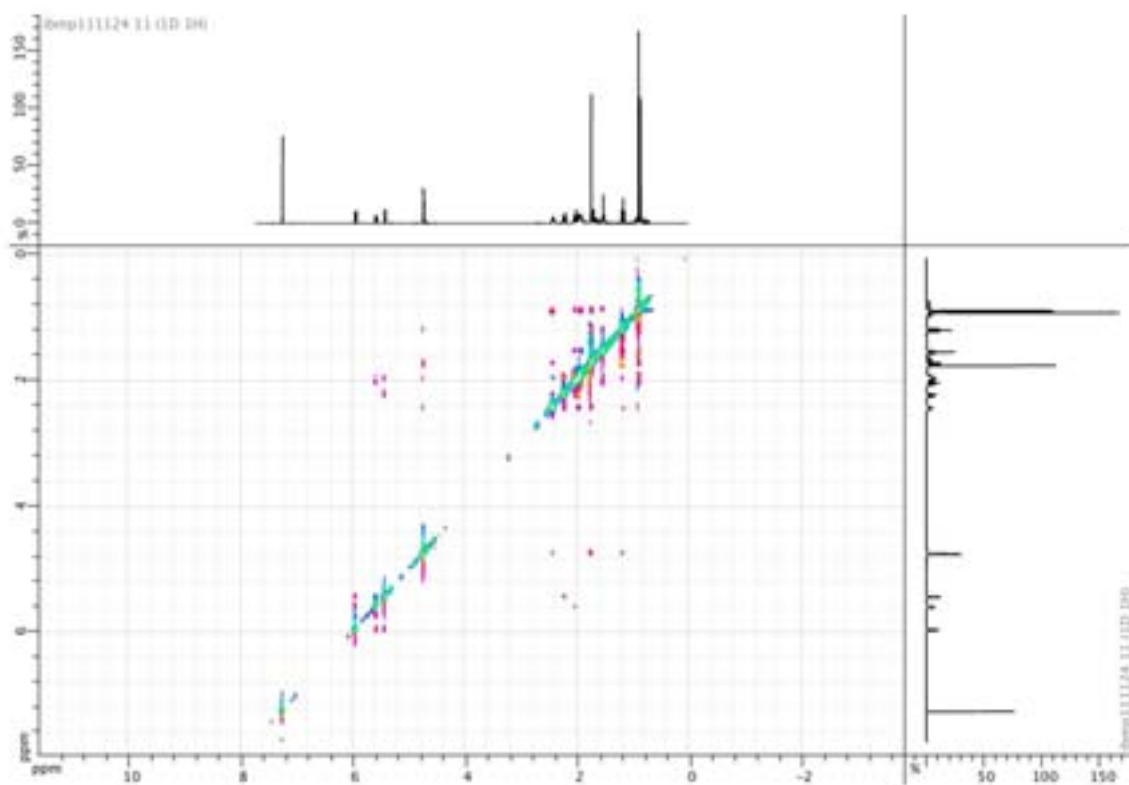


Fig. S10. 2D <sup>1</sup>H-NOESY (600 MHz) spectrum of (-)-nootkatene standard in CDCl<sub>3</sub>

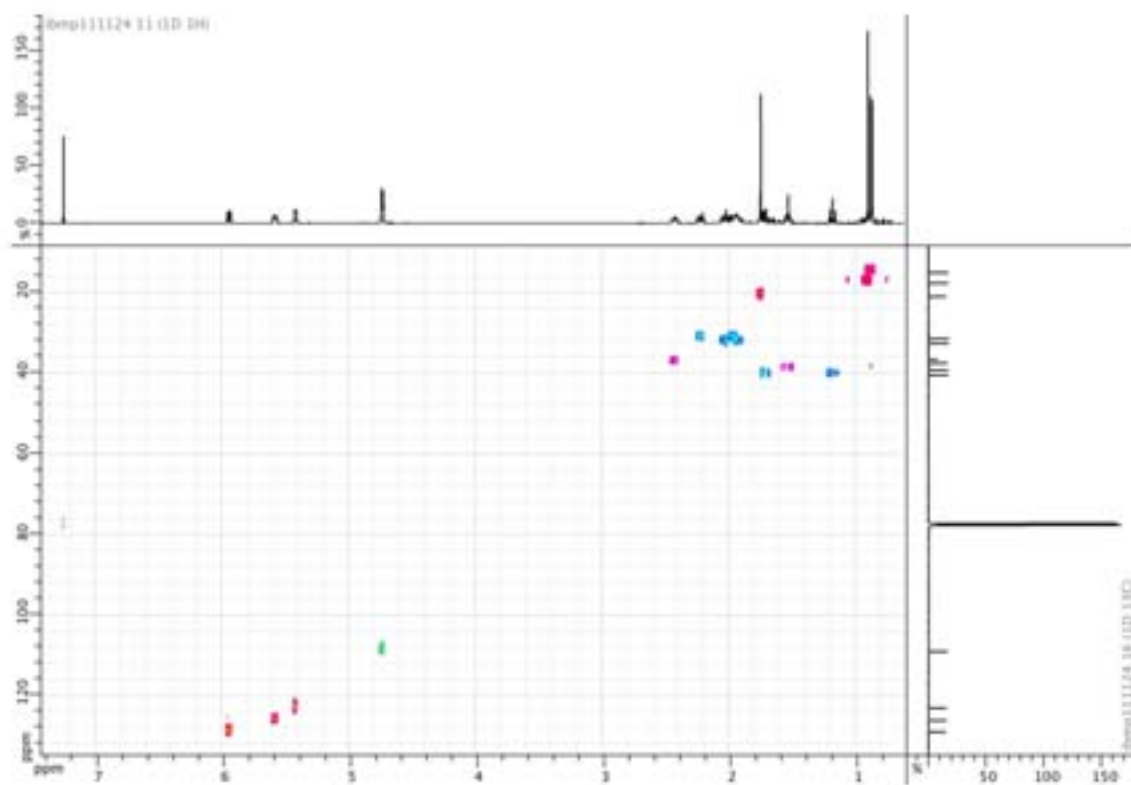


Fig. S11. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (600 MHz) spectrum of (-)-nootkatene standard in  $\text{CDCl}_3$

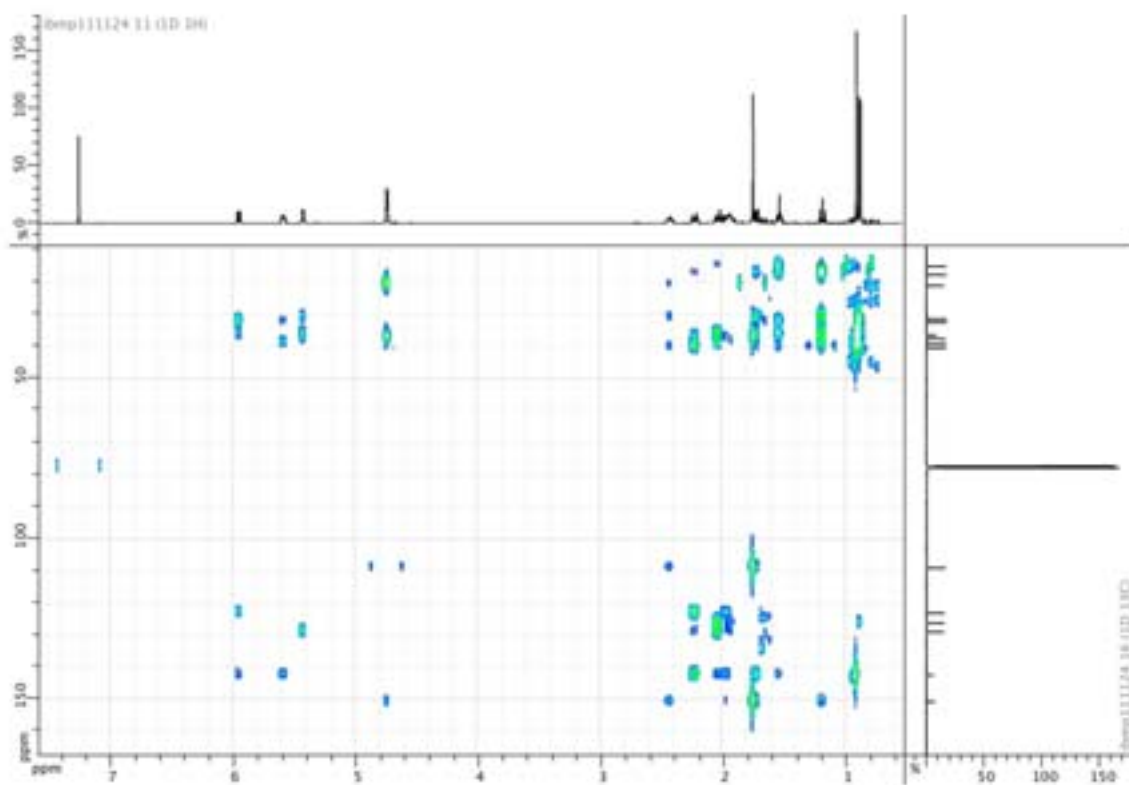
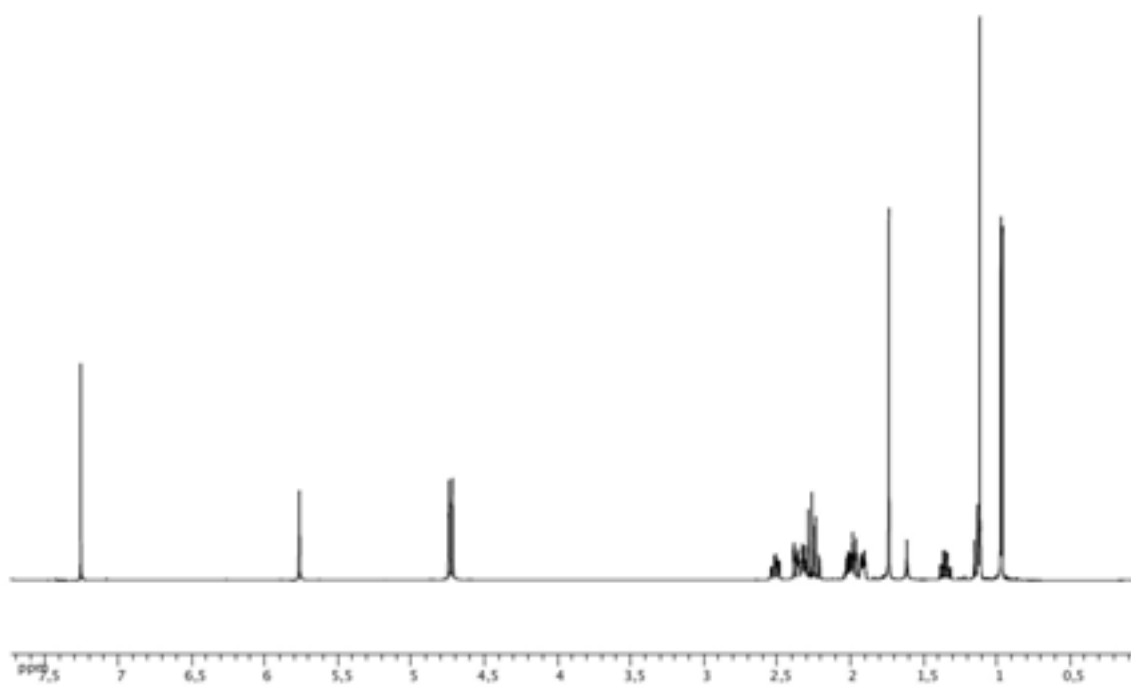


Fig. S12. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (600 MHz) spectrum of (-)-nootkatene standard in  $\text{CDCl}_3$



**Fig. S13.  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) spectrum of (+)-nootkatone standard in  $\text{CDCl}_3$**

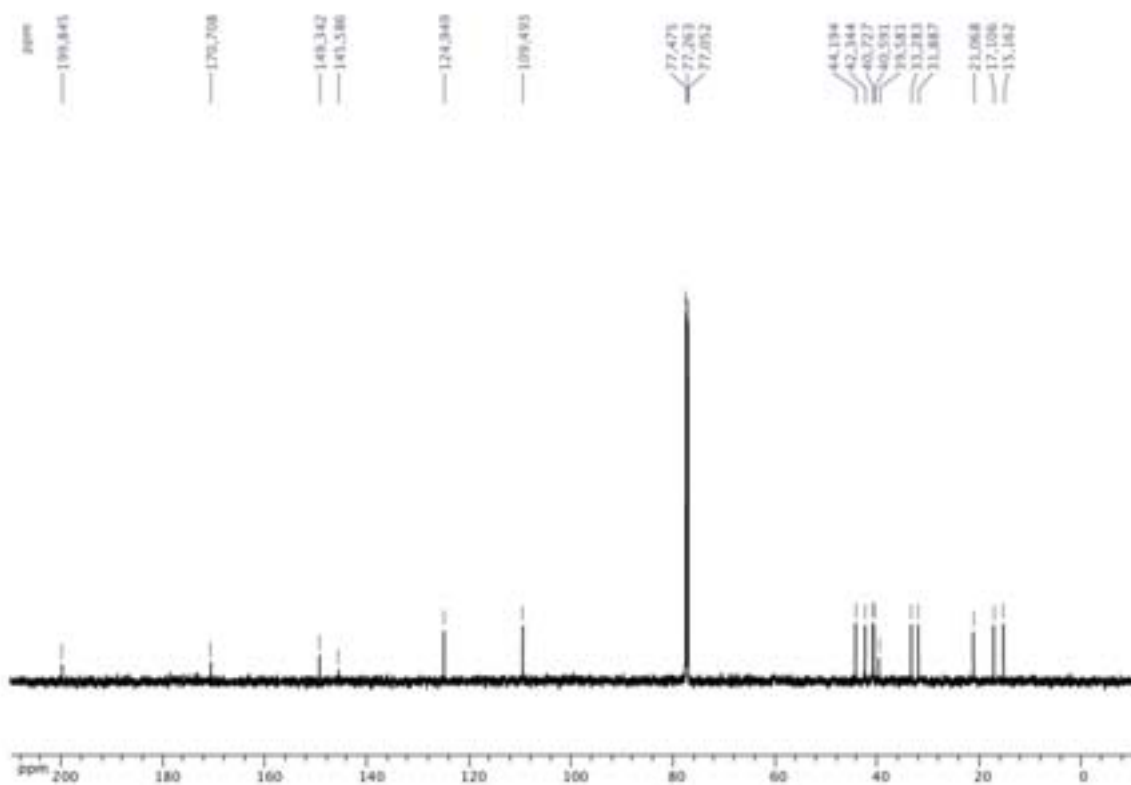


Fig. S14.  $^{13}\text{C}$ -NMR (600 MHz) spectrum of (+)-nootkatone standard in  $\text{CDCl}_3$



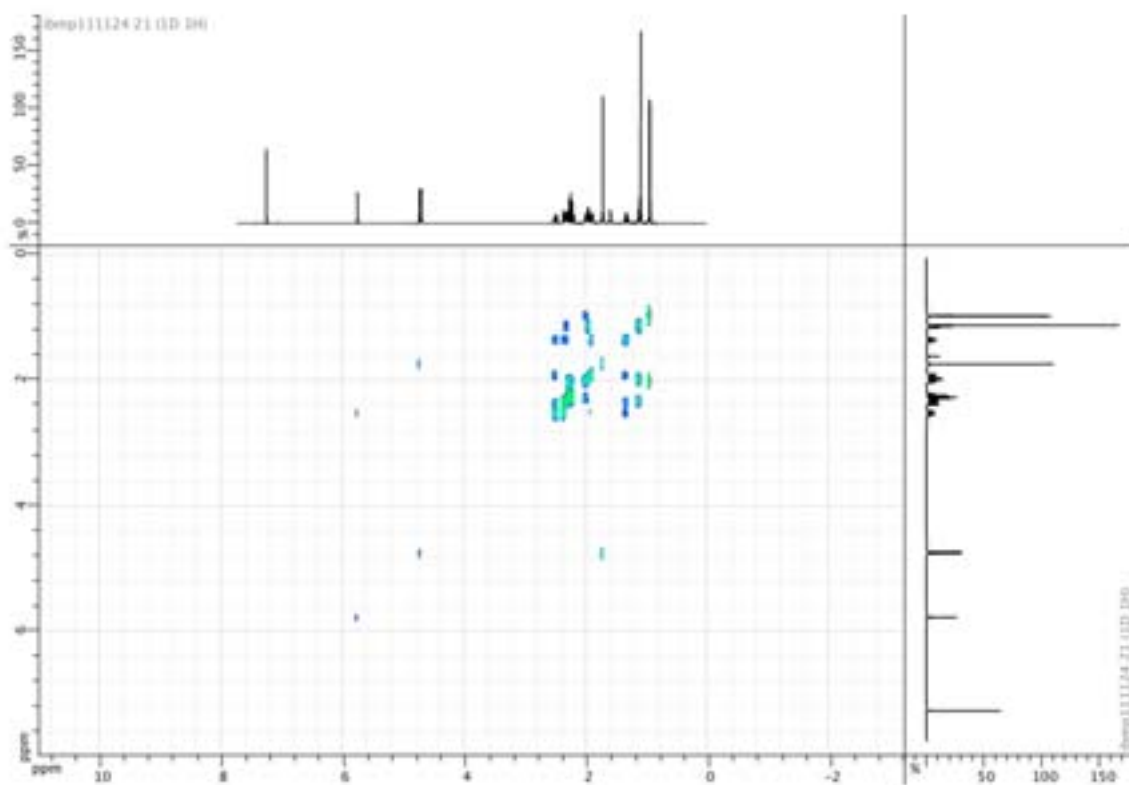


Fig. S15. 2D  $^1\text{H}$ -COSY (600 MHz) spectrum of (+)-nootkatone standard in  $\text{CDCl}_3$

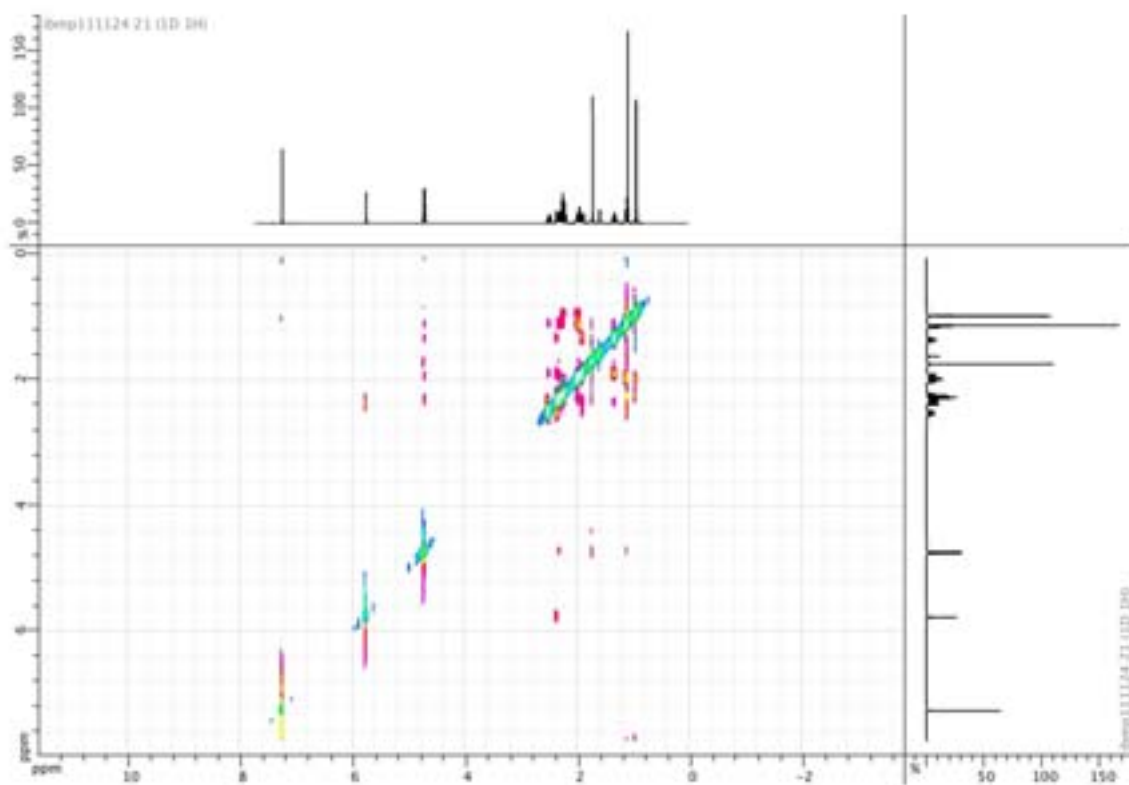


Fig. S16. 2D  $^1\text{H}$ -NOESY (600 MHz) spectrum of (+)-nootkatone standard in  $\text{CDCl}_3$

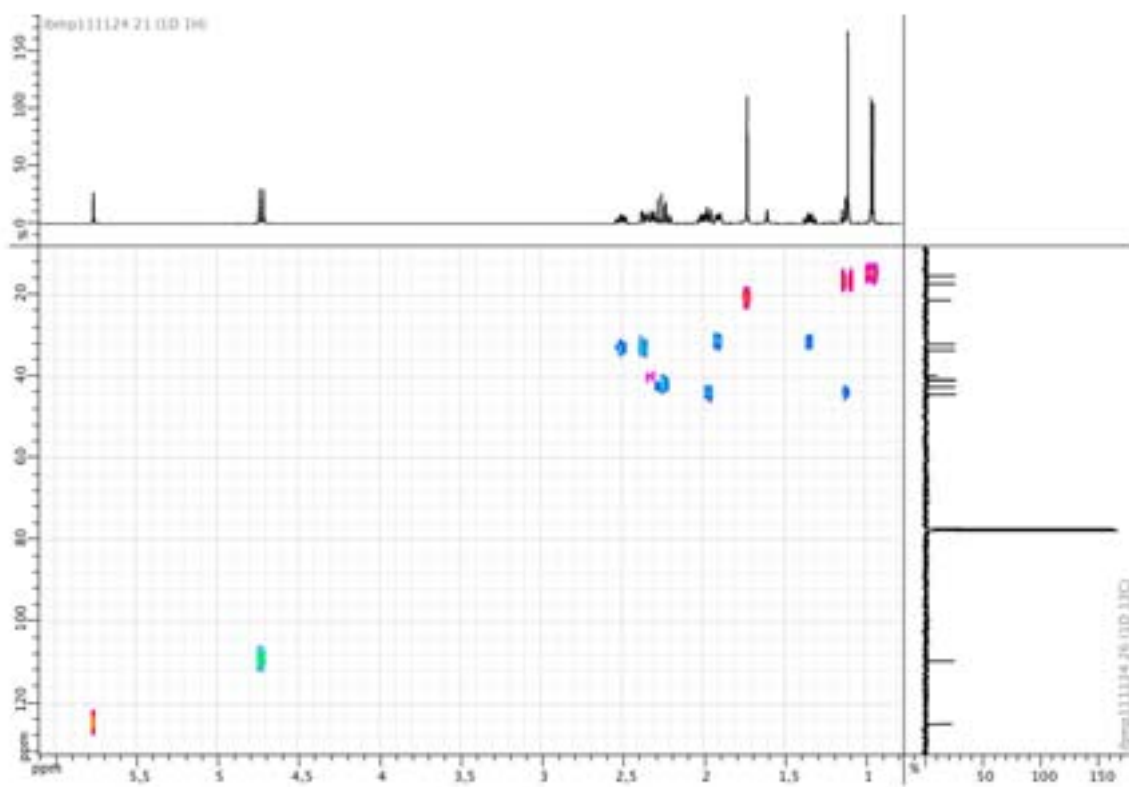


Fig. S17. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (600 MHz) spectrum of (+)-nootkatone standard in  $\text{CDCl}_3$

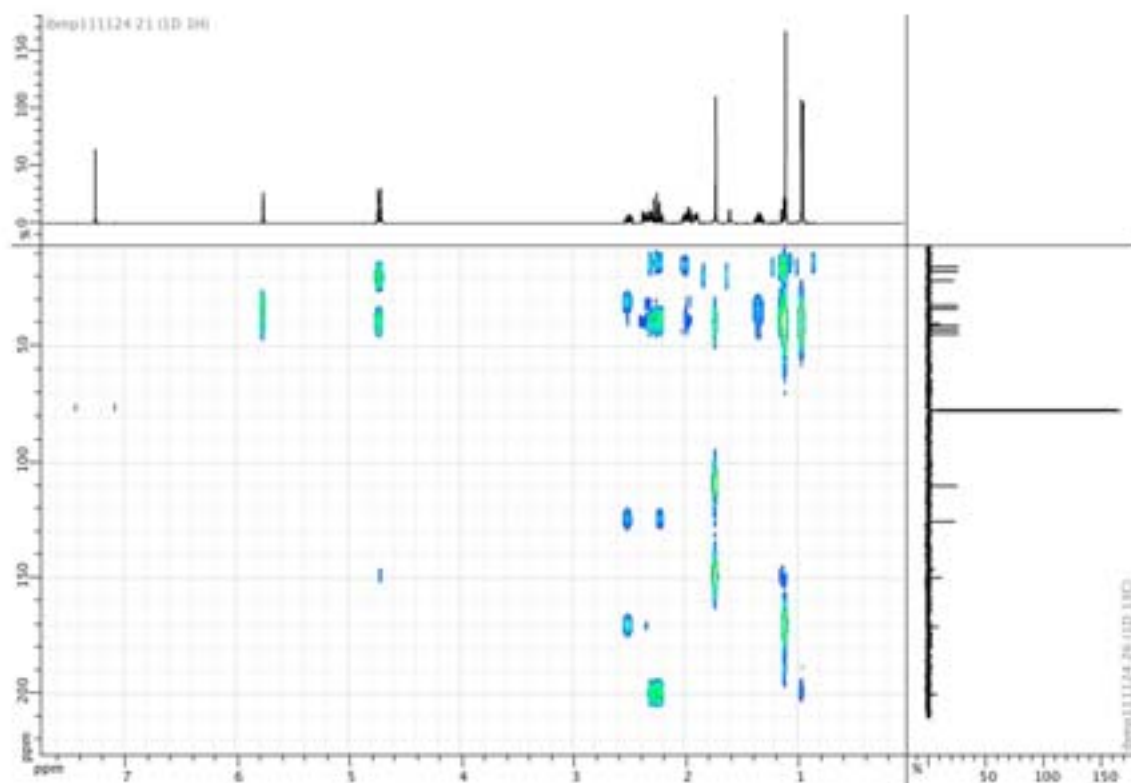


Fig. S18. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (600 MHz) spectrum of (+)-nootkatone standard in  $\text{CDCl}_3$

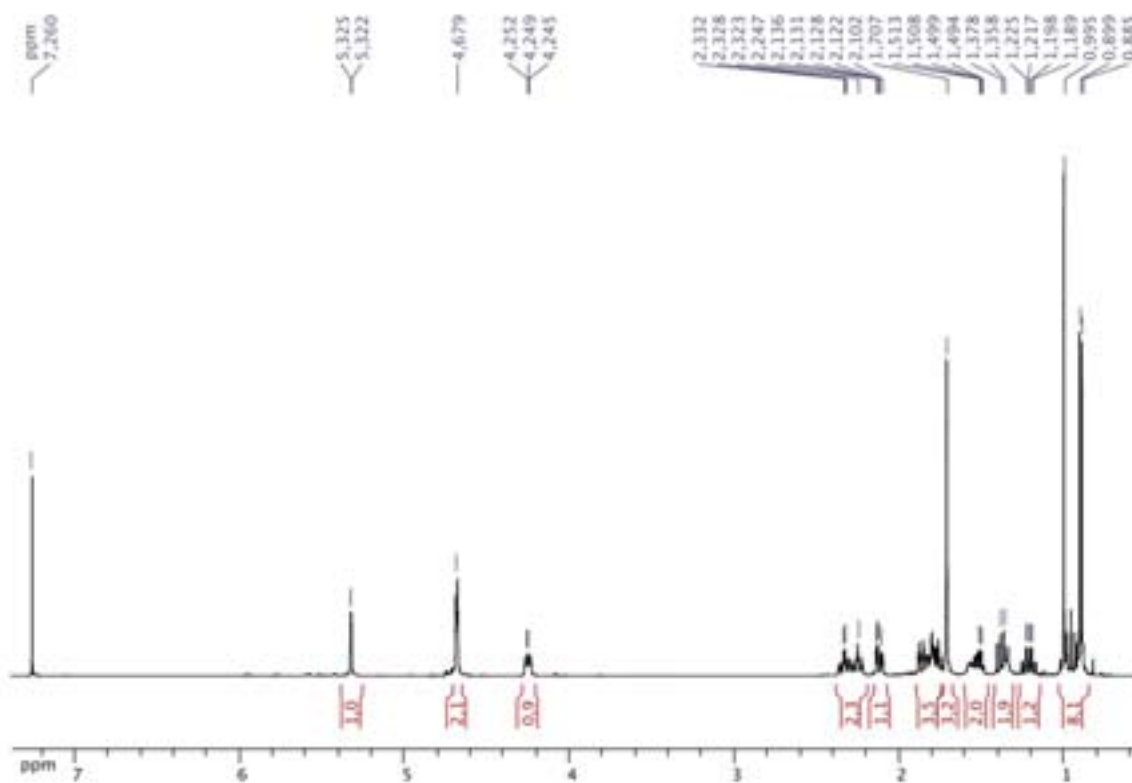


Fig. S19.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) spectrum of  $\beta$ -nootkatol standard in  $\text{CDCl}_3$

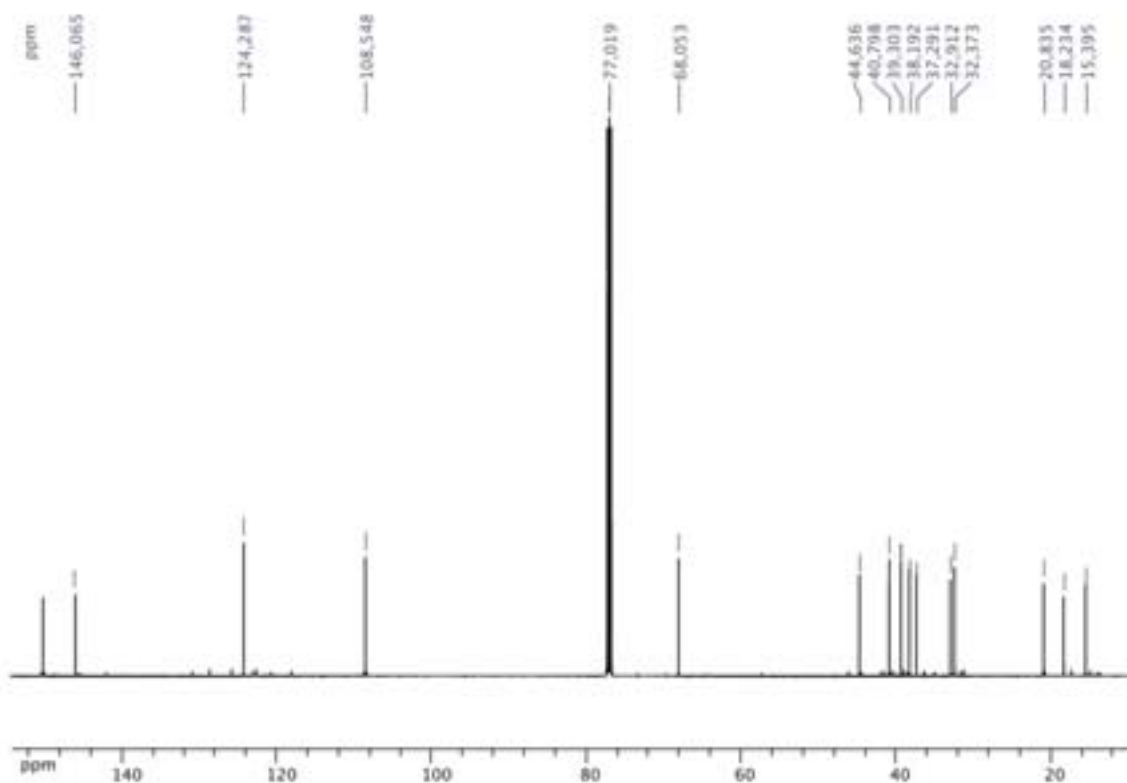


Fig. S20. <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz) spectrum of β-nootkatol standard in CDCl<sub>3</sub>

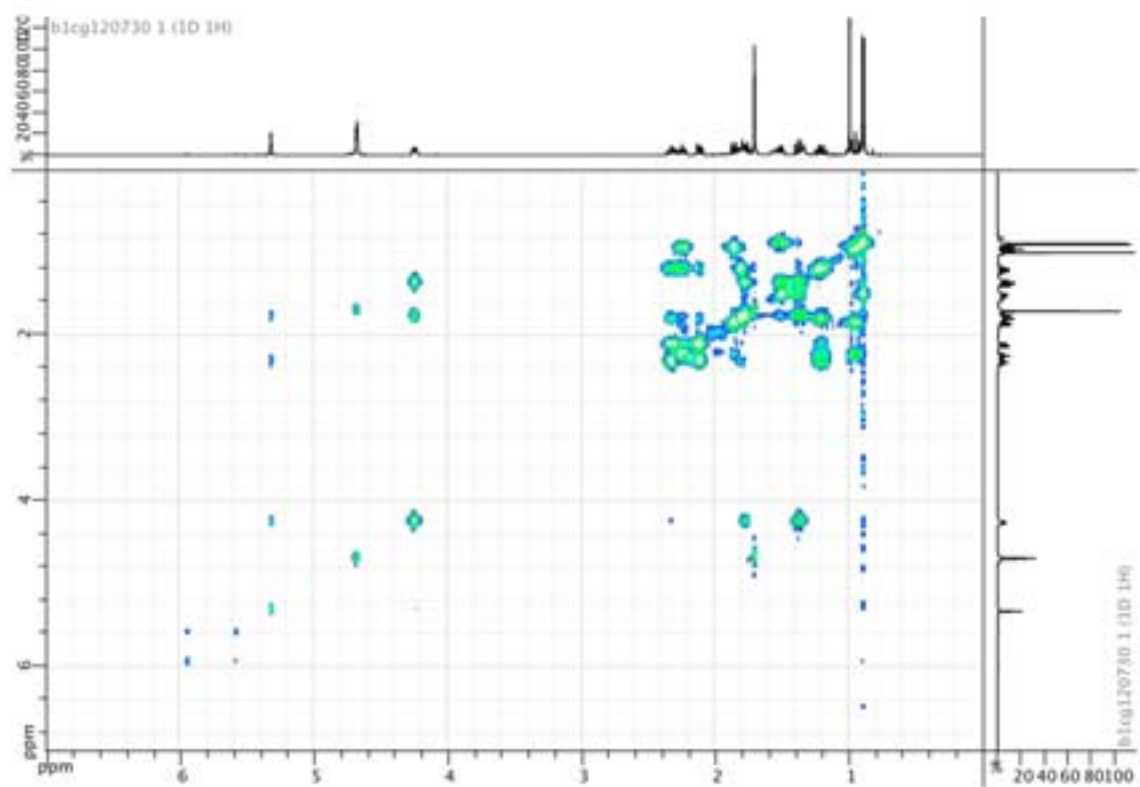


Fig. S21. 2D  $^1\text{H}$ -COSY (500 MHz) spectrum of  $\beta$ -nootkatol standard in  $\text{CDCl}_3$

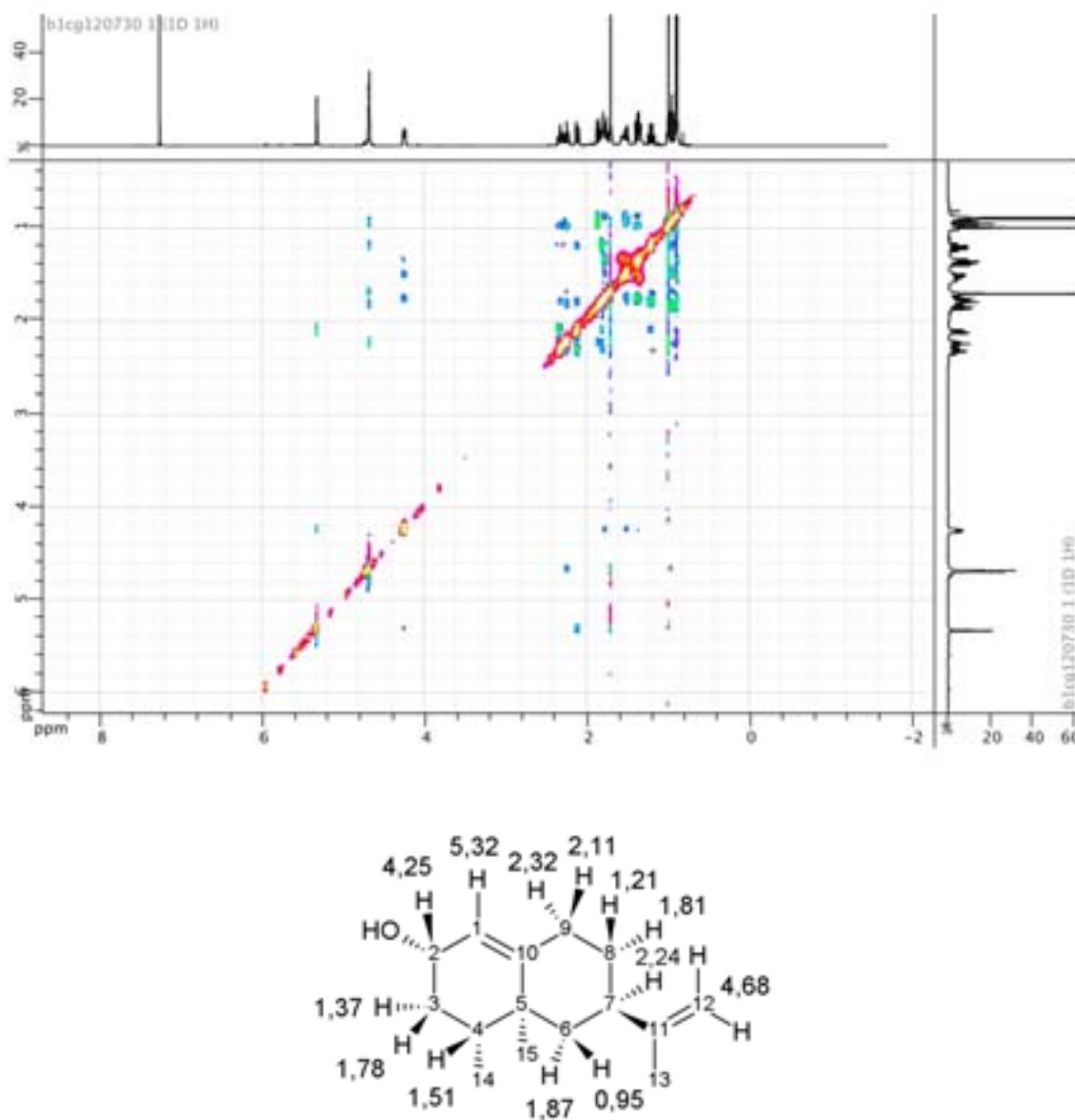


Fig. S22. 2D <sup>1</sup>H-NOESY (500 MHz) spectrum of β-nootkatol standard in CDCl<sub>3</sub>

The stereochemistry proposed is compatible with the 2D <sup>1</sup>H-NOESY (500 MHz) spectrum of β-nootkatol standard in CDCl<sub>3</sub>.



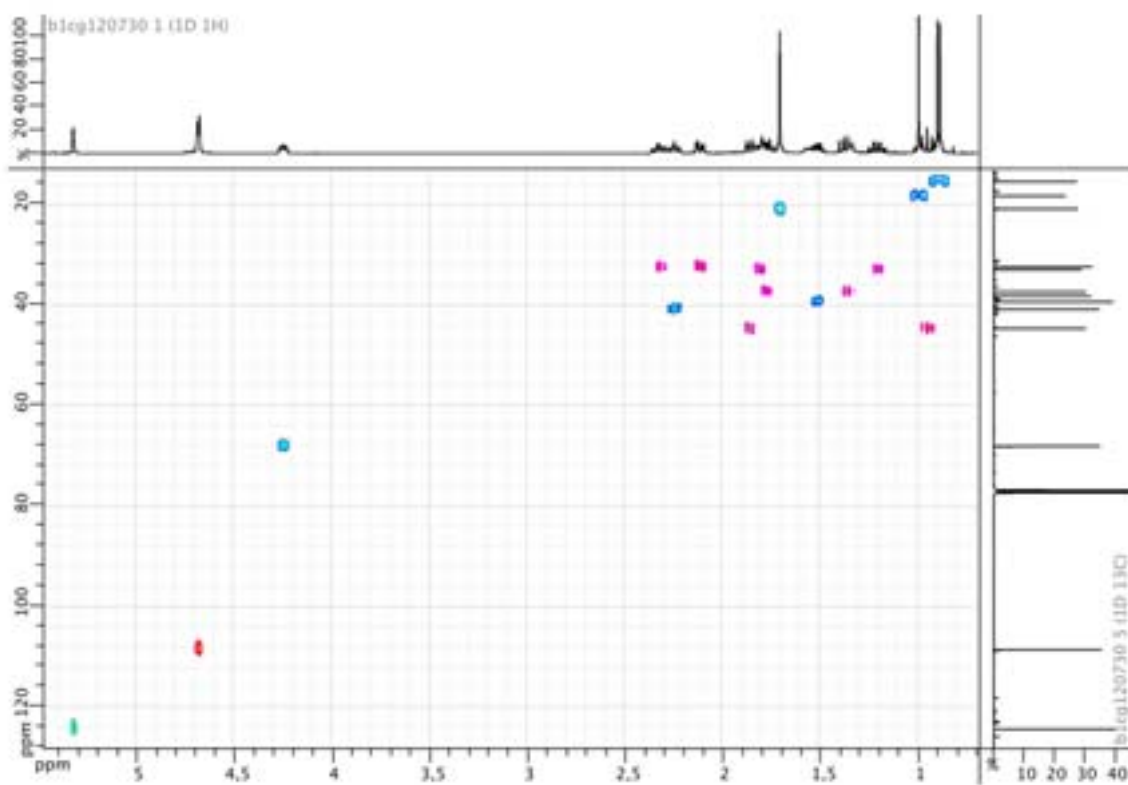


Fig. S23. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (500 MHz) spectrum of  $\beta$ -nootkatol standard in  $\text{CDCl}_3$

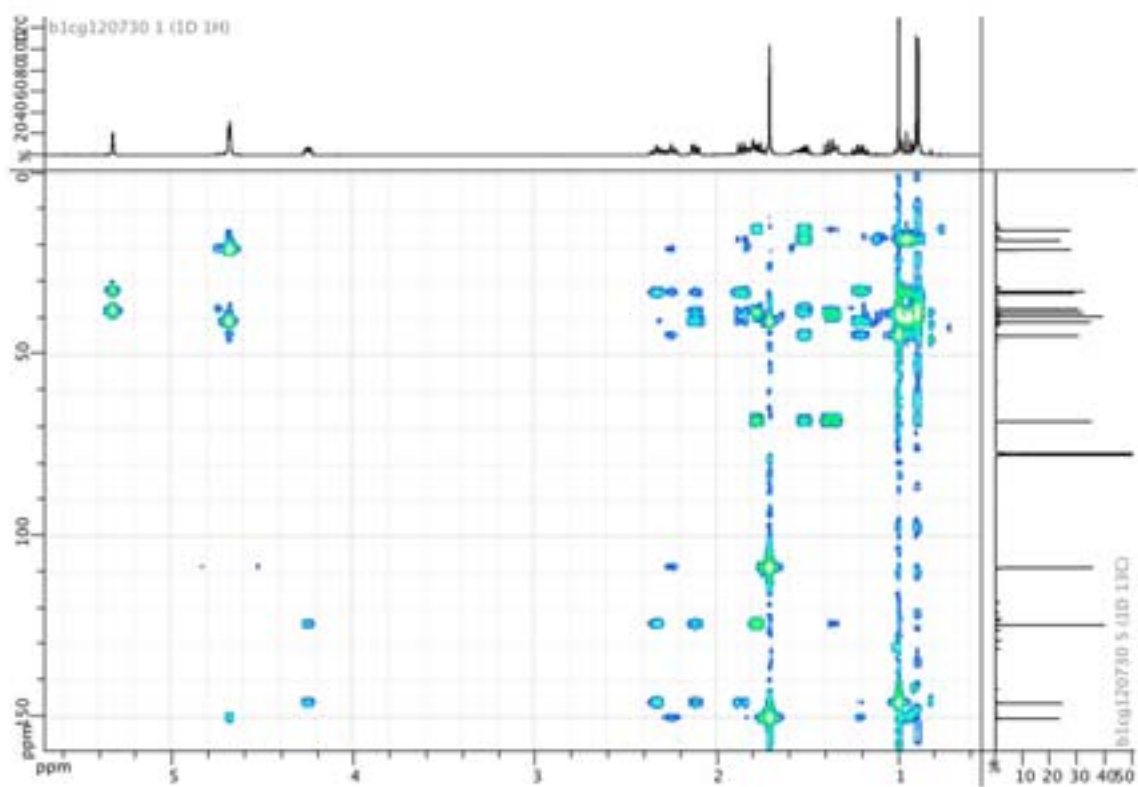
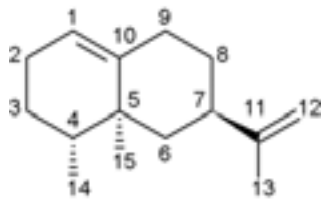


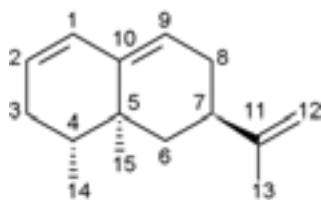
Fig. S24. 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (500 MHz) spectrum of  $\beta$ -nootkatol standard in  $\text{CDCl}_3$

Table S1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR (600 MHz) assignments for (+)-valencene standard in  $\text{CDCl}_3$ .



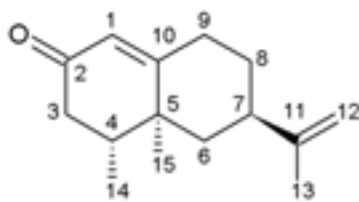
Label	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5,33	120,3
2	1,95 – 1,92	26
3	2,02	26
4	1,41	41,2
5	-	38,3
6	1,87 – 0,98	45,2
7	2,23	41
8	1,76 – 1,18	33,3
9	2,3 – 2,08	33
10	-	143,5
11	-	151
12	4,68	108,3
13	1,71	21,2
14	0,87	15,75
15	0,95	18,52

Table S2.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR (600 MHz) assignments for (-)-nootkatene standard in  $\text{CDCl}_3$ .



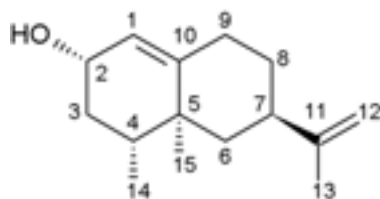
Label	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5,95	129
2	5,59	126
3	2,06 – 1,94	32,4
4	1,54	39
5	-	36,3
6	1,71 – 1,18	40,4
7	2,43	37,5
8	2,26 – 1,97	31,3
9	5,42	123
10	-	142,3
11	-	150,4
12	4,74	108,7
13	1,75	20,9
14	0,88	14,9
15	0,91	17,5

Table S3.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR (600 MHz) assignments for (+)-nootkatone standard in  $\text{CDCl}_3$ .



Label	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5,77	124,8
2	-	200
3	2,25	42,4
4	1,98	40,6
5	-	39,3
6	1,97 – 1,13	44,1
7	2,32	40,5
8	1,91 – 1,35	31,9
9	2,51 – 2,37	33,3
10	-	170,5
11	-	149
12	4,73	109,3
13	1,74	21,2
14	0,96	15,1
15	1,11	17

Table S4.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR (500MHz) assignments for  $\beta$ -nootkatol standard in  $\text{CDCl}_3$ .



Label	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	5,32	124,3
2	4,25	68
3	1,78 – 1,37	37,4
4	1,51	39,4
5	-	37,9
6	1,87 – 0,95	44,5
7	2,24	41
8	1,81 – 1,21	32,4
9	2,32 – 2,12	32,9
10	-	146
11	-	150,2
12	4,68	108,5
13	1,71	20,8
14	0,89	15,4
15	0,99	18,2

ATGCAACTAAGATTGAAGAATATCAATTAACATAAGATGCAATCTTTTCTTTAGTATCTATATCTTATTTTGTCTTCTTATTCTATTAAGGATTTGGAAA  
AATTCTAATTCGCAAAGTAAGAAAATACCACCCGGCCCATGGAAGTTACCCATTTTAGGCTCCATGCTGCACATGGTAGGTGGCTTACCTCATCATGTATTG  
CGTGATCTAGCAAAGAAGTATGGTCTCTGATGCACTTGCAGTTGGGCGAAGTCAGCGCTGTTGGTTACAAGTCCAGATACAGCTAAAGAAGTCTTGAA  
GACACATGATATTGCTTTTGCATCAAGACCTCTTTGTTAGCTCCTGAGATTGTGTGTACAACGTTCTGATCTGGCTTTTGTCCCTATGGAGACTATTGGA  
GACAAATGAGAAAAATCTGTGTTTTAGAGGTACTTTCAGCCAAGAATGTTAGAACAATTTCTCGATTAGAAGAAACGAAGTATTAAGACTAATCAATTTTA  
TCAGATCATCTTCAGGGGAACCAATCAATGTAACAGAGCGTATCTTCTTTTACGAGTAGCATGACCTGCTGCTTGTGCTTTGGTCAAGGTTTCAAAGGC  
AAGATAAATTTATACAATTGATTAAGAAGTCATCCTGCTTGTGGTGGATTGATGTCGCAGACATCTTCCCAGTTTGAATTTTGCATGTGCTAAGCG  
GTATGAAAGGTAAGATTATGAACGCTCATCACAAGTCGACGCAATTTGTCGAGAATGTTATAAACGAACAAAAAACTGGCTATTGGTAAAACAAAC  
GGTGTCTTGGTGGAGAGGATTAATTGACGTTTTGCTTAGGCTGATGAACGATGGCGGTGCAATTTCCAATCACGAATGATAACATAAAGGCAATTAT  
ATTTGATATGTTTGCAGCAGGTACCAGAACTAGTTCATCGACTATTGTGTGGCAATGGTTGAAATGGTTAAAAATCCTGCCGTTTTGCTAAGGCGCAGG  
CAGAAGTAAGAGAGGCCCTTAGGGGAAAAGAACTTTGATGAAAATGATGTGGAGGAACCTAATTAATAAATTTGGTATTAAAGAACTCTTAGGCT  
ACATCCACCGGTGCCATTGTTGTTACCAAGAGAATGCCGTGAAGAACTAACATAAACGTTTATACCATAACGATTAAGACAAAGGTTATGGTTAATGTCT  
GGGCCCTTGGTAGAGATCCGAAATATTGGAATGATGCTGAACTTTTATGCCAGAAAGTTTGAACAGTGTCTAAGGACTTTGTTGGAATAATTTTGAA  
TACTTGCCATTGCGTGGCGGAAGGAGAATTTGCCAGGGATATCTTCCGATTGGCTAACGCCTACTTGCCTTAGCCCACTACTTTATCATTTTCGACTGG  
AAGCTACCAGCAGGGATTGAGCGTCAGACTTGGATCTAACAGAACTTGTGCGTGAACCGCTGCGAGAAAAATCCGACTTATACTTGGTTGCGACTCCTTA  
CCAACCTCTCAGAAATAA

**Fig. S25. *CYP71D51v2* cds sequence with codon optimization according to yeast usage.**

ATGCAATCTTGTCTTAGCTTCAATATTTCTGTTCTTAAAGCTTTCTGTTCTTGTGCTGCGTAAATGGAAAAATTCGAATTTCAAAGCAAAAAATACCACCAAG  
TCCTTGAAATACCCTACTAGGTAGTATGTTGCATATGGCAGGAGGTTGCCACATCATGTTCTGAGAGATCTAGCTAAAAAGTACGGTCCATTGATGCA  
TTTACAATTAGGTGAAGTTAGCGCAGTTGAGTTACCTCACCAGATATGGCGAAGGAAGTTCTTAAGACGCACGATATAGCTTTTGTCTTAGACCAAACT  
TTTGGCACCAGAAATCGTTTGTACAATAGATCTGATATCGCTTTTGTCCATACGGAGATTATTGGCGTCAAATGAGGAAAACTGTGTCTAGAACTACT  
TCGGCTAAAAATGTCGTTCTATGGATCTATAAGGAGGGATGAAGTTGACAGATTAGTAACTTTATTAGTCCAGTTCTGGAGAGCCAGTTAATTTAC  
AGAAAGATTGTTCTTGTTCACATCATCTATGACATGTAGATCAGCGTTTGGAAAAAGTTTCAAAGAACAAGATAAAATTTATCCAATTAATCAAAGAGGTGAT  
AGGTTTGGCCGGTGGTTTTGATGTTGCAGACATTTTCCAAGTTTAAAGTTTTTACATGTGTTAAGTGGGATGAAAGGTAAATCATGAATGCTCACCATAA  
GGTAGACGCTATTGTCCAAGATGTAATAAATGAACACAAAAAGAAATTTGCGATTGGTAAGACCAATGGTGCATTGGGTGGCGAAGACTTAATAGATGTC  
TTAATTAGACTAATGAACGACGGTGGCTTGAATTTCTATTACAAACGACAATATTAAGGCCATTATTTTCGACATGTTTCCGCTGGGACGGAGACCAGT  
TCCTCTACTCTAGTGTGGCCATGGTACAGATGATGAAGAACCCTGAGTATTGCAAAAGCTCAGGCCGAAGTAAGAGAAGCATTCAAAGATAAGGAAA  
CTTTTGACGAAAACGATGTAGAGGAATTAAGTATTGAAGCTAGTTAATGAAGGACTCTTAGACTGCATCTCCAGTTCTCTTTTAGTGCCTAGAGAAT  
GTAGAGAAGAGACGGATATTAACGGGTATACAATCCCGTGAAACTAAGTCAATGGTTAACGTGTGGCTTTGGCCGTGGCCCAAGTACTGGGATGA  
TGCCGAGTCTGTTTAAACCCGAAAGTTTGAACAGAGATCAGTAGATTTTGGAAATACTTTGAGTATTGCCATTGCGCGGGGCGAGGAGAATATCG  
CCGGCATCTCTTTCGACTAGCAAATGTGATTTGCCACTTGCACATTTGCTTTACCAATTTGACTGGAAACTACCGATAGGATGGAACCTAAGGATTTG  
AATTTAACTGAACCTGTTGGTGTACCAGCCAGCAAAAAGATGACTTGATTCTGGTCTGCTACTCTTATGAGCCTCCTAGGCAATAA

**Fig. S26. *CYP71D4* cds sequence with codon optimization according to yeast usage.**

ATGGATTTTGAATATCTAACCTTAATTTGGTGACGTTCTTATTTTTTGTGTTTTCGATTCTTACTTATCAACGGACGTAGAAAAGTACTAGGACCAAGAC  
GATTAACCTCCACCAGGTCCTTGGAAATTTGCCATTTTGGGTAATTTGCATAATATGATGATGGGTTCCGTTCTCACCCTTTATTAAGAGACTTGGCAA  
GAAACATGGCGATTTAATGTTGTTGAAATAGGCGAATTAATGCGATCGTGTGTCATCCCAAGGATGGCGAAAGAAGTCTTAAACACATGATTTAT  
CTTTTCAAATAGACCTATTATTCAAGCACAAAGATCTTTGTTACGATAACTCTGACTTGGTATTAGTCAATACGGAGACAGCTGGAGACAAATGAGAA  
AGATATTTGTTTTGGAGTTGCTTTCAACAAAACGTGTTAGATCATTCCAGCCATCAGACAAGACGAAGGTAGCAGGTTAGTCTTTGATTAAGAATCCG  
TTGGCAAATCGATTGATTTATCCGAAAAGATTAACCTGACACTACTTCTATGTTGCTAGAGCTGCTTTTGGTAAAGGTCAACGACGCTGGAGTAACTTTCT  
TAAACTAGTTAAAGAAGCATCAGAAGTCGCCGGTGGCTTCCAGCTGATTTTTCCGTCATACAAGTTCTTAACTGTTCTTTAACAGTAGAAGCA  
AACTATTGAAAATTCACGGTAAGACTGATATGATTCTGGAAGAGATGATCGACGAACACATTAACAACTGAAATGGGGAAAAAGGCTAACGGGGAAA  
ACGGAAAAGAGGACGTGATAGATATTTGCTAAGTATAAAGGATAGTGGAGAAGTGAATTTCCATTCCAGATGAATAATGTCAAGGCCTTCATTTCCGAT  
ATGTTCCGACGAGGTACAGAACTTCTACTGTTGAGTGGGCTATGTCCGAGTTAATAAGAAATCCGGATGTTATGGCCAAAGCACAGAACGAGGT  
TAGACAAGTATTGAAGGGGAAACAATAGTTGATGAAAGCGTTTTACAAGAGCTAGAGTACTTAAAGCTGATAGTTAAGGAAGTTTTAAGACTTCATCCTT  
CTTCTCCTGTTGATCCCTAGGGAATGCAGGGAAGATTGCCAGATTGATGTTATGATATACCCGTAACGAGAGTGTGTTGTAATATCTGGGCCATC  
GCCAGAGATGATAAATATTGAAAGACCCGGAATCGTTTATCCAGAACGTTTTGAGAATACTTGTGTTGATTTTACAGGCAATAATTTGAAATATCTACCTT  
TTGGATCTGGTAGGCGTATGTGTCGGGTATGACCTTTGGTCTGGCTAATGTTGACCTAGTATTAGCTTTACTATTATACCTTAAATTTGAAATTTGCCACC  
AGGCGTAAATGATATTGACATGACAGAACGTGTTGGTCTGGGTGCAACCAAGAAACATTCTTTGGTCTGATTCTACATTATGACCCATCATTCTAA

**Fig. S27. *CYP71D1* cds sequence with codon optimization according to yeast usage.**

ATGAGTTTATCCTTTCTTATACTGTCTCTTATCTTTATATATATGTTTCTTAACTTTGGAAGAGGTCAAATCCAAGCATAGTACCTTAAAGAATTTGCCACC  
TGGTCCAACAAAATTGCCACTAATCGGAAATATGCACCAGTTGTTAGGTTCTTACCGCATCACAGGTTGAGAGATCTAGCAAAGAAATATGGTTCAATAA  
TGCATCTTCAACTGGTGAAGTCCCTCACGTTGTGGTATCGTCTCCAGAAGCTGCAAAAGAGTAATGAAAACCTCATGATATTGTTTTGCTCAACGTCCTTT  
TCTACTTGACGATCCGTCATTACTTATAATTTTACCGATATTGCTTTCTCCCCATACAGCGATTACTGGAGACAGTTGCGTAAAAATTTGCGTCTAGAGCTAC  
TTTCTGCTAAAAGGGTCCAATCTTTTAGAAGTATAAGAGAAGAAGAAGTTAGTAATTTGATTAATACTTTGACATCTTTCAGCGGAAACCTTTCAATTTTA  
GTAGGAAATATTTTCAAGTACATACGGGATTGCCGCTCGTGCTCTTTTGGGAAGAAATATAAAGATCAAGAAGAATTCATTAAGTTGCCAGCAAAATG  
ACGGAGGTCGCTGGAGGCTTCTCTGCGCCGACCTATCCCTCAATCGCGTTCCTGCATGTTATCTCAGGCATGAAGAGCAGATTATTAAGGCTAAGAGA  
TGATGGAGACAACATTTTGGAAAATATTATTGACGATCATAGAGCCAGAAACATGACAGGCAAAACTTCCGGTGAAGGAGAAGACGACGATTTGGTGGAC  
GTTCTGTTGCGTTTTCAAAAAGGTGGACAATTGGAGTTCCCTTGACTACTAATAATATCAAGGCTGTAATCTTAGACATTTTCATAGCAGGTTCCAGAAACA  
AGCTCAACAACTGTGGAGTGGGCTATGTCGGAAATGTTAAGGAATCCTAGAGTAATGGAGAAGGCACAGGAAGAGTAAGAAAGGTTGTTGGAAAAA  
GGGTAACGTAGACGAGGCCGAATTGCATGAACGAATTATTGAAGTTAGTTATTAAGAGACGCTGAGATTGCATCCTCCTGCGCCATTGTTATTGCCTC  
GTGAATCTAGAGAGTCTTGTGAAATTAACGGTTATTATATCCCGTGAATTCGAAGGTCATCGTTAACGCGTGGGCCATAGGCAGAGATCCAAACAATGG  
ACCGAGGCCGAAACCTTTTACCCGAAAGATTTTATAGATTCTGCTATAGATTATAAAGGTAACACTTTCGAATTTATACCATTGCGCGCTGGCAGAAGGATG  
TGTCGGGAATATTATTCGGTATGGCAAACGTTGAATTACCATTAGCTCAATTTCTATACCCTTTGATTGGAAGTTACCGGATGGTTTGGAAAGCGGAATCA  
TTAGATATGATGGAAGTTTTGGTGAACGTTCTGTAGAAAGAATGATTTACATCTAATCGCAATTCACACCATTAA

**Fig. S28. *CYP71D326* cds sequence with codon optimization according to yeast usage.**



```

CYP71D51v2  MQLRFEEYQL TKMQFFSLVS IFLFLSFLFL LRIWKNSNSQ SKKLPPGPWK
CYP71D55    -----
CYP71D20    -----
CYP71AV8    -----MEI.IPT TLGLAVII.I IFKLLTRTTS K.N.L.E..R

CYP71D51v2  LPILGSMLHM VGGLPHHVLRL DLAKKYGPLM HLQLGEVSAV VVTSPDTAKE
CYP71D55    ..L.....
CYP71D20    I..... I..E.....
CYP71AV8    ...I.H.H.L I.TM..RGVM E..R.H.S.. ..S..RW...

                                SRS 1
CYP71D51v2  VLKTHDIAFA SRPSLLAPEI VCYNRSDLAF CPYGDYWRQM RKICVLEVLV
CYP71D55    .....
CYP71D20    .....VV..
CYP71AV8    ..T.Y..T.. N..ET.TG.. .A.HNT.IVL A...E...L ..L.T..L..

CYP71D51v2  AKNVRTFSSI RRNEVLRRLIN FIRS--SSGE PINVTERIFL FTSSMTCRSA
CYP71D55    .....S.... ..D.....V. .V.--.TS. .V.F..L..
CYP71D20    .....S.... ..D..V...D S...DS... LV.F.Q..IW .A.....
CYP71AV8    N.K.KS.Q.L .EE.CWN.VK D...-TGQ.S ..LS.N..K MIATILS.A.

                                SRS 2
                                SRS3
CYP71D51v2  FGQVFKEQDK FIQLIKEVIL LAGGFDVADI FPSLKFLHVL SGMKGKIMNA
CYP71D55    ..K.....ET .....G ..... T.E...K.
CYP71D20    ....L.G..I .AKK.R...G ..E...V.. ..TY..... ..R.LL..
CYP71AV8    ..KGI.D.M. .TE.V..ILR .T..... ..K.L.L.H. ..KRA.LT.I

                                SRS 4
CYP71D51v2  HHKVD AIVEN VINEHKKNLA IGKTNGALGG EDLIDVLLRL MNDGGLQFPI
CYP71D55    .....D ..... M.....
CYP71D20    .L.....D ..... A..S..... ..TS.....
CYP71AV8    .N.L.NLIN. I.A..PG.RT SSSQ----- .T.L..... KES--AE..L

CYP71D51v2  TNDNIKAIIF DMFAAGTETS SSTIVWAMVE MVKNPAVFAK AQAQEVREAFR
CYP71D55    .....
CYP71D20    .....V.V ..... .T.T...A. .M..S..T.
CYP71AV8    .A..V..V.L ...G...D.. .A..E..IS. LIRC.RAME. V.T.L.Q.LN

                                SRS 5
CYP71D51v2  GKETF DENDV EELNYLKLVI KETLRLHPPV PLLLPRECRE ETNINGYTIP
CYP71D55    .....
CYP71D20    D.VS..... ..K..... ..S ..V..... D.D.....
CYP71AV8    ...RIQ.E.L Q..... ..L ..VM..... PCVLG..D..

CYP71D51v2  VKTKVMVNWV ALGRDPKYWN DAETFMPERF EQCSKDFVGN NFEYLPFGGG
CYP71D55    .....
CYP71D20    A..... ..D ...S.K.... ..V..F.. ...F.....
CYP71AV8    S...LI...F .IN...E..K ..... .NSPITVM.S EY.....A.

                                SRS 6
CYP71D51v2  RRICPGISFG LANAYLPLAQ LLYHFDWKLP AGIEPSDLDL TELVGVIAAR
CYP71D55    .....
CYP71D20    .....M... ..L..... T..M.R.... ..S.I.I..
CYP71AV8    ..M...AAL. ...VE...H I..Y.N.... N.KTFE...M ..SF.A.VQ.

                                494 496
CYP71D51v2  KSDLYL V ATP YQPPQK--
CYP71D55    ....M..... ..SRE--
CYP71D20    .GG...N... ..SRE--
CYP71AV8    .TE.L..P.D F.TLTAST

```

Fig. S29. Amino acid sequences alignment of CYP71D51v2 with other reported sesquiterpene hydroxylases.

CYP71D55 is from *Hyoscyamus muticus* (GenBank ID: EF569601), CYP71AV8 from *Cichorium intybus* (GenBank ID: HQ166835), CYP71D51v2 from *Nicotiana tabacum* (GenBank ID: DQ350345) and CYP71D20 is from *Nicotiana tabacum* (GenBank ID: AF368376). Dots represent identical amino acids to CYP71D51v2. Shaded boxes show the 6 putative SRS as defined by Gotoh et al. (1992). Amino acids 494 and 496 are framed because the corresponding amino acids in CYP71D55 are noted for catalytic efficiency improvement according to Takahashi et al. (2007). The alignment was generated with Clustal W alignment using BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999).

**Table S5: Protein sequences identities of different sesquiterpene hydroxylases.**

CYP71D55 (GenBank ID: EF569601) and CYP71AV8 (GenBank ID: HQ166835) catalyze valencene hydroxylation (Takahashi et al., 2007; Cankar et al., 2011). CYP71D51v2 (GenBank ID: DQ350345), CYP71D4 (GenBank ID: AJ296346), CYP71D1 (GenBank ID: EU541505) and CYP71D326 (NCBI ID: XM\_002522675) were screened for the same activity. CYP71D20 (GenBank ID: AF368376) catalyze 5-*epi*-aristolochene hydroxylation (Takahashi et al., 2005).

Sequence Identity Matrix  
Input Alignment File: Untitled1

Seq->	CYP71AV8	CYP71D55	CYP71D51v2	CYP71D4	CYP71D20	CYP71D1	CYP71D326
CYP71AV8	ID	0.495	0.504	0.497	0.466	0.485	0.494
CYP71D55	0.495	ID	0.883	0.926	0.815	0.562	0.547
CYP71D51v2	0.504	0.883	ID	0.879	0.794	0.548	0.540
CYP71D4	0.497	0.926	0.879	ID	0.817	0.550	0.549
CYP71D20	0.466	0.815	0.794	0.817	ID	0.539	0.519
CYP71D1	0.485	0.562	0.548	0.550	0.539	ID	0.485
CYP71D326	0.494	0.547	0.540	0.549	0.519	0.485	ID

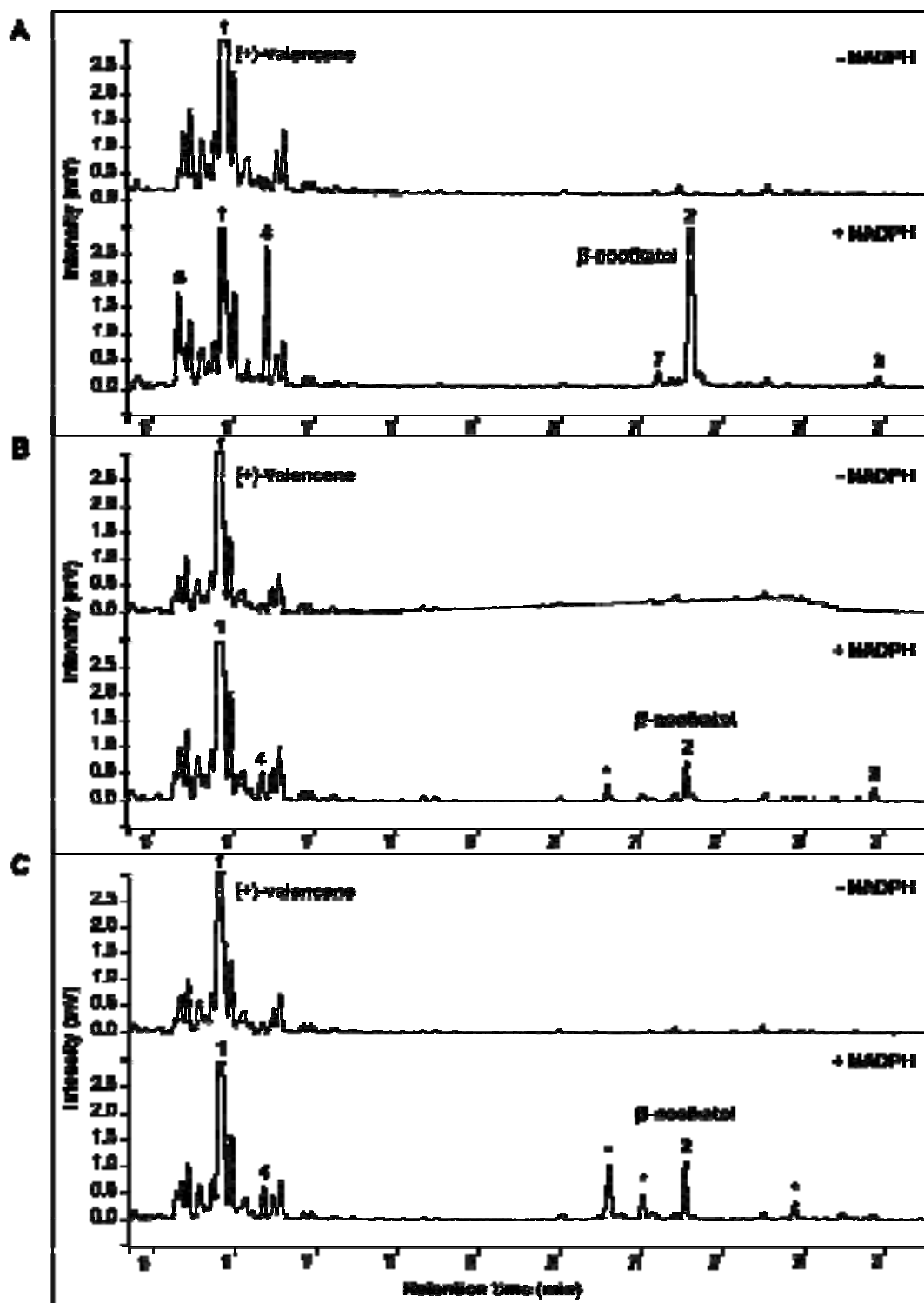


Fig. S30. Analysis of the products of (+)-valencene conversion by microsomes prepared from yeast expressing the candidates cytochromes P450.

GC-FID analysis of the products obtained after 20 min incubation at 28 °C of CYP71D4 (A) or CYP71D1 (B) or CYP71D326 (C) in yeast microsomes with 200 μM of (+)-valencene in the presence or absence of 1 mM NADPH. 1 : (+)-valencene, 2 : β-nootkatol, 3 : (+)-nootkatone, 4 : (-)-nootkatene, 5, and \* : unknown compounds.

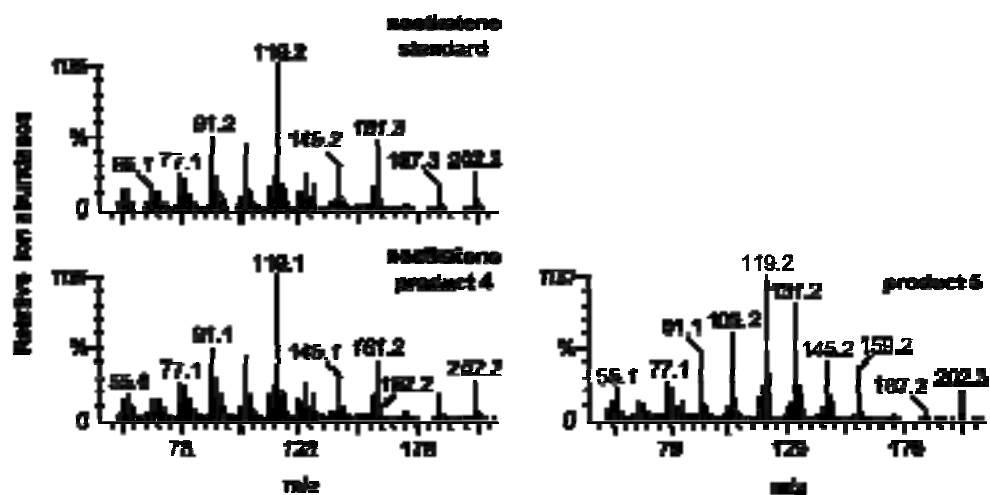
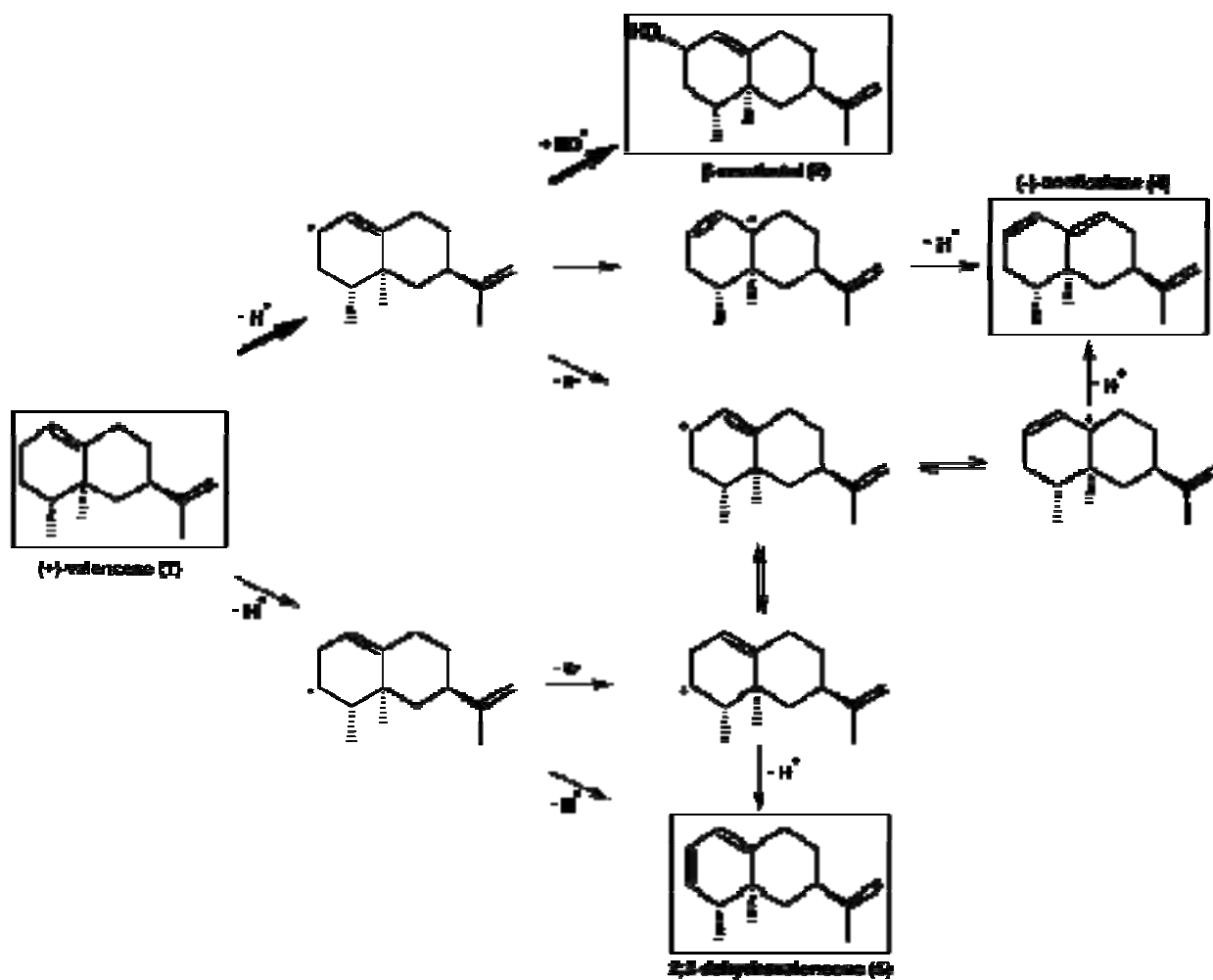


Fig. S31. Mass spectra of the minor products of (+)-valencene metabolism by microsomes of yeast expressing CYP71D51v2.

Mass spectrum is compared to the (-)-nootkatene standard. 4 : (-)-nootkatene, 5 : unidentified compound.



**Fig. S32. Possible reaction mechanism of (+)-valencene conversion by microsomes prepared from yeast expressing CYP71D51v2.**

Thick arrows represent the major reactions. Framed compounds are accumulated. 1 : (+)-valencene, 2 : β-nootkatol, 4 : (-)-nootkatene, 5 : 2,3-dehydrovalencene.

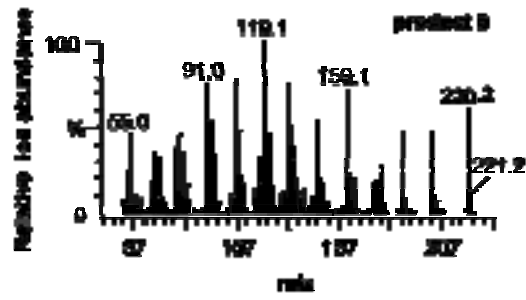


Fig. S33. Mass spectrum of the unidentified product from the bioconversion of  $\beta$ -nootkatol by the control yeast.

### III. Conclusion et perspectives

Nous avons décrit les propriétés catalytiques de CYP71D51v2, P450 potentiellement exploitable pour la production de  $\beta$ -nootkatol dans un procédé de bioconversion. Malgré les facteurs limitants décrits, la productivité volumétrique de  $\beta$ -nootkatol, égale à 0,005 g/L/jour, est tout à fait comparable à la productivité volumétrique d'acide artémisinique obtenue en culture de 25 mL par Ro et al. (2006c) avant culture en bioréacteur et optimisation (0,006 g/L/jour). L'optimisation de la production par mutation du P450 et par glycosylation du produit formé peut être envisagée comme perspective. Une optimisation en bioréacteur par un procédé en semi-continu est également possible. La conversion du  $\beta$ -nootkatol en nootkatone par un organisme tolérant ces deux molécules se ferait alors dans une seconde étape après déglycosylation.







## Chapitre V

# **Bifonctionnalité de CYP71As dans le métabolisme des terpénoïdes et de la camalexine chez *A. thaliana***



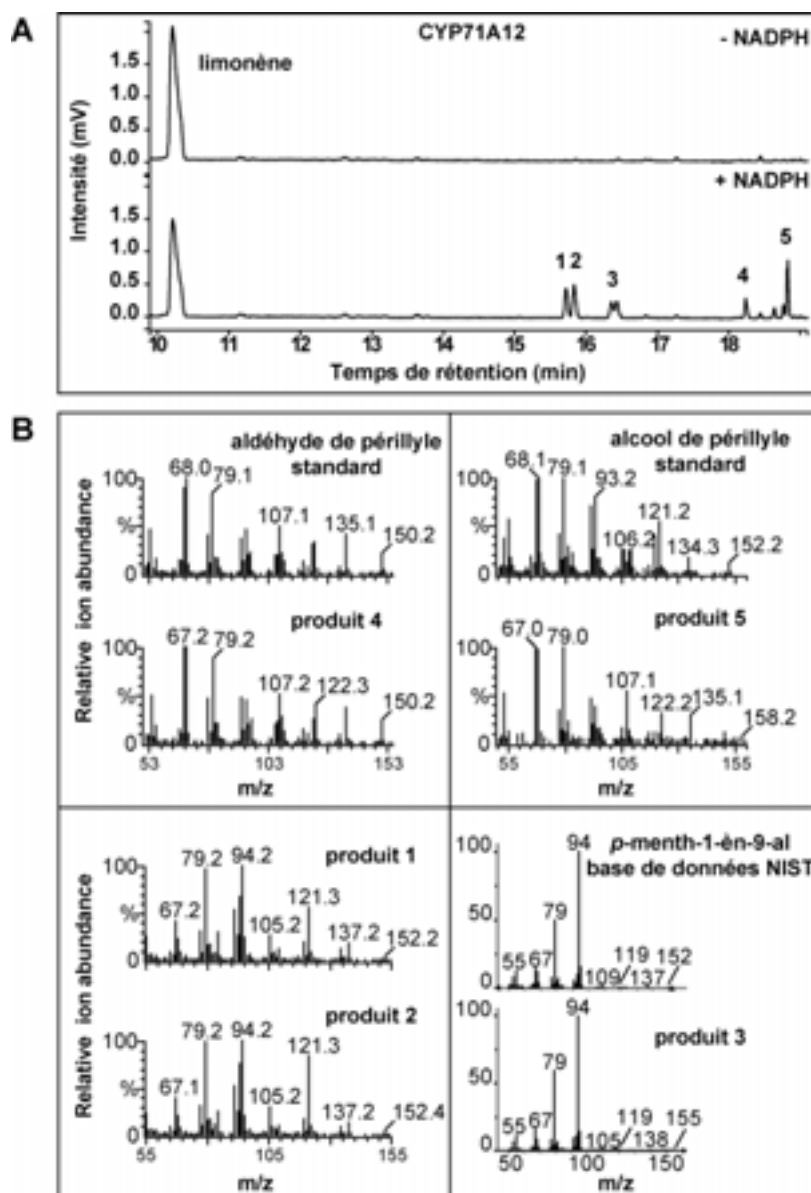


## Chapitre 5: Bifonctionnalité de CYP71As dans le métabolisme des terpénoïdes et de la camalexine chez *A. thaliana*

### I. Activité enzymatique *in vitro* de CYP71A12 avec le limonène

#### A. Résultats

La métabolisation du limonène par les microsomes de levure exprimant CYP71A12 est l'une des activités enzymatiques les plus fortes détectées au cours du criblage. En présence de NADPH, le limonène est converti avec un pourcentage de 42 % (sur la base des surfaces de pics observées en CPG) en plusieurs produits (Figure 28).



**Figure 28 : Analyses CPG-SM des produits de la conversion *in vitro* du limonène par CYP71A12**

Analyses CPG-DIF des produits obtenus après incubation de microsomes de levures exprimant CYP71A12 avec 200  $\mu$ M de limonène en présence ou en absence de NADPH (A). L'identification des produits (B) s'est faite par comparaison du spectre de masse obtenu avec celui de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) pour le produit 3, avec celui d'un standard authentique de référence pour les produits 4 et 5, et avec ceux décrits dans la littérature pour les produits 1 et 2 (Almeida and Jones Jr, 2005; De Mattos and Sanseverino, 1994). 1 et 2 : limonène-8,9-époxyde ; 3 : *p*-menth-1-èn-9-al ; 4 : aldéhyde de périllyle ; 5 : alcool de périllyle.

Les produits 1 et 2 ont des spectres de masse relativement similaires. Ils sont susceptibles d'être deux stéréo-isomères du limonène-8,9-époxyde d'après la comparaison des données SM obtenues (Tableau 16) avec celles décrites par De Mattos et Sanseverino (1994) et d'Almeida et Jones Jr (2005), et celles de la base de données de MANE (résultat non montré). Cette hypothèse devrait être confirmée par comparaison avec le spectre de masse

d'un standard authentique. Ce produit n'est pas disponible dans le commerce mais sa synthèse a été décrite (Almeida and Jones Jr, 2005). La bioconversion avec la levure entière exprimant CYP71A12 n'a pas permis une production de ce produit suffisamment importante pour envisager une identification par RMN (Chapitre 3:V.C, page 101). Le limonène-8,9-époxyde possède deux atomes chiraux en positions 4 et 8 (Figure 30). Van der Werf et al. (2000) indique que les formes 4*S*,8*R* et 4*R*,8*S* ont le même temps de rétention sur une colonne non chirale HP-5 et élue avant les formes 4*R*,8*R* et 4*S*,8*S* qui ont également le même temps de rétention. Nos analyses ayant été réalisées sur une colonne similaire (DB-5 non chirale), le produit 1 pourrait correspondre aux formes 4*S*,8*R* et/ou 4*R*,8*S*, et le produit 2 aux formes 4*R*,8*R* et/ou 4*S*,8*S*. La configuration *R* ou *S* du limonène utilisé comme substrat n'est pas connue.

Ces époxydes pourraient subir un réarrangement non enzymatique après leur formation pour former le *p*-menth-1-èn-9-al (3) qui a le même degré d'oxydation que l'époxyde (Figure 30). Les monoterpénoïdes sont des molécules instables capables de s'auto-oxyder de façon spontanée sous l'action de divers facteurs comme la lumière, la température ou le pH (Anandaraman and Reineccius, 1986; Van der Werf et al., 1997).

Produit	Données SM	Référence
<b>Produit 1</b>	152 [M <sup>+</sup> ] (3), 137 (17), 134 (12), 121 (55), 119 (17), 109 (12), 105 (25), 95 (23), 94 (100), 93 (67), 92(26), 91 (52), 84 (29), 81 (16), 80(14), 79 (96), 77 (29), 68 (22), 67 (41), 55 (23), 53 (23)	Gavira et al., in prep
<b>Produit 2</b>	152 [M <sup>+</sup> ] (3), 137 (13), 121 (83), 119 (16), 105 (29), 95 (19), 94 (100), 93 (75), 92(24), 91 (51), 84 (25), 81 (17), 80(15), 79 (99), 77 (30), 68 (19), 67 (38), 55 (21), 53 (23)	Gavira et al., in prep
<b>(4R, 8R)-limonène-8,9-époxyde et (4R, 8S)-limonène-8,9-époxyde</b>	152 [M <sup>+</sup> ] (3), 137 (19), 121 (90), 119 (25), 109 (13), 105 (39), 93 (72), 91 (65), 84 (28), 79 (100), 77 (42), 67 (48), 55 (25), 53 (30), 43 (48), 41 (40), 39 (44)	Almeida and Jones, 2005
<b>(4R, 8R)-limonène-8,9-époxyde et (4R, 8S)-limonène-8,9-époxyde</b>	152 [M <sup>+</sup> ] (2), 121 (23), 119 (11), 105 (16), 95 (17), 94 (100), 93 (38), 91 (33), 79 (89), 77 (24), 67 (34), 55 (27), 53 (30), 43 (38), 41 (55)	De Matos et al., 2001
<b>(4R, 8R)-limonène-8,9-époxyde ou (4S, 8S)-limonène-8,9-époxyde</b>	152 [M <sup>+</sup> ] (3), 137 (11), 134 (11), 121 (100), 105 (38), 93 (90), 79 (65), 67 (31), 53 (15)	Van der Werf et al., 2000
<b>(4S, 8R)-limonène-8,9-époxyde</b>	151 [M <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> ] (2), 137 (12), 134 (17), 120 (80), 106 (39), 93 (100), 79 (71), 67 (32), 54 (15)	Van der Werf et al., 2000

**Tableau 16 : Comparaison des données SM de la littérature avec celles des produits 1 et 2 obtenus lors de la conversion du limonène *in vitro* par CYP71A12**

L'intensité des pics de fragmentation est indiquée entre parenthèse.

Deux autres produits majeurs de l'oxydation du limonène par CYP71A12 sont l'alcool de périllyle (5) et l'aldéhyde de périllyle (4). La formation de l'aldéhyde de périllyle pourrait résulter d'une oxydation spontanée de l'alcool de périllyle après sa formation. Elle pourrait également résulter d'une réaction enzymatique. La capacité d'oxydation de l'alcool de périllyle par CYP71A12 a donc été testée par essai enzymatique *in vitro*. On observe une faible conversion en aldéhyde de périllyle en présence de NADPH (Figure 29A) qui n'est pas présente après incubation de la levure transformée avec le vecteur vide (Figure 29B). La quantité d'aldéhyde de périllyle obtenue est très faible par rapport à celle formée après conversion du limonène (Figure 28A). Cela pourrait s'expliquer par une inhibition par l'alcool de périllyle lorsque celui-ci est incubé à forte concentration (100 µM). L'affinité de CYP71A12 pour l'alcool de périllyle pourrait être confirmée par spectrophotométrie différentielle selon la technique décrite par Jefcoate (1978) qui permet d'observer un pic d'absorption après formation du complexe enzyme-inhibiteur. On remarque également que la levure est capable de métaboliser faiblement l'alcool de périllyle de façon NADPH-dépendante en un produit inconnu par une enzyme qui lui est propre (Figure 29B).



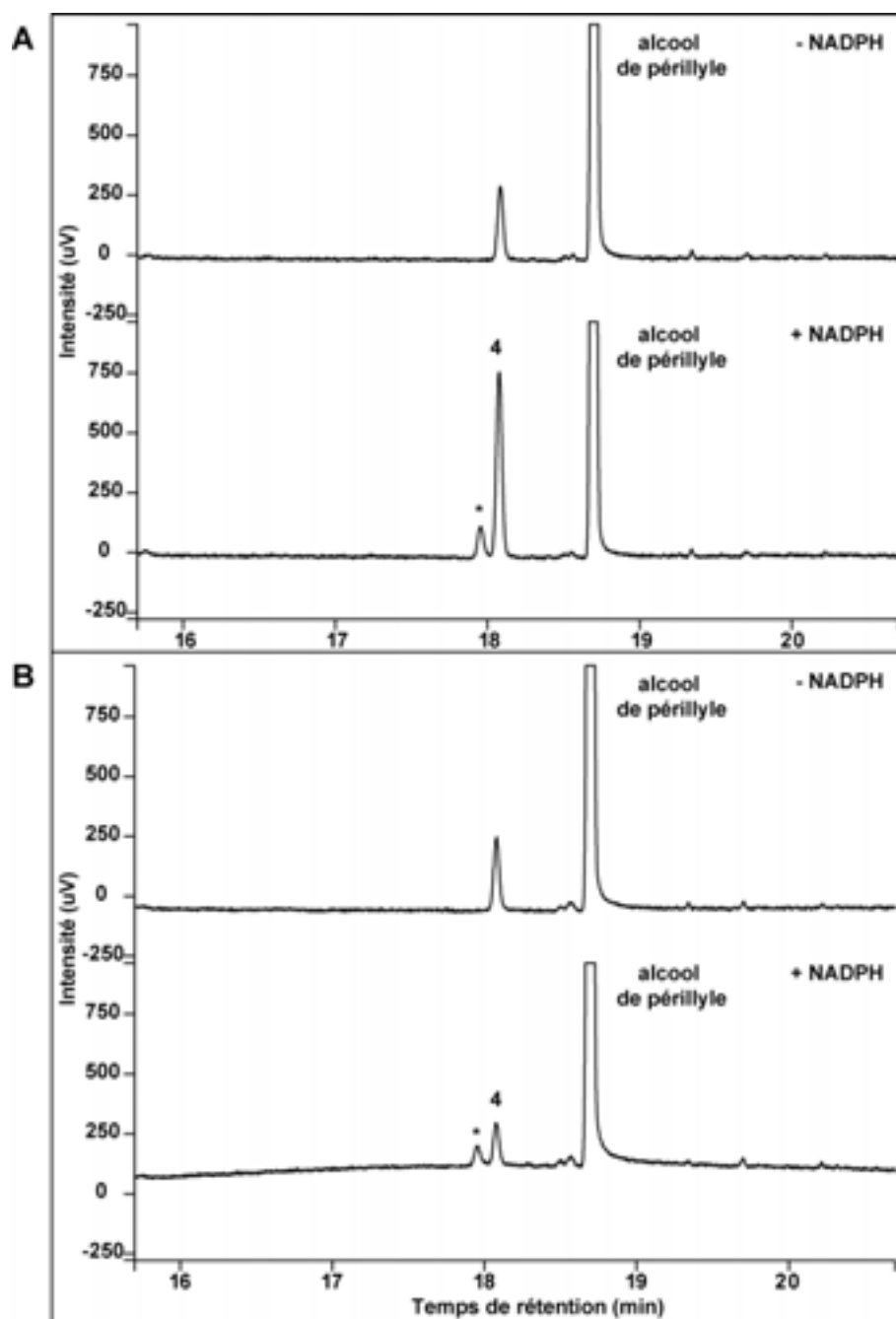
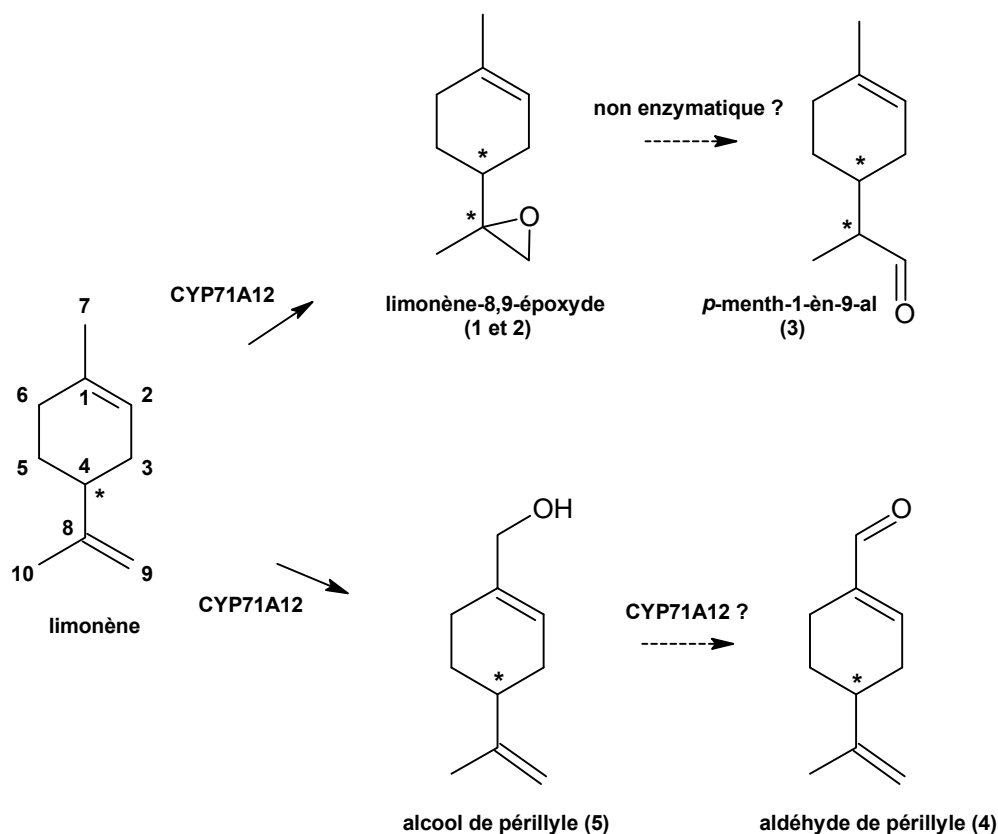


Figure 29 : Analyses CPG des produits de la conversion *in vitro* de l'alcool de périllyle par CYP71A12

Analyses CPG-DIF des produits obtenus après incubation de microsomes de levures exprimant CYP71A12 (A) ou transformées avec le vecteur pYeDP60u2 vide (B) avec 100  $\mu$ M d'alcool de périllyle en présence ou en absence de NADPH. L'identification du produit s'est faite par comparaison du SM obtenu et du temps de rétention avec ceux d'un standard authentique (non montré). 4 : aldéhyde de périllyle ; \* : composé non identifié.



**Figure 30 : Proposition de schéma réactionnel expliquant la formation des produits de métabolisation du limonène par les microsomes de levures exprimant CYP71A12**

Les étoiles représentent les carbones asymétriques. Les flèches solides représentent les réactions enzymatiques catalysées par le P450. Les réactions en pointillées pourraient être de nature non-enzymatique.

## B. Discussion

CYP71A12 apparaît comme un P450 peu régiosélectif et peu stéréospécifique, mais très actif sur le limonène (Figure 30). Ce résultat est surprenant. En effet, CYP71A12, ainsi que son plus proche paralogue CYP71A13, sont décrits dans la littérature comme étant des acteurs importants du métabolisme indolique de défense contre les pathogènes chez *A. thaliana* (Millet et al., 2010; Nafisi et al., 2007). CYP71A13 métabolise l'IAOx en IAN dans la voie de biosynthèse de la camalexine (Figure 9). CYP71A12 présente la même activité catalytique *in vitro* (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle) mais avec un profil d'expression différent, *CYP71A13* étant majoritairement exprimé au niveau des feuilles, surtout en condition de stress (Nafisi et al., 2007) et *CYP71A12* au niveau de la zone d'élongation de la racine de jeunes plantules élicitées (Millet et al., 2010).

L'activité de CYP71A12 sur le limonène peut donc être soit fortuite, le limonène étant un substrat opportuniste, soit une activité résiduelle acquise d'un gène ancestral ayant donné naissance par duplication à CYP71A12 et CYP71A13 recrutés dans la voie de biosynthèse de la camalexine.

Une analyse phylogénétique de la famille CYP71 (Figure 31) suggère que CYP71A12 et CYP71A13 (en tandem sur le chromosome 2) résultent probablement d'une duplication récente de CYP71A18 présent sur le chromosome 1 (Annexe en page 261).

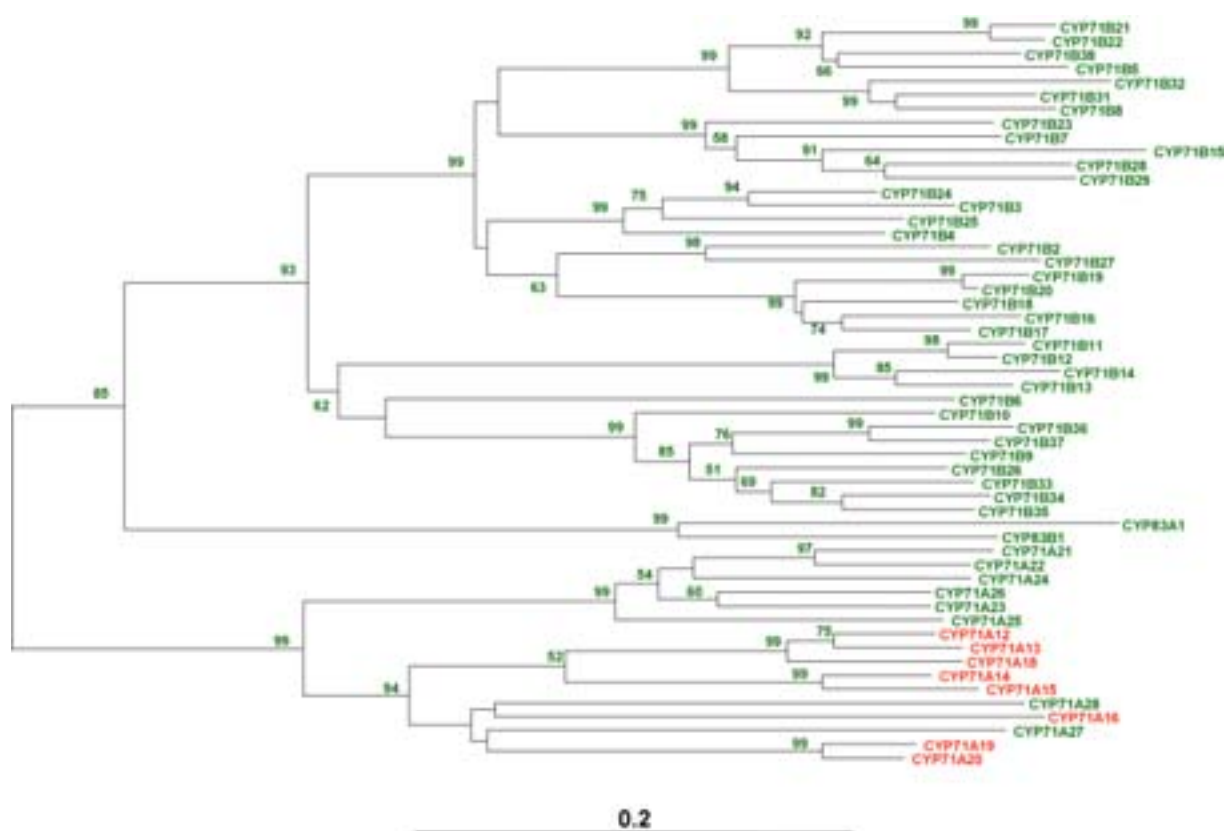
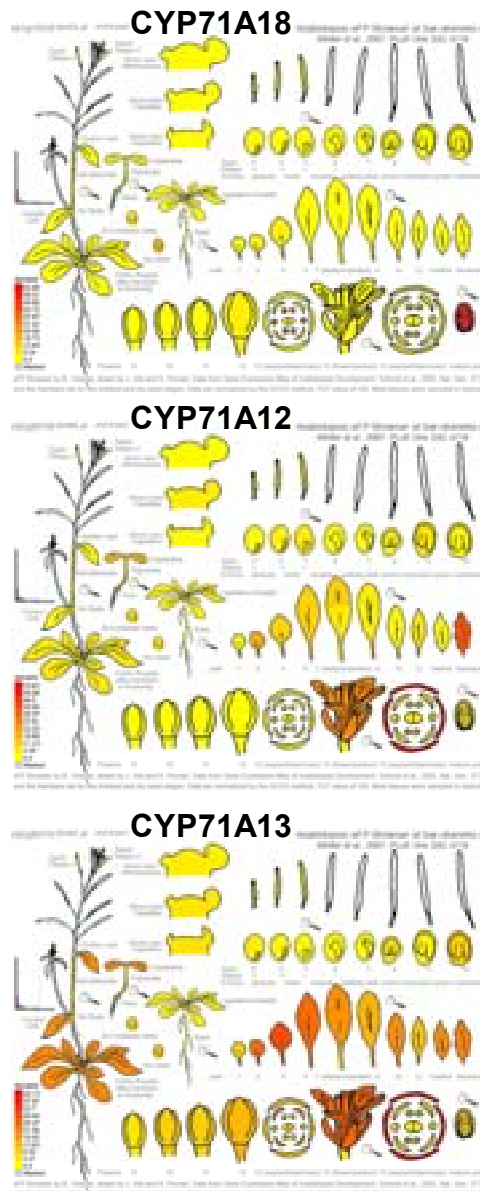


Figure 31 : Cladogramme de la famille CYP71A chez *Arabidopsis thaliana* d'après Bak et Paquette (2010)

Cet arbre phylogénétique est extrait de celui de l'ensemble des P450s d'*Arabidopsis* réalisé par alignement des 246 membres en utilisant le logiciel Clustal X 1.83 Windows ([www.p450.kvl.dk](http://www.p450.kvl.dk)). Les P450s criblés pour une activité enzymatique vis-à-vis du limonène et du *p*-cymène sont en rouge.

CYP71A18 semble spécifiquement exprimé dans les anthères (plus particulièrement dans le pollen) au cours du développement floral (Figure 32). D'autre part, un examen des données publiques de transcriptome indique que CYP71A12 et CYP71A13 sont certes exprimés en conditions de stress et de réponse aux pathogènes, mais aussi dans les organes floraux (plus particulièrement dans les sépales) au cours du développement de la plante en

conditions normales (Figure 32). Ceci semble indiquer une implication de ces P450s dans le métabolisme floral. Les fleurs d'Arabidopsis en conditions normales ne contiennent pas de camalexine (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle). Nous avons donc décidé de tester l'hypothèse selon laquelle CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 pourraient contribuer au métabolisme du limonène au cours du développement floral.



**Figure 32 : Profil d'expression de CYP71A18, CYP71A12 et CYP71A13 dans les différents organes d'*A. thaliana* d'après les analyses des données publiques de transcriptome provenant du site Arabidopsis Efp Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)**

Trois approches ont été utilisées :

- une approche biochimique : l'expression dans la levure et la détermination des activités enzymatiques des différents paralogues appartenant à la même clade que CYP71A12.
- une approche transcriptomique : l'expression des gènes d'intérêt au cours du développement floral a été analysée de manière plus fine par RT-qPCR.
- une approche couplée génétique et métabolomique : l'utilisation de mutants d'insertion pour les gènes d'intérêt pour un profilage métabolique des composés volatils émis lors de l'épanouissement des inflorescences et des métabolites solubles présents dans ces dernières.

## II. Analyse fonctionnelle des enzymes paralogues recombinantes

Pour tenter de déterminer la chronologie d'apparition des fonctions dans le métabolisme du limonène et de la camalexine, l'ensemble des P450s appartenant à la même clade (indiquée en rouge sur la Figure 31) ont été synthétisés avec optimisation de codons, exprimés dans la levure et testés pour la métabolisation du limonène (au laboratoire) et pour la métabolisation de dérivés indoliques (au laboratoire d'Erich Glawischnig). Cette approche nous offrait en sus une opportunité de tenter d'identifier un P450 plus actif sur le limonène et/ou plus régiospécifique.

*CYP71A27* et *CYP71A28* sont annotés comme pseudogènes (Bak, 2010). *Thellungiella halophila* et *Arabidopsis lyrata* étant les organismes séquencés phylogénétiquement les plus proches d'*A. thaliana* (<http://www.phytozome.net>), nous avons cherché les gènes orthologues chez ces deux plantes. Aucun orthologue n'a été trouvé dans le cas de *CYP71A28* (Annexe en page 262). Des orthologues de *CYP71A27* sont, en revanche, présents chez *A. lyrata* (*AlyCYP71A27*) et *T. halophila* (*ThhCYP71A27*). Un alignement d'*AlyCYP71A27* avec la séquence de P450s fonctionnels montre que le motif PERF est manquant et qu'il y a probablement d'autres motifs manquants ou incorrects (Annexe en page 263). *AlyCYP71A27* semble donc être un pseudogène. *ThhCYP71A27* qui s'aligne en revanche correctement avec les paralogues, a été sélectionné pour le criblage.

## A. Expression dans la levure

La majorité des P450s de la clade s'expriment correctement dans la levure, d'après la différence d'absorbance observée à 450 nm lors de la mesure du spectre différentiel au monoxyde de carbone (Figure 33) (Annexes en page 240). Toutefois, aucune différence d'absorbance n'est observée avec CYP71A13 et CYP71A27, et une différence d'absorbance à 420 nm est observée avec CYP71A15.

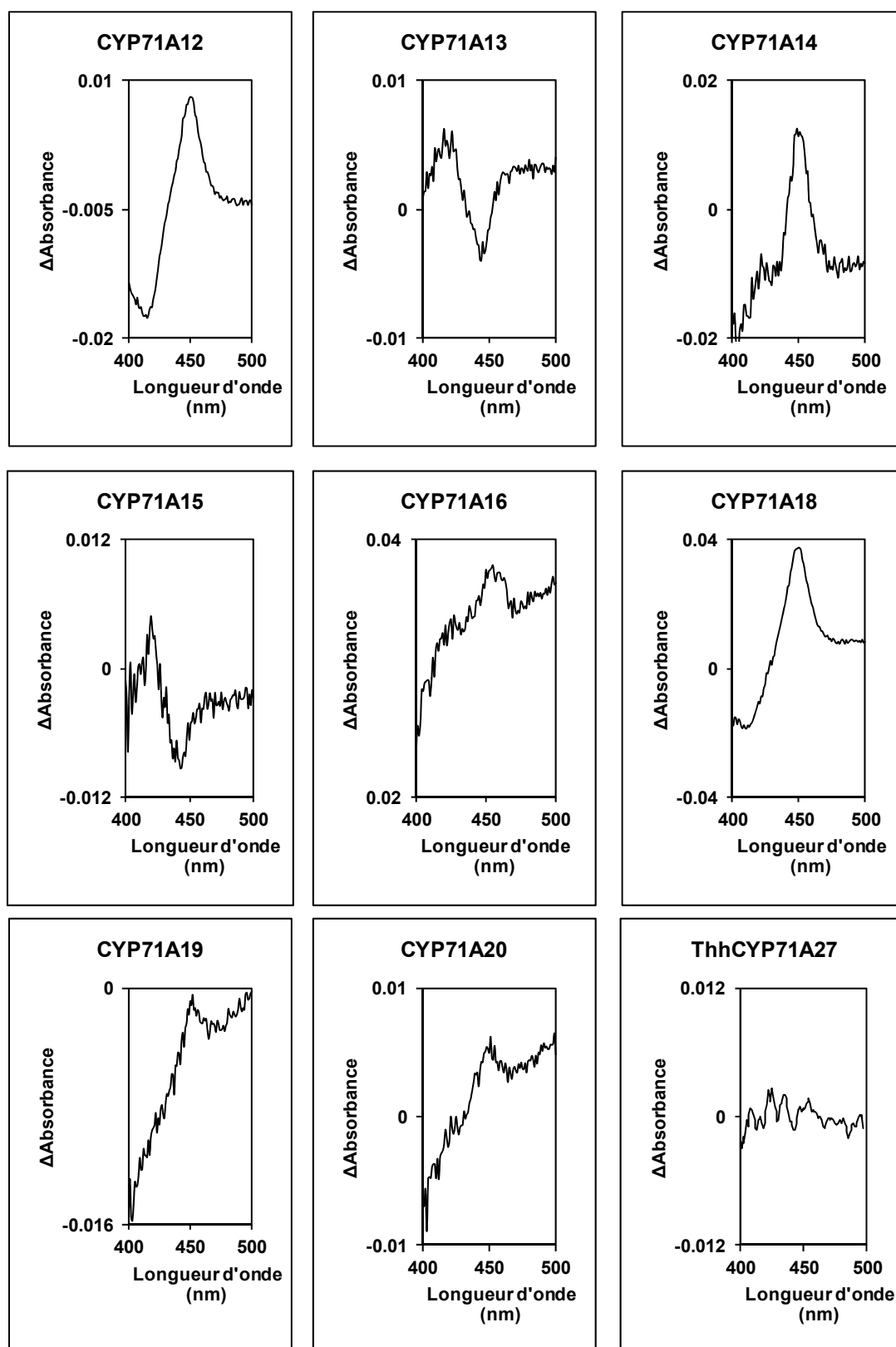


Figure 33 : Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP71s appartenant à la clade CYP71A12

Ces P450s sont issus d'*Arabidopsis thaliana*, excepté ThhCYP71A27 qui est issu de *Thellungiella halophila*.

## B. Activités enzymatiques *in vitro*

CYP71A18 convertit le limonène pour former les mêmes produits que CYP71A12 (Figure 34). La formation d'un seul énantiomère (ou couple d'énantiomères) de limonène-8,9-époxyde semble cependant être privilégiée par CYP71A18 (produit 1), contrairement à CYP71A12 qui génère deux pics équivalents (produits 1 et 2). Le pourcentage de conversion est plus fort dans le cas de CYP71A18 (52 % sur la base des surfaces des pics observés en CPG). Cela peut s'expliquer par une meilleure expression de CYP71A18 dans la levure. En effet, les quantités de P450 détectées dans les fractions microsomales utilisées sont de 4 nmol/mL pour CYP71A18 et de 2 nmol/mL pour CYP71A12.

Avec 89 % d'identité protéique, CYP71A13 est le P450 le plus proche de CYP71A12 (Figure 31). Il était donc probable qu'il catalyse la même réaction *in vitro*. Après incubation du limonène avec des microsomes de levure exprimant CYP71A13, on observe une très faible formation de limonène-8,9-époxyde et de *p*-menth-1-èn-9-al (Figure 34C). Cette faible conversion peut s'expliquer soit par la faible expression du P450 dans la levure (aucune différence d'absorbance n'a pu être observée pour le P450 réduit + CO (Figure 33)), soit, par l'incapacité de ce P450 à métaboliser le limonène. La première hypothèse est la plus probable. CYP71A14 convertit également le limonène de façon faible (Figure 34B), en dépit d'une expression correcte dans la levure (2 nmol/mL).

Aucune activité enzymatique avec le limonène n'a été détectée après incubation de microsomes de levure exprimant CYP71A15, CYP71A16, CYP71A19, CYP71A20 ou ThhCYP71A27 (non montré). On peut en conclure que le limonène n'est pas un substrat de CYP71A16, CYP71A19 et CYP71A20 étant donné que ces derniers semblent s'exprimer correctement dans la levure (Figure 33). En revanche, l'absence d'activité enzymatique observée pour CYP71A15 et ThhCYP71A27 peut être due soit à l'absence d'expression de ces P450s dans la levure (Figure 33), soit à l'incapacité de ces P450s à métaboliser le limonène.

Le *p*-cymèn-8-ol étant détecté dans les fleurs d'*Arabidopsis* (Rohloff and Bones, 2005), le *p*-cymène a également été testé comme substrat des CYP71As. Bien que la conversion soit plus faible qu'avec le limonène, les 4 mêmes P450s sont capables de métaboliser le *p*-cymène (Annexes en page 247) avec un pourcentage de conversion de 27 % pour CYP71A12 et CYP71A18, et un pourcentage inférieur à 10 % pour CYP71A14 et



CYP71A13 sur la base des surfaces des pics observés en CPG. Plusieurs produits sont formés, avec l'alcool cumique et le *p*-cymèn-8-ol comme produits principaux.

En conclusion, les activités enzymatiques détectées *in vitro* suggèrent une implication de certains CYP71As dans le métabolisme des monoterpènes chez *Arabidopsis*.

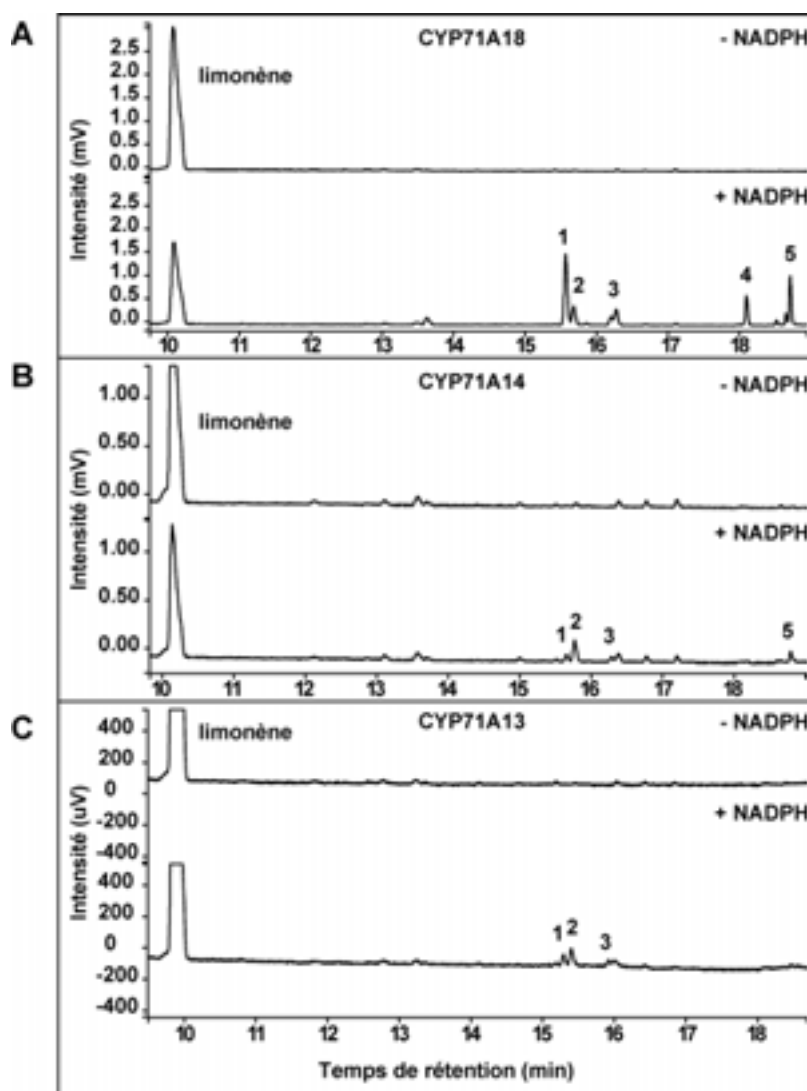


Figure 34 : Analyses CPG des produits de la conversion *in vitro* du limonène par les CYP71As

Analyses CPG-DIF des produits obtenus après incubation de microsomes de levures exprimant CYP71A18 (A), CYP71A14 (B) ou CYP71A13 (C), avec 200  $\mu$ M de limonène, en présence ou en absence de NADPH. L'identification des produits s'est faite par comparaison du spectre de masse obtenu avec celui de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) pour le produit 3 et avec celui d'un standard authentique de référence pour les produits 4 et 5. 1 et 2 : limonène-8,9-époxyde ; 3 : *p*-menth-1-èn-9-al ; 4 : aldéhyde de périllyle ; 5 : alcool de périllyle.

### III. Activité enzymatique *in vitro* des P450s appartenant à la clade CYP71A12 avec des alcaloïdes indoliques

L'activité des enzymes appartenant à la clade CYP71A12 a été testée pour la métabolisation de dérivés indoliques par notre laboratoire partenaire sur ce projet, celui du Dr. Erich Glawischnig (Université Technique de Munich). Les substrats indole 3-acétaldoxime (IAOx) et indole 3-acétonitrile (IAN) ont principalement été testés. Les résultats sont résumés dans le Tableau 17 (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle).

P450	Monoterpènes		Alcaloïdes indoliques	
	limonène	<i>p</i> -cymène	IAOx	IAN
CYP71A12	++++	+++	+++	++
CYP71A13	+	+	++++	-
CYP71A18	++++	+++	++	++
CYP71A14	+	++	-	+
CYP71A19	-	-	-	+
CYP71A15	-	-	-	-
CYP71A16	-	-	-	-
CYP71A20	-	-	-	-
ThhCYP71A27	-	-	-	-

**Tableau 17 : Conversion de monoterpènes (au laboratoire) et d'alcaloïdes indoliques (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle) par les microsomes de levure exprimant les P450s de la clade CYP71A12**

Ces P450s sont issus d'*Arabidopsis thaliana*, excepté ThhCYP71A27 qui est issu de *Thellungiella halophila*. L'intensité de la conversion est indiquée par le signe +. Le signe - représente l'absence d'activité enzymatique. Les essais enzymatiques avec les monoterpènes et les alcaloïdes indoliques n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions.

CYP71A12, CYP71A13, CYP71A18 et CYP71A14 qui présentaient une activité enzymatique avec les monoterpènes, sont capables de métaboliser *in vitro* des dérivés indoliques. Une faible activité enzymatique a également été détectée en présence de CYP71A19 et d'IAN. Aucune activité enzymatique n'avait été détectée avec ce P450 en présence de monoterpènes en dépit de son expression dans la levure observable lors de la mesure du spectre différentiel au CO.

Les produits des réactions *in vitro* sont représentés sur la Figure 35 (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle). L'IAOx est converti en IAN par CYP71A13. Il est converti en IAN et en indole 3-carbaldéhyde (ICA) par CYP71A12 et CYP71A18. Ce dernier semble avoir une spécificité de substrat plus large que CYP71A12. En effet, CYP71A18 convertit tout autant l'IAOx que l'IAN alors que CYP71A12 convertit préférentiellement l'IAOx (Tableau 17). Enfin, CYP71A14 et CYP71A19 convertissent faiblement l'IAN en ICA. Cependant, CYP71B6 est un meilleur candidat pour la conversion de l'IAN en ICA.

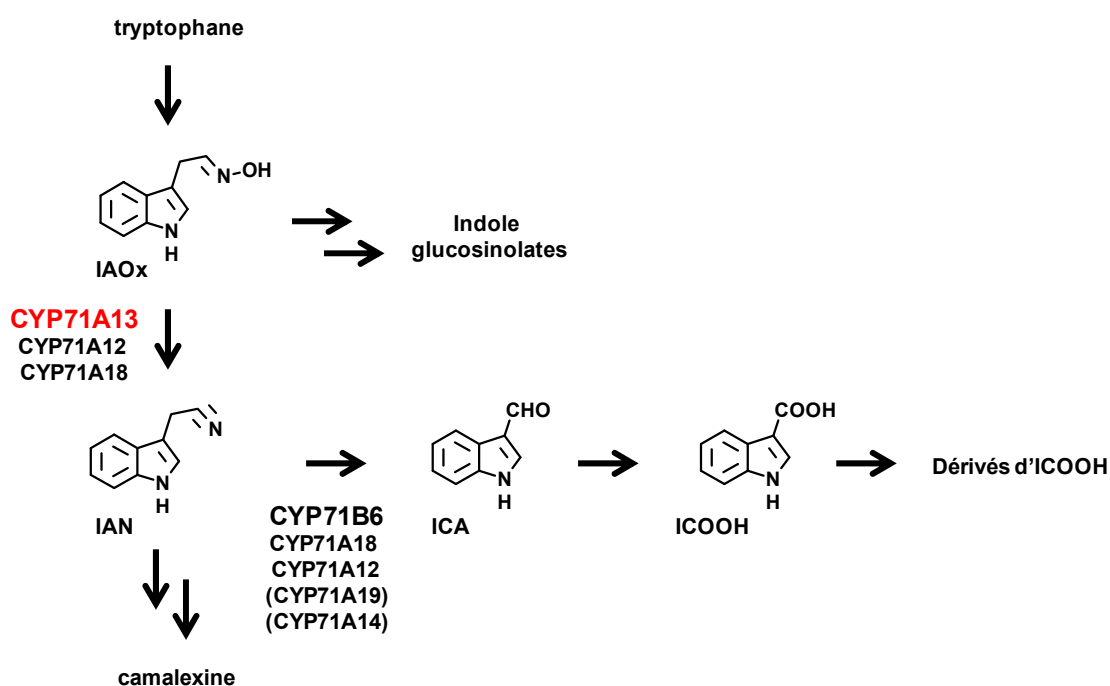


Figure 35 : Voie métabolique de la camalexine et de dérivés indoliques proposée à partir des activités enzymatiques obtenues *in vitro* (Dr. Erich Glawischnig, communication personnelle)

CYP71A13, représenté en rouge, est le seul P450 dont la fonction physiologique a été caractérisée *in planta*. IAN : indole 3-acétonitrile ; IAOx : indole 3-acétaldoxime ; ICA : indole 3-carbaldéhyde ; ICOOH : indole 3-carboxylate.

En conclusion, CYP71A12 et CYP71A18 catalysent fortement *in vitro* la conversion de monoterpènes et la conversion d'alcaloïdes indoliques. C'est la première fois que des P450s sont décrits comme étant très actifs sur deux types de molécules appartenant à des métabolismes très différents chez les plantes. Les paramètres catalytiques de ces enzymes vont être déterminés prochainement afin de pouvoir comparer leur efficacité catalytique vis-à-vis des deux types de substrats.

#### IV. Le limonène est-il un substrat de CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 *in planta* ?

Le rôle de CYP71A12 et de CYP71A13 dans la production de camalexine *in planta* semble bien établi (Millet et al., 2010; Nafisi et al., 2007). CYP71A18 pourrait aussi être impliqué dans le métabolisme de la camalexine d'après les résultats d'expression. En effet, tout comme celle de *CYP71A12* et *CYP79B2*, l'expression de *CYP71A18* est induite dans les feuilles après traitement au nitrate d'argent (Glawischnig et al., 2004). Mais aucune étude fonctionnelle *in planta* n'a permis de définir son rôle physiologique.

Afin de déterminer si le limonène peut également être un substrat des CYP71s dans la plante en conditions normales de croissance, CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 ont fait l'objet d'une analyse fonctionnelle *in planta*.

##### A. Expression constitutive de *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18*

Pour confirmer leur expression constitutive, l'expression des gènes *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* a été quantifiée par RT-qPCR dans les différents organes de la plante saine (la racine, la jeune racine, la feuille, la tige, la fleur et la silique) ainsi qu'à différents stades du développement floral (se reporter au Chapitre 2:IV.A.2 page 64 pour la description des stades floraux). L'expression a été calculée relativement à 3 gènes de références (*SAND*, *TIP41* et *PP2A*) choisis pour la stabilité de leur expression dans les différents organes testés (résultat non montré).

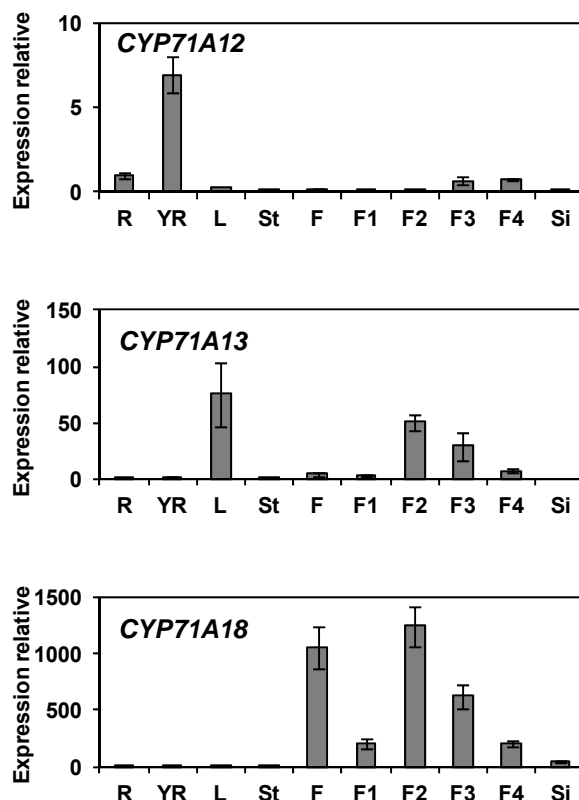


Figure 36 : Expression relative de *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana*

L'expression relative (mesurée par Benoit Boachon) a été quantifiée par RT-qPCR sur 3 à 5 réplicats biologiques, à l'exception de la jeune racine (2 réplicats). R : racine ; YR : jeune racine ; L : feuille ; St : tige ; F : fleur ; F1 à F4 : fleur du stade 1 au stade 4 ; Si : silique.

D'après les résultats de la RT-qPCR quantitative (Figure 36), *CYP71A12* s'exprime principalement dans la jeune racine, mais aussi à un niveau plus faible dans la fleur aux stades 3 et 4. *CYP71A13* s'exprime dans les feuilles (peut-être légèrement blessées par les parasites des chambres de culture) et de manière assez forte dans les fleurs, principalement aux stades 2 et 3. L'expression de *CYP71A18* se limite aux fleurs aux stades 2 et 3 principalement. On peut noter que son expression est très élevée dans ces tissus floraux.

L'expression des gènes *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* a été aussi quantifiée par RT-qPCR dans les différentes pièces florales : sépales, pétales, étamines et carpelle.

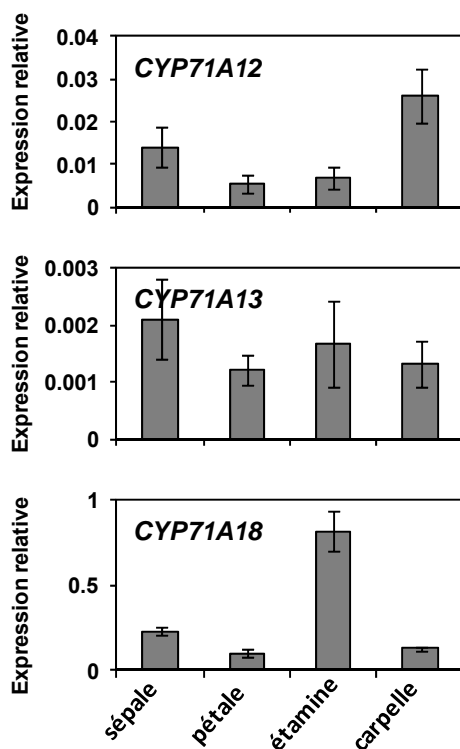


Figure 37 : Expression relative de *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* dans les différentes pièces florales

L'expression relative (mesurée par Benoit Boachon) a été quantifiée par RT-qPCR sur 3 à 5 réplicats biologiques.

D'après les résultats de la RT-qPCR quantitative (Figure 37), *CYP71A12* s'exprime principalement dans le carpelle alors qu'il était prédit s'exprimer dans les sépales (Figure 32). *CYP71A13* s'exprime indifféremment dans les sépales, pétales, étamines ou carpelles. Conformément aux analyses microarray, *CYP71A18* s'exprime majoritairement dans les étamines. On peut encore une fois constater que l'expression de *CYP71A18* est de très loin la plus forte.

Ces résultats tendraient à conforter l'hypothèse d'une implication de *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* dans la production de monoterpènes floraux.

B. Comparaison des profils de métabolites volatils émis par les mutants *cyp71a12*, *cyp71a13* ou *cyp71a18* et par les plantes sauvages

Le limonène est un terpène très volatil qui, s'il est produit et non oxydé, est attendu dans la fraction "espace de tête" des métabolites floraux. Afin de tester une possible implication de CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 dans le métabolisme du limonène (ou d'un autre monoterpène volatil) par les organes floraux, des mutants d'insertion de chaque gène ont été isolés et les composés volatils émis par ces mutants ont été comparés aux composés volatils émis par les plantes sauvages.

Les plantes homozygotes pour l'insertion d'ADN de transfert (ADN-T) dans *CYP71A12* (GABI-KAT 127HO3), *CYP71A13* (SALK 105136) et *CYP71A18* (WiscDsLox297300\_18A) ont été identifiées par PCR (résultat non montré). Des plantes homozygotes de chaque lignée ont été mises simultanément en culture avec une lignée sauvage pendant 75 jours jusqu'à pleine floraison (photopériode de 12 h alternant lumière à 22 °C avec une humidité relative de 70 % et obscurité à 19 °C avec une humidité relative de 85 %). Une soixantaine d'inflorescences portant des fleurs épanouies ont été collectées et leurs tiges placées dans un récipient contenant de l'eau. Les composés volatils émis par les différents bouquets d'inflorescences ont été collectés dans un bocal en verre d'1 L hermétiquement fermé sous un flux d'air de 100 mL/min. Cet air est filtré à l'entrée et à la sortie du récipient par des cartouches en métal de 140 x 4 mm contenant 200 mg de Tenax TA (20/35, Grace Scientific) pendant 24 h. Les composés volatils adsorbés sur les cartouches de Tenax ont été analysés après thermodésorption par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (TD-CPG-SM).

La comparaison des profils d'émission montre la présence d'un pic très significatif de limonène dans les composés volatils émis par les mutants *cyp71a12* alors que ce composé est absent dans les composés émis par les fleurs sauvages (Figure 38). Ce résultat a pu être répété une fois. Lors d'une troisième expérience des résultats plus contradictoires ont été obtenus. Aucun dérivé du limonène n'a été détecté à partir des inflorescences des plantes sauvages, conformément à la littérature (Chen et al., 2003; Rohloff and Bones, 2005). Aucune différence dans l'émission des composés volatils n'a été observée avec les inflorescences sauvages et celles des mutants *cyp71a13* et *cyp71a18* (résultat non montré). Cette expérience doit cependant être reproduite car les conditions de sa réalisation n'étaient pas optimales.

On peut noter que l'indole 3-acétonitrile (IAN) et l'indole 3-carbaldéhyde (IAC) sont des composés qui seraient aussi susceptibles d'être émis par les inflorescences. Ces composés n'ont cependant pas été détectés parmi les molécules volatiles collectées à partir des plantes sauvages.

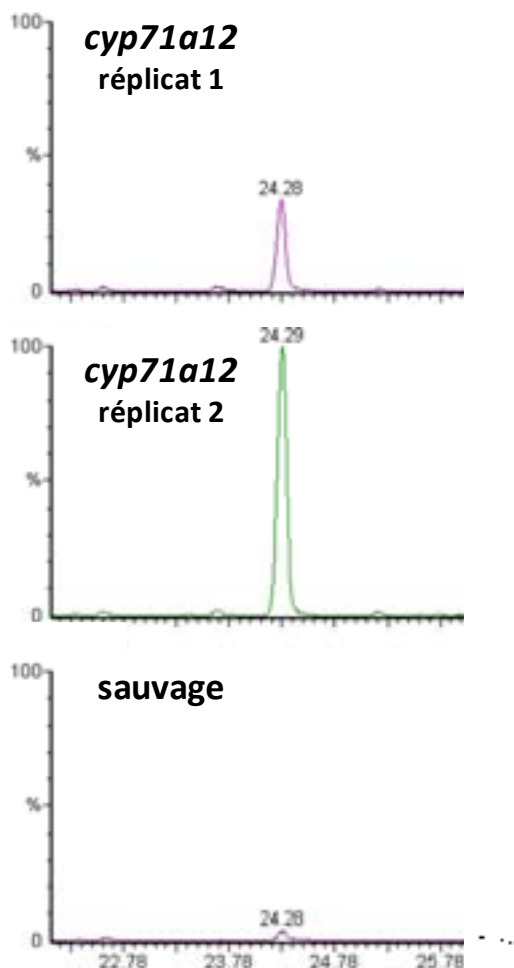


Figure 38 : Comparaison du limonène émis par les inflorescences des plantes mutantes *cyp71a12* et des plantes sauvages

Les composés volatils émis pendant 24 h par les fleurs épanouies d'une soixante d'inflorescences de plantes mutantes *cyp71a12* et de plantes sauvages ont été adsorbés sur cartouche Tenax et analysés après thermodésorption par TD-CPG-SM (par Jean-François Ginglinger).

En conclusion, un problème de reproductibilité des résultats d'analyses de l'émission de monoterpènes, essentiellement lié à l'instrumentation semble-t-il (émission de limonène parasite) ne permet pas pour le moment de valider l'émission de limonène par les plantes mutées et de valider l'implication des CYP71As dans le métabolisme des monoterpènes émis par les inflorescences d'*A. thaliana*.



Des analyses d'extraits des inflorescences en chromatographie liquide à ultra performance couplée à un spectromètre de masse (CLUP-SM) ont également été réalisées, ciblées sur une recherche du limonène, de l'alcool et de l'aldéhyde de périllyle, de l'IAOx, de l'IAN et de l'ICA. Ces premières analyses n'ont pas été concluantes en raison de la difficulté à ioniser ces molécules. Un autre problème potentiel à gérer est la production de dérivés plus oxydés ou conjugués dans la plante.

## V. Discussion et perspectives

### A. Implication de CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 dans le métabolisme des monoterpènes

CYP71A12 et CYP71A13 sont jusqu'ici décrits comme étant impliqués dans le métabolisme de la camalexine (Millet et al., 2010; Nafisi et al., 2007). La phylogénie et l'activité récemment détectée sur les dérivés indoliques par l'équipe de Munich laissent penser que CYP71A18 y contribue également (Glawischnig et al., 2004). La conversion très active du limonène et du *p*-cymène par CYP71A12 et CYP71A18 suggère cependant que ces deux P450s pourraient aussi participer au métabolisme des monoterpènes *in vivo*. CYP71A13 étant faiblement exprimé dans la levure, nous n'avons pas pu évaluer correctement sa capacité à métaboliser les monoterpènes *in vitro*.

Les profils d'expression florale de *CYP71A12*, *CYP71A13* et *CYP71A18* dans la plante cultivée en conditions normales (non stressée et non infectée) suggèrent que ce métabolisme des monoterpènes pourrait opérer dans les fleurs. Les données de RT-qPCR confirment en grande partie les données publiques de transcriptome et montrent que *CYP71A12*, *CYP71A13*, et *CYP71A18* ont une expression florale. *CYP71A18* serait exprimé plus spécifiquement dans le pollen d'après les analyses microarray (Winter et al., 2007). Des transformants *promCYP71A18:GUS* permettraient de préciser l'expression de ce gène au cours du développement pollinique.

L'émission par les fleurs de *p*-cymèn-8-ol (Rohloff and Bones, 2005), l'un des produits de la conversion *in vitro* du *p*-cymène par CYP71A12 et CYP71A18, tendrait à

conforter l'hypothèse de leur participation au métabolisme floral du limonène. Cependant, aucun des produits (limonène-8,9-époxyde, *p*-menth-1-èn-9-al, alcool et aldéhyde de périllyle) obtenus après conversion du limonène *in vitro* par CYP71A12 et CYP71A18 n'a été détecté chez *Arabidopsis* jusqu'ici. Les produits de conversion primaire pourraient cependant être modifiés ou stockés par la plante de manière à ne plus être émis. On peut aussi noter que le manteau pollinique est un milieu extrêmement lipophile qui pourrait dissoudre de tels composés. Il a été montré que chez certaines plantes, les composés majoritairement émis par le pollen sont différents de ceux majoritairement émis par toute la fleur (Dobson and Bergström, 2000). C'est le cas, par exemple, chez le rosier du Japon (Dobson et al., 1990a).

Chez *Arabidopsis* d'écotype *Columbia-0* (*Col-0*), la fleur émet un mélange de molécules contenant principalement des sesquiterpènes et également des monoterpènes (Chen et al., 2003). Le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène est la molécule prédominante. Deux terpènes synthases, TPS11 et TPS21, sont responsables de la biosynthèse de la quasi-totalité des sesquiterpènes (Tholl et al., 2005). Les gènes correspondant sont majoritairement exprimés dans les glandes nectarifères et dans le stigmate de la fleur, respectivement. Une monoterpène synthase (TPS24) formant *in vitro* plusieurs monoterpènes, dont le limonène, a été caractérisée (Chen et al., 2003). Le gène correspondant est exprimé dans les sépales, le réceptacle floral, le stigmate et les filaments de l'anthere. Le pollen serait également capable d'émettre des terpènes d'après les expériences de coloration GUS qui mettent en évidence l'expression du gène codant pour la TPS03 responsable de la formation d'(*E,E*)- $\alpha$ -farnésène, composé volatil minoritairement émis par les fleurs (Huang et al., 2010). Dobson et al. (1991) a développée une méthode pour collecter et analyser spécifiquement les composés volatils du pollen en adaptant la technique de "headspace" utilisée pour les fleurs. Elle a été employée avec succès pour identifier une émission précoce des composés volatils à l'intérieur du grain de pollen, puis une émission plus tardive à l'intérieur ainsi qu'à l'extérieur du grain de pollen chez les inflorescences de petite taille présentes chez la vigne (Dobson et al., 1990b; Martin et al., 2009).

Pour le moment, les résultats des analyses d'émission florale qui ont pu être réalisées sont encourageants mais ne sont pas assez reproductibles pour valider la métabolisation du limonène par les CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 floraux chez d'*A. thaliana*. De nouvelles expériences sont prévues dans les prochaines semaines pour tester les émissions des différentes lignées de mutants d'insertion. Parallèlement, des recherches de dérivés indoliques

floraux sont menées à Munich pour consolider les données existantes indiquant pour le moment une absence de camalexine.

Nos résultats permettent pour le moment de mettre en évidence, pour la première fois, la capacité d'un P450 à participer par son activité enzymatique à deux métabolismes totalement différents. La pertinence de cette double fonction *in vivo* reste encore à être démontrée.

## B. Co-évolution du métabolisme des terpénoïdes et de la camalexine

La capacité de métabolisation du limonène est partagée par la plupart des cytochromes P450 appartenant à la même branche que CYP71A12, qui inclut CYP71A18, CYP71A13 et CYP71A14 (Figure 31). Ceci suggère que cette activité était déjà propre à l'enzyme codée par un gène ancestral qui leur a donné naissance. CYP71A16 est décrit comme étant impliqué dans le métabolisme du triterpène marneral (Field et al., 2011). D'autre part, *CYP71A19* est co-localisé avec le gène *At4g13280* exprimant une sesquiterpène synthase, et son expression est co-régulée avec ce gène, ce qui laisse suggérer que CYP71A19 est impliqué dans le métabolisme de dérivés sesquiterpénoïdes (Ro et al., 2006a). Il n'a pas pu être testé avec les substrats sesquiterpènes par faute de temps.

Des cinétiques enzymatiques avec les monoterpènes et avec les alcaloïdes indoliques permettront de déterminer si l'affinité et l'efficacité catalytique de ces enzymes envers les deux types de substrats sont comparables. On observe cependant un recouvrement quasi parfait des fonctions de métabolisation du limonène et des dérivés indoliques. Il n'est pas possible, chez *Arabidopsis* du moins, de déterminer si l'une des deux fonctions est apparue avant l'autre ou s'il y a eu co-évolution.

On peut toutefois noter que le métabolisme de l'IAOx pour catalyser la formation de glucosinolates est une propriété de CYP83B1, appartenant à une branche très ancestrale de la famille CYP71 chez les Brassicaceae (Rauhut and Glawischnig, 2009) et que la sous-famille CYP71C joue un rôle essentiel dans le métabolisme des dérivés indoliques chez les graminées (Frey et al., 1995). Le métabolisme des dérivés indoliques est donc une fonction très ancienne de la famille CYP71. En revanche la production de monoterpènes prédate l'évolution des plantes et est observée chez de nombreux microorganismes. De nombreux cytochromes P450

bactériens et fongiques catalysent l'oxydation des mono- ou sesquiterpènes. Ces derniers semblent toutefois sans parenté phylogénétique avec les P450 végétaux qui les métabolisent.

Une exploration plus large de la famille CYP71 et le séquençage de nouveaux génomes, en particulier celui d'Amborella (la famille CYP71 semble apparaître avec les plantes à fleurs) pourrait permettre de répondre à la question de la fonction du CYP71 ancestral.





**Chapitre VI**

**Conclusion Générale**





## Chapitre 6: Conclusion Générale

L'objectif principal était d'identifier des P450s capables d'oxygéner des composés volatils hydrocarbonés appartenant principalement aux familles des mono- et sesquiterpènes, puis de produire des composés volatils fonctionnalisés pouvant être labellisés naturels, et/ou de produire des composés volatils fonctionnalisés aux nouvelles propriétés organoleptiques inconnues jusqu'ici.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons sélectionné une trentaine de P450s principalement issus d'*Arabidopsis thaliana* à partir d'une analyse de co-expression de gènes, et une dizaine de P450s issus de différentes plantes par homologie de séquences avec des P450s ayant une activité sur des sesquiterpènes cibles décrite dans la littérature. Les P450s sélectionnés ont été exprimés dans la souche *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 exprimant ATR1, l'une des P450s-réductases d'*A. thaliana*. Les tests de fonctionnalisation d'une quinzaine de substrats par les P450s candidats ont été réalisés par essai enzymatique *in vitro* sur des membranes microsomales extraites de levures exprimant les P450s d'intérêt.

La moitié des P450s sélectionnés ont été capables d'oxygéner au moins un des composés volatils testés, confirmant la validité de la stratégie de sélection des P450s candidats. Cependant, un grand nombre de ces activités enzymatiques présentaient un très faible taux de conversion. 7 couples P450-substrat montrant une conversion supérieure ou égale à 45 %, et/ou responsables de la formation d'un produit d'intérêt, ont été sélectionnés pour un test d'activité enzymatique par bioconversion avec la levure entière dans un volume de 1 mL :

- la conversion de la framboisone en frambinone par CYP76C4
- la conversion du valencène et du nootkatène en nootkatone par CYP71D51v2 et CYP71D4
- la conversion du limonène par CYP71A12 et CYP71A18

Dans chacun des cas, les quantités de produits obtenus résultants de l'activité du P450 de plante n'ont pas été assez fortes pour envisager un procédé industriel de bioconversion. Les

principales difficultés rencontrées ont été la métabolisation du substrat par la souche hôte en coproduit non-désirés et le faible taux de bioconversion.

La bioconversion du valencène par la levure exprimant CYP71D51v2 a été testée dans un volume de 100 mL et les facteurs limitant la quantité de nootkatone formée ont été étudiés plus en détail. Le premier facteur mis en évidence a été la toxicité chez la levure induite par les deux produits, le  $\beta$ -nootkatol et la nootkatone, à partir de 100 mg/L. Le second facteur a été l'accumulation du  $\beta$ -nootkatol dans les membranes de la levure. Le troisième et dernier facteur a été l'inhibition des produits de la réaction d'hydroxylation du valencène après leur formation. De plus, il a également été montré que la formation de nootkatone était dépendante des enzymes propres à la levure. Les perspectives pouvant être envisagées repose sur l'introduction dans la levure d'une glycosyl-transférase capable de conjuguer le  $\beta$ -nootkatol, ce qui éviterait son accumulation dans les membranes et réduirait sa toxicité et sa rétention dans le site actif de CYP71D51v2. La conversion efficace du  $\beta$ -nootkatol en nootkatone après déglycosylation, interviendrait dans une seconde étape et ferait intervenir un micro-organisme qui reste à être identifié.

Parallèlement, un nouvel objectif émergea des résultats du criblage des activités enzymatiques *in vitro*. L'activité de monoterpène oxydase de CYP71A12, P450 déjà caractérisé comme étant impliqué dans la voie métabolique de la camalexine chez *Arabidopsis*, nous a amené à nous intéresser au rôle physiologique et aux mécanismes évolutifs des P450s issus de la même clade (dont CYP71A13 et CYP71A18). L'oxydation du limonène par CYP71A12, CYP71A13 et CYP71A18 ainsi que les résultats de RT-qPCR montrant une expression florale de ces trois P450s, sembleraient indiquer leur implication dans le métabolisme des monoterpènes floraux. L'émission de limonène par les inflorescences de plantes mutantes *cyp71a12* par rapport aux plantes sauvage confirmerait cette hypothèse, mais ce résultat n'a pas été reproductible pour le moment. Ces enzymes offriraient le premier cas démontré de P450 à fonctions multiples dans deux voies métaboliques totalement indépendantes.





## **Références Bibliographiques**



## Références bibliographiques

- Aharoni, A., Giri, A. P., Deuerlein, S., Griepink, F., De Kogel, W. J., Verstappen, F. W. A., Verhoeven, H. A., Maarten, A. J., Schwab, W., Bouwmeester, H., 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell*. 15, 2866-2884.
- Aharoni, A., Giri, A. P., Verstappen, F. W. A., Berteaux, C. M., Sevenier, R., Sun, Z., Jongsma, M. A., Schwab, W., Bouwmeester, H. J., 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*. 16, 3110-3131.
- Aharoni, A., Jongsma, M. A., Bouwmeester, H. J., 2009. Terpene hydroxylation. US Patent Application No. 0031455 A1.
- Almeida, Q. A. R., Jones Jr, J., 2005. Chemoselective formation of 8, 9-epoxy-limonene. *Synth. Commun.* 35, 1285-1290.
- Amunom, I., Srivastava, S., Prough, R. A., 2011. Aldehyde reduction by cytochrome P450. *Curr. Protoc. Toxicol.*, 10.1002/0471140856.tx0471140437s0471140848.
- Anandaraman, S., Reineccius, G. A., 1986. Stability of encapsulated orange peel oil. *Food Technol.* 40, 88-93.
- Arimura, G., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J., Bohlmann, J., 2004. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (*E*)- $\beta$ -ocimene and transcript accumulation of (*E*)- $\beta$ -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 135, 1976-1983.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* 23, 1631-1640.
- Aubourg, S., Lecharny, A., Bohlmann, J., 2002. Genomic analysis of the terpenoid synthase (*AtTPS*) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics.* 267, 730-745.
- Bak, S., 2010. [www.p450.kvl.dk](http://www.p450.kvl.dk).
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S., Werck-Reichhart, D., 2011. Cytochromes p450. *Arabidopsis Book*. 9, e0144.
- Bassard, J.-E., Etude des interactions protéine-protéine et protéine-membrane permettant la canalisation des flux métaboliques dans la voie des phénylpropanoïdes chez *Arabidopsis thaliana*. Analyse fonctionnelle des CYP73As et CYP98As chez *Nicotiana tabacum*. Thèse de doctorat d'université. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2010, 352.
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatos, A., Oldham, N. J., Hahlbrock, K., 2005. Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 138, 1058-1070.
- Beekwilder, J., van der Meer, I. M., Sibbesen, O., Broekgaarden, M., Qvist, I., Mikkelsen, J. D., Hall, R. D., 2007. Microbial production of natural raspberry ketone. *Biotechnol. J.* 2, 1270-1279.
- Belanger, J. T., 1998. Perillyl alcohol: applications in oncology. *Altern. Med. Rev.* 3, 448-457.
- Bell, A. A., 1986. Physiology of secondary products, in: Mauney, J. R., Stewart, J. M. Eds., *Cotton Physiology*. The Cotton Foundation, Memphis, Tennessee, pp. 597-621.
- Bergmans, H. E., Van Die, I. M., Hoekstra, W. P., 1981. Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. *J. Bacteriol.* 146, 564-570.
- Bernasconi, M. L., Turlings, T. C. J., Ambrosetti, L., Bassetti, P., Dorn, S., 1998. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, shape *Rhopalosiphum maidis*. *Entomol. Exp. Appl.* 87, 133-142.
- Berteaux, C., Schalk, M., Mau, C. J. D., Karp, F., Wildung, M. R., Croteau, R., 2003. Molecular evaluation of a spearmint mutant altered in the expression of limonene hydroxylases that direct essential oil monoterpene biosynthesis. *Phytochemistry.* 64, 1203-1211.
- Berteaux, C. M., Schalk, M., Karp, F., Maffei, M., Croteau, R., 2001. Demonstration that menthofuran synthase of mint (*Mentha*) is a cytochrome P450 monooxygenase: cloning, functional expression, and characterization of the responsible gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 279-286.
- Bloch, K., Rittenberg, D., 1942. On the utilization of acetic acid for cholesterol formation. *J. Biol. Chem.* 145, 625-636.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, C. M., Wood, B., Peel, G., Orlova, I., Gang, D., Rhodes, D., Dudareva, N., 2004. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol.* 135, 1993-2011.

- Boelens, M. H., Boelens, H., Van Gemert, L. J., 1993. Sensory properties of optical isomers. *Perfumer & flavorist.* 18, 1-16.
- Bohlmann, J., 2000. Terpenoid Secondary Metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA Cloning, Characterization, and Functional Expression of a Myrcene/(E)- $\beta$ -Ocimene Synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 261-269.
- Bonn, B., Moortgat, G. K., 2003. Sesquiterpene ozonolysis: Origin of atmospheric new particle formation from biogenic hydrocarbons. *Geophys. Res. Lett.* 30, 1585-1588.
- Borejsza-Wysocki, W., Hrazdina, G., 1994. Biosynthesis of *p*-hydroxyphenylbutan-2-one in raspberry fruits and tissue cultures. *Phytochemistry.* 35, 623-628.
- Bosman, A., Mendis, K. N., 2007. A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 193-197.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., Glawischnig, E., 2009. The multifunctional enzyme CYP71B15 (phytoalexin deficient 3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 21, 1830-1845.
- Bouwmeester, H. J., De Kraker, J. W., Schurink, M., Bino, R. J., De Groot, A., Franssen, M. C. R., 2007. Plant enzymes for bioconversion. US Patent No. 7214507 B2.
- Bouwmeester, H. J., Konings, M. C. J. M., Gershenzon, J., Karp, F., Croteau, R., 1999. Cytochrome P-450 dependent (+)-limonene-6-hydroxylation in fruits of caraway (*Carum carvi*). *Phytochemistry.* 50, 243-248.
- Bozak, K. R., Yu, H., Sirevag, R., Christoffersen, R. E., 1990. Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3904-3908.
- Brewster, M. E., Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 645-666.
- Brown, J. T., Hegarty, P. K., Charlwood, B. V., 1987. The toxicity of monoterpenes to plant cell cultures. *Plant Sci.* 48, 195-201.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Wasicky, M., Nikiforov, A., 1994. Headspace analysis of *Vitis vinifera* (Vitaceae) flowers. *Journal of Essential Oil Research.* 6, 311-314.
- C.F.R. Réglements du Code Fédéral, 1985. 21 CFR 101.22(a)(3).
- Cankar, K., van Houwelingen, A., Bosch, D., Sonke, T., Bouwmeester, H., Beekwilder, J., 2011. A chicory cytochrome P450 monooxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Lett.* 585, 178-182.
- Chang, M. C. Y., Eachus, R. A., Trieu, W., Ro, D.-K., Keasling, J. D., 2007. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat. Chem. Biol.* 3, 274-277.
- Chang, M. C. Y., Krupa, R. A., Ro, D. K., Yoshikuni, Y., Keasling, J. D., 2012. Nucleic acids encoding modified cytochrome P450 enzymes and methods of use thereof. US Patent No. 8097438 B2.
- Chappell, J., Ralston, L. F., 2011. Cytochrome P450s and uses thereof. US Patent Application No. 0318797 A1.
- Chappell, J., Yeo, Y., Takahashji, S., 2006. Functional identification of the *Hyoscyamus muticus* gene coding for premnaspirodiene hydroxylase activity. World Intellectual Property Organization Patent WO 079020 A2.
- Chefson, A., Auclair, K., 2006. Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol. Biosyst.* 2, 462-469.
- Chen, F., Ro, D.-K., Petri, J., Gershenzon, J., Bohlmann, J., Pichersky, E., Tholl, D., 2004. Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1, 8-cineole. *Plant Physiol.* 135, 1956-1966.
- Chen, F., Tholl, D., D'Auria, J. C., Farooq, A., Pichersky, E., Gershenzon, J., 2003. Biosynthesis and Emission of Terpenoid Volatiles from *Arabidopsis* Flowers. *Plant Cell.* 15, 481-494.
- Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., Chen, X. Y., 2007. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology.* 49, 179-186.
- Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A. M. G., van der Heijden, R., Verpoorte, R., Memelink, J., 2001. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett.* 508, 215-220.
- Comité-Française-Du-Parfum, 1998. Classification Des Parfums et Terminologie. Société Française des Parfums, Paris.
- Crocoll, C., Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. Doctoral thesis. Jena: University Friedrich Schiller, 2011, 143.



- Croteau, R., 1998. The discovery of terpenes, in: Shain-dow Kung, Yang, S. Eds., Discoveries in Plant Biology. vol. 1. World Scientific, pp. 329-343.
- Croteau, R. B., Lupien, S. L., Karp, F., 2001. Recombinant materials and methods for production of limonene hydroxylases. US Patent No. 6194185 B1
- Czechowski, T., Stütt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., Scheible, W.-R., 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139, 5-17.
- Dai, J. R., Cardellina II, J. H., Mc Mahon, J. B., Boyd, M. R., 1997. Zerumbone, an HIV-inhibitory and cytotoxic sesquiterpene of Zingiber aromaticum and Z. zerumbet. *Nat. Prod. Lett.* 10, 115-118.
- Damodaran, N. P., Dev, S., 1968. Studies in sesquiterpenes—XXXVII: Sesquiterpenoids from the essential oil of *zingiber zerumbet* smith. *Tetrahedron.* 24, 4113-4122.
- De Carvalho, C. C. C. R., Da Fonseca, M. M. R., 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* 24, 134-142.
- De Jong, E., Field, J. A., De Bont, J. A. M., 1994. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 153-187.
- De Kraker, J. W., Franssen, M. C., Dalm, M. C., de Groot, A., Bouwmeester, H. J., 2001. Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene a hydroxylase and NADP<sup>+</sup>-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiol.* 125, 1930-1940.
- De Kraker, J. W., Schurink, M., Franssen, M. C. R., König, W. A., de Groot, A., Bouwmeester, H. J., 2003. Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Tetrahedron.* 59, 409-418.
- De Mattos, M. C. S., Sanseverino, A. M., 1994. An easy and efficient synthesis of iodohydrins from alkenes. *J. Chem. Res. Synop.* 26, 440-441.
- Delfine, S., Csiky, O., Seufert, G., Loreto, F., 2000. Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber*): Monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytol.* 146, 27-36.
- Dexter, R., Qualley, A., Kish, C. M., Ma, C. J., Koeduka, T., Nagegowda, D. A., Dudareva, N., Pichersky, E., Clark, D., 2006. Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol. *Plant J.* 49, 265-275.
- Dobson, H., Bergström, G., Groth, I., 1990a. Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb.(Rosaceae). *Isr. J. Bot.* 39, 143-156.
- Dobson, H. E. M., 1991. Analysis of flower and pollen volatiles, in: Linskens, H. F., Jackson, J. F. Eds., *Modern Methods of Plant Analysis.* vol. 12. Springer, Berlin, pp. 231-251.
- Dobson, H. E. M., Bergstroem, G., Groth, I., 1990b. Differences in fragrance chemistry between flower parts of *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Isr. J. Bot.* 39, 143-156.
- Dobson, H. E. M., Bergström, G., 2000. The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Syst. Evol.* 222, 63-87.
- Dudareva, N., 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1893-1902.
- Dudareva, N., Andersson, S., Orlova, I., Gatto, N., Reichelt, M., Rhodes, D., Boland, W., Gershenzon, J., 2005. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 933-938.
- Duetz, W. A., Bouwmeester, H., Van Beilen, J. B., Witholt, B., 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 269-277.
- Duvnjak, Z., Roche, B., Azoulay, E., 1970. Isolation and study of a strain of *Candida tropicalis* growing on n-alkanes. *Arch. Microbiol.* 72, 135-139.
- Ehrling, J., Hamberger, B., Million-Rousseau, R., Werck-Reichhart, D., 2006. Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochem. Rev.* 5, 239-270.
- Ehrling, J., Sauveplane, V., Olry, A., Ginglinger, J.-F., Provart, N. J., Werck-Reichhart, D., 2008. An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 8, 47.
- Falbe, J., Regitz, M., 1991. *Römpp Chemie Lexikon.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Fey, H., Otte, I., 1985. *Wörterbuch der Kosmetik.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Field, B., Fiston-Lavier, A.-S., Kemen, A., Geisler, K., Quesneville, H., Osbourn, A. E., 2011. Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16116-16121.

- Field, B., Osbourn, A. E., 2008. Metabolic diversification--independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science*. 320, 543-547.
- Frey, M., Kliem, R., Saedler, H., Gierl, A., 1995. Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.* 246, 100-109.
- Friedman, M., Henika, P. R., Mandrell, R. E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65, 1545-1560.
- Funk, C., Croteau, R., 1993. Induction and characterization of a cytochrome P-450-dependent camphor hydroxylase in tissue cultures of common sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol.* 101, 1231-1237.
- Galis, I., Simek, P., Narisawa, T., Sasaki, M., Horiguchi, T., Fukuda, H., Matsuoka, K., Unpublished. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco.
- Gang, D. R., Beuerle, T., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., Pichersky, E., 2002. Differential production of *meta* hydroxylated phenylpropanoids in sweet basil peltate glandular trichomes and leaves is controlled by the activities of specific acyltransferases and hydroxylases. *Plant Physiol.* 130, 1536-1544.
- Gershenson, J., Dudareva, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3, 408-414.
- Gershenson, J., Duffy, M. A., Karp, F., Croteau, R., 1987. Mechanized techniques for the selective extraction of enzymes from plant epidermal glands. *Anal. Biochem.* 163, 159-164.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., Schiestl, R. H., 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
- Ginglinger, J.-F., Functional analysis of cytochromes P450 involved in the biosynthesis of monoterpenoids in *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat d'université. Strasbourg: University of Strasbourg, 2010, 159.
- Girhard, M., Machida, K., Itoh, M., Schmid, R. D., Arisawa, A., Urlacher, V. B., 2009. Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microb. Cell Fact.* 8, 36.
- Glawischnig, E., Hansen, B. G., Olsen, C. E., Halkier, B. A., 2004. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8245-8250.
- Golan, A., Kahn, V., Sadovski, A. Y., 1977. Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 25, 1253-1260.
- Gounaris, Y., 2010. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. *Flavour and fragrance journal.* 25, 367-386.
- Graham, S. E., Peterson, J. A., 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 24-29.
- Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., 1978. Bacterial P-450cam methylene monooxygenase components: cytochrome m, putidaredoxin, and putidaredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 52, 166-188.
- Hagemeyer, J., Schneider, B., Oldham, N. J., Hahlbrock, K., 2001. Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 753-758.
- Haines, D. C., Tomchick, D. R., Machius, M., Peterson, J. A., 2001. Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry (Mosc.)*. 40, 13456-13465.
- Hall, T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Vol. 41, 1999, pp. 95-98.
- Hallahan, Dawson, W., G., West, M., J., Wallsgrove, M., R., 1992a. Cytochrome P-450 catalysed monoterpene hydroxylation in *Nepeta mussinii*. *Plant physiol. Biochem.* 30, 435-443.
- Hallahan, D. L., 2000. Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiate plants. *Adv. Bot. Res.* 31, 77-120.
- Hallahan, D. L., Lau, S.-M. C., Harder, P. A., Smiley, D. W. M., Dawson, G. W., Pickett, J. A., Christoffersen, R. E., O'Keefe, D. P., 1994. Cytochrome P-450-catalysed monoterpenoid oxidation in catmint (*Nepeta racemosa*) and avocado (*Persea americana*); evidence for related activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1201, 94-100.
- Hallahan, D. L., Nugent, J. H., Hallahan, B. J., Dawson, G. W., Smiley, D. W., West, J. M.,

- Wallsgrove, R. M., 1992b. Interactions of avocado (*Persea americana*) cytochrome P-450 with monoterpenoids. *Plant Physiol.* 98, 1290-1297.
- Hallahan, D. L., West, J. M., 1995. Cytochrome P-450 in plant/insect interactions: geraniol 10-hydroxylase and the biosynthesis of iridoid monoterpenoids. *Drug Metabol. Drug Interact.* 12, 369-382.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* 95, 853-860.
- Harada, T., Harada, E., Sakamoto, R., Ashitani, T., Fujita, K., Kuroda, K., 2012. Regio- and Substrate-Specific Oxidative Metabolism of Terpinolene by Cytochrome P450 Monooxygenases in *Cupressus lusitanica* Cultured Cells. *American Journal of Plant Sciences.* 3, 268-275.
- Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A., Deisenhofer, J., 1995. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure.* 3, 41-62.
- Hatanaka, A., 1993. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry.* 34, 1201-1218.
- Hauer, B., Habicher, T., Schmid, R., Maurer, S. C., Urlacher, V. B., Schulze, H., Huber, N., Bachmann, T. T., 2008. Method for producing a hydroxylation catalyst and the use thereof. US Patent No 7364884 B2.
- Hedge, I. C., 1992. A global survey of the biogeography of the Labiatae, in: Harley, R. M., Reynolds, T. Eds., *Advances in labiate science.* Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 7-17.
- Heipieper, H. J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H., de Bont, J. A. M., 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 12, 409-415.
- Hemmerlin, A., Hoeffler, J. F., Meyer, O., Tritsch, D., Kagan, I. A., Grosdemange-Billiard, C., Rohmer, M., Bach, T. J., 2003. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 26666-26676.
- Herz, W., 1977. Sesquiterpene lactones in the Compositae, in: Heywood, V. H., Harborne, J. B., Turner, B. L. Eds., *The biology and chemistry of the Compositae.* vol. 1. Academic Press Incorporated, New York, pp. 337-358.
- Höfer, R., Dong, L., Lukan, R., André, F., Ginglinger, J.-F., Gavira, C., Grec, S., Memelink, J., Van der Krol, S., Bouwmeester, H., Werck-Reichhart, D., Geraniol hydroxylase and hydroxygeraniol oxidase activities of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes and potential for engineering the early (seco)iridoid pathway. manuscrit en préparation.
- Hoffmann, T., Odum, J. R., Bowman, F., Collins, D., Klockow, D., Flagan, R. C., Seinfeld, J. H., 1997. Formation of organic aerosols from the oxidation of biogenic hydrocarbons. *J. Atmos. Chem.* 26, 189-222.
- Hotze, M., Schröder, G., Schröder, J., 1995. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus* and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 374, 345-350.
- Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J., Haupt, I., Cosimano, J., Gershenzon, J., Tholl, D., 2010. Variation of Herbivore-Induced Volatile Terpenes among Arabidopsis Ecotypes Depends on Allelic Differences and Subcellular Targeting of Two Terpene Synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiol.* 153, 1293-1310.
- Huang, M., Sanchez-Moreiras, A. M., Abel, C., Sohrabi, R., Lee, S., Gershenzon, J., Tholl, D., 2012. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- $\beta$ -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol.* 193, 997-1008.
- Hull, A. K., Vij, R., Celenza, J. L., 2000. Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2379-2384.
- Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Chapple, C., 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10045-10050.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger, Y., Hirschberg, J., Schaffer, A. A., Katzir, N., Tadmor, Y., Lewinsohn, E., 2006. Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry.* 67, 1579-1589.
- Ikezawa, N., Gopfert, J. C., Nguyen, D. T., Kim, S. U., O'Maille, P. E., Spring, O., Ro, D. K., 2011. Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in

- sesquiterpene lactone metabolism. *J. Biol. Chem.* 286, 21601-21611.
- Inoue, A., Horikoshi, K., 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*. 338, 264-266.
- Irmeler, S., Schröder, G., St-Pierre, B., Crouch, N. P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U., Schröder, J., 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J.* 24, 797-804.
- Isin, E. M., Guengerich, F. P., 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1770, 314-329.
- Janssens, L., De Pooter, H. L., Schamp, N. M., Vandamme, E. J., 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochem.* 27, 195-215.
- Jefcoate, C. R., 1978. Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods Enzymol.* 52, 258-279.
- Jensen, H. P., Sharpless, K. B., 1975. Selenium dioxide oxidation of d-limonene. Reinvestigation. *J. Org. Chem.* 40, 264-265.
- Jensen, K., Johnston, J. B., de Montellano, P. R. O., Möller, B. L., 2012. Photosystem I from plants as a bacterial cytochrome P450 surrogate electron donor: terminal hydroxylation of branched hydrocarbon chains. *Biotechnol. Lett.* 34, 239-245.
- Karp, F., Croteau, R., 1992. Hydroxylation of (-)- $\beta$ -pinene and (-)- $\alpha$ -pinene by a cytochrome P450 system from hyssop (*Hyssopus officinalis*), in: Petroski, R. J., McCormick, S. P. Eds., Secondary metabolite biosynthesis and metabolism. Plenum Press, New York, pp. 253-260.
- Karp, F., Harris, J. L., Croteau, R., 1987. Metabolism of monoterpenes: demonstration of the hydroxylation of (+)-sabinene to (+)-*cis*-sabinol by an enzyme preparation from sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 179-193.
- Karp, F., Mihaliak, C. A., Harris, J. L., Croteau, R., 1990. Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 219-226.
- Katano, N., Yamamoto, H., Lio, R., Inoue, K., 2001. 7-Deoxyloganin 7-hydroxylase in *Lonicera japonica* cell cultures. *Phytochemistry*. 58, 53-58.
- Kawai, H., Kuroyanagi, M., Ueno, A., 1988. Iridoid glucosides from *Lonicera japonica* THUNB. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 36, 3664-3666.
- Kerschbaum, M., 1927. Über Lactone mit großen Ringen—die Träger des vegetabilischen Moschus-Duftes. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. 60, 902-909.
- Kessler, A., Halitschke, R., Diezel, C., Baldwin, I. T., 2006. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*. 148, 280-292.
- Kinsella, J. E., Hwang, D. H., Dwivedi, B., 1976. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8, 191-228.
- Klouwen, M. H., Ter Heide, R., 1965. Studies on terpenes. II. The monoterpene hydrocarbon composition of the volatile oil of *Angelica archangelica* L.(Umbelliferae). *Perfum. Essent. Oil Rec.* 56, 224-228.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M., Vigerschow, H., 1986. Action of terpenoids on energy metabolism, in: Brunke, E.-H. (Ed.), Progress in essential oil research. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 429-445.
- Knudsen, J. T., Tollsten, L., Bergström, L. G., 1993. Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*. 33, 253-280.
- Koch, T., Bandemer, K., Boland, W., 1997. Biosynthesis of *cis*-Jasmone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helv. Chim. Acta.* 80, 838-850.
- Krings, U., Berger, R. G., 1998. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 1-8.
- Krotz, A., Helmchen, G., 1990. Total syntheses of sandalwood fragrances:(Z)- and (E)- $\beta$ -Santalol and their enantiomers, ent- $\beta$ -Santalene. *Tetrahedron Asymmetry*. 1, 537-540.
- Krotz, A., Helmchen, G., 1994. Total syntheses, optical rotations and organoleptic properties of sandalwood fragrances, (Z)- and (E)- $\beta$ -santalol and their enantiomers, ent- $\beta$ -santalene. *Liebigs Ann. Chem.*, 601-609.
- Lange, B. M., Rios-estepa, R., Turner, G. W., 2012. Production of terpenes and terpenoids in glandular trichome-bearing plants. US Patent Application No. 0052535 A1.
- Lanza, E., Ko, K. H., Palmer, J. K., 1976. Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *J. Agric. Food Chem.* 24, 1247-1250.

- Lanza, E., Palmer, J. K., 1977. Biosynthesis of monoterpenes by *Ceratocystis moniliformis*. *Phytochemistry*. 16, 1555-1560.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P. B., Gruissem, W., Lange, M., 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6866-6871.
- Lawrence, B. M., Harley, R. M., Reynolds, T., 1992. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation, in: Harley, R. M., Reynolds, T. Eds., *Advances in labiatae science*. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 399-436.
- Le Guéret, A., Corbin, P., Faure, J., Verdon, L. D., 1999. *Histoire en Parfums*. Le Garde Temps, Paris.
- Lee, S., Badiyan, S., Bevan, D. R., Herde, M., Gatz, C., Tholl, D., 2010. Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21205-21210.
- Lenihan, J. R., Tsuruta, H., Diola, D., Renninger, N. S., Regentin, R., 2008. Developing an industrial artemisinic acid fermentation process to support the cost-effective production of antimalarial artemisinin-based combination therapies. *Biotechnol. Prog.* 24, 1026-1032.
- Leon, R., Fernandes, P., Pinheiro, H., Cabral, J., 1998. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 483-500.
- Lerner, I., 2003. D-limonene impacted by events in Brazil and Asia. *Chemical Market Reporter*. 263, 16.
- Linstrom, P. J., Mallard, W. G., 2011. NIST MS Search Program v2.0. Gaithersburg MD.
- Longo, M. A., Sanromán, M. A., 2006. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 335-353.
- Loreto, F., Pinelli, P., Manes, F., Kollist, H., 2004. Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiol.* 24, 361-367.
- Lücker, J., Schwab, W., Franssen, M. C. R., Van Der Plas, L. H. W., Bouwmeester, H. J., Verhoeven, H. A., 2004. Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis: two-step production of (+)-*trans*-isopiperitenol by tobacco. *Plant J.* 39, 135-145.
- Luo, P., Wang, Y. H., Wang, G. D., Essenberg, M., Chen, X. Y., 2001. Molecular cloning and functional identification of (+)-delta-cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. *Plant J.* 28, 95-104.
- Lupien, S., Karp, F., Wildung, M., Croteau, R., 1999. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 181-192.
- Mabberley, D. J., 1987. *The plant book*. Cambridge University Press, Cambridge.
- MacLeod JR, W. D., Buigues, N. M., 1964. Sesquiterpenes. I. Nootkatone, a new grapefruit flavor constituent. *J. Food Sci.* 29, 565-568.
- Madyastha, K. M., Meehan, T. D., Coscia, C. J., 1976. Characterization of a cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*. *Biochemistry (Mosc.)*. 15, 1097-1102.
- Mahmoud, S. S., Williams, M., Croteau, R., 2004. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. *Phytochemistry*. 65, 547-554.
- Mansuy, D., 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. Comparative biochemistry and physiology. Part C. Pharmacology, toxicology & endocrinology. 121, 5-14.
- Martin, D. M., Aubourg, S., Schouwey, M. B., Daviet, L., Schalk, M., Toub, O., Lund, S. T., Bohlmann, J., 2010. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biol.* 10, 226.
- Martin, D. M., Toub, O., Chiang, A., Lo, B. C., Ohse, S., Lund, S. T., Bohlmann, J., 2009. The bouquet of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) flowers arises from the biosynthesis of sesquiterpene volatiles in pollen grains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7245-7250.
- Martinis, S. A., Blanke, S. R., Hager, L. P., Sligar, S. G., Hoa, G. H., Rux, J. J., Dawson, J. H., 1996. Probing the heme iron coordination structure of pressure-induced cytochrome P420cam. *Biochemistry (Mosc.)*. 35, 14530-14536.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K.-I., Kamiya, Y.,

- Kasahara, H., 2011. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18512-18517.
- Mateo, J., Jiménez, M., 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A.* 881, 557-567.
- Mau, C. J. D., Karp, F., Ito, M., Honda, G., Croteau, R. B., 2010. A candidate cDNA clone for (-)-limonene-7-hydroxylase from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry.* 71, 373-379.
- Mazzaro, D., 2000. Orange oil, D-limonene market unsettled due to Brazilian delays. *Chemical Market Reporter.* 258, 18.
- Mercke, P., Kappers, I. F., Verstappen, F. W. A., Vorst, O., Dicke, M., Bouwmeester, H. J., 2004. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiol.* 135, 2012-2024.
- Meunier, B., De Visser, S. P., Shaik, S., 2004. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews-Columbus.* 104, 3947-3980.
- Mikkelsen, M. D., Hansen, C. H., Wittstock, U., Halkier, B. A., 2000. Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* 275, 33712-33717.
- Millet, Y. A., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D., Ausubel, F. M., 2010. Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell.* 22, 973-990.
- Mizutani, M., Ohta, D., 2010. Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 291-315.
- Mizutani, M., Sato, F., 2011. Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 194-203.
- Mouri, T., Michizoe, J., Ichinose, H., Kamiya, N., Goto, M., 2006. A recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam monooxygenase system coupled with enzymatic cofactor regeneration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 514-520.
- Mueller, E. J., Loida, P. J., Sligar, S. G., de Montellano, P. R. O., 1995. Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry, in: Ortiz de Montellano, P. R. (Ed.), Plenum Press. New York, pp. 83-124.
- N°1334/2008 Règlement (CE) du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008. Article 3.2(c) et Article 16. *Journal Officiel L 354* du 31.12.2008, page 34.
- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C. J., Glawischnig, E., Olsen, C. E., Halkier, B. A., Glazebrook, J., 2007. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell.* 19, 2039-2052.
- Nair, P., Vining, L., 1965. Cinnamic acid hydroxylase in spinach. *Phytochemistry.* 4, 161-168.
- Nankai, H., Miyazawa, M., Akazawa, S., Kameoka, H., 1998. Biotransformation of (±)-lavandulol by the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3858-3862.
- Negre, F., Kish, C. M., Boatright, J., Underwood, B., Shibuya, K., Wagner, C., Clark, D. G., Dudareva, N., 2003. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. *Plant Cell.* 15, 2992-3006.
- Nelson, D. R., 2006. Cytochrome P450 Nomenclature, 2004, in: Phillips, I. R., Shephard, E. A. Eds., *Cytochrome P450 Protocols.* vol. 320. Humana Press, pp. 1-10.
- Nelson, D. R., 2009. The cytochrome P450 homepage. *Hum. Genomics.* 4, 59-65.
- Nelson, D. R., 2011. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics.* 1814, 14-18.
- Nelson, D. R., Schuler, M. A., Paquette, S. M., Werck-Reichhart, D., Bak, S., 2004a. Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiol.* 135, 756-772.
- Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M. G., Maltais, L. J., Wain, H. M., Nebert, D. W., 2004b. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenet. Genomics.* 14, 1-18.
- Nguyen, D. T., Gopfert, J. C., Ikezawa, N., MacNevin, G., Kathiresan, M., Conrad, J., Spring, O., Ro, D. K., 2010. Biochemical Conservation and Evolution of Germacrene A Oxidase in Asteraceae. *J. Biol. Chem.* 285, 16588-16598.
- Norin, T., 1972. Some aspects of the chemistry of the order Pinales. *Phytochemistry.* 11, 1231-1242.
- Nour-Eldin, H. H., Hansen, B. G., Nørholm, M. H. H., Jensen, J. K., Halkier, B. A., 2006. Advancing uracil-excision based cloning

- towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* 34, e122.
- O'Keefe, D. P., Leto, K. J., 1989. Cytochrome P-450 from the Mesocarp of Avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.* 89, 1141-1149.
- O'Neil, M. J., 2006. The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck, New Jersey.
- Ohloff, G., 1994. Scent and Fragrances: The Fascination of Odours and their Chemical Perspectives. Springer Verlag, Berlin.
- Ohta, D., Mizutani, M., 1998. Plant geraniol/nerol 10-hydroxylase and DNA coding therefor. US Patent No. 5753507.
- Omelianski, V. L., 1923. Aroma-producing microorganisms. *J. Bacteriol.* 8, 393-419.
- Omura, T., Sato, R., 1964a. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.
- Omura, T., Sato, R., 1964b. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385.
- Osakabe, K., Tsao, C. C., Li, L., Popko, J. L., Umezawa, T., Carraway, D. T., Smeltzer, R. H., Joshi, C. P., Chiang, V. L., 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8955-8960.
- Petzoldt, K., Annen, K., Laurent, H., Wiechert, R., 1982. Process for the preparation of 11-beta-hydroxy steroids. US Patent No. 4353985.
- Pichersky, E., Dudareva, N., 2007. Scent engineering: toward the goal of controlling how flowers smell. *Trends Biotechnol.* 25, 105-110.
- Pierrel, M. A., Batard, Y., Kazmaier, M., Mignotte-Vieux, C., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1994. Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 224, 835-844.
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., Urban, P., 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* 272, 51-64.
- Poulos, T. L., Cupp-Vickery, J., Li, H., 1995. Structural Studies on Prokaryotic Cytochromes P450, in: Ortiz de Montellano, P. R. (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. New York, pp. 125-150.
- Raguso, R. A., Light, D. M., 1998. Electroantennogram responses of male *Sphinx perelegans* hawkmoths to floral and 'green-leaf volatiles'. *Entomol. Exp. Appl.* 86, 287-293.
- Ralston, L., Kwon, S. T., Schoenbeck, M., Ralston, J., Schenk, D. J., Coates, R. M., Chappell, J., 2001. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-*epi*-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Arch. Biochem. Biophys.* 393, 222-235.
- Ramírez-Martínez, J. R., Luh, B. S., 1973. Phenolic compounds in frozen avocados. *J. Sci. Food Agric.* 24, 219-225.
- Rapp, A., Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Cell. Mol. Life Sci.* 42, 873-884.
- Rathore, K. S., Sunilkumar, G., Campbell, L. A. M., 2011. Cotton plant with seed-specific reduction in gossypol. US Patent No. 7999148 B2.
- Rauhut, T., Glawischnig, E., 2009. Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds. *Phytochem. Rev.* 70, 1638-1644.
- Rausch, T., Helmlinger, J., Hilgenberg, W., 1985. High-performance liquid-chromatographic separation and some properties of (*ε*)-indoleacetaldoxime and (*ζ*)-3-indoleacetaldoxime. *J. Chromatogr. A.* 318, 95-102.
- Ro, D.-K., Ehling, J., Keeling, C. I., Lin, R., Mattheus, N., Bohlmann, J., 2006a. Microarray expression profiling and functional characterization of *AtTPS* genes: Duplicated *Arabidopsis thaliana* sesquiterpene synthase genes At4g13280 and At4g13300 encode root-specific and wound-inducible (*Z*)- $\gamma$ -bisabolene synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* 448, 104-116.
- Ro, D. K., Newman, K., Paradise, E. M., Keasling, J. D., Ouellet, M., Eachus, R., Ho, K., Ham, T., 2010. Polynucleotides encoding isoprenoid modifying enzymes and methods of use thereof. US Patent Application No. 0218283 A1.
- Ro, D. K., Ouellet, M., Paradise, E. M., Burd, H., Eng, D., Paddon, C. J., Newman, J. D., Keasling, J. D., 2008. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinin acid. *BMC Biotechnol.* 8, 83.
- Ro, D. K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., 2006b. Production of the antimalarial drug precursor artemisinin acid in engineered yeast. *Nature.* 440, 940-943.
- Ro, D. K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A.,

- Eachus, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C. Y., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R., Keasling, J. D., 2006c. Production of the antimalarial drug precursor artemisinin acid in engineered yeast. *Nature*. 440, 940-943.
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., Didierjean, L., Werck-Reichhart, D., 1998. The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiol*. 118, 1046-1056.
- Rohloff, J., Bones, A. M., 2005. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana*-Putative olfactory compounds in plant communication. *Phytochemistry*. 66, 1941-1955.
- Russell, D. W., Conn, E. E., 1967. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 256-258.
- Ružička, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*. 9, 35-37.
- Sakuda, Y., 1969. The oxidation of limonene with selenium dioxide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42, 3348-3349.
- Salim-ur-Rehman, Paterson, A., Piggott, J. R., 2006. Flavour in sourdough breads: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 557-566.
- Schalk, M., Batard, Y., Seyer, A., Nedelkina, S., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1997. Design of fluorescent substrates and potent inhibitors of CYP73As, P450s that catalyze 4-hydroxylation of cinnamic acid in higher plants. *Biochemistry (Mosc.)*. 36, 15253-15261.
- Schenkman, J. B., Remmer, H., Estabrook, R. W., 1967. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* 3, 113-123.
- Schneider, E., Clark, D. S., 2013. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 39, 1-13.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 36566-36574.
- Schreier, P., 1997. Enzymes and flavour biotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55, 51-72.
- Schrodinger, LLC, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. 2010.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B. L., Olsen, C. E., Svatos, A., Halkier, B. A., Glawischnig, E., 2006. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol*. 141, 1248-1254.
- Schuler, M. A., Werck-Reichhart, D., 2003. Functional Genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 629-667.
- Seifert, A., Pleiss, J., 2009. Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: A systematic analysis of the substrate recognition site 5. *Proteins*. 74, 1028-1035.
- Seifert, A., Vomund, S., Grohmann, K., Kriening, S., Urlacher, V. B., Laschat, S., Pleiss, J., 2009. Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *Chembiochem*. 10, 853-861.
- Seo, M., Akaba, S., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M., Koshiba, T., 1998. Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superroot1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 116, 687-693.
- Sharon-Asa, L., Shalit, M., Frydman, A., Bar, E., Holland, D., Or, E., Lavi, U., Lewinsohn, E., Eyal, Y., 2003. Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *Plant J.* 36, 664-674.
- Siebert, T. E., Wood, C., Elsey, G. M., Pollnitz, A. P., 2008. Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3745-3748.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022-8028.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201-222.
- Snoeren, T. A., Kappers, I. F., Broekgaarden, C., Mumm, R., Dicke, M., Bouwmeester, H. J., 2010. Natural variation in herbivore-induced volatiles in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 61, 3041-3056.
- Sowden, R. J., Yasmin, S., Rees, N. H., Bell, S. G., Wong, L.-L., 2005. Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450<sub>cam</sub> and P450<sub>BM-3</sub>. *Org. Biomol. Chem.* 3, 57-64.
- Steeghs, M., Bais, H. P., De Gouw, J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R., Vivanco, J. M., 2004. Proton-transfer-reaction mass spectrometry as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic



- compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 47-58.
- Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, J., Liu, G., Ren, D., 2011. Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 23, 364-380.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshihara, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., Kasahara, H., 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5430-5435.
- Szente, L., Szejtli, J., 1988. Stabilization of flavors by cyclodextrins, Flavor encapsulation. American Chemical Society, Washington DC, pp. 148-157.
- Takahashi, S., Yeo, Y.-S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., Chappell, J., 2007. Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *J. Biol. Chem.* 282, 31744-31754.
- Tan, J., Bednarek, P., Liu, J., Schneider, B., Svatoš, A., Hahlbrock, K., 2004. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry.* 65, 691-699.
- Teoh, K. H., Polichuk, D. R., Reed, D. W., Nowak, G., Covello, P. S., 2006. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Lett.* 580, 1411-1416.
- Teutsch, H. G., Hasenfratz, M. P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J. M., Jeltsch, J. M., Durst, F., Werck-Reichhart, D., 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 90, 4102-4106.
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., Pichersky, E., 2005. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J.* 42, 757-771.
- Tholl, D., Lee, S., 2011. Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book.* 9, e0143.
- Tissier, A., 2012. Glandular trichomes : what comes after expressed sequence tags? *Plant J.* 70, 51-68.
- Trapp, S., Croteau, R., 2001. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu. Rev. Plant Biol.* 52, 689-724.
- Trudgill, P. W., 1990. Microbial metabolism of monoterpenes—recent developments. *Biodegradation.* 1, 93-105.
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., Lewis, W. J., 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science.* 250, 1251-1253.
- Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., Pompon, D., 1997. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* 272, 19176-19186.
- Urlacher, V. B., Eiben, S., 2006. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 24, 324-330.
- Urlacher, V. B., Girhard, M., 2012. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 30.
- Urlacher, V. B., Makhsumkhanov, A., Schmid, R. D., 2006. Biotransformation of  $\beta$ -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 53-59.
- US-EPA, 2011. <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>.
- Van Beilen, J. B., Holtackers, R., Lüscher, D., Bauer, U., Witholt, B., Duetz, W. A., 2005. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1737-1744.
- van der Heijden, R., Jacobs, D. I., Snoeijs, W., Hallard, D., Verpoorte, R., 2004. The *Catharanthus roseus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* 11, 607-628.
- Van der Werf, M. J., De Bont, J. A. M., Leak, D. J., 1997. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55, 147-177.
- van der Werf, M. J., Keijzer, P. M., van der Schaft, P. H., 2000. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene. *J. Biotechnol.* 84, 133-143.
- Van Poecke, R. M., Posthumus, M. A., Dicke, M., 2001. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *J. Chem. Ecol.* 27, 1911-1928.

- Velasco, R., Zharkikh, A., Troglio, M., Cartwright, D. A., Cestaro, A., et al, 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*. 2, e1326.
- Vetter, H.-P., Mangold, U., Schröder, G., Marner, F.-J., Werck-Reichhart, D., Schröder, J., 1992. Molecular analysis and heterologous expression of an inducible cytochrome P-450 protein from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.). *Plant Physiol.* 100, 998-1007.
- Vik, Å., Rine, J., 2001. Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6395-6405.
- Vuorinen, T., Nerg, A. M., Ibrahim, M. A., Reddy, G. V. P., Holopainen, J. K., 2004. Emission of *Plutella xylostella*-induced compounds from cabbages grown at elevated CO<sub>2</sub> and orientation behavior of the natural enemies. *Plant Physiol.* 135, 1984-1992.
- Wallach, O., 1887. Zur Kenntniss der Terpene und ätherischen Oele. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 238, 78-89.
- Walton, N. J., Mayer, M. J., Narbad, A., 2003. Vanillin. *Phytochemistry*. 63, 505-515.
- Wang, J., Liu, Y., Cai, Y., Zhang, F., Xia, G., Xiang, F., 2010. Cloning and functional analysis of geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 from *Svertia mussotii* Franch. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1583-1590.
- Wang, X., Howell, C. P., Chen, F., Yin, J., Jiang, Y., 2009. Gossypol - a polyphenolic compound from cotton plant, in: Taylor, S. L. (Ed.), *Adv. Food Nutr. Res.* vol. Volume 58. Academic Press, pp. 215-263.
- Warman, A. J., Roitel, O., Neeli, R., Girvan, H. M., Seward, H. E., Murray, S. A., McLean, K. J., Joyce, M. G., Toogood, H., Holt, R. A., Leys, D., Scrutton, N. S., Munro, A. W., 2005. Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 747-753.
- Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1, 3003.3001-3003.3009.
- Westfall, P. J., Pitera, D. J., Lenihan, J. R., Eng, D., Woolard, F. X., Regentin, R., Horning, T., Tsuruta, H., Melis, D. J., Owens, A., Fickes, S., Diola, D., Benjamin, K. R., Keasling, J. D., Leavell, M. D., McPhee, D. J., Renninger, N. S., Newman, J. D., Paddon, C. J., 2012. Production of amorphaadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109, E111-E118.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F. M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 414, 562-565.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., Provart, N. J., 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*. 2, e718.
- Winterhalter, P., Rouseff, R., Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. Vol. 802. ACS Publications, 2002, pp. 1-19.
- Yamamoto, H., Katano, N., Ooi, A., Inoue, K., 2000. Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. *Phytochemistry.* 53, 7-12.
- Yerger, E. H., Grazzini, R. A., Hesk, D., Cox-Foster, D. L., Craig, R., Mumma, R. O., 1992. A rapid method for isolating glandular trichomes. *Plant Physiol.* 99, 1-7.
- Yu, F., Okamoto, S., Harada, H., Yamasaki, K., Misawa, N., Utsumi, R., 2011. *Zingiber zerumbet* CYP71BA1 catalyzes the conversion of alpha-humulene to 8-hydroxy-alpha-humulene in zerumbone biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1033-1040.
- Zhou, N., Tootle, T. L., Glazebrook, J., 1999. Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell.* 11, 2419-2428.





# **Annexes**



## Annexes

### I. Liste des séquences nucléotidiques de cytochromes P450 synthétisés

Les séquences nucléotidiques, ci-dessous, codent pour des cytochromes P450 sélectionnés pour le criblage d'activités enzymatiques avec des substrats terpéniques. Elles ont été synthétisées par GeneCust Europe (Dudelange, Luxembourg) après optimisation des codons selon l'usage pour une expression dans la levure. Les références NCBI, GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ou phytozome ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)) de ces gènes sont listées dans le Tableau 2.

#### Séquence nucléotidique codant pour CYP706A7.

```
ATGACGGATATATTCACCTTCTTTACAATTCAAAACAGGAACGATCATTTTGATTTTGTACTAGCCACAATTGTAATTCGTCGGTTTTCTGGTATATATGGGT
TTATGTTAAATCTAAAAGGTTATTTCCCTTTACCTCCGGGTCCAAGAGGTTTACCGATCGTGGGTAATTTGCCTTTTCTACATCCAGAACTACATACTTATT
TCCACTCATTGGCGCAAAAGCAGGCCCTGTTTTAAACTATGGTTAGGAGCTAAATTAACTATTGTTATCACATCCTCGGAAGCGACTAGAGATATTCTGC
GTACAAACGATGTTATTTTTGCCAACGATGATGTGCCTGTTGCAGGATCATTATCTACATATGGTGGCGTAGATATAGTATGGTCACCCCTACGGTCCAGAGT
GGCCAATGTTGCGTAAAATTTGTATTAACAAGATGCTGTCTAATGCCACTCTTGATTCTAATTCCTTTAGTGCCCTGAGGCGTCAAGAACTAGAAGGACGG
TTAGATATTTAGCTGATAGAGCTAGAGCAGGGTTAGCTGTCAATGTAGGCGAACAGATATTTGTAACCATTCTAATGTGGTGACGCAAATGTTGTGGGGT
GAGACAGTCGCTGATGATGAGGAAAGAGAGAAAGTTGGCGCAGAATTCCTTGGAATTAATCACCGAAATTATAGACGTAGTTGGTAAACCAAATGTCTCGG
ACTTCTCCCTGTCCTTAGCAGATTCGATCTTCAAGGTTTGGCTAACGTGTAAGAAGGTCTGCACAACGTATGGACAGAATGTTTGATAGAATCATAAGCC
AGAGGATGGGAATGGACAAGGGCTCTAAAGGTAATGGGGTGACTTTTTGATGTTCTATTAATGCTAAAGACGAAGATGAGAACATGAGCATGAACC
ATGTCAAAGCCTTGCTGATGGACATGGTACTAGGAGGAACAGACACCTCTTGAATACTATTGAATTCGCTATGGCCGAACATAATCAACAAGTTAGAGATT
ATGAAAAGAGCTCAGCAAGAGCTTGACAAGGTCGTTGGTAAGAACAACATCGTGGAAGAGAAGCACATAACCAAGCTTCCTTACATATTGTCAATAATGA
AAGAAACGTTAAGGTTGCATCCAGCATTGCCATTGTTGATCCCAAGATGCCAAGTGAACCACTGTTATTGGTGGATACACTATTCCAAATGACAGTAAG
GTCTTTATCAATGTTTGGGCAATTCACCGTAACCCCAACGTTTGGGAAAATCCCTTGAATTAATCCGGATAGATTTCTTGATAAGGGCTATGACTTTAGTG
GTAATGATTATTCTACTTTCTTTTGGATCAGGTAGGAGAATCTGTGCTGGTATGGCGATGGCAGAAAAAGTCGTGTTATACAATCTGGCTACTTTGTTGC
ATTCATTGATTGGAGAATTGGTGAAGGGGAAAAAGTGAACCTTGAGGAAAAGTTCGGGATTTTGCTAAAATGAAGAATCCTTTAGTCGCAACACCAGT
TTAAGACTGTCCGATCCAAATCTATTCTTATAA
```

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A13.**

ATGTCTAATATTCAAGAGATGGAGATGATCCTTTCAATCAGTTTATGCCTTACTACCTTAATTACATTGCTGTTACTGAGAAGATTTTTGAAAAGAACCCTA  
CAAAGGTTAATTTACCACCATCGCCATGGAGGTTACCGGTGATAGGTAACCTACATCAATTGCTCTTCATCCTCATAGATCGTTGAGATCCTTGAGTTTGA  
GATATGGTCTCTTATGCTACTGCACTTTGGTAGGGTCCGATCCTAGTAGTTTCATCTGGTGAAGCAGCTCAAGAGGTTTTAAAGACTCACGATCACAAT  
TTGCGAATAGGCCTAGATCTAAAGCAGTTCACGGGTTAATGAATGGCGGCAGAGACGTGGTATTTGCTCCCTACGGCGAGTACTGGCGTCAAATGAAATC  
AGTCTGTATCCTTAACCTACTACTAATAAGATGGTTGAGTCGTTGAAAAGGTTAGAGAGGATGAGGTTAATGCCATGATCGAAAAATTAGAAAAGGCAT  
CGTCTCAAGTTCCTCAGAGAAATTAAGTGAATTTTATTACATTACCATCTGACGTAACATCTAGAGTGGCCTTGGGTAGGAAACATCCGAAGATGAGA  
CTGCACGTGATTTGAAAAGAGAGTTAGGCAAATATGGAACCTTCTAGGAGAATTTCCAATAGGTGAGTACGTGCCAATACTGGCTTGGATTGATGGTATT  
CGTGGCTTTAATAACAAGATAAAGGAGGTAAGTAGGGGATTCAGCGATCTAATGGATAAAGTGGTTCAGGAACATTTGGAAGCTTCTAATGACAAAGCCG  
ACTTCGTTGACATTTTGTGCTATAGAAAAGACAAAACCTCAGGCTCCAGGTTCAACGTAATGACATTAATTCATGATCTTGATATGTTTCATTGGAG  
GTACTTCTACTACGTCTACACTGTTGGAATGGACAATGACCGAATTGATTAGGAGTCCGAAGTCAATGAAAAGCTGCAGGATGAAATAAGATCAACTATA  
AGGCCCCACGTTAGCTATATAAAGGAAAAGGAAGTCGAAAACATGAAATATTTGAAGGCTGTCATCAAAGAAGTACTTAGATTGCATCCAGCTTACTAT  
GATTTTCCCAGATTACTTTCAGAAGACGTTAAAGTTAAAGGTTATAACATTGCAGCAGGAACCGAAGTAATTATTAACGCGTGGGCTATACAAAGAGATA  
CGGCTATATGGGGGCTGATGCCGAAGAATCAAACCTGAAAGGCATTTGGATTCCGGTTTAGATTATCATGGTAAGAATCTAAATACATCCCATTTGGG  
TCTGGTCGTAGAATCTGTCCAGGAATTAACCTAGCCTTAGGACTAGCTGAAGTCACTGTGGCCAATTTAGTCGGTAGATTTGATTGGAGAGTAGAAGCTGG  
TCCAAACGGAGATCAACCAGACCTAACGGAAGCAATTGGCATTGATGTCTGCTGTAATTTCTCTGATCGCATTTCTAGCTCCGTGGTCTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A14.**

ATGGAAATGATTATCATAAGCTTGTGCCTAGCTACTATTCTTGCCTATTGCTGTTGAAACAGTTTCTGAATAGAACATACACTGCTAAAGTTAATTTACCAC  
CTAGCCCATGGAGAGTACCAGTTATTGGTAATCTGCACCAATTATCTCTGCACCCTCATAGGAGTTTGAGATCTTTGAGTCACAGATATGGACCTTAATGTT  
ACTACATTTTGAAGAGTTCCTGTTCTAGTCGTTTCGTCCTCTGATGTAGCCCATGATTTAATGAAGACGCATGATTTGAAAGTGCCTAACAGACCCGCAAT  
GAAAGTTGTAGAAAAATATTCAACGGTGGCCGTGAAATGGTTTTTCTCCCTATGGGGAATACTGGCGTCAAATTAATCGGTGTGATTGTTAACCTATT  
GAACAAGAAGAAGGTCCAGAGTTTCGAAAAGTCAAGGAAGAAGAGATATCAGAGATGATGGAACGTGTTGAAAAGCTTCATCTGACTCATCGCCGT  
GAATCTTCCGAGTTACTTCTGACATTGACCTCAGATGTGACAAGCAGGGTTTCTTAGGCAGGAAATATAGCAAAGAGGAGAGATGTCAGATTTTAAAGA  
TTCAAATGAGGAAAATTAAGTGAATTAGTAGCGGATTTCCAGTTGGTGAATACATTCCCTGTTTAGCATGGATTGATAAATTGAGAGGTGTGGATGAAAA  
GCGGAGGAAGTTTCAAAGCGTTTGGCGATTTGATGGAAAAGGTGCTACAAGAACATCTTGATGCAACTGATAAACCAGCTTTAGATTTTGTGGATGTTTT  
ATTGTCTCTGGAACGTCACGAAAGAAATGGGGTCCAAATCAGGAGATCCGACATTAAGTTCCTTATATTAGACATGTTTCTGCGGTAAGTAAACGACAT  
ACGCACTACTGGAATGGATCATGACCGAATTGATAAGACATCCAGAATGCATGAAGAACTTCAGGACGAAATACGTGCCAAGGCCACAAAATTGATATT  
GTACATCTCTGAAGAAGACGTTGAGGATATGAAATATTTAAAAGCAGTTGTGAAGGAAGTCTAAGACTACACCCACCTTTACCAGTCTGTTGCCAAGAG  
AGTTATCTGAAGATTAAGTTAAAGGGATATGACATCGCCGCTGGTACCCAAGTAATCATTAAACGCTTGGGCAATCAAAGAGATACTATGACCTGGGGA  
ATAGATGCAGAAGAATTTAGACCTGAGAGACATTTAGATTCTTAGTAGACTTTAGGGGTACGAATTTGAGTTTCATCCCTTTGGTTCTGGTAGGAGAATT  
TGTCGCCGATTGGGTTTGTATGGCTTTGGTAGAGTTACATTGGCTAATTTGGTCAATAGATTCAACTGGAGAATTGGAGGTGCAGCATTAGGTTGATGA  
ATATGACTTGGCTGAAAGTACTGGTCTAGACGTGTGCTGAAGTTCCCATTAATCGTATTCCCTTCTCCAGCATAA



**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A15.**

ATGGAAATTATCATCATTTTCGTTATGCTTGGCAACTATTCTGGCATTCTTACTGTTGAAGCCATTGCTTAACAGGACTGTTGCAAAGGATAATTTGCCTCCGT  
CACCTTGGAGAGTTCCCGTTATTGGTAACCTTCATCAATTATCTTTGCACCCACACAGGTCTTTGAGATCTTTATCACATAGATATGGTCCCTTAATGTTACTT  
CATTTCCGGTAGAGTGCCTATATTAGTTGTGTATCTTCTGATGTGGCCCATGATTTAATGAAAACACATGACTTAAAAGTGGCCAACAGGCCGAGATTGAAA  
GTTATAGAAACAATTTTGAACGGAGGTAGGGAAGTAGTTTTTCCCTACGGAGATTACTGGAGACAAATCAAACCGTGTGTGTAGTTCACCTGTTAAA  
TAAGAAAATGGTGCAGTCATTTGCTAAGGTGAGAGAAGAAGAAGATCAGTTATGATGGAGAAAGTCGAGAAGGCTTCTCTGACAGCTCTCCATTGAAT  
TTGAGTAAATTGTTGATAACCTTAACGAGCGATGTAGCTAGCCGTGATCATTTGGGAAGAAACATTCCAATGAGGCCTCGATGTCGGATTTTAAAAACCA  
AGTCAGGAAAATTACTGAATTAGTAGAGGTTTTCCAGTTAGTGAATACATTCCATGCTTAGCCTGGATTGATCAGATTGCTGGGCTGTATAACCGTGCTG  
AGGAAGTATCAAAAATTTCCGGCGATCTAATGGACAAGTTGTTCAAGAGCACCTAGATGCCACAAACAAGCCTACAAAAGATTTTCGTTGATATCTCTGTTG  
AGTTTTGAAAGGCAGTCTAAAGATGGTATAGAAGTTAGGAGGTGATATCAAGTTCATAATCTAGATATCTTTCTAGGGGGCAGCAACTACTAATAG  
TCTGCTAGAATGGACTATGACCGAATTATCAGACATCCAGAGTGTATGAAGAAGTTGCAAGATGAAATTAGAGGCGATGCTACCAACCTGACAATTTATA  
GGTCTCACGAAGAAGTAGAGGACATGAAGTACCTAAAAGCCGTCAATAAAGAGGGTTAAGACTTCATCCACCTTTCCCTTACTAGTCTTGAGACTTTTGA  
CTCAAGACGTTAAATTGAAGGGATATGACATAGCTGCAGGTACGCAAGTCATAACTAATGCATGGGCTATACAACGTGACATTGTTACCTGGGGCATTGAT  
GCTGAAGAATTTAGACCAGAAAGACATCTAGACAGCCGTTAGATTTTCGTTGTTACAATTTTCAATATATACCTTCGGTAGTGGGAAGACGATTTGTCCA  
GGTATTGGTTTCGCAATGGCATTGGTGCAGGTCCTTGGCAATTTAGTCAATAGATTTAATTGGAGAATGGATGCTAGATTATCGGGCGACGAATATGA  
CCTGGCGGAAGCAACAGGAATTGATGTTGTAGAAAATTTCCACTTATCGTATTCCCTTCTAATGCTTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A16.**

ATGGAGATGATGATCTTGATTTCACTTTGCCTTACCCTTTCTTGACTATTTTCTGATTTTCAAGTCTCTACTAAAAAGACCAAATTCAAACTTACCGCCATCT  
CCTTGGAGGCTACCAGTTATTGGGAACCTGCATCAATTAAGTTTACACCCACATCGTCTTTGAGTTCCTTATCTGCAAGGCATGGACCGTTAATGTTGCTG  
AGATTTGGTAGGGTCCAGTTTTAATCGTAAGTTCTGCAGATGTCGCTCAGATGTAATGAAGACACATGATCTGAAGTTTGCCAAATAGACCAATAACGAA  
GTCCGCCATAAGATTTCCAATGGTGGACGTGACCTAGTATTTGCTCTTACGGCGAGTATTGGAGAAACGTCAAATCCTTATGCACAATTCATCTGTTATC  
AAACAAAATGGTGCAAAGCTCTGAGAAGCGTAGGGAAGAAGAATAACGTTGTTGATGGAAACTTTAGAAGAGGCAAGCCTTTTCGAGTAGTAGTGTAAA  
CCTGAGTAACTTATTACTAACATGGTTTCAGACATTATGGGTAAGTCTGTTGGGTAAGAAATATTCGGGAGAAAGAGGGTACGATTGATGTCAAAACTA  
TAACTAAATCTTTCTGATGCCGTTGGTTAAGCCCTGTTGGCGAATACATTCCATCACTTGCCTGGATTGGCAAAATTAAGGAAAGCGATGGAAAGTTGG  
AAAAATCACAAGCAATTTGGGGATTTTATTGAAAAGTATTGCAGGAGCACGAAGATACAACAGCTGACAAAAGAAACACCCGATTTTGTGATATGTT  
GCTTACCATCCAGAGAGACGAAACTGCGCAATGTCAACTAGACAAGTCTGACCTGAAAGTGATAATCTCGAAATGTTTTAGGAAGCACCACAACGACCT  
CTGCAGTAATAGAATGGGCTATGACCAGATTGATGAGGAATCCCGAATGTTTAAAGAAATTACAGGATGAAATCAGGTCTGTGTCGAAGATGAATCTTAC  
GTTCCGGCAAAGAGGTAGAGAATATGAATTACTTAAAAGCAGTTATCAAAGAGGTTCTAAGACTACACCTCCATTGCCCTTGTGGTCCCAAGATTACTT  
TCTGAAGACGTCAAGTTGAAGGGTTATGATATAACAGCCGGTACTCAAGTCAATATAAATGCTTGGGCTATTCAACGTGATACAGCCACTTGGGGGTCAGA  
TGCTCAAGAATTTAGCCCTGAAAGACATTTGATTCCACCTGGGATTTGTGGGTAGAAATTTCAAATATATACCGTTTGGCGCGGGTGAAGATTGTGTC  
TGGTATTGGCTAGGTTGATGATGTCATCCGTTACTTTAGCTAACTTAGTTAAAGATTGACTGGAGAGTTGAAGATGGTCTTCAGGATATGATAAACC  
CGACTTGGTCAAGGTGCAGGTATCGACGTGTGTCGTAATTTCCATTAGTGGTATTCCCTTCTATCGGCTTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A18.**

ATGGAAATGACCCTGATGGTTTCTCTTTGTTTGACTACACTGTTAACTCTTCTTTTATTGAAGAAGTTTTTGAAACGTACAGCTAAGAAGGTTAATTTACCAC  
CGTCACCATGGAGAATTCCAGTGATAGGGAACCTACATCAATTGAGTTTGCATCCCATAGAAAGTTTGCACAGCTTACTACTAAGGTATGGACCCCTTATGC  
TTCTACACTTTGGCAGGGTGCCAAATTTGGTTGTCTTCAAGTGAAGCAGCCCATGAAATTTGAAGACGCATGACTTGAAATTCGCTAACAGACCTAAAT  
CGAAGGCTGTGCATGGTCTGATGAATGGAGGTAGAGATGTCGATTTTGGTCCTACGGTGAATATTGGAGGCAAATGAAGTCCGTTTGTATCTTGAACCTA  
CTAACGAATAAGATGGTCGCTAGCTTTGAAAAGGTTAGAGAGGAGGAAGTGAATGCAATGATGGAGAACTGGAGAAAGCTTCTTGTCAAGCTCCGCC  
GAAAATCTATCCGAACTTTTGTACATTGACTTCTGACGTAAGTACAGAGTTTCATTAGGCCAAAAATATTGGGAAGACGAGACAGCTGGTGGTCTGAA  
AAAGCGTGTACAGCAGATTATGGAACCTTTACGTGAATTTCCCATAGGAGACTACGTACCAGCTTTGGCCTGGATAGACAGGATTAATGGCTTTAACTCTA  
AGATCGTGGAAAGTTTCGCGTGCCTACTCAGATTTAATGGAAAAGGTGGTACAGGAACACTTAGAAGCAGGAGAACATAAAGCCGACTTCGTTAACATTCT  
GCTGAGTATCGAGAAGGAGAAAAACAATGGGTTCAAAGTACAAAAGAAATGACATTAATTCATGATCCTTGACATGTTTATCGGAGGTATTAGTACTTCT  
CTACCTTGCTAGAAATGGATAATGACCGAGTTAATCAGGAATCCAGAGTGCATGAAAAGTTGCAAAACGAAATAAGATCGACTATTAGACCACACGGGTC  
ATATATCAAAGAAAAGAAGTCGAAAACATGAGATACCTAAAAGCAGTTATTAAGAGGTTTTAGGGTCCACCCACCTTTACCGTTGATCTTACCAGAGAC  
TATTAACCGAAGATGTTAAAGTTAAAGGATATGATATTGCAGCTGGAAGTGAAGTACTTATTAATGCTTGGTCTATACATAGAGATCCTGCCATATGGGGC  
CCTGATGCAGAGGAATTTAAACCTGAAAGACATTTAGATAGTACACTGGATTACCATGGTCAAGATTTGAAATATATTCCATTCGGTTCCGGCAGACGTATA  
TGTCAGGTATTAATCTAGCGATGGTTTTAGTTGAAGTAAACATTGGCGAATTTAGTCGGTAGGTTTGATTGGTCTGTGGATCCCGCCCTAATGGTGATCA  
ACCAGATTTAGCAGAAGATTTTCGGTTTAGATGTCTGCAGAAAGAACCCTTTGATTGCTTTCCCATCCTCTGTAGCATAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A19.**

ATGGAGATAATTCTAGTACTTTGTGCTTGACGACCTTGCTTGCACTACTTTTATTGAAGTCCATACTTAAAAGGACAACCCACCAATAATCTGAATCTGCCTC  
CGAGTCCATGGAGATTACCCGTAATTGGTAACCTGCATCAATTGTCTTTGAACACGCATCGTTCTTTGAGGAGCTTGAGTCTAAGATATGGCCATTAATGT  
TATTGCATTTTGGTAGAACGCTGTGTTAATAGTCTCTCAGCTGACGTGCTCACGACATTTTGAAGACATATGACGTTATCTGTGCCAACAGGCCTAAAA  
CAAAAGTTATAGATAAAATCTTAGAGGTGGTAGAGATGTTGCTTTGCTCCCTACGGCGAATACTGGAAGCAGATGAAAAGTATCTGCATCCAGAAGTTG  
TTGTCAAATAAGATGGTGAGATCTTACAAGAAGATCAGGGAAGATGAGATCAAGTTAATGATTGAGAAAGTTGAAAATGCTTCTTCTTGTTCGCCACCATC  
TCCTGTTAATCTTCTCAGCTATTTATGACTCTGACTAACGACATAATTTGTCGTGCCGCTTTAGGAAGGAAGTACTCCTCAAAGAAGACGGAATCGATGT  
CGAAAACATTGTGAGGGCCTTTTCAGCATTAGTAGGAGAATTTCCATTGGGGAATATATACCTTCCCTTCTGGATTGACAAGATAAGGGGCCAGGATC  
ACAAAATGGAAGAAGTCGATAAAAAGATTTCGATGAATTCCTAGAAAAGAGTTGTAAGAGAGCATGAAGATGCAATAAAGGACACCCGTAGTACTTGGTAG  
ATACTCTTCAACAATCAAAGCGACAAGAGCGCACTGAAATTGATTATATGGGATATGTTTCTGCTGGGACTGCAACGTCCTATCATTTTATAGATGGG  
CGATGACTGAACTGATGAGAAAACCAAAGGTCATGAAGAAATTGCAAGAAGAGATTAGATCGTCTAGTCGTCAAGGCCTATTGTAACTGAAAAGAAGC  
CGAGAAAATGGATTATTTACAAGCTGTGATAAAGGAAGCACTGAGATTAAGACCTCCAGCGCCTTTAATGGTTCCAGAGTATTCTCAGAAGATGTAACCT  
TGAAAGGCTATAATATACCAGCCGTACCCAGGTTATTATTAATGCTTGGGCTATACAAAGAGATACAACAACCTGGGGTATCGATGCAGAAGAGTTCCGT  
CCGGAAAAGACACTGGATAGTATTTAGATTTCCAAGGTCAAGACTTCAAATTCATTCCATTTGGTTCCGGTAAAAGGATTTGTCCAGGAATTGGTTTACA  
AGCGGTTAATGGTGTGACTCTAGCAAATATCGTTAAAAGGTTAATTTGGCGTATGGATGTTGAACCGCAAAGAGTCCAACATGATTTAACTGAGGCTAC  
AGGATTGGTGTGTTTTAGAAAATTTCCACTAATTGCTATCCCTTCATCGGCCTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A20.**

ATGGAAATGATTCTTATTACGTTGTGTTTAAACCACACTGCTTGCCCTATTACTAAAGTCAATACTGAAAAGGACTGCAACCAAAAATTTAACTTACCTCCAA  
GCCCTTGGAGGCTTCCAGTCATTGGTAATCTACACCAATTGCTTTACATACACATAGGTCATTAAGGTCCTGTCTCTACGTTACGGTCCACTAATGTTGTT  
ACATTTGGTAGAACACCAGTGTTAATTGTGAGTAGCGCTGATGTTGCACATGATGTTATGAAGACCCACGATCTGGTATGTGCCAATAGGCCAAAATA  
AAGTAGTCGATAAAATATTATCTGTTGGCAGAGACGTCGCTTTCGCCCCTATGGCGAGTACTGGAGACAGATGAAAAGTATCTGTATCCAGAATTTATTG  
AACACAAGATGGTCAGAAGTTACGAGAAGATCCGTGAAGAAGAAATCAAGAGAATGATTGAAAACTGGAAAAAGCTTCATGCTCTTACCCCCCTC  
CAGTCAACTTGTCCAGATTCTAATGACATTAACCAATGATATAATATGCAGAGTTGCACTAGGTAGAAAAGTACTCGGAAAGAAGGATGGAATCGACGTT  
GAGAATATTGTTAGAACCTTTCAGCATTGTTGGGAGAATTTCCAGTGGGTGAATATATCCCAAGTTTGTCTTGGATTGATCGTATTCTGGGCTTGACCAT  
AAGATGGAGGTAGTAGACAAAAGATTTGATGAATTTCTGAAAGAGTCGTAAGAAGACATGAAGAAGCCGACAAGGAGACACGTTCTGACTTGGTTGATA  
AATTGCTAACGATCCAATCGGACAAAAGTGGCCAAATTTGAATTGAAAAAGCGCGTTGAAACTGATTATTTGGGATATGTTTTAGCTGGCACAGCAACT  
ACTCTATCTTTCTAGAGTGGGCTATGACGGAATTAATGAGGAACCCAAAAGTAAAGAAAAGTTGCAAGAAGAGATTAGATCTCAAGCCCCAAGATTT  
ATTCGTAACAGAAAAGAGGCGGAAAAGATGAATTATCTGCAAGCTGTTATAAAGGAAGCTTTAAGATTAAGACCACCTGCTCCACTTTTGGTGCCTAGAG  
TTTTAAGTGAAGATGTGAAACTTAAAGGCTATAATATCCCCGCTGTTACTCAGGTTATAGTCAACGCATGGGCTATTCAGAGAGATACTACGACCTGGGGT  
ACAGATGCTGAAGAATTTAAACCTGAAAGACACTTAGATACAAACCTGACTTCCAAGGTCAAGATTTCAAGTTCAATCCGTTTGGATCAGGGAAGAGGAT  
ATGTCGGGTATAGGGTCACTTCGGCATTGATTGGAGTACTTTGGCCAAATATAGTTAAACGTTTCAATTGGAGGATGGATGTTGAGCCTCAAAGAGTGC  
AACACGACTTAACTGAAGCCACTGTTTGGTGTTCAGGAAGTTTCTTTGATTGCTATCCCGTCTTCAGCGTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71A27.**

ATGGAAATGATTGTCATTAGTTGTGCTTGACTACGCTGTTAGCGTTTCTTTTTTGAAGAGCTTTCATAAAAAGAATACAACACTACGAACTAATCCTCCAC  
CTTCTCCTTGGAGATTACAGTTATTGGGAATTTGCACCAACTTAGCCTGCATCCACATAGATCCTTTTATTCAATTATCTTTAAGATACGGTCCGTTAATGTTA  
TTTCATTTGGGAGAGTCCCAACTTTAGTCGTTTCTAGTGTGATGCCGCACTAGAGGTACTGAAAACCAATGACATCAAAATCTCAACAGACCGAAGACT  
AAGATGGTAGATAAGTTACTTAATGGAGGTAGAGATCTTGCATTGCCCCCTTATGGAGAATACTGGAGACAAGTCAAGTCACTATGCGCATTGCACTTGCT  
TAGTAAAAGACGATCCAGTCAATTTGAATGTGTTAGGAAACAAGAAATAAACGTGATGATGGATACTTTAGAAAAGGCTTCGCTTCTCCTCGTCCAGCA  
CCGTGAATTTGTCACAACTATTGACCACACTTACTAACGACGTTATAACTACAGCGGTTTTGGGTAGAAAATATTCTTGAAGAAGGCGGAAACAATTCAA  
ACAACCTAGTTAGGAGATTTAACGAATTGTAGGAGCATTCCGTTGGGCGAGTTTATACCAGTATTAGCCTGGATTGACAGGATTAGAGGGTTAGACAAA  
AAGGTTGAAAAGTCAATGACGAAATAGATGTGTTTTAGAAAAGTTGTTGAGGAACATGAAGATCATTGGATGAAGAGATGTCCGCTTTGTTGACAT  
CCTATTAAGTACCAGAAGGATAAACTACACAATTCGAGTTAGATCGTAAAGGCTTGAATACTTGTGGTGAATGCTATTGCGCGGTGCTGCTACTAC  
TTTTACCTAATGGAATGGACAATGACTGAATTTAGAGGCACCCGAGTGTATGAAGAACTGAGAGATGAAATCAGATCTGTTTCAACACACGACCTAT  
ATGTGACAGAGAAAGAGGTGAAAGAAATGAACTATTTGAATATGTCATTAAGGAGGTACTAAGATTACATCCAAGCGGACCACTGATACCTAGGGAAT  
ACGTGAAGATGTGAAGTTAATGGTTACGACATTGCTGCAGGTACCAGGGTTTTAATTAATTTATGCTATACAAAGAGATACCGCTACGTGGGGTGCGG  
ATGCTGGCAATTTAAACCCGAAAGACATTTGAACTCACTTCTAGATTTGAAGGACAAAATTTCAAGTACTTACCATTCCGGTATGGCAGACGTCGTTGTC  
CCGGTATGGTCTTGAATGGCACTAGTAGAGGTAGCTTTGGCTAATCTTGAAGAGGTTGCACTTGCCTTCAAAGTGGTCTATCGGTATGATAAA  
CCTGACCTGGCTGAGGCAACAGGTCTTGTATGTTGTAGGAAATTCCTACTGATTGTCTCTCCATTTTCTGCCCTGTCCAGTACATAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71D14.**

ATGGAAATCCAATTGCTTCTCTGGTGCCTTTCTTTTATTCTTGAGTAGTATCTTCTTTTGTAAAGAAATGGAAGACTCAAGAACTTAATTTACCTCCAGG  
TCCATGGAAATTACCTTTCATTGGATCATTACATCATCTAGTCTTTCAGGCCCACTTCTCATCATGGCTTGACCAACTTAGCTAAGAGATACGGTCTTTG  
ATGTTATTGCAATTGGGCGAACAGCCTACCGTTTTCAATTCATCACCACAGATGGCAAAAAGAAGTCTAAAGACGCACGATTTAGCATTGCAACCCGTCCA  
AAACTGACTTTTGCAGAAATTATTAAGTATGGCTCTACTGACATTGCCTTCTCCCATACGGTGAATATTGGAGGCAAATTCGTAATAATTTGCGTAATGGAA  
CTACTGTCCGCTAAGATGGTTAATAGCTTCAGTAGCATAAGAGAAGATGAACCTTCTAACATGATTTCTGGATTAGACTTAGCCGAACATTCCCGTGAAT  
TTGACTGAAAAGGTGAAGTGGTTCACGCTTCCGTAGTTGTAGATCGGCTCTGGGAAAGATATGCAAGGATCAGAACAAAGTTAATCATCCTAATGAGGG  
AGATTCTGTCTTAGCTATCTCGTTAATTTGCTGATTTCTTCCAAGATGGAAGTCTTACACGATTTGGTGGTAGCAAAACAAGGCTATTTAAAGAAC  
ATCATAAGATAGATGAGATACTACAAGACATAGTGAATGAGCACAAGCAGAACAGGGTAAATGGTAAATGGGTAATGGTGAATTTGGTGGTGAGGACT  
TGATAGATGCTTGTAAAGAGTACGTGAAAAGTGGGCAACATCAATTGCCGATAACTGACGATAACATAAAAAGCCGTTATTGTTGATATGTTAGTGCTGGT  
ACCGAAACATCTTACCACATCATCTGGGCTTTGGCCGAAATGATGAAGAAACCATCTGTGCTGGCCAAAGCACAAGCAGAAAGTTAGACAAGCCATGAA  
AGGTAAAAAGGGTTTCAGTTGATCGATCTGGATGAATTGAAATACTTAAACTAGTTATTAAGAAACACTTCGTATGCCACCCCACTTCCACTTTTGAT  
CCCCAGAGAGTGTATGGAGGAGACTAAAATTAACGGGTTAATATACCGTTAAAAACAAGAGTTATTGTCAATTTGGGCCATTGGTAGAAATCCAGAGT  
CATGGGAAGATCCTGAATCATTATGCCCCGAACGTTTTGAGAACACCAATAGACTTTACTGGTAATCATCATCAATTTATCCCTTTGGCGCTGGAAGAA  
GGATGTGTCGGGAATGCTTTTTGGCTTAACAAATGTTGCTCAATTACTAGCGCAATTGTACACCATTTGATTGAAACTACCTAATGGACAATCACCTC  
AGGATTTAGACATGACAGAATCACCTGGAGTTAGCGCTACGAGGAAAGACGATTTGGTCTTTGTAGCCACACCATATGACTCGTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71D48v1.**

ATGGAAATACAGTTCAGTAATCTAGTGGCTTTCTTGTGTTCTTAAGTTCATTTTTCTGTTTTCAAGAAGTGGAAAAGTAACTAAGTAACTACCGCCGG  
GACCATGGAAGTTGCCGTTTATTGGTCTTACATCATCTAGCGTTCGAGGCCATTGCCTCACCACGGTCTGAAGAATTTAGCTAAAAGATATGGTCTT  
TAATGCACCTACAACCTGGTCAAATCCAACATTAGTTATTAGTAGTCCCAAATGGCGAAGGAAAGTCTTAAAACTCACGATCTAGCTTTTGTACAAGAC  
CTAAGTTAGTTGTTGCTGATATTATTATTATGATTGACCGATATTGCAATTTCTCTTACGCGCAATATTGGAGACAGATTAGAAAAATTTGATTTTAGA  
ACTGCTGTCGCTAAAATGGTTAAGTTTTTTCTTATTAGACAAGATGAATGTCAAAAATGGTCTCCTCAATACGTACAACCTCAAATCTCCAGTTAATC  
TAACCGACAAGATTTCTGGTTCATTCATCAGTCAATTTGCCGTTCCGCTTTGGGTAAAATATGTGGTGACCAAGATAAACTGATAATTTTATGAGGGAGA  
TTATTTCTCTGGCTGGTGGTTTCTATAGCAGACTTCTTCCGACTTGGAAAATGATTCATGATATAGATGGTAGCAAGTCGAAATGGTAAAAGCACATA  
GGAAAATTGACGAGATTTTAGAGAACGTTGTGAATGAGCATAAACAACAGGGCCGATGGTAAAAAGGAAATGGTGAGTTTGGTGGAGAAGATTTGA  
TTGATGTTTTGTTAAGGGTTAGAGAGTCCGGTGAAGTCCAATACCAATCACGGACGATAACATAAAAAGTATACTTATCGATATGTTTTCTGCTGGATCAG  
AAACTTCGAGTACAACATAATATGGGCTTTAGCAGAAATGATGAAAAACCATCAGTTTTAGCCAAGGCACAGGCCGAAGTGAAGCAAGCCCTAAAGGG  
TAAGAAAATCTTTTTCAAGAAATCGATATCGACAAGTTAAAATACTTAAAGCTGGTAATAAAAAGAGACATTGAGAATGCATCCTCCAATCCCCTTGTGGT  
ACCAAGAGAATGCATGGAAGATACAAAGATCGATGGCTACAACATCCCTTTAAGACTCGTGAATTGTGAATGCATGGGCGATCGGTCGTGATCCTCAA  
GCTGGGACGACCTGAAAGCTTACGCCAGAAAGATTTGAAAATAATTCAATCGATTTCTTGGAAACCACCATCAGTTTATCCCTTTGGAGCAGGGAGG  
AGGATTTGCCCGCATGTTGTCGGCTTAGCTAATGTGGGCAACCTTGGCCGACTTTTATCATTGACTGAAAACCTACCAATGGACAATCTCAT  
GAAAACCTTGTATGACGGAATCACCTGGCATCTGCTACTAGAAAGGACGATTTGGTATTGATAGCCACCCATACGACAGCTATTA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71D98.**

ATGGAGCTGCCTTCACCTTTGCGCGTTGCCAGTTCATTGCTAGTAATTACATTCTTACTTTTTACATAGTCAAAAAGTCAAAGCAACAATCTAAATCCAATTT  
ACCACCAGGACTTTGGAAATTGCCCGTATTGGCAACCTATTTCAAGTGGCTGGTAAAATTCACATAGGGGGTTGAGGAACTAGCGGATAAATTTGGCC  
CGCTAATGCACCTACAATTGGGTGAGATTTAGCCATAGTTATATCTGATCCAAGAGTAGCCAAAGAAGTATTGCGTACACATGATTTGGCGTTTCAGATC  
GTCCAGTCGTTTTGTTGGGAAATATTATATTGGCTAACTGTAGAGACATTGTTCTTGCTTTATACGGTGATTATTGGAGGCAAAATGAGGAAAATATGCACAT  
TAGAATTAAGCGCTAACAAGGTTCTTTCCGTTTCGATTAGAGAAGATGAAACGTGGAAGCTGATTGAGTCTATTAAGCTTTCCAGCGGCTCATCCT  
TAGTAGATGTGAGTCATAAAGTTTCGGCTTTAGCTAACGCGTTACGTGTAGAGCAACAATAGGACAAGCATGTAATAACCAAGACGAGCTGATAGAATT  
AGTGGAAGAAATTGCATACTTAGGATCTGGATTTTTCTAGCCGACTTGTTCGAAGTATATTTTTCTTACTACTTTAAGCGGTATGAAACCGGCCTTAAAG  
AAGATAAGAAAGAAAGTTAGACGTTATCTTCGATAATATCATTAAAGAGCATAATGACAAAATTGAGTAGAAGAAAAAAGGTTTCGGAAATCGACGCAGAAG  
AGGAAGATTTGGTGGATGTTTTACTGAGGATTAATGATAGTCAAAGATTAGAATCCCTATCTCTAGTGGGGATCCAGGGTTTGGTTTTAGATATGTTAA  
CAGCAGGTAAGTACACCTCGTCAGCAGTTTTAGAATGGCCATGTCTGAATTAATGAGGAACCCGAAAGTATGAAAAAGTGCAGTCAGAAGTGCCTGA  
AGTTGTCAAAGGAAAAAAGAAATTTAGGAAGCTGATTTCAAACATGAGCTATCTTAAGCTAGTAGTTAAGGAACTTTGAGATTGCATGCTCCAGTCC  
CTCTGCTACTTCTAGAGAATGTAGAAAGGAATGTGAGATTAATGGTTATACTATTCCCGTAGGCACCAAGTTATGGTTAATGTCTGGGCAATCGCACGT  
GATCCTGAGTGTGGGACGATCGCGAGTCTTTTATTCCCGAGAGATTGCAAAATTTCTCTGCTGACTATATCGGTGCAAACTTTGAATTTTTGCCCTTTGGT  
GCTGGTAGAAGATGTGCGTGGCATCTCTTTTGGTATCGCTACTGCGAATTGCCATTGCCCCAGCTTCTGCACTCATTGCACTGGAAGCTACCAAACGAG  
ATGAAGCCAGAAGATTTGGATATGGATGAAACAAATGCTGCTACTTGTAAAAGAAAGAATAATCTGATGCTTATTGCTACCGATTGCTCCCATACTATAGA  
ATCCGTAACCGAAGTCTCCTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71D177.**

ATGGAAAATAGACTTGTGGCAGCCTTGTACTTGTACCAACTGTTATTTTTGTCTTAATCAATGCACCTAAGAACAGTAAGAATATAAGAATTTGCCTC  
CGTGTCCCCGAGCTTGCCAGTCATAGGACACTTACACCATCTGGGGACTGAGCTACCTCATAGAGCCTTGCAAGAAAATGGCGAAAAAGTATGGACCTTTG  
ATGCATTTAAGATTGGGCAATGCCTGGCAATAGTTGTATCCTCTAGAGAAGGTGCTAAAGAATTGTTGAAAAACAAAGACCTTTGTGTGCCGACAGACC  
AGAATCTATCGGCTCACAAATCATGTGGTATGATTATAGAGACATCATATTCTACCATATAATGATTATTGGAGGCAAATGAGGAAAATTTGTATGATCGA  
ACTTTTATCTACTAAAAATGTAAGAAGCTTTTCATCAATTAGGCAAGATGAGGCCTTACAATGGTGGAGTCCATCAGGGCGTCTTCAAGGTAACCAGTCA  
ATTTTACTGAGACAATTTTACGTTTACGTCGCCATTACCTGTAGAACAGCTTTGCGTAAGGTTATGAAACCTGAGGATAGACATACCCTGTCAGAATTAC  
TAAAAAAGGCCGCTGCAATGGCAGCTGGTTATGAACTGGCAGATCTATTTCCAGCACTGTCCCTGTTGAGCGTGAATAAGTATAAATTGATGAAAATGAGG  
AGACAAATGGATTCTATTTTATGATGCTATAGTTAAAGAACACGAATTCAAGCAAAGAGGGGAGTTCGGAGGTGAGGATATTGTAGATGTATTATTGCGTTT  
GAAGCAGACTGGTGATTTACAATTTCCATTGAAAGGGATAACATCAAGGCCGTTATTTTTGATGTTTTTCAAGTGCAGGTTCTGAAACTTCCAGTACAACAGT  
CGATTGGGCCATGGCTGAGCTTATGCAGAACCCGCGTGTGATGGCTAAAGTTCAGGCTGAATTGAGAGATGCGTTCAAGGGTAAGAAAATATAGACGA  
AAGTGACATACAGTCGTTAACATACCTAAAAGTATATAAAGAAACGTTAAGATTGCATCCTCCCTTTCCAATGCTACTGCGTGGTACCAGGGGAAGAATC  
TCAACTAAATGGTTACACGATCCCTACAAAGCAAAGATTATTGTGAACAATTGGGCAATGGGCAGGGACCCAGCTTACTGGCATGAACCAAGAGATTTTC  
AACCAGAACGTTTGAATCTATTTGACCCGACTTTTTAGGTAACAACCTTTGAATTTTTGCCTTTTGGTGTGGCAAACGATTTGCCCTGGCTTACACTTTGGT  
CTAGCTAATGTTGAATTACCATTGGCGCAACTTTTATACCATTTTAACTGGAATTTTCTCAAGGAATGACCGCTAAAGACATTGATTGACTGAAACTGAAG  
GACTTTTATTATCGAGAAAGAACGGGCTATTCTTGATTCCAACAACATACATAAAGTCTTCGGACTTAAAGATGACAAGAATCTATTGTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71AS4v2.**

ATGGAAGTGTATTACCAAGTATATGGTTGCTGCTTGTCTACTATTACCCTTGATGTATTTAATAAACGTTAGAAATGAATTAAGGGTCAGAAAAAG  
CCACTTCCACCTGGACCAACCAACTGCCAATCATCGGCAACCTGCATCAGCTAGGTGCTTTGCCTCATTATTCGTGGTGGCAATTATCCAAAAAGTACGGT  
CCCATTATGCTTTTACAAGTGGTGTGCCAAGTGTGTTGTTAGTTCAGTTGAGGCTGCTAGAGAATTTTTAAAGACTCACGATATTGATTGTTGTTCTAGGC  
CTCCTTTAGTTGGACTTGGGAAGTTTTCATACAATCATAGAGACATTGGTTTCGCACCATACGGCGACTACTGGAGAGAGGTCAGGAAAAATATGTGTGTTA  
GAAGTCTTTTCGACAAAAAGAGTTCAATCATTTCAATTTATTAGGGAAGAAGAAGTAACATTGTTAATAGATTCTATTGCTCAATCTCTTCGTGAGGGAGT  
CCAATTGACTTGACAGAAAGGCTTATGAGCTTGACTGCAAATATTATATGCCGATTGCTTTCCGTAAGGCTTTCAGGTTAGTGAGTTCCGGTATGGGAG  
ATTCCAAGAGGTAGTGCATGAAGCTATGGCTCTACTAGGAGGTTTTACCGCCGAGATTTTTTCCCTATGTAGGCAGAATAGTTGATAGATTAAGTGGCCA  
TCATGGTAGATTGGAGCGTTCTTCTTGGAGATGGATGGGTTCTATGAGCGTGTATTGAGGACCACCTAAACCCAGGTAGAGTTAAAGAAGAACACGAA  
GATATTATCGACGTATTGTTGAAGATTGAGCGTGAAAGATCCGAAAGCGGAGCTGTGCAATTTACTAAGGACTCTGCAAAAGCCATTTTGTATGGATTTGTT  
TTTGGCCGGCTAGATACAGGCGCTATTACGTTGACGTGGCCATGACGGAGTTGGCCAGAAATCTAGAATTATGAAAAAGGCACAAGTCGAAGTCAGA  
AACTCTATCGGTAATAAGGGAAAAAGTTACCGAAGGAGATGTAGATCAACTACACTATCTTAAATGGTCTGCAAGAAACATTAAGATTGCATCTCTCTGC  
GCCGTTACTAGTACCTAGGAAACCATGTCTCATTTTGAAATCAACGGTTACCATATCTATCCGAAAACCTAAGTGCACGTTAATGTCTGGGCAATAGGTAG  
GGACCCAAATTTGTGGAAGAACCAGAGGAATTTTACCGAAAAGGTTTATGGACAATTTCTGTGGATTTTCGTGGACAGCATTTTCAAACTGCTTCCATTCTG  
GTGCGGGCAGGAGAATCTGCCTGGTATGTATATGCAATAGCCACAGTGAATTAGCACTAGCGAACTTATTATACAGGTTTAAATGGAATTTACCCAAC  
GGTATGAGAGAAGCTGATATCAATATGGAAGAAGCAGCCGGACTGACTGTTAGAAAGAAATTTGCTCTGAATCTTGTCCAATATTACATCACTGTTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71AU4.**

ATGTTGTTACTGGATCCATTATCGTTCTTTATTTCCCTTCTTCTTTATTGTGCTACTGGTCAGATGGTTATTCTCAACTCCACCTACTACGCACAAAAACA  
TTGCCACCTAGCCCGCCAGGTTGCCAGTCTAGGAAACATGCACCAATTAGGTATCTACCCTTACAGAAGCCTGTTATGCCTTGCTAGATGTTATGGGCCG  
TTAATGCTTCTACAGTTGGGAGAGTAAGAACACTAGTTGTTTCGTCTCCAGATGCAGCTCAAGAGATTATGAAAACCTCATGATCTAATCTTTGCCAATAGA  
CCTAAGATGCTTTGGGAAACGTCTATTATACGATTACAAGATGTCTCAGTCGCACCATACGGTGAATATTGGAGACAAATGAGATCAATCTGTGTTCTT  
CACCTACTTTCCAACAAACGTGTGCAATCATTTAATACTGTTAGGAGGGAAGAAATAAGTCTTCTTATCCAAAAGATTGAAGAATTCTTCTTATTGTCTACTT  
CTATGGACCTTAGTGGCATGTTTATGAGGCTTACCAATGATGTAATATGACGGTGGCTTTCCGGCAGAAAATATTCCGGTATGAAAGGGGCAAGAAATTT  
AGAAGATTGTTAGGTGAATTTGTTGAGCTTTTAGGCGGATTCAATGTTGGTGATTATATCCCATGGCTAGCATGGGTGCAATATGTCAATGGTTGGAGTGC  
GAAAGTTGAACGTGTGGCTAAAGATTTGATGAATTTCTGGATGGAGTTGTAGAGGAGCATTATAGACGGTGGTACCGGCTCAATAGCAAAAGGTGATAAT  
GAAAAGGACTTCGTTGACGTTCTACTAGAGATCCAAAGGATGTTACCTGGGATTTAGTATGGATAGAGATTCTATCAAAGCTTTAATTTTAGATATATTC  
GCTGGAGGTAAGTACACAACCTTATACTGTGTTAGAATGGGCGATGACGGAATTTGTCGTCATCCTAAGGCCATGAAGGAATTACAGAATGAGGTAAGAG  
GTATAACCAGAGGTAAGAACATATAACAGAGGATGACTTAGAAAAGATGCACATTTTAAAGGAGTCAATTAAGAAACATTGAGACTGCATCCACCTATT  
CCATTGTTGGTACCCAGGGAATCTCCAGGATGTAACATTATGGGGTACCATATCCAGCTGGCACAATGGTGATTATAAATGCATGGGCCATGGGTAG  
GGATCCAATGTCGTGGGACGAGCTGAGGAATTTCTCCAGAAAAGATTTTAAACACGAACATTGATTTTAAAGGGTATGACTTTGAATGATTCCGTTTG  
GTGACGGTAGACGTGGATGTCGGGGATTAGCTTTGCAATGCCACCAACGAATTTGGTATTGGCTAATTTGGTTAAACAAGTTCGATTGGGCTGTCAGAG  
GGAGCCAGAGCCGAAGACTTGGACATGACAGAATGCACGGGATTAACAATTCATAGAAAATTTCTTTGCTGGCTGTTTCCACTCCTGTTTCTAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71BE5.**

ATGGAATTACAATTTTCGTTCTTTCCATTTTATGTACTTTCTTGCTTTTTATTACCTACTAAAACGTTTAGGTAAGCCCTCTAGAACAATCATCCGCCCTT  
AAATTACCTCCGGGCCATGGAACTACCGATCATTGGAAACATGCATCAACTGTTGGATCTTACCACATAGATCTTAAAGTCTTTGGCCAAGAAGCAC  
GGTCTTTAATGCATTTGCAATTGGGGGAAGTGCAGCAATTGTGTTTCTAGCAGAGAAATGGCAAAAGAAGTTATGAAAACGCATGACATTATATTTTC  
TCAAAGGCCATGCATTCTTGCAGCCTCAATTGTTTCTTATGACTGCACTGACATAGCATTGCCCCATATGGTGGTTATTGGCGTCAAATCAGAAAAATTAG  
CGTTTTAGAACTTTTGTGCGCAAAAAGAGTCAAAGCTTCAGATCCGTTAGAGAAGAGGAAGTATTGAATTTAGTGCAGTGTGAGTCTACAGGAAGGT  
GTTTTAATCAACTTAACAAAATCCATTTTCTCATTGACTTTTTCAATTATATCCAGGACGGCATTGGTAAGAAATGCAAGGACCAAGAAGCCTTCTCGGTTA  
CTCTGGATAAGTTTCCGATAGTGTGTTGTTTCAACAATTGCTGATGTATTCCCAAGTATCAAGCTTTTGCACGTTGTTCCGGTATGAGGAGGAAGCTTG  
AAAAAGTTCACAAAAGTTAGATCGTATTTTGGGAAATATCATCAACGAACATAAAGCAAGGTCTGCTGCGAAAGAAACATGTGAAGCTGAAGTAGATGA  
TGATTTGGTAGATGTTGTTAAAAAGTCCAGAAACAGGGCGATCTAGAGTTCCCTTTGACAATGGATAACATTAAGGCTGTGTTGTTGGATCTTTTGTGTC  
TGGTACAGAGACTTCTTACAGCAGTTGAGTGGGCTATGGCAGAGATGTTGAAAAACCCAGTGTGATGGCTAAAGCCCAAGCTGAGGTGAGGGACATA  
TTTTCAAGAAAAGCAATGCGGATGAAACCGTAGTCAGAGAGTTGAAATTCCTTAAGTTAGTCATAAAAGAAACCTGAGATTGCATCCACCAGTACCTCT  
GTTGATCCCAAGAGAAAGTAGAGAAAGATGTGCAATCAATGGGTATGAAATCCAGTTAAGACTCGTGTGATTATCAATGCTTGGGCTATAGCCAGAGATC  
CAAAGTACTGGACCGATGCAGAGTCAATCAATCCCGAAAGTTTTAGATTCCAGCATTGACTACCAAGGCACCAATTTGAATACATTCCTTTTGGTGTG  
GTAGAAGAATGTGCTGGAATACTGTTGGAATGGCAAACGTAGAGTAGCTTTAGTCAATTAAGTGTACCCTTTGACTGGAAGCTACCGAATGGAGCG  
AGGCATGAAGAATTAGACATGACTGAGGGCTTTCGTACGTCAACTAAAAGAAAGCAGGATCTATATCTGATACCTATAACCTATAGACCTTTGCCAGTCGA  
ATAA

**Séquence nucléotidique codant pour CYP71BC1.**

ATGACGATGAAGATAAGTAAAAATATGTTGTTATTGTTCTCTCAAAGTTCAGCTAATCAATGGTTATTGGCATTGGGTATCTTGAGCTTTCCAATTCTTTATC  
TATTTCTGCTGCAAAGTGGAAAAAGAAGGGAATTGAAGGTGCTCAAGGTTGCCACCGTCTCTCCAAAATTGCCCATCATCGGTAATTTACACCAACTG  
GGTAAATTGCTCATAGATCTCTTCCAAATATCTCAAGAATTTGGTCCCGTCTATTGCTACAACCTGGTCTGATCCCAACATTGTTAATTTCTCCGCTGA  
TATGGCAAAGAAGTTTTAAAGACTCATGACATTGATTGTTGTTCTAGAGACCCAGCCAGGGCCCCAAAAGATTGTCGTACAATTTCTTAGATATGTGCTT  
TTCACCTTATTCTGATTATTGGCGTCCATGAGAAAAGTATTTGATTAGAACTTTTGTCTGCTAAAAGGGCGCATTCTTTGTCGATGCATGGGAAGTTGA  
AGTGAGTCATTAATAAGTTCGCTGTGAGAAGCTAGTCTAATCCTGTGGACTTACATGAAAAGATTTTTCACTAATGGATGGTATCCTTAATATGTTGCGA  
TTCGGAAGAATTATGGAGGTAACAGTTTAAAGAACGAGAAATTTAGGATGTACTAGTGGAGGCAATGAAAATGTTAGATTCAATTTAGCGCTGAAGACT  
TTTTCCCATCTGTTGGCTGGATTATAGATGCATTAACCGTCTCTGTCGAAGACATAACAAATGTTTTAGAAACCTTGATAATTACTTCCAGATGGTAGTCGA  
TGAACATCTAGATCCAAGTCCAAACCTGAACACGAGGACTTAGTTGATGTCCTATTGGGTTTATCAAAGATGAGAATTTGCTTTCCATTTAACTAA  
CGATCATATTAAGCTATTCTATTGAACACATTTATTGGAGGGACCGATACTGGTGCAGTCAATGGTTTGGCGATGTCCGAGTTAATGGCTAATCCTAG  
AGTCATGAAGAAAGTCAAGCCGAAGTGAGATCCTGCGTCGGATCAAAGCCAAAGTTGATAGGGATGACCTGGCCAAGCTGAAATACTTAAAGATGGT  
TGTAAGGAAACCTTTAGAATGCACCTGCGGCCCATTTATTGATACCACACAGAACTAGACAGCACTGCCAAATTAATGTAACGGGTGACTTATGATAT  
CTTCCCTCAAACATACTTAGTTAACGCTTTTGTATCGGTAGAGACCCGAACTTTGGAAAAATCCAGATGAATTTACCCAGAGCGTTTTGAGACAG  
CGACATTGACTTCAAAGGTCAACACTTTGAGCTATTACCCTTCGGCGCGGGAAGGCGTATATGTCGGCCATAGCCATGGCCGTTTCGACGGTCAATTTA  
CCTTGGCTAACTTGTGATTGCTTCGATTGGGAGATGCCTATGGGCATGAAAACACAAGACATGGACATGGAAGAAATGGGTGGGATAACTACACATAG  
AAAGACGCCGCTTGTCTGGTACCAATTAAGTACGGCTGTGTTGAATAA

## II. Amorces utilisées pour le clonage USER, le séquençage et la RT-qPCR

### Clonage User

	Amorce sens F1	Amorce antisens R1
CYP71A13	GGCTTAUATGTCATATTC AAGAGATGGAGA	GGTTTAAU TTAGACCACGGAGCTAGGAAA
CYP71A18	GGCTTAUATGGAATGACCCTGATGGTT	GGTTTAAU TTATGCTACAGAGGATGGGAAA
CYP71D1	GGCTTAUATGGATTTGAATATCTAACCTTTA	GGTTTAAU TTAGAAATGATGGGTCATATAATGAGG
CYP71D4	GGCTTAUATGCAATTC TTGTCTTAGCTTCAA	GGTTTAAU TTATTGCCTAGGAGGCTCATAAGGAGT
CYP71D14	GGCTTAUATGGAATCCAATTGCTTCTCT	GGTTTAAU TTACGAGTCATATGGTGTGGCTA
CYP71D48v1	GGCTTAUATGGAATACAGTTCAAGTAATCTAGTG	GGTTTAAU TTAAATAGCTGCTGATGGGGTG
CYP71D51v2	GGCTTAUATGGAAC TAGATTTGAAGAATATC	GGTTTAAU TTATTTCTGAGGAGGTTGGTAAGGA
CYP71D98	GGCTTAUATGGAGCTGCCTTCACTTTTC	GGTTTAAU TTAGGAGACTTCGGTTACGGATTCAT
CYP71D177	GGCTTAUATGGAATAGACTTGTGTGG	GGTTTAAU TTACAATAGATTC TTGTCATCTTTA
CYP71D326	GGCTTAUATGAGTTTATCCTTTCTTACTGTCTC	GGTTTAAU TTAAATGGTGTGGAATTGCGAT
CYP71AS4v2	GGCTTAUATGGAAC TAGATTCCACCAAGTAT	GGTTTAAU TTAAACAGTGATGTAATATTGGAACAAG
CYP71AU4	GGCTTAUATGTTGTACTGGATCCATTATCGT	GGTTTAAU TTAGAAACAGGAGTGGAAACAGC
CYP71BE5	GGCTTAUATGGAATACAATTTCTGCTTTT	GGTTTAAU TTATTCTGACTGGCAAGGCTCAT
CYP71BC1	GGCTTAUATGACGATGAAGATAAGTGAAAAAT	GGTTTAAU TTATTCACACAGCCGTACTTA
CYP706A1	GGCTTAUATGGAACCGGCTCTTCTAATTTCTCT	GGTTTAAU TTAAAGCTGTATAGAGTTTGGATCGGAC
CYP706A2	GGCTTAUATGGGAACAGCGTCTGCTAA	GGTTTAAU TTAAAGCTGTGTAGAGTTTGGATCGG
CYP706A7	GGCTTAUATGACGGATATTCACCTTCTTTA	GGTTTAAU TTATAAGAATAGATTGGATCGGACA

### Séquençage

	Amorce sens vecteur pYeDP60	Amorce antisens vecteur pYeDP60	Amorce sens F2
CYP71A13	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AGAAAAGGCATCGTCCCTCAA
CYP71A18	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AAGCTCCGCCGAAAATCTAT
CYP71D1	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	ATTAAGAATCCGTTGGCAAAAT
CYP71D4	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	CAGTTAATTTACAGAAAGATTG
CYP71D14	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AACATTCCTGGAAATTTGACTG
CYP71D48v1	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AAATCTCCAGTTAATCTAACCGAC
CYP71D51v2	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AAGTATTAAGACTAATCAATTTTAT
CYP71D98	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	TGATTCAGTCTAATTAAGCTTTCCA
CYP71D177	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AATTTACTGAGACAATTTTAGCTT
CYP71D326	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AAACCTTTCAATTTTAGTAGGAAT
CYP71AS4v2	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	ATTCTATTGCTCAATCCTCTTC
CYP71AU4	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AATTCCTTCATTGTCTACTCTATG
CYP71BE5	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	AAGGTGTTTAAATCAACTTAACAAA
CYP71BC1	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	ATTTAATAAGTTCGCTGTCCAGAA
CYP706A1	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	CCATTGGAGGAGACTTCGTAA
CYP706A2	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	CCATTGTCACATGTCGG
CYP706A7	CCTTATACATTAGTCCCTTTG	CGGATAAGAAAGCAACACCTG	TGCCTGTTGCAGGATCATT

### RT-qPCR

	Amorce sens F1	Amorce antisens R1	Amorce sens F2	Amorce antisens R2
CYP71A12	TGTGGTGTGGTCCCTATG	TTGTTCTGAGCAGATTGAGA	GTGCATCCTCCTTCCACT	ATGGCCC AAGCATTGATTAT
CYP71A13	GATGTTGTGTTTGCTCCCTATG	TTGTTGGT GAGCAGATTGAGA	TTCCGGTTGCATCCTTCTT	GTCCCCATATCGCAGTGTCT
CYP71A18	TGACTGGAGTGTGATCCTG	TTCTGCGACAACATCGAG		
SAND	GGATTTTCAGCTACTTCAAGCTA	CTGCCTTGACTAAGTTGACACG		
TIP41	GAACTGGCTGACAATGGAGTG	ATCAACTCTCAGCCAAAATCG		
PP2A	GACCGGAGCCAAC TAGGAC	AAAAC TTGTAAC TTTTCCAGCA		
EXP	GAGCTGAAGTGGCTTCCATGA	GGTCCGACATACCCATGATCC		

Les extensions USER sont en rouge.



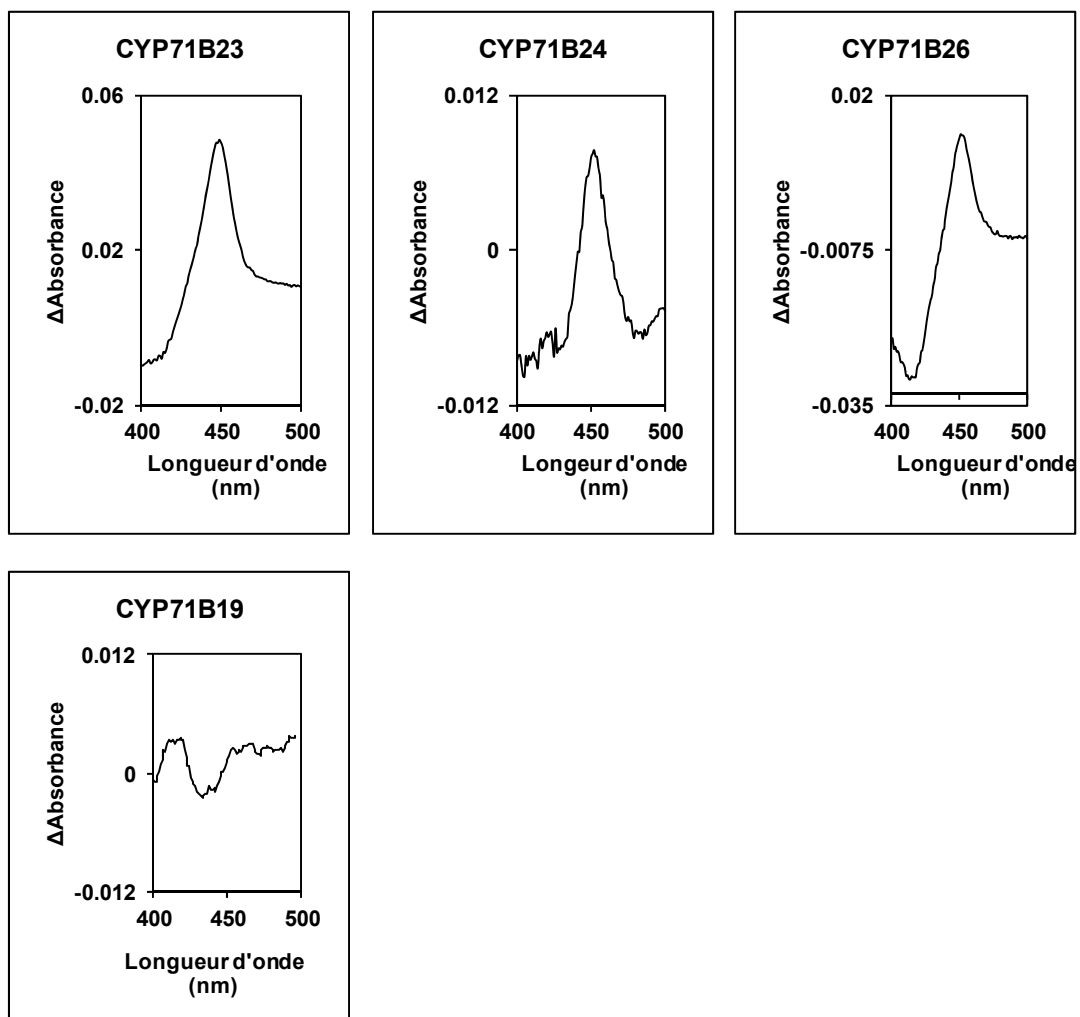
## III. Brevets revendiquant un P450 homologue aux P450s candidats

<b>brevet</b>	US 2005/0019882 A1	US 2010/0218283 A1	WO 2006/079020 A2	US 7,700,834 B2 US 7,812,227 B2 US 8,058,504 B2 US 8,188,337 B2
<b>P450 revendiqué</b>	P450 d'Asteracées C2 hydroxylase	CYP71AV1	CYP71D55	CYP71D51v2
<b>domaine d'application</b>	arômes et parfums	production d'isoprénoïdes modifiés	production d'un terpène oxydé	amélioration du phénotype de plants de tabac
<b>réaction revendiquée</b>	(+)-valencène en nootkatone	(+)-valencène en terpène hydroxylé (trop large)	(+)-valencène en $\beta$ -nootkatol puis en nootkatone par une <i>Hyoscyamus m.</i> prémnaspirodiène synthase	inhibe l'expression d'une nicotine déméthylase entre autre
<b>% d'identité protéique revendiqué</b>	-	au moins 45 (trop élevé : protège tous les CYP71s de plantes)	qui diffère de 1 à 20 acides aminés avec des substitutions conservatives	100
<b>% d'identité avec la séquence protéique CYP71D51v2</b>	49	51	20 acides aminés avec des substitutions conservatives	100
<b>ce qui nous différencie du brevet</b>	la famille de plante d'où provient le P450: CYP71D51v2 provient de <i>Nicotiana tabacum</i> appartenant à la famille des solanacées. La réaction revendiquée	-	la réaction revendiquée: CYP71D51v2 convertit le (+)-valencène qu'en $\beta$ -nootkatol. CYP71D51v2 est une hydroxylase et n'a pas d'activité de synthase. L'identité protéique: 28 acides aminés avec des substitutions non conservatives	le domaine d'application: aucune revendication pour une application dans le domaine du parfum et des arômes
<b>ce qui est similaire ou très proche du brevet</b>	la réaction revendiquée. Le domaine d'application	la réaction revendiquée. Le pourcentage d'identité protéique	le nombre d'acides aminés ayant des substitutions conservatives	la séquence de l'enzyme

CYP71D51v2 est protégé par un brevet dans un domaine d'application différent de celui des arômes et du parfum. Il n'appartient pas à la famille des Astéracées. CYP71D51v2 pourra donc être utilisé comme hydroxylase du valencène pour produire d'importante quantité de  $\beta$ -nootkatol.

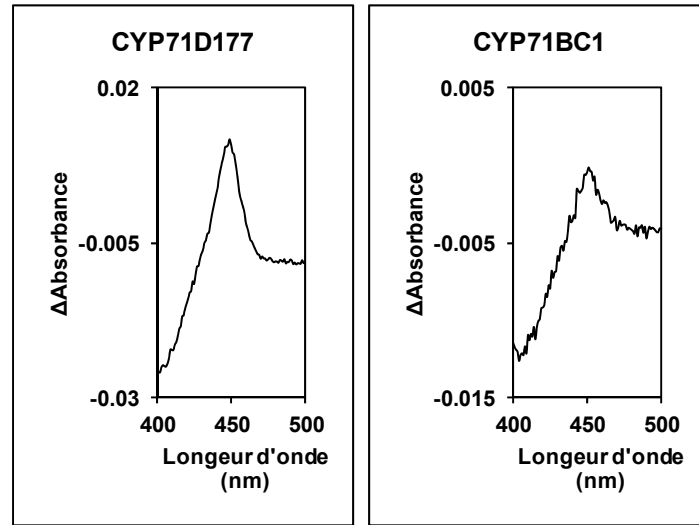
#### IV. Spectres différentiels au monoxyde de carbone des microsomes de levures exprimant les P450s candidats

**Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP71s candidats issus d'*Arabidopsis thaliana* pour lesquels une différence d'absorbance à 450 nm est observée**



Se référer au chapitre 5 (page 189) pour les spectres différentiels au CO des microsomes de levures exprimant CYP71A12, CYP71A13, CYP71A14, CYP71A15, CYP71A16, CYP71A18, CYP71A19, CYP71A20 et ThhCYP71A27.

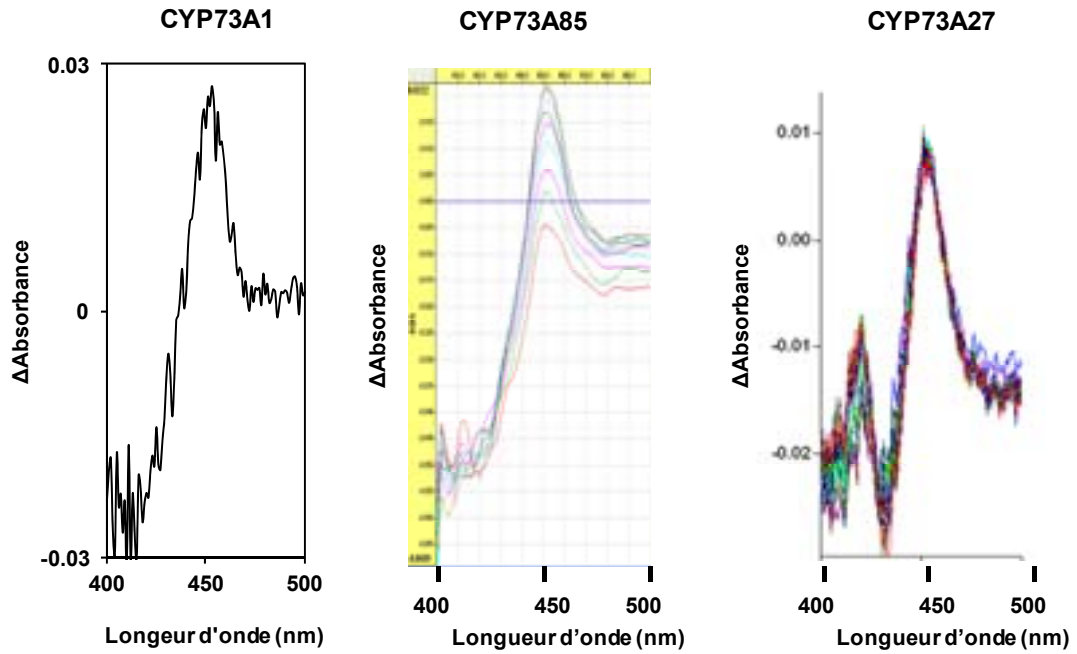
Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP71s candidats non issus d'*Arabidopsis thaliana* pour lesquels une différence d'absorbance à 450 nm est observée.



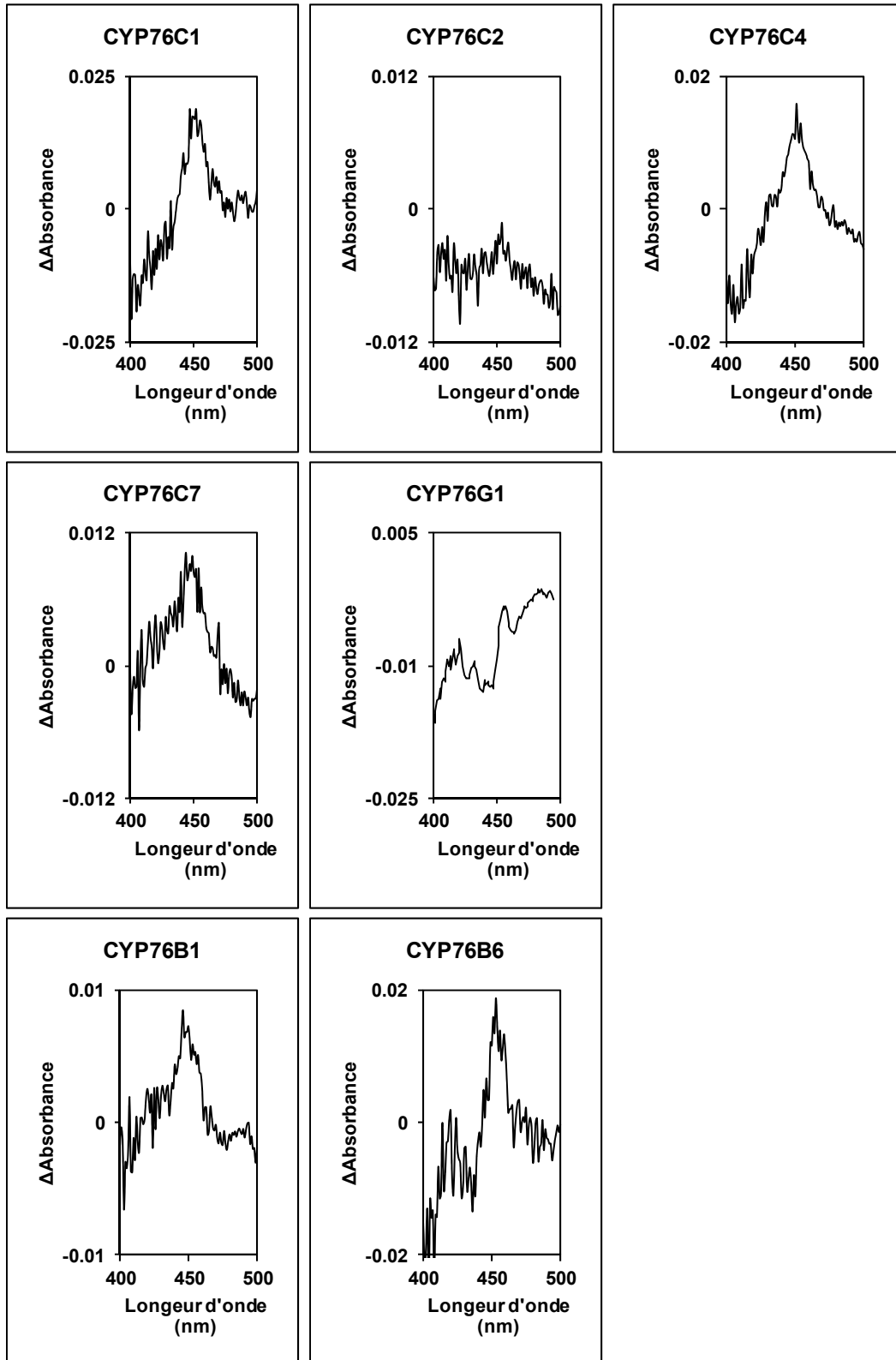
Se référer au Chapitre 4:II (page 110) pour les spectres différentiels au CO des microsomes de levures exprimant CYP71D4 et CYP71D51v2.

**Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP73s candidats.**

Les microsomes de levures exprimant CYP73A85 et CYP73A27 et les spectres différentiels au CO ont été réalisés par Jean-Etienne Bassard (2010).



Spectres différentiels (réduit + CO / réduit) obtenus avec les microsomes de levures exprimant les CYP76s candidats pour lesquels une différence d'absorbance à 450 nm est observée.



V. Résultats du criblage enzymatique *in vitro*

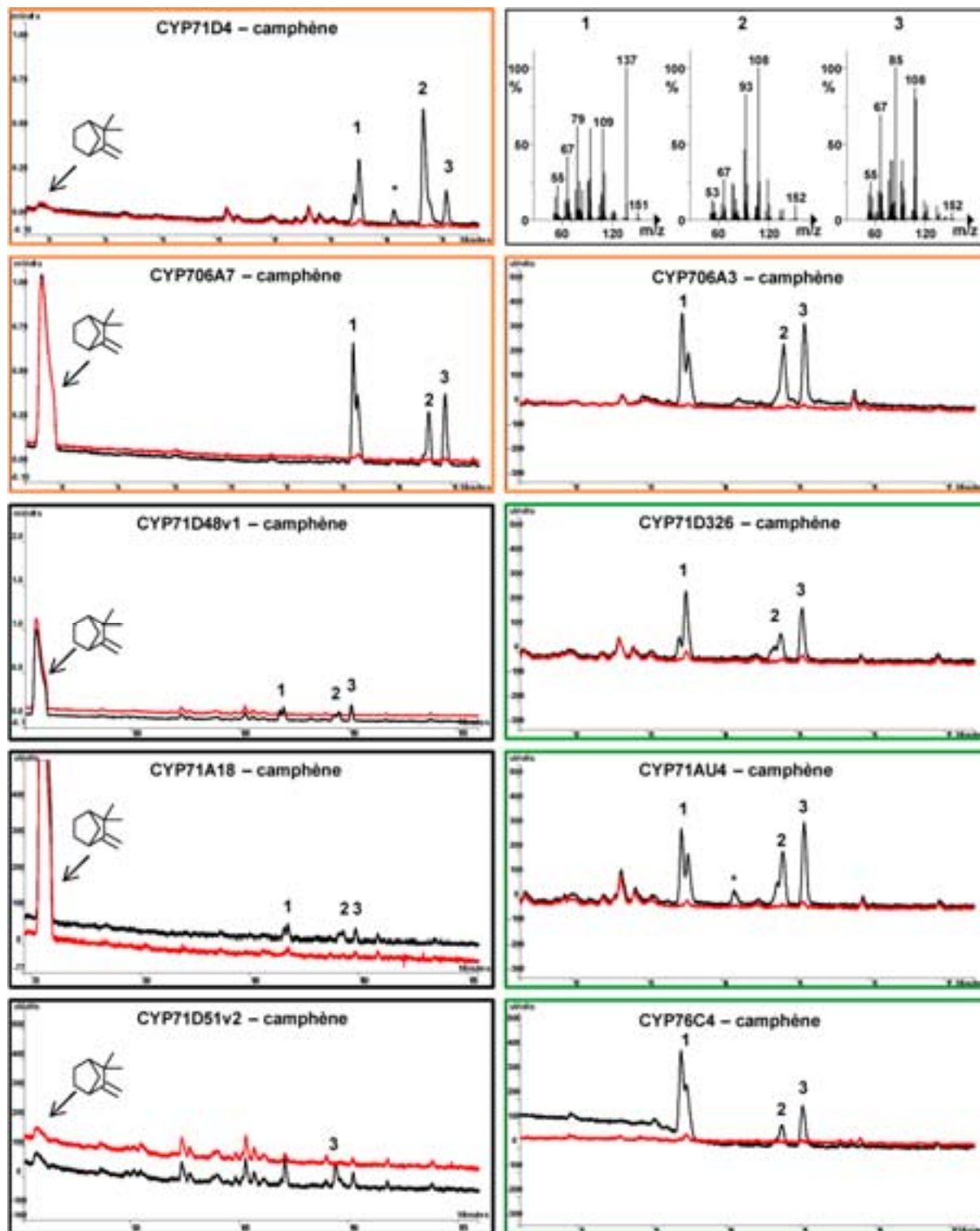
Les tableaux ci-dessous servent de sommaire.

P450s	Monoterpénoïdes				
	camphène	<i>p</i> -cymène	lavandulol	limonène	$\alpha$ -phéllandrène
CYP71A12	-	✓page 247		✓	✓page 252
CYP71A13	-	✓page 247		✓page250	-
CYP71A14		✓page 247		✓	
CYP71A15		-		-	
CYP71A16		-		-	
CYP71A18	✓page 246	✓page 247		✓page250	✓page 252
CYP71B31	-	✓page 247		-	-
P450s	Monoterpénoïdes				
	camphène	<i>p</i> -cymène	lavandulol	limonène	$\alpha$ -phéllandrène
CYP71D1	-	-		✓page 250	-
CYP71D4	✓page 246	-		-	-
CYP71D14	-	-		✓page 250	-
CYP71D48v1	✓page 246	-		-	-
CYP71D51v2	✓page 246	-		✓page 250	-
CYP71D98	-	-		-	-
CYP71D177	-	✓page 247		✓page 250	✓page 252
CYP71D326	✓page 246	✓page 247		✓page 250	✓page 252
CYP71AS4v2	-	✓page 248		✓page 250	-
CYP71AU4	✓page 246	-		✓page 250	✓page 252
CYP71BE5	-	-		-	-
CYP71BC1	-	✓page 248		✓page 250	-
P450s	Monoterpénoïdes				
	camphène	<i>p</i> -cymène	lavandulol	limonène	$\alpha$ -phéllandrène
CYP76C1	-	-	✓page 249	-	-
CYP76C2			✓page 249		
CYP76C3	-	-	-	-	-
CYP76C4	✓page 246	✓page 248	✓page 249	✓page 251	-
CYP76C5	-	-	-	-	-
CYP76C6	-	-	-	-	-
CYP76C7	-	-	-	-	-
CYP76G1	-	-	-	-	-
CYP76B1	-	✓page 248	✓page 249	✓page 251	✓page 252
CYP76B6	-	✓page 247	✓page 249	✓page 251	✓page 252
P450s	Monoterpénoïdes				
	camphène	<i>p</i> -cymène	lavandulol	limonène	$\alpha$ -phéllandrène
CYP706A1	-	-		-	-
CYP706A2	-	-		-	-
CYP706A3	✓page 246	✓page 248		✓page 251	-
CYP706A7	✓page 246	✓page 248		✓page 251	-

P450s	Sesquiterpénoïdes						
	$\beta$ -caryophyllène	$\alpha$ -cédrene	$\beta$ -farnésène	$\alpha$ -humulène	isolongifolène	nootka-tène	valencène
CYP71A24	-	-	-	-	-		✓ page259
CYP71D1	✓ page253	✓ page254	-	-	✓ page257	✓	✓
CYP71D4	✓ page253	✓ page254	-	✓ page256	✓ page257	✓	✓
CYP71D14	-	-	-	-	-	✓ page258	-
CYP71D48v1	-	-	-	-	-	-	-
CYP71D51v2	-	✓ page254	-	-	✓ page257	✓	✓
CYP71D98	-	-	-	-	-	-	-
CYP71D177	✓ page253	✓ page254	✓	✓ page256	✓ page257	✓	✓ page259
CYP71D326	✓ page253	✓ page254	✓ page255	✓ page256	✓ page257	✓	✓
CYP71AS4v2	-	-	-	-	-	-	-
CYP71AU4	✓ page253	✓ page254	-	-	✓ page257	-	✓ page259
CYP71BE5	-	-	-	✓ page256	-	-	-
CYP71BC1	-	-	-	-	-	-	-
CYP706A1	-	-	-	-	-		-
CYP706A2	-	-	-	-	-		-
CYP706A3	✓ page253	✓ page254	-	✓ page256	✓ page257		✓ page259
CYP706A7	✓ page253	✓ page254	-	✓ page256	✓ page257	✓	✓ page259
P450s	Phénylpropanoïdes						
	aldéhyde anisique	framboi-sone					
CYP73A1	✓ page260	-					
CYP76C4	✓ page260	✓					
CYP76B1	✓ page260	-					
CYP76B6	✓ page260	✓					

### Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec le camphène

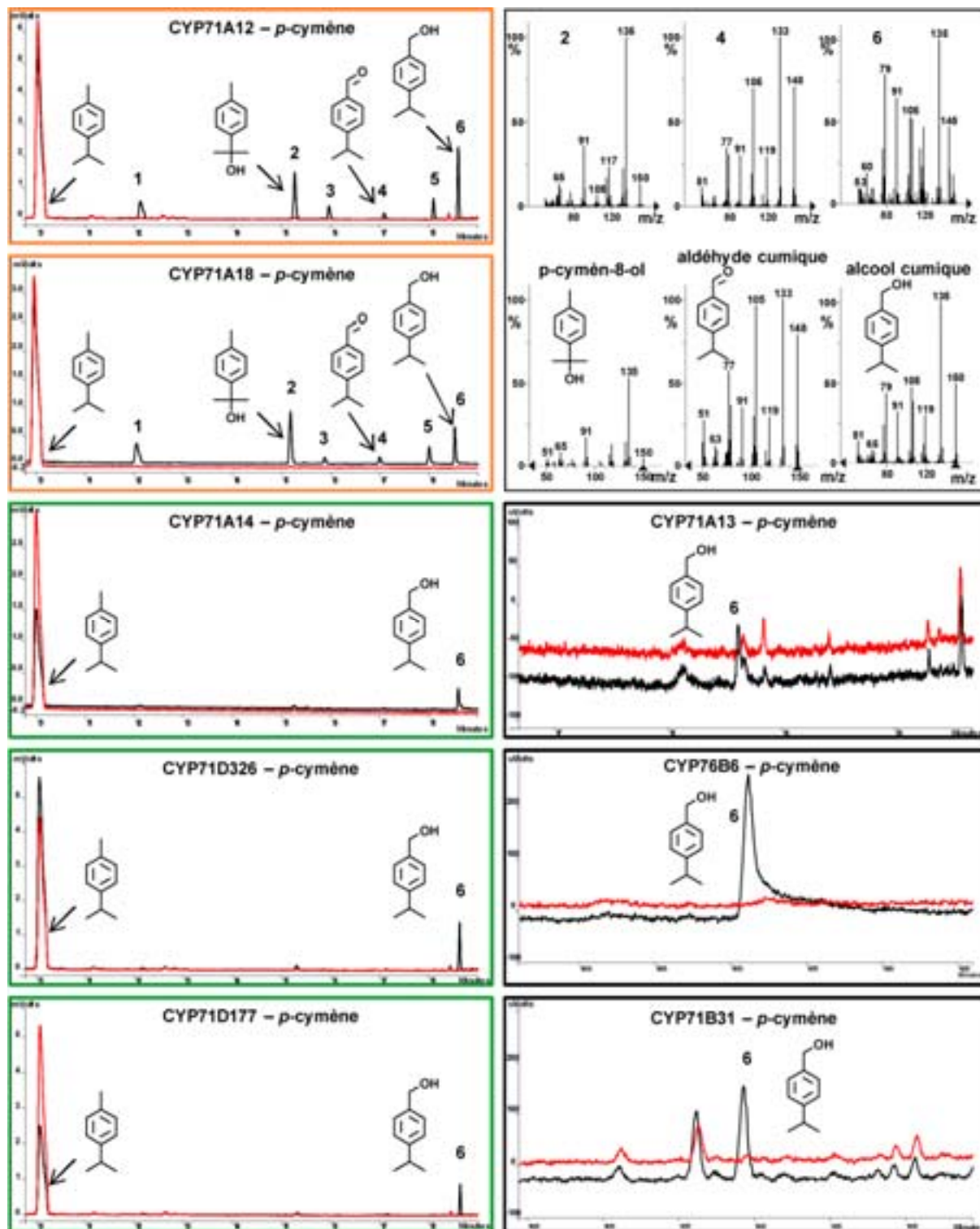
Les analyses CPG encadrées en orange montrent les activités enzymatiques qui ont une conversion estimée entre 30 et 45 %, celles en vert sont inférieures à 30 %, et celles en noir sont à l'état de traces. Un zoom sur les produits a été effectué pour les traces d'activités de la colonne de droite en gardant une échelle verticale commune. Le substrat camphène n'a pas toujours été correctement détecté. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1, 2 et 3 : produits récurrents analysés par SM et non identifiés ; \* : produits minoritaires non identifiés.

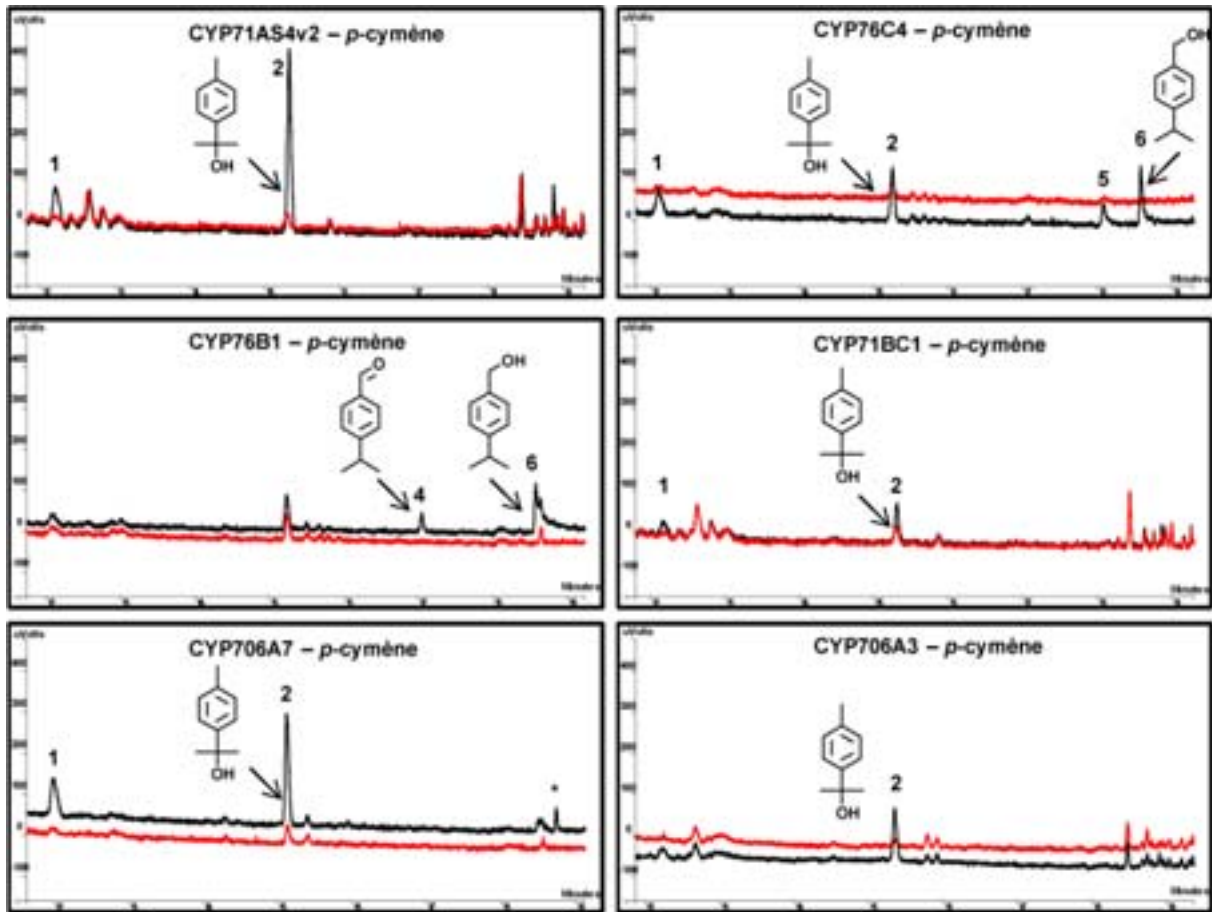




**Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec le *p*-cymène**

Les analyses CPG encadrées en orange montrent les activités enzymatiques qui ont une conversion entre 30 et 45 %, celles en vert sont inférieures à 30 %, et celles en noir sont à l'état de traces. Un zoom sur les produits a été effectué pour les traces d'activités encadrées en noir. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1, 3 et 5 : produits récurrents identifiés par comparaison des SM avec ceux de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) ; 2, 4 et 6 : produits récurrents non identifiés dont les SM n'ont pas pu être obtenus.

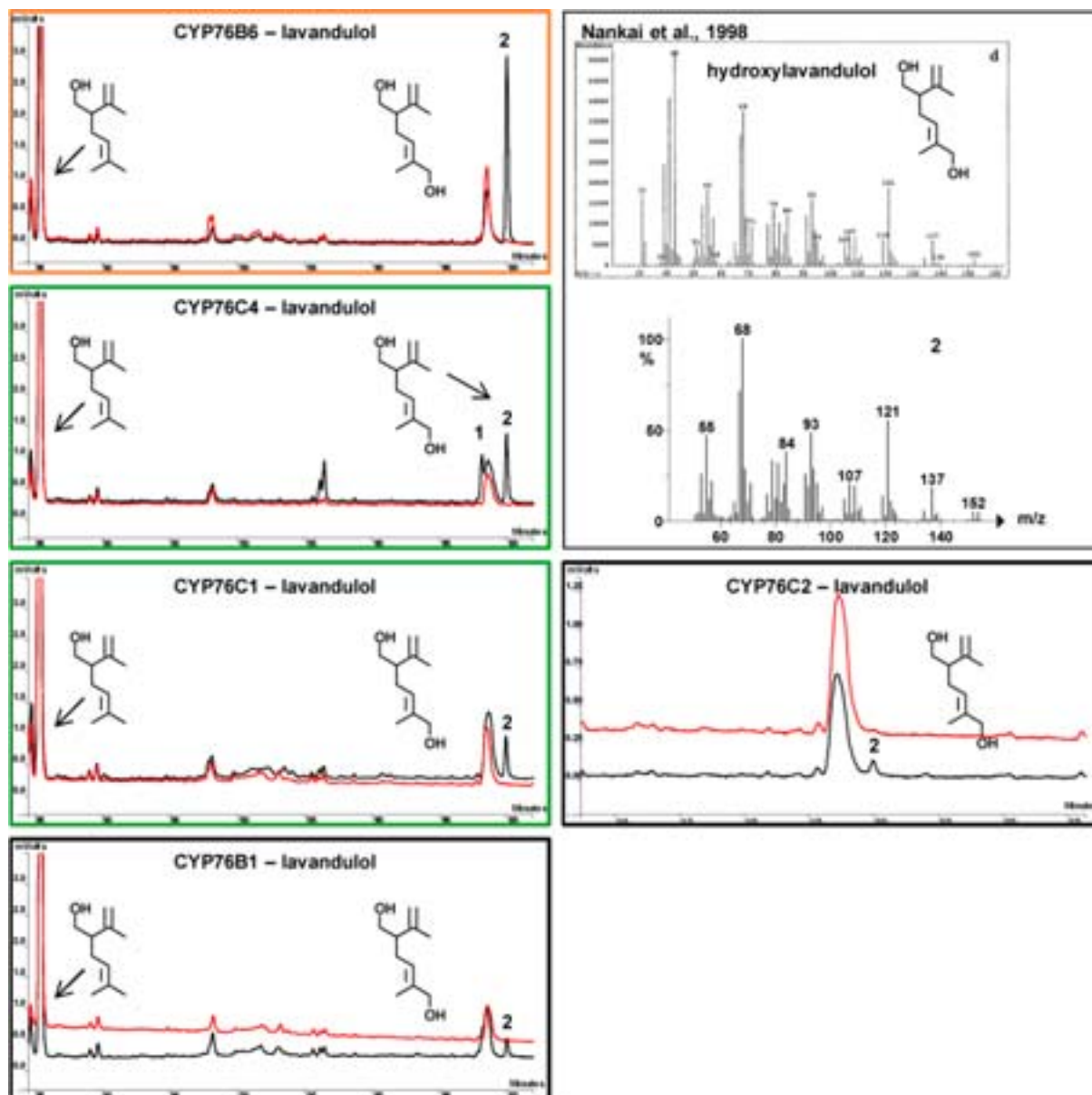




*retour au sommaire ci-dessus*

### Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec le lavandulol

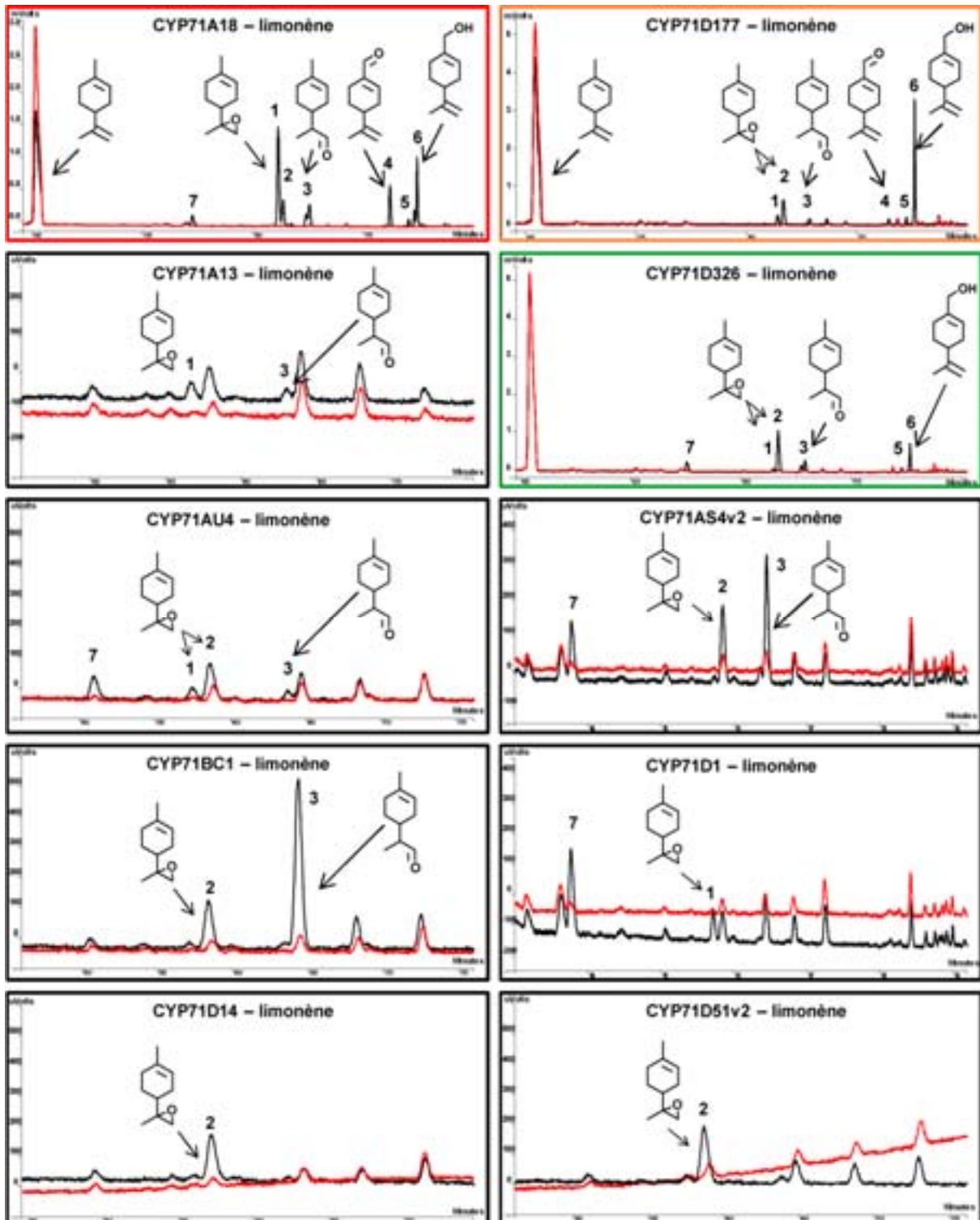
L'analyse CPG encadrée en orange montre l'activité enzymatique qui a une conversion estimée à 30 %, en vert celles inférieures à 30 %, en noir celles à l'état de traces. Un zoom sur le produit a été effectué pour l'analyse CPG de la colonne de droite. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1 : produit non identifié coéluant avec une molécule polluante ; 2 : hydroxylavandulol identifié par comparaison du SM avec celui de Nankai et al. (1998).

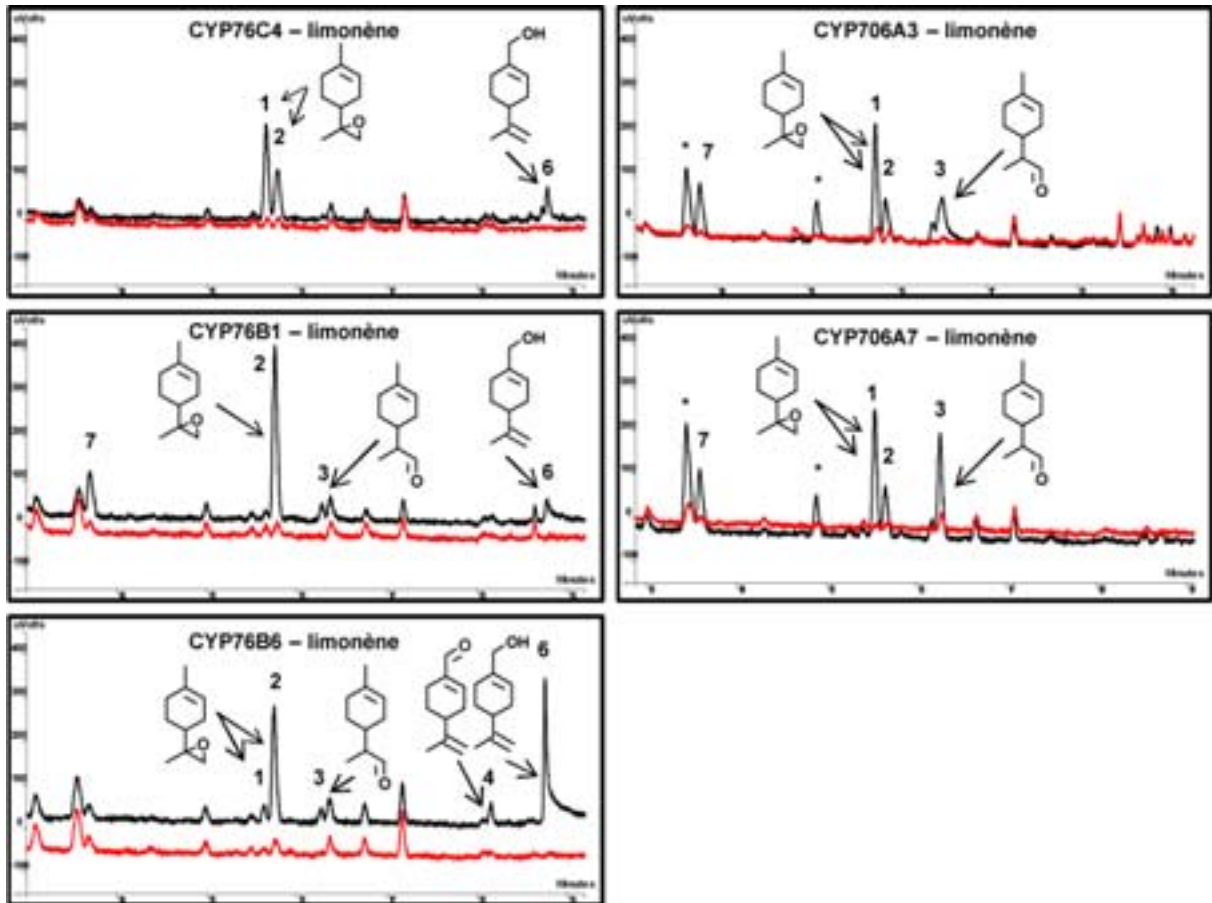


*retour au sommaire ci-dessus*

### Analyses CPG des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec le limonène qui n'ont pas été sélectionnées

Les activités de CYP71A18 et CYP71A13 sont montrées par comparaison. L'analyse CPG encadrée en rouge montre l'activité enzymatique qui a une conversion de 52 %, en orange celle à 26 %, en vert celle à 18 %, et en noir celles à l'état de traces. Un zoom sur les produits a été effectué pour les traces d'activités encadrées en noir. Se reporter au chapitre 5 (Figure 28, page 180) pour l'identification des produits. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1 et 2 : stéréoisomères de limonène-8,9-époxyde ; 3 : *p*-menth-1-èn-9-al ; 4 : aldéhyde de périllyle ; 6 : alcool de périllyle ; 5, 7 et \* : produits récurrents non identifiés dont les SM n'ont pas pu être obtenus.

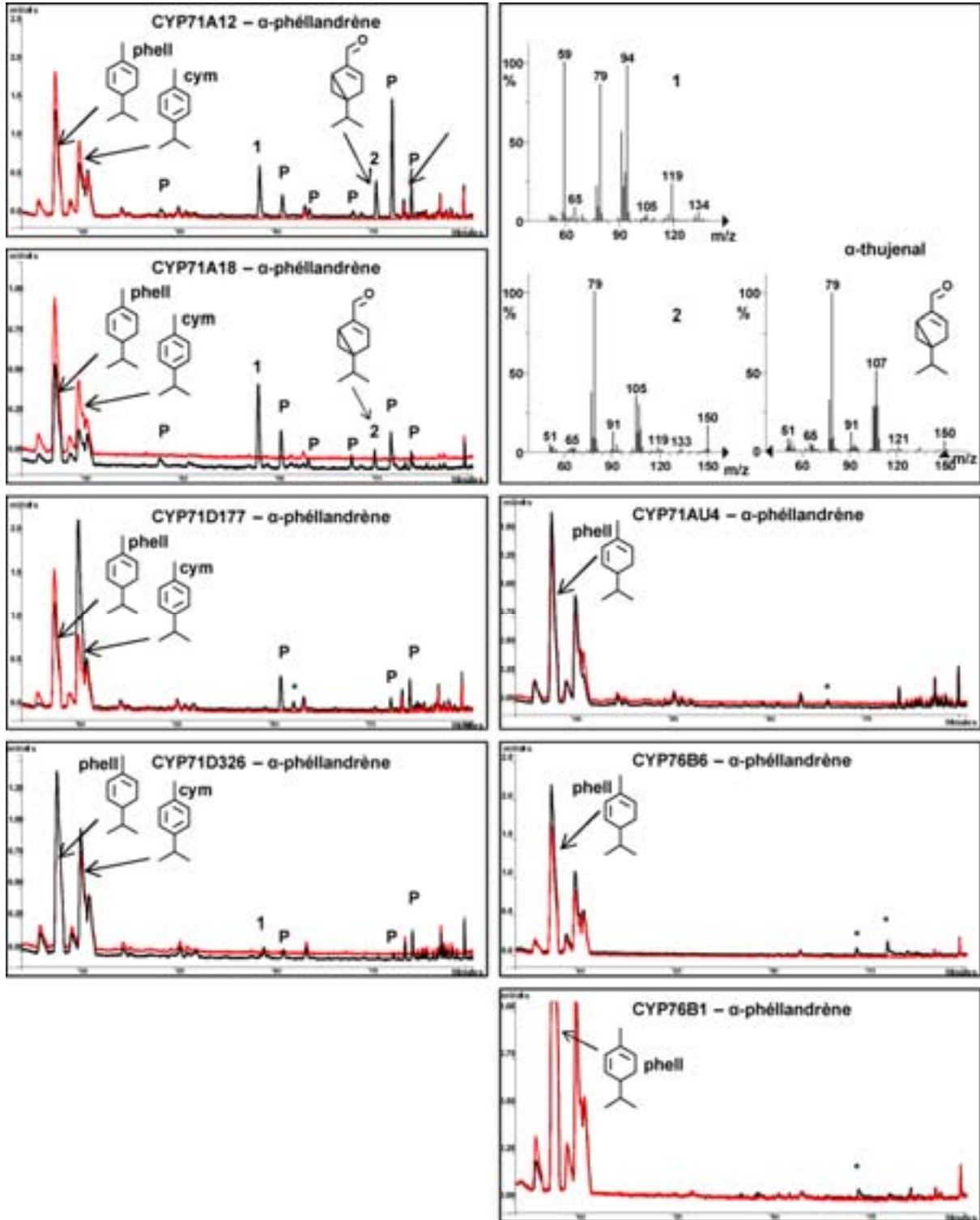




*retour au sommaire ci-dessus*

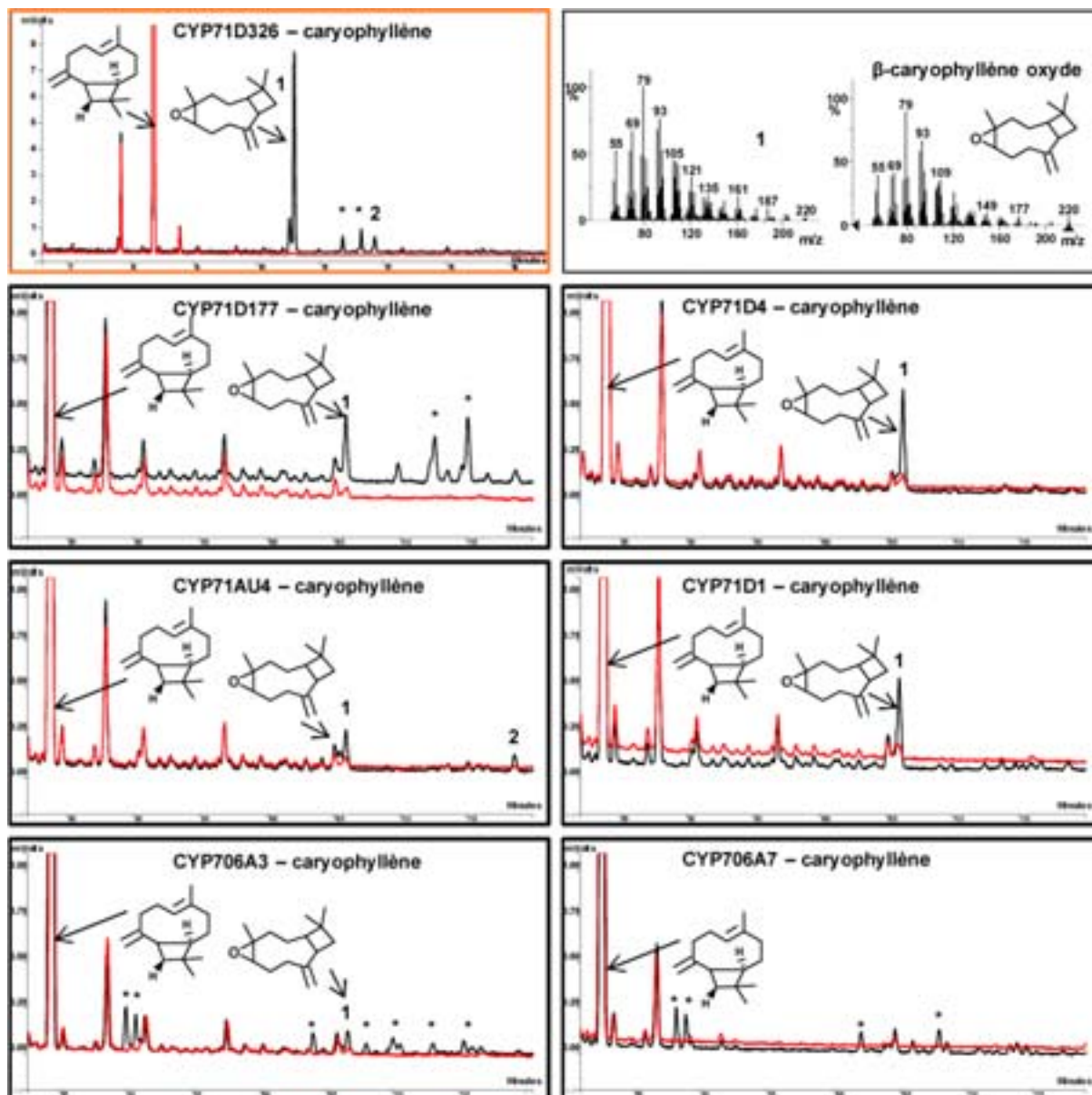
**Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec l' $\alpha$ -phéllandrène**

Les activités enzymatiques détectées sont à l'état de trace. L'extrait végétal contenant l' $\alpha$ -phéllandrène (phell) à une pureté de 60 % et contient également du cymène (cym) et du thujène (non montré). CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; P : produits communs aux produits obtenus après incubation avec le *p*-cymène ; 1 : produit non identifié analysé en SM ; 2 :  $\alpha$ -thujénal identifié par comparaison du SM obtenu avec celui de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) ; \* : produit non identifié dont le SM n'a pas pu être obtenu.



### Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec le $\beta$ -caryophyllène

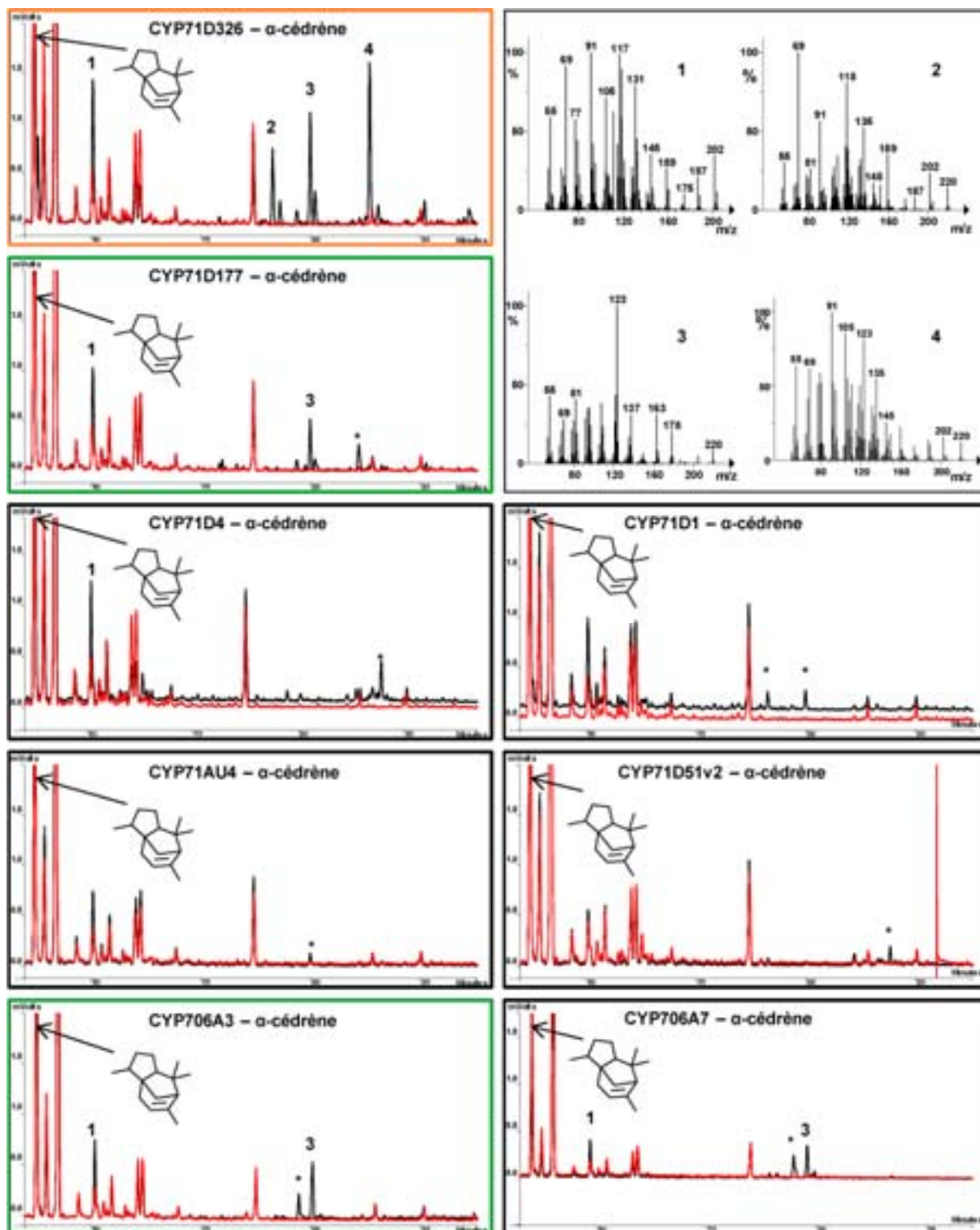
L'analyse CPG encadrée en orange montre l'activité enzymatique qui a une conversion de 23 %, et celles en noir sont à l'état de traces. Un zoom a été effectué pour les traces d'activités encadrées en noir en gardant une échelle verticale commune. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1 :  $\beta$ -caryophyllène oxyde identifié par comparaison du SM obtenu avec celui de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) ; 2 : produit non identifié dont le SM n'a pas pu être obtenu ; \* : produits non identifiés dont les SM n'ont pas pu être obtenus.



*retour au sommaire ci-dessus*

**Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec le  $\alpha$ -cédrène**

L'analyse CPG encadrée en orange montre l'activité enzymatique qui a une conversion de 23 %, celles en vert qui ont une conversion inférieures à 30 % et celles en noir sont à l'état de traces. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1, 2, 3 et 4 : produits non identifiés analysés par SM ; \* : produits minoritaires non identifiés dont les SM n'ont pas pu être obtenus.

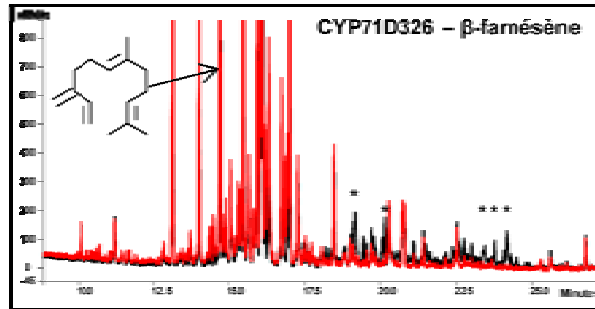


*retour au sommaire ci-dessus*



**Analyses CPG de l'activité enzymatique *in vitro* de CYP71D326 avec le  $\beta$ -farnésène**

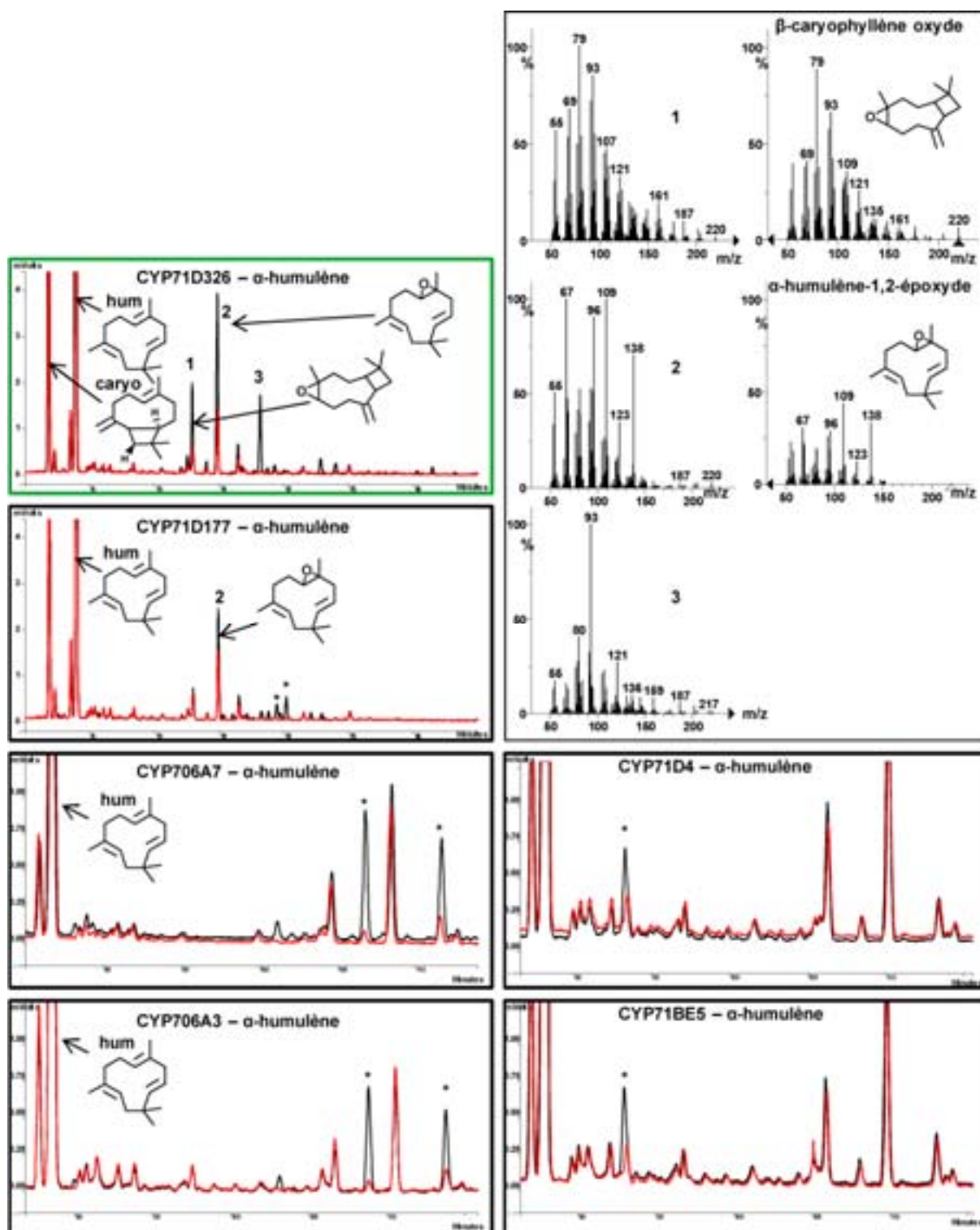
Chromatogramme CPG-DIF de l'essai enzymatique avec NADPH en noir et sans NADPH en rouge. L'extrait végétal testé en tant que substrat est un mélange de molécules contenant 8 % de  $\beta$ -farnésène. Les produits obtenus sont à l'état de traces et sont marqués d'une étoile.



*retour au sommaire ci-dessus*

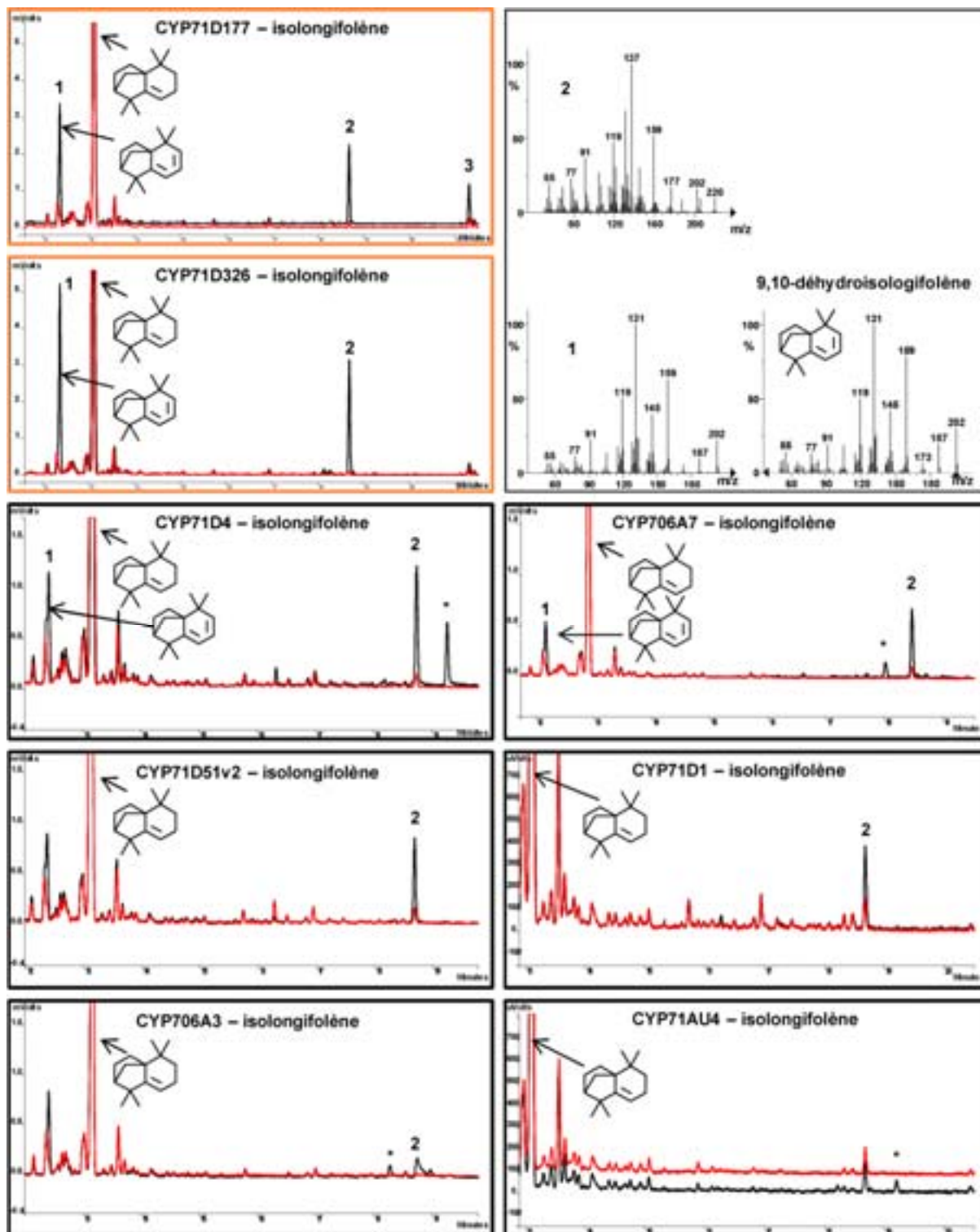
**Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec le  $\alpha$ -humulène**

L'analyse CPG encadrée en vert montre une activité enzymatique faible et celles encadrées en noir sont à l'état de traces. Ces dernières ont une échelle verticale identique, exceptée dans le cas de CYP71D177. L'extrait végétal contenant l' $\alpha$ -humulène (hum) à une pureté de 67 % et contient également du  $\beta$ -caryophyllène (caryo). CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1 et 2 :  $\beta$ -caryophyllène oxyde et  $\alpha$ -humulène-1,2-époxyde, respectivement, identifiés par comparaison des SM obtenus avec ceux de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) ; 3 : produit non identifié analysé par SM ; \* : produits minoritaires non identifiés dont les SM n'ont pas pu être obtenus.



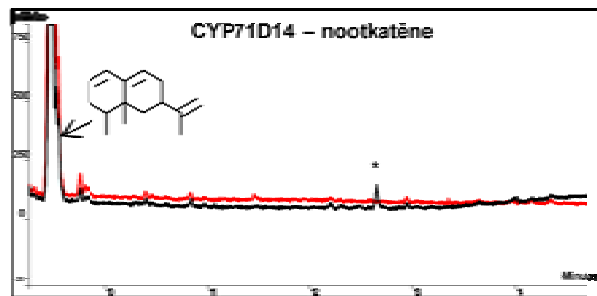
### Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec l'isolongifolène

Les analyses CPG encadrées en orange représentent les activités enzymatiques avec une conversion entre 30 et 45 %, et celles encadrées en noir sont à l'état de traces. Ces dernières ont une échelle verticale plus petite, avec une échelle encore plus petite pour CYP71D1 et CYP71AU4. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1 : 9,10-déhydroisolongifolène identifié par comparaison du SM obtenu avec celui de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011) ; 2 : produit récurrent analysé par SM et non identifié ; 3 et \* : produits non identifiés dont les SM n'ont pas pu être obtenus.



**Analyse CPG de l'activité enzymatique *in vitro* de CYP71D14 avec la nootkatène**

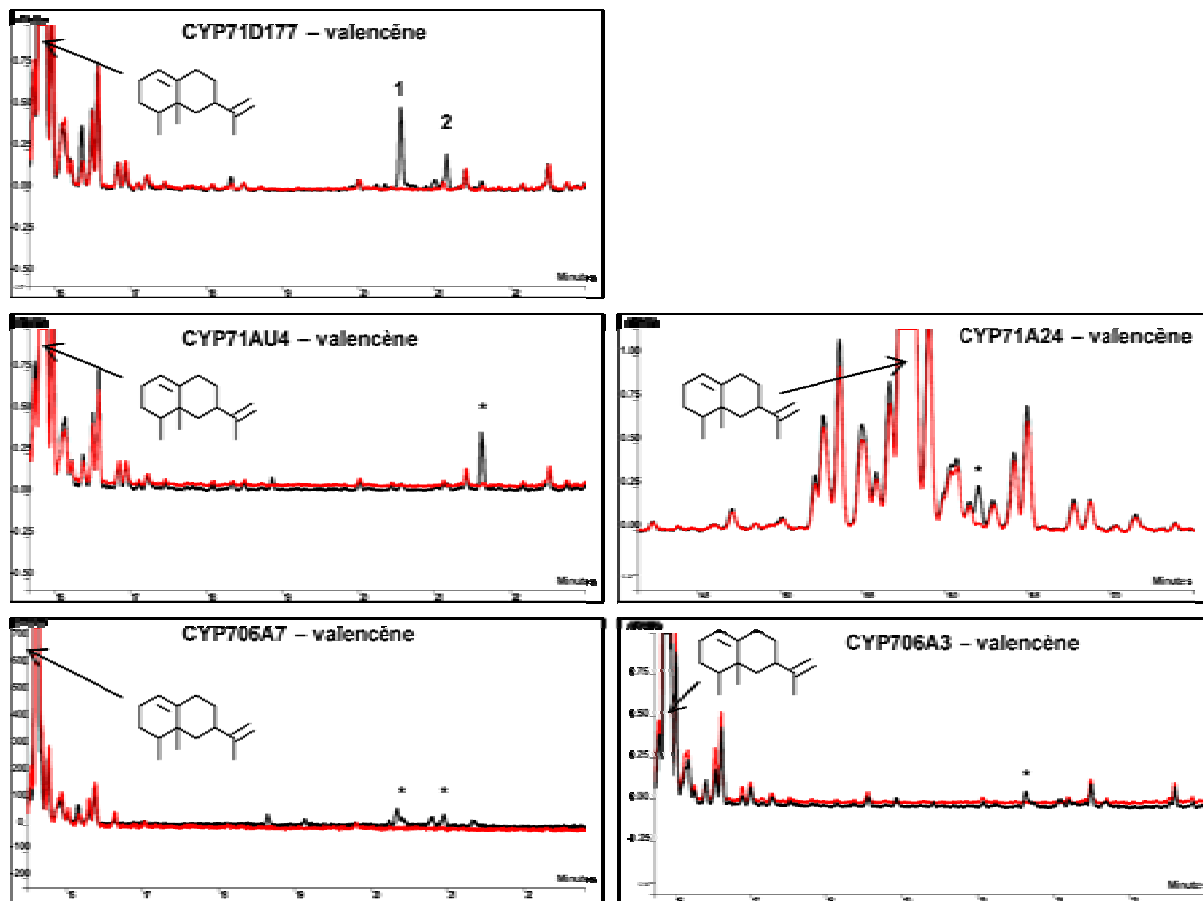
Chromatogramme CPG de l'essai enzymatique avec NADPH en noir et sans NADPH en rouge. Le produit obtenu à l'état de trace est marqué d'une étoile.



*retour au sommaire ci-dessus*

**Analyses CPG des plus faibles activités enzymatiques *in vitro* de P450s candidats avec le valencène**

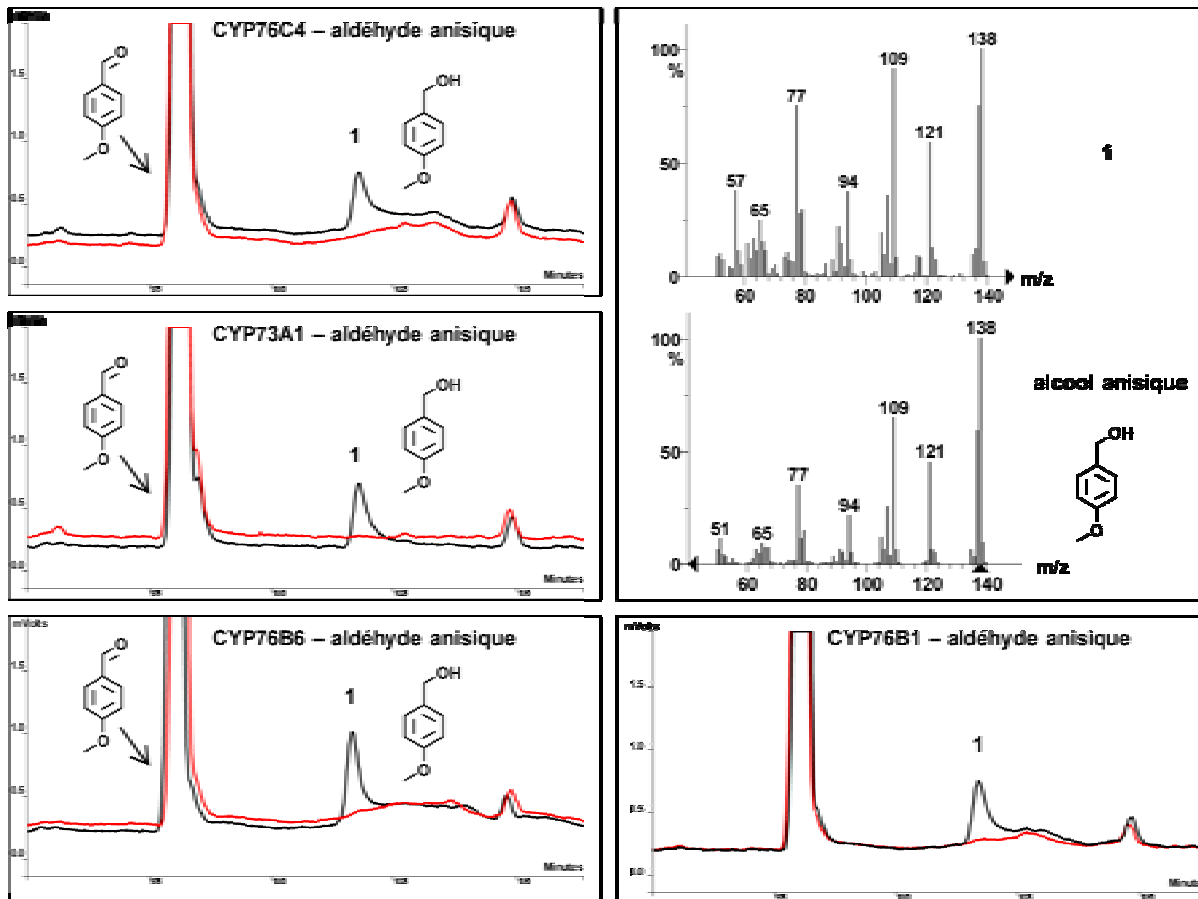
Les activités enzymatiques détectées sont à l'état de trace. Se reporter au chapitre 4 (page 110) pour l'identification des produits. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1 et 2 : stéréoisomères de nootkatol ; \* : produits non identifiés.



*retour au sommaire ci-dessus*

### Analyses CPG-SM des activités enzymatiques *in vitro* des P450s candidats avec l'aldéhyde anisique

Les activités enzymatiques détectées sont à l'état de trace. CPG noir : essais avec NADPH ; CPG rouge : essais sans NADPH ; 1 : alcool anisique identifié par comparaison du SM obtenu avec celui de la base de données NIST MS Search v2.0 (Linstrom and Mallard, 2011).

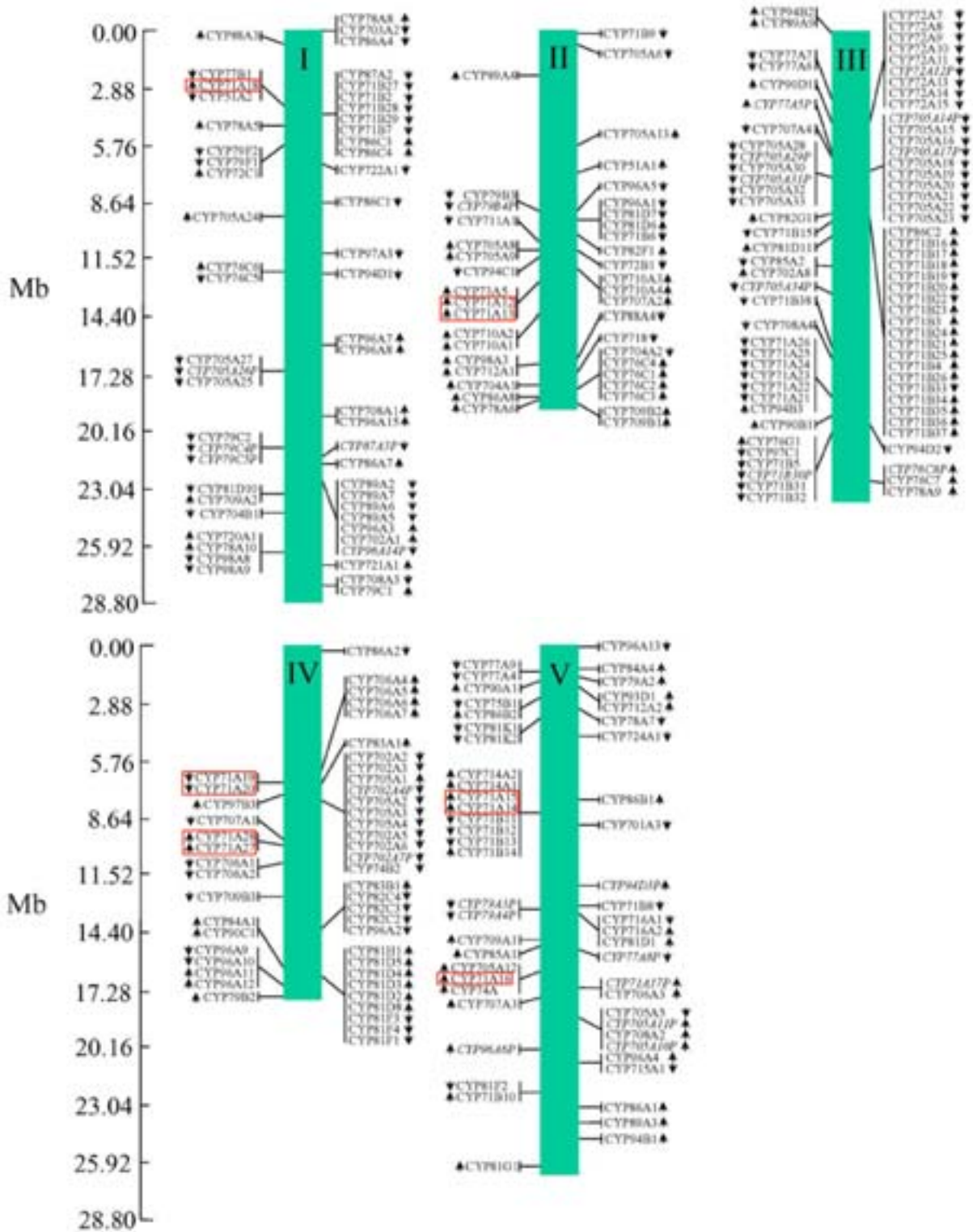


*retour au sommaire ci-dessus*

VI. Annexes du chapitre 5

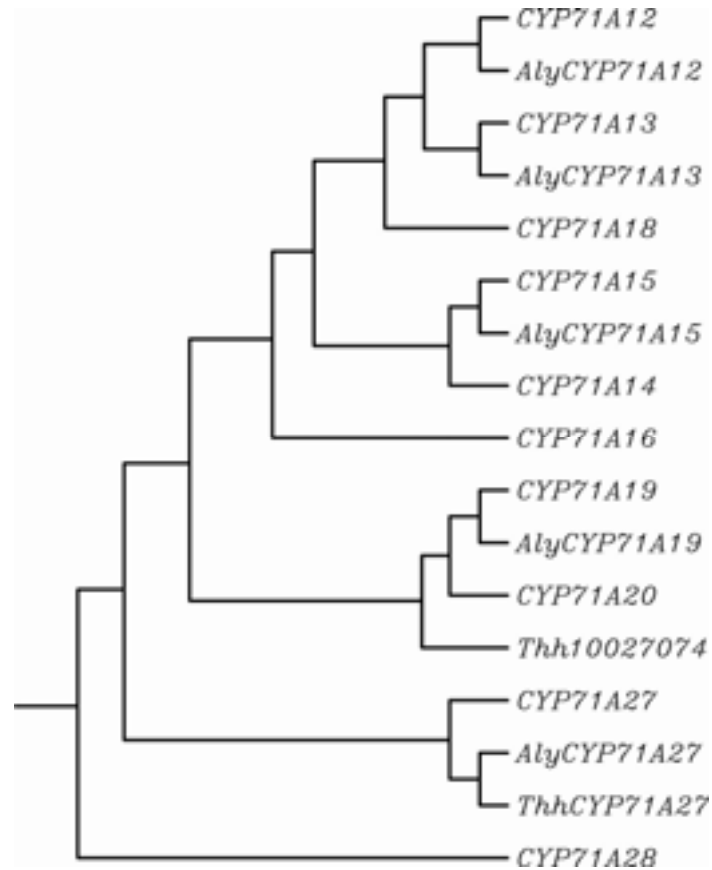
Schéma de la localisation chromosomique des *P450s* d'*Arabidopsis thaliana* d'après Bak et al. (2011)

Les P450s de la clade *CYP71A* étudiée sont encadrés en rouge.



**Cladogramme de CYP71As appartenant à la même clade que CYP71A12 chez *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* et *Thellungiella halophila***

Ce cladogramme a été réalisé par Nicolas Navrot par alignement Clustal W (version 1.83) des séquences protéiques d'*A. thaliana* (nommés sans préfixe), d'*A. lyrata* (nommés avec le préfixe Aly) et de *T. halophila* (nommés avec le préfixe Thh). La référence *Thh10027074* provient de la base de données Phytozome ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)).





## Analyse et correction de la séquence protéique AlyCYP71A27

La séquence protéique d'AlyCYP71A27 (Query) a été alignée avec celle de CYP71A15 d'*A.thaliana* (Sbjct) sur Phytozome (www.phytozome.net). Les séquences surlignées en bleues ont été rajoutés par David Nelson d'après l'analyse des séquences surlignées en jaunes. La séquence surlignée en vert correspond au motif PERF. Après cette analyse et correction de séquence protéique, ce P450 a été nommé CYP71A48P par David Nelson.

```

Query: 4   ILLISLCITTFALMFIKRSKRRTTTKLNPPPPSPWRLPVIGNLHQLSLHPHRSLHLSLSLR 63
          I++ISLC+ T LA + +K   RT  K N PPSPWR+PVIGNLHQLSLHPHRSL SLS R
Sbjct: 3   IIIISLCLATILAFLLKPLLNRVAKDNLPPSPWRVPVIGNLHQLSLHPHRSLRSLSHR 62

Query: 64  YGPLMLLHFGRVPTLVVLSADMAHDVMKTNDLKFADRPKRKAVSMFLNGGRDVAFSPFS- 122
          YGPLMLLHFGRVP LVV S+D+AHD+MKT+DLK A+RP+ K +   LNGGR+V FSP+
Sbjct: 63  YGPLMLLHFGRVPILVVSSSDVAHDLMKTHDLKVANRPRLKVIETILNGGREVVVFSYGD 122

Query: 123 PG-- IQSICVMHLLSKKMVRSFEKVVREEEINVMMEKVEKAASSSSPLNL SGLLSS 177
          +CV+HLL+KKMV+SF KVVREEE +VMMEKVEKA+S SSPLNL +++T
Sbjct: 123 YWRQIKTVCVVHLLNKKMVQSFQVREEEERSVMMEKVEKASSDSSPLNL SKLLIT 177

Query: 178 LTSDLCRIALGRKYSSD IHIMLI KEIVRKTMELSGSFPLGEYIPI LAWIDKICGVDDKV 224
          V + K VRK EL G FP+ EYIP LAWID+I G+ ++
Sbjct: 178 LTSDVASRVSFQKKSNEASMSDF KNQVRKITELVGGFPVSEYIPLAWIDQIRGLYNRA 237

Query: 225 EEVSNKIDSFLEKAVQEHVEDHADKERSDFVDILVSIQRDKTMGFEE GNSEIKNLII DVF 274
          EEVS ++K VQEH+ D +K DFVDIL+S +R G E D+F
Sbjct: 238 EEVSKIFGDLMDKVVQEHL-DATNKPTKDFVDILLSFERQSKDGI EVRRSDIKFIILDIF 296

Query: 275 LGGTATTFTLLEWTMTELMRHPECMKKLKDDIYSASTTTEKLYVSEEEVEKMKYLKAVIK 334
          LGGT TT +LLEWTMTEL+RHPECMKKL+D+I T +Y S EEVE MKYLKAVIK
Sbjct: 297 LGGTTTNSLLEWTMTELIRHPECMKKLQDEI -RGDATNLTIYRSHEEVEDMKYLKAVIK 355

Query: 335 EVLRLHPPVP- IILRGLCEDVKLKGYDIAOQTL VIINAWAIQRDTETWGADAEFRPERH 366
          E LRLHPP P ++LR L +DVKLGKGYDIA GT
Sbjct: 356 EGLRLHPPFP LLVLRLLTQDVKLGKGYDIAAGTQ VITNAWAIQRDIVTWGIDAEFRPERH 415

Query: 367 *DALVEFEGQDFMYIPFGSGRRRCPGIRFGLTMAEVTLANLVKQFDWR TKVKPLGAE PDL 413
          F G +F YIPFGSGRR CPGI F + + EVTLANLV +F+WR + DL
Sbjct: 416 LDSPLDFRGNTNFYIPFGSGRRICPGIGFAMALVEVTLANLVNRFNWRMDARLSGDEYDL 475

Query: 414 AEATGVDVCRKFPLVVFPSYA 434
          AEATG+DVCRKFPL+VFPS A
Sbjct: 476 AEATGIDVCRKFPLIVFPSNA 496

```









Carole GAVIRA

## **Production de terpènes fonctionnalisés par les cytochromes P450 de plantes recombinants**

Notre objectif était d'identifier des cytochromes P450 capables d'oxygéner des mono- et sesquiterpènes, pour produire des molécules aux propriétés organoleptiques intéressantes labellisés « naturelles » par l'industrie des arômes et du parfum.

Nous avons identifié 7 couples P450-substrat catalysant une conversion *in vitro* supérieure  $\geq 45\%$  et/ou formant un produit attendu. Les quantités de produit obtenu par bioconversion dans la levure restent insuffisantes pour un procédé industriel. Les facteurs limitants ont été identifiés dans le cas du valencène comme : 1) la toxicité induite par les produits, 2) l'accumulation du  $\beta$ -nootkatol dans les membranes, 3) l'inhibition de l'enzyme par les produits réactionnels.

Trois cytochromes P450 d'*Arabidopsis thaliana* impliqués dans le métabolisme indolique oxydent activement le limonène. Ils s'expriment dans les inflorescences et constituent le premier exemple de P450s susceptibles de participer à deux voies métaboliques indépendantes chez les plantes.

Mots clés : cytochrome P450, terpènes, bioconversion, arômes, parfums

Our aim was to identify cytochromes P450 catalyzing hydroxylation of mono- and sesquiterpenes to produce functionalized “natural” compounds with interesting organoleptic properties for the flavor and fragrance industry.

We identified 7 P450-substrate pairs showing  $\geq 45\%$  *in vitro* conversion and/or forming an expected product. The amounts of products resulting from yeast bioconversion were however too low for implementation of an industrial process. Factors limiting the nootkatone production from the P450-dependent bioconversion of valencene were identified : 1) toxicity for yeast of the  $\beta$ -nootkatol and nootkatone products, 2)  $\beta$ -nootkatol accumulation in endomembranes, 3) products inhibition of valencene hydroxylation.

Three previously characterized P450s from *Arabidopsis thaliana* in indolic metabolism were shown to actively oxidize limonene. They are expressed in inflorescences and may provide the first demonstrated case of multifunctional P450s involved in independent plant pathways.

Key words : cytochrome P450, terpenes, bioconversion, scent, aroma