



HAL
open science

**Expression de l'hydroperoxyde lyase recombinante
d'olive chez la bactérie Escherichia coli et chez la levure
Pichia pastoris Etude des relations structure-fonction de
l'enzyme**

Sophie Vincenti

► **To cite this version:**

Sophie Vincenti. Expression de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive chez la bactérie Escherichia coli et chez la levure Pichia pastoris Etude des relations structure-fonction de l'enzyme. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pascal Paoli, 2016. Français. NNT : 2016CORT0010 . tel-03369238

HAL Id: tel-03369238

<https://theses.hal.science/tel-03369238>

Submitted on 7 Oct 2021

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

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



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UMR CNRS 6134 SPE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES



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

Mention : Biochimie et Biologie moléculaire

Soutenue publiquement par

Sophie VINCENTI

Le 09 Décembre 2016

**Expression de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive
chez la bactérie *Escherichia coli* et chez la levure *Pichia pastoris*
Etude des relations structure-fonction de l'enzyme**

Directeurs :

Mme Liliane BERTI, Pr, Université de Corse

Mme Virginie BRUNINI, MC, Université de Corse

Rapporteurs :

Mme Magali REMAUD-SIMEON, PR, INSA de Toulouse

Mme Yolande PERRIN, PR, Université de Compiègne

Jury :

Mme Magali REMAUD-SIMEON, PR, INSA de Toulouse

Mme Yolande PERRIN, PR, Université de Compiègne

Mme Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU, MC-HDR, Université de La Rochelle

M. Félix TOMI, PR, Université de Corse

Mme Liliane BERTI, PR, Université de Corse

Mme Virginie BRUNINI, MC, Université de Corse

Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal de l'UMR-CNRS 6134 SPE de l'Université de Corse. Je remercie la Collectivité Territoriale de Corse pour avoir accepté de financer ma thèse, ainsi que l'Ecole Doctorale 377.

Mes remerciements s'adressent en tout premier lieu au Professeur Liliane Berti, directrice du laboratoire, qui m'a accueillie au sein de son équipe et m'a permis de réaliser ce travail de thèse sous sa direction. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir toujours fait confiance et soutenue durant mes années universitaires, et particulièrement depuis mon stage de Master. Je la remercie pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements, ainsi que pour avoir pris le temps de corriger ce manuscrit, ainsi que l'article. Je la remercie enfin de m'avoir permis d'effectuer un service de monitorat au cours de ses trois années. J'ai particulièrement apprécié les enseignements qui m'ont été confiés.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Virginie Brunini, ma co-directrice de thèse, pour son soutien, son investissement dans ces travaux, sa disponibilité permanente, sa gentillesse et sa bienveillance. Je lui suis extrêmement reconnaissante de m'avoir guidée, d'avoir été à l'écoute, d'avoir su trouver les mots justes pour me remonter le moral et m'encourager. Je la remercie pour tous les précieux conseils qu'elle m'a apportés tout au long de ces trois années, tant au niveau du travail de recherche que lors de la préparation des enseignements. Je la remercie également pour tout le temps qu'elle a consacré à la correction de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Jacques Maury, pour son implication et son appui scientifique. Sa présence et sa disponibilité à chaque fois que j'en ai eu besoin, ainsi que nos nombreuses conversations, m'ont été d'une grande aide tout au long de cette thèse. Son regard avisé, son expérience et ses conseils ont été essentiels pour mener à bien et approfondir ce travail. Je tiens également à le remercier pour avoir pris le temps de corriger mon travail, aussi bien durant la rédaction de l'article que lors de l'écriture du manuscrit. Je lui suis également reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner en Licence BBM.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de pilotage de thèse, le Professeur Magali Remaud-Siméon, le Docteur Stéphanie Bordenave-Juchereau et le Professeur Félix Tomi, pour avoir accepté de me guider dans ce travail, pour leur implication, leurs encouragements, et leur bienveillance. Leurs nombreux conseils, leurs commentaires et leur expérience m'ont beaucoup apporté. Je les remercie, ainsi que le Professeur Yolande Perrin, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer mon travail de thèse. J'adresse également mes remerciements au Professeur Daniel Thomas pour sa participation à la tenue de mon premier comité de thèse, au cours duquel il m'a fait partager son expérience et son expertise.

Je souhaite remercier le Docteur Isabelle André pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances incontestables et de son enthousiasme pour la modélisation moléculaire, pour toutes les explications qu'elle m'a fournies, ainsi que pour sa bienveillance et sa sympathie.

*Je remercie également le Docteur Jean-Marc Nicaud pour avoir accepté notre collaboration afin de produire une souche recombinante de *Yarrowia lipolytica*, ainsi que pour sa disponibilité lors de nos nombreuses réunions téléphoniques.*

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à l'ensemble des enseignants du département de Biochimie de l'Université. Je remercie tout d'abord le Docteur Claude Gambotti, pour son implication dans mon travail de recherche et son aide précieuse concernant notamment le traitement statistique des résultats, mais aussi pour sa gentillesse et sa sympathie. Je remercie également le Docteur Anne Luciani, le Docteur Jean Giannettini, le Docteur Elodie Guinoiseau et le Docteur Vannina Lorenzi, qui, même si je n'ai pas travaillé directement avec eux, m'ont témoigné leur sympathie et leurs encouragements au cours de ces années. J'exprime enfin toute ma reconnaissance au Docteur Jérémie Santini, pour son soutien, son écoute attentive et bienveillante, sa sympathie, pour tous ses précieux conseils, et pour toujours avoir su trouver le mot pour rire, me remonter le moral, ou me rassurer. Je le remercie également pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer des enseignements en DEUST.

J'adresse mes vifs remerciements à Stéphanie Federici et Jenny pour leur aide précieuse, leur sympathie et leur bonne humeur, qui ont permis que les séances de travaux pratiques se déroulent dans les meilleures conditions.

J'exprime mes sincères remerciements au Docteur Jean-Christophe Alberti, pour son soutien, ses conseils, pour tous les bons moments passés au laboratoire, mais aussi pour avoir toujours été à l'écoute du moindre problème, qu'il soit d'ordre scientifique ou personnel. Nos nombreuses discussions scientifiques et son regard à la fois critique et bienveillant m'ont beaucoup apporté.

Je tiens également à remercier Magali Mariani pour sa sympathie, sa gentillesse, son enthousiasme et sa bonne humeur au laboratoire, ainsi que pour son aide actuelle pour la synthèse des 9-hydroperoxydes.

Je n'oublie pas le Docteur Sabrina Jacopini, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au laboratoire et de collaborer pour les articles. Je la remercie vivement pour son aide et sa contribution aux expérimentations, notamment en effectuant les synthèses d'aldéhydes.

Je remercie les stagiaires Emma et Quentin, que j'ai eu le plaisir d'encadrer, ainsi que Sébastien, pour leur bonne humeur et la bonne ambiance qu'ils ont su faire régner lors de leur passage au laboratoire.

Je remercie également mes « collègues doctorants » de Biochimie, Julie et Jean-Pierre, pour leur complicité, leur écoute attentive et leur soutien. Je vous adresse tous mes encouragements pour la poursuite de la thèse et vous souhaite le meilleur pour la suite. A vous Jenny, Vanessa, Sophie, Isabelle, et bien sûr Seb, un immense merci pour votre amitié, votre soutien indéfectible depuis le début, pour tous les souvenirs inoubliables partagés avec vous, tout au long de ces années universitaires. Radia, ta bonne humeur, ton écoute et notre complicité au laboratoire ont égayé mes journées. Je vous remercie donc tous, ainsi que Lisandru, Shirley et Laetitia, pour les bons moments que nous avons passés mais aussi pour m'avoir épaulée, encouragée, et écoutée me plaindre (de trop nombreuses fois) quand les manips ne marchaient pas. Les liens d'amitié que j'ai tissés avec chacun d'entre vous ont été source de réconfort et de motivation.

Mes derniers remerciements s'adressent à ma famille, et en premier lieu à mes parents, à qui je dois beaucoup et sans qui il m'eut été impossible d'envisager arriver jusque-là. Merci de m'avoir soutenue dans tous mes choix, encouragée, aidée et supportée, durant toute ma scolarité, et en particulier ces derniers mois. Je remercie aussi mes grands-parents pour leur soutien, leurs encouragements et l'intérêt constant qu'ils portent à mon travail. J'adresse enfin un très grand merci à l'ensemble de ma famille, votre présence et votre soutien ont été essentiels.

À ma maman,

Résumé

L'hydroperoxyde lyase (HPL) est une enzyme présente chez les végétaux supérieurs et impliquée dans la voie de la lipoxigénase. Elle agit sur les 9- et/ou les 13-hydroperoxydes d'acide gras pour produire des aldéhydes à 6 ou 9 carbones, responsables de l'odeur fraîche de l'herbe coupée dite « note verte », et très utilisés par les industries cosmétiques et agroalimentaires. Afin de répondre à la demande croissante en molécules à note verte naturelles, des systèmes de production utilisant des enzymes recombinantes sont développés. Ainsi, l'HPL d'olive (HPL wt) et l'enzyme dépourvue de son peptide de transit chloroplastique (HPL del), ont été clonées au laboratoire et exprimées chez *Escherichia coli*. Les deux enzymes recombinantes ont été purifiées puis caractérisées biochimiquement. Elles sont spécifiques des 13-hydroperoxydes, présentent une activité maximale à pH 7,5 et à 25°C, et agissent plus efficacement sur le 13-hydroperoxyde d'acide linoléique. L'étude de la stabilité de l'HPL wt et de l'HPL del au cours du temps a montré que la totalité de l'activité enzymatique est conservée durant cinq semaines de stockage à -80°C en présence de glycérol 10%. De plus, l'ajout de composés chimiques tels que le NaCl, le Na₂SO₄ et la glycine ont permis d'augmenter l'activité des deux enzymes. Parallèlement, les HPL recombinantes ont été exprimées dans un système eucaryote, la levure *Pichia pastoris*. Les enzymes ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture, mais exprimées au niveau intracellulaire, avec une activité maximale obtenue après 24h d'induction. Par ailleurs, les relations structure-fonction de l'HPL ont été étudiées. La structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive a été modélisée grâce à des méthodes computationnelles. Des acides aminés potentiellement impliqués dans la régiospécificité de l'enzyme ont été ciblés, puis modifiés par mutagenèse dirigée. Ainsi, le mutant T302K présente une efficacité catalytique sur les 13-hydroperoxydes similaire à celle de l'HPL wt , mais il est également actif sur le 9-hydroperoxyde d'acide linoléique.

Mots clés : hydroperoxyde lyase, expression hétérologue, biocatalyse, modélisation moléculaire, mutagenèse dirigée.

Abstract

Hydroperoxide lyase (HPL) is an enzyme found in higher plants and involved in the lipoxygenase pathway. HPL acts on the 9- and/or 13-hydroperoxy fatty acids to produce C6 or C9 aldehydes, responsible for the fresh odor of cut grass known as "green note" and widely used by cosmetic and food industries. Production systems using recombinant enzymes are developed to meet the growing demand for natural green leaf volatiles. Thus, HPL from olive fruit (HPL*wt*) and the enzyme with its chloroplast transit peptide deleted (HPL*del*), were cloned in the laboratory and expressed in *Escherichia coli*. Both recombinant enzymes were purified and biochemically characterized. They act only on 13-hydroperoxides, exhibit maximum activity at pH 7.5 and 25°C, and are more effective on the 13-hydroperoxy linoleic acid. The study of HPL*wt* and HPL*del* stability over time has shown that all of the enzymatic activity is retained during a five weeks storage at -80°C in the presence of 10% glycerol. Furthermore, the addition of chemical compounds such as NaCl, Na₂SO₄ and glycine have increased the activity of both enzymes. Meanwhile, recombinant HPLs have been expressed in the eukaryotic system *Pichia pastoris* yeast. The HPLs are not secreted into the culture medium, but are expressed intracellularly, with a maximum after 24h of induction. Moreover, HPL structure-function relations were studied. The olive 13-HPL three dimensional structure has been built by computational modelling. Amino acids potentially involved in regiospecificity of the enzyme have been identified and modified by site-directed mutagenesis. Thus, T302K mutant has a catalytic efficiency on 13-hydroperoxides similar to the HPL*wt*, but it is also active on the 9-hydroperoxy linoleic acid.

Keywords : hydroperoxide lyase, heterologous expression, biocatalysis, molecular modeling, site-directed mutagenesis.

TABLE DES MATIERES

Introduction Bibliographique	1
I. La voie de la lipoxygénase chez les plantes supérieures.....	2
I.1. Généralités	2
I.1.a) Activation et description de la voie	2
I.1.b) Rôle des phyto-oxylipines	5
I.2. Principales enzymes impliquées	5
I.2.a) Les enzymes lipolytiques	5
I.2.b) Les lipoxygénases.....	6
I.2.c) Les enzymes de la sous-famille CYP74	9
II. Les hydroperoxydes lyases de plantes supérieures.....	20
II.1. Diversité	20
II.2. Nomenclature	20
II.3. Localisation intracellulaire.....	21
II.4. Mode d'action	22
II.4.a) Les substrats.....	22
II.4.b) Les produits	23
II.4.c) Mécanisme réactionnel	25
II.4.d) Inhibition	27
II.5. Structure et relations structure-fonction	28
II.6. Stabilité de l'HPL	34
III. Les molécules à note verte.....	35
III.1. Production des molécules à note verte chez les plantes.....	35
III.1.a) Formation lors de la voie de la lipoxygénase.....	35
III.1.b) Fonctions biologiques	38
III.2. Production industrielle des molécules à note verte	40
III.2.a) Intérêt industriel et utilisation	40
III.2.b) Moyens de production à l'échelle industrielle	42
IV. Problématique scientifique et objectifs.....	46

Matériel et Méthodes.....	48
I. Matériel biologique.....	49
I.1. Hydroperoxyde lyases d'intérêt.....	49
I.2. Souches bactériennes, levures et plasmides	49
II. Composés chimiques et réactifs.....	49
III. Production d'hydroperoxyde lyases recombinantes chez la bactérie <i>Escherichia coli</i>	50
III.1. Obtention de clones bactériens recombinants	50
III.2. Expression et purification des enzymes recombinantes.....	51
III.2.a) Expression chez <i>E. coli</i> M15	51
III.2.b) Lyse bactérienne.....	52
III.2.c) Purification par chromatographie d'affinité	52
III.3. Caractérisation biochimique.....	53
III.3.a) Détermination du pH optimum et de la température optimale.....	53
III.3.b) Détermination des paramètres cinétiques	53
IV. Optimisation des conditions de conservation et amélioration de l'activité de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive	53
IV.1. Stockage à basse température	53
IV.2. Amélioration de l'activité enzymatique par ajout de composés chimiques....	53
V. Production d'hydroperoxyde lyases recombinantes chez la levure <i>Pichia pastoris</i>	54
V.1. Avantages de l'utilisation de la levure	54
V.2. Système <i>Pichia pastoris</i>	55
V.2.a) Généralités	55
V.2.b) Souche et plasmides utilisés	55
V.2.c) Construction géniques et plasmidiques.....	58
V.2.d) Transformation des bactéries <i>E. coli</i> TOP10F' et criblage des clones recombinants	61
V.2.e) Préparation de l'ADN plasmidique.....	61
V.2.f) Transformation intégrative de <i>Pichia pastoris</i>	62
V.2.g) Sélection des clones recombinants et criblage Mut ⁺ /Mut ^S	63
V.2.h) Expression des HPL recombinantes chez <i>P. pastoris</i> X-33	64
V.2.i) Analyse des transcrits par RT-PCR.....	65
V.2.j) Analyse de l'expression des HPL recombinantes.....	65

VI. Etude des relations structure-fonction de l'hydroperoxyde lyase.....	66
VI.1. Identification des acides aminés d'intérêt et choix des mutations.....	66
VI.1.a) Alignement de séquences en acides aminés.....	66
VI.1.b) Modélisation de la structure tridimensionnelle.....	67
VI.2. Obtention de mutants de la 13-HPL d'olive par mutagenèse dirigée.....	68
VI.2.a) Mutagenèse dirigée.....	68
VI.2.b) Transformation des bactéries <i>E. coli</i> M15	69
VII. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et immunoempreinte	69
VIII. Détermination des activités enzymatiques	70
VIII.1. Synthèse des hydroperoxydes d'acides gras.....	70
VIII.2. Mesure des cinétiques enzymatiques	70
IX. Détermination de la concentration en protéines	71
X. Traitement statistique des données	71
Résultats et Discussion.....	72
I. Purification et caractérisation d'hydroperoxyde lyases recombinantes exprimées chez la bactérie <i>Escherichia coli</i>.....	73
I.1. Expression des enzymes recombinantes et purification par chromatographie d'affinité	73
I.2. Caractérisation biochimique des enzymes recombinantes.....	76
I.2.a) Détermination du pH optimum et de la température optimale.....	77
I.2.b) Détermination des paramètres cinétiques	79
II. Optimisation des conditions de conservation et amélioration de l'activité de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive	80
II.1.a) Stockage à basse température.....	80
II.2. Amélioration de l'activité enzymatique par ajout de composés chimiques....	83
II.2.a) Effets de différents composés chimiques sur l'activité enzymatique.....	83
II.2.b) Effet sur les paramètres cinétiques	88
III. Production d'hydroperoxyde lyases recombinantes chez la levure <i>Pichia pastoris</i>	91
III.1. Obtention de levures <i>Pichia pastoris</i> recombinantes.....	91
III.1.a) Clonage et multiplication des plasmides recombinants chez les bactéries	91

III.1.b) Intégration des plasmides recombinants dans le génome des levures ...	92
III.2. Expression des HPL recombinantes chez <i>Pichia pastoris</i>	94
III.2.a) Essais de sécrétion des HPL recombinantes	94
III.2.b) Expression intracellulaire	104
IV. Etude des relations structure-fonction de l'hydroperoxyde lyase.....	106
IV.1. Modélisation de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive	106
IV.1.a) Construction et validation du modèle tridimensionnel.....	106
IV.1.b) Etude de la structure tridimensionnelle modélisée	109
IV.2. Identification de résidus potentiellement impliqués dans la spécificité réactionnelle de l'hydroperoxyde lyase.....	118
Conclusion et Perspectives	123
Références Bibliographiques.....	128
Annexes.....	128
Communications.....	128

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : La voie de la lipoxigénase chez les végétaux	3
Figure 2 : Produits de l'action des 9-LOX et des 13-LOX sur l'acide linoléique et l'acide linolénique	7
Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la lipoxigénase 1 de soja (PDB : 1YGE).....	8
Figure 4 : Cladogramme basé sur la séquence protéique des enzymes des différentes classes de CYP74, réalisé à l'aide du logiciel ClustalW2-Phylogeny	10
Figure 5 : Phyto-oxylipines produites par les enzymes de la famille CYP74 à partir du 13-HPOT.....	11
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'AOS de guayule (PDB ID : 3DBM),	13
Figure 7 : Structure de l'hème <i>b</i> (A) et représentation tridimensionnelle schématique des ligands du fer chez les CYP74 (B)	14
Figure 8 : Comparaison de la boucle de liaison à l'hème des CYP74 par rapport aux P450 classiques	15
Figure 9 : Vue agrandie au niveau de l'entrée du site actif de l'AOS de guayule	16
Figure 10 : Entrée du site actif de l'AOS d' <i>Arabidopsis</i> sous forme native (A) ou complexée avec le 13(S)-HOD (B) ou le 13(S)-HOT (C).....	17
Figure 11 : Résidus hydrophobes du site actif de l'AOS de guayule.....	18
Figure 12 : Résidus catalytiques décrits par Li <i>et al.</i> , (2008) chez l'AOS de guayule ...	19
Figure 13 : Clivage des hydroperoxydes d'acides gras consécutif à l'action de l'HPL chez les plantes supérieures	23
Figure 14 : Composés formés suite à l'action de 9-HPL (A) ou de 13-HPL (B) sur des 9- ou des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linolénique	24
Figure 15 : Schéma du mécanisme réactionnel de l'HPL (Lee <i>et al.</i> , 2008).....	26
Figure 16 : Modèle tridimensionnel du site actif putatif de CYP74C3 (Hughes <i>et al.</i> , 2008).....	29
Figure 17 : Alignement des séquences en acides aminés du domaine central de l'hélice I d'AOS et d'HPL (d'après Toporkova <i>et al.</i> , 2008)	30
Figure 18 : Alignement des séquences en acides aminés d'AOS et d'HPL (d'après Lee <i>et al.</i> , 2008)	31
Figure 19 : Superposition de la structure de l'AOS d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et de son mutant F137L au niveau du site actif (Lee <i>et al.</i> , 2008).	32

Figure 20 : Mécanismes réactionnels générant les produits de l'AOS ou de l'HPL (d'après Lee <i>et al.</i> , 2008).....	33
Figure 21 : Formation des composés volatils responsables de l'arôme par la branche HPL de la voie de la lipoxygénase, à partir de 13-hydroperoxydes.....	36
Figure 22 : Formation des composés volatils responsables de l'arôme par la branche HPL de la voie de la lipoxygénase, à partir de 9-hydroperoxydes.....	37
Figure 23 : Mécanisme de défense des plantes contre les herbivores (Matsui <i>et al.</i> , 2006).....	39
Figure 24 : Communication intra- et inter-plante médiée par les composés à note verte (Arimura <i>et al.</i> , 2010).....	40
Figure 25 : Procédé de production biocatalytique de composés à note verte	43
Figure 26 : Exemple de procédé avec estimation quantitative des matières premières nécessaires (Gigot 2011)	44
Figure 27 : Vecteur pQE-30 (Qiagen).....	51
Figure 28 : Carte des plasmides de type pPICZ (A) et pPICZ α (B) (Invitrogen, Life technologies).....	56
Figure 29 : Phénomènes de recombinaisons homologues chez <i>Pichia pastoris</i> , générant des levures de type Mut ⁺ (A) ou Mut ^S (B).....	58
Figure 30 : Profil d'élution des hydroperoxydes lyases recombinantes lors de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine au cobalt (Talon Superflow Metal Affinity).	74
Figure 31 : Analyse des étapes de purification de l'HPL wt (A et B) et de l'HPL del (C et D) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % et par immunoempreinte.....	75
Figure 32 : Influence de la température sur l'activité spécifique de l'HPL wt (A) et l'HPL del (B), avec le 13-HPOD (a) ou le 13-HPOT (b) comme substrat	77
Figure 33 : Influence du pH sur l'activité spécifique de l'HPL wt (A) et l'HPL del (B), avec le 13-HPOD (a) ou le 13-HPOT (b) comme substrat.....	78
Figure 34 : Stabilité de l'HPL wt (A, C, E) et de l'HPL del (B, D, F) au cours d'un stockage de cinq semaines à basse température	81
Figure 35 : Effet de la concentration en sels sur l'activité spécifique de l'HPL wt (A, C, E) et de l'HPL del (B, D, F)	84
Figure 36 : Effet de la concentration en glycine et en glycérol sur l'activité spécifique de l'HPL wt (A et C) et de l'HPL del (B et D).....	86

Figure 37 : Effets comparés des différents composés chimiques sur l'activité spécifique de l'HPL wt (A) et de l'HPL del (B).....	87
Figure 38 : Analyse sur gel d'agarose du plasmide recombinant linéarisé par l'action de <i>Pmel</i>	92
Figure 39 : Analyse sur gel d'agarose des amplifiats obtenus par PCR lors du criblage des clones de <i>Pichia pastoris</i> recombinants.....	93
Figure 40 : Analyse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion des produits de PCR par <i>EcoRI</i> , pour la détermination du phénotype Mut.....	94
Figure 41 : Cassettes d'expression contenant les séquences codant pour l'HPL wt (A) ou l'HPL del (B).....	95
Figure 42 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL wt ou l'HPL del	96
Figure 43 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL wt	97
Figure 44 : Cassettes d'expression contenant la séquence codant pour l'HPL del , dépourvue de signal de clivage D ₄ KA (A) ou permettant l'insertion de l'étiquette polyHistidine à l'extrémité C-terminale de l'enzyme (B).....	98
Figure 45 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL del	98
Figure 46 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats obtenus par RT-PCR à partir des ARN totaux extraits des levures <i>P. pastoris</i> exprimant l'HPL wt	99
Figure 47 : Cassette d'expression contenant la séquence codant pour l'HPL opt	100
Figure 48 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL opt	101
Figure 49 : Cassettes d'expression contenant la séquence codant pour l'HPL Le (A), l'HPL wt (B), l'HPL opt (C), ou l'HPL del (D).....	102
Figure 50 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12%, des surnageants de culture (A) et des culots de levures (B) exprimant les HPL recombinantes.....	102
Figure 51 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL wt , l'HPL del ou l'HPL opt	104
Figure 52 : Expression intracellulaire de l'HPL wt , de l'HPL opt et de l'HPL del chez <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	105
Figure 53 : Superposition du modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive et de sa structure minimisée.....	108

Figure 54 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la 13-HPLd'olive.....	109
Figure 55 : Topologie générale des éléments de structure secondaire des P450 (Peterson et Graham 1998) (A) et structure tridimensionnelle de la 13-HPLd'olive (B).....	111
Figure 56 : Domaines putatifs de liaison à la membrane de la 13-HPL d'olive.....	112
Figure 57 : Alignement de la structure secondaire et de la séquence peptidique de la 13-HPL d'olive avec les séquences peptidiques d'AOS et autres P450 cristallisés, à l'aide de l'outil ESPript 3.0.....	113
Figure 58 : Positionnement de l'hème au sein de la structure tridimensionnelle modélisée de la 13-HPL d'olive	115
Figure 59 : Site actif putatif de la 13-HPL d'olive	116
Figure 60 : Résidus du domaine central de l'hélice I.....	117
Figure 61 : Alignement des séquences en acides aminés d'HPL de régiospécificités différentes	118
Figure 62 : Implication du résidu en position 302 dans le contrôle de la régiospécificité de l'HPL	119
Figure 63 : Analyse des étapes de purification du mutant T302K par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% coloré au bleu de Coomassie (A) et par immunoempreinte (B).....	120
Figure 64 : Résidus potentiellement impliqués dans le contrôle de la spécificité réactionnelle de l'HPL	127

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Flaveurs attribuées aux aldéhydes et alcools volatils formés par la voie de la lipoxygénase (Gargouri et Akacha 2008 ; Gigot <i>et al.</i> , 2010)	41
Tableau II : Constructions géniques réalisées en vue de l'expression des HPL recombinantes chez <i>Pichia pastoris</i>	59
Tableau III : Tableau de purification de l'HPL wt et de l'HPL del	76
Tableau IV : Paramètres cinétiques des HPL wt et HPL del recombinantes purifiées....	79
Tableau V : Paramètres cinétiques de l'HPL wt (A) et de l'HPL del (B) en présence de composés chimiques.....	89
Tableau VI : Tableau de purification de l'HPL wt et du mutant T302K	120
Tableau VII : Régiospécificité de l'HPL wt et du mutant T302K	121
Tableau VIII : Paramètres cinétiques de l'HPL wt et du mutant T302K.....	122

LISTE DES ABBREVIATIONS

C18:2 ω -6	Acide linoléique (acide (9Z,12Z)-octadécadiénoïque)
C18:3 ω -3	Acide α -linoléique (acide (9Z,12Z,15Z)-octadécatriénoïque)
ADH	Alcool déshydrogénase
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AOC	Allène oxyde cyclase
AOS	Allène oxyde synthase
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Albumine sérique bovine
DES	Divinyl éther synthase
DNase I	Désoxyribonucléase I
dNTP	Désoxyribonucléosides triphosphate
EAS	Epoxyde alcool synthase
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
HPL	Hydroperoxyde lyase
HPL _{wt}	Hydroperoxyde lyase sauvage
HPL _{del}	Hydroperoxyde lyase délétée du peptide de transit chloroplastique
HPL _{opt}	Hydroperoxyde lyase optimisée pour l'expression chez <i>Pichia pastoris</i>
9-HPOD	9-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (10Z,12E)-9-hydroperoxy-octadécadiénoïque)
9-HPOT	9-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (10E,12Z,15Z)-9-hydroperoxy-octadécatriénoïque)
13-HPOD	13-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (9Z,11E)-13-hydroperoxy-octadécadiénoïque)
13-HPOT	13-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (9Z,11E,15Z)-13-hydroperoxy-octadécatriénoïque)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB agar	Milieu Luria-Bertani agar
LB Broth	Milieu Luria-Bertani bouillon
LOX	Lipoxygénase

OPDA	Acide oxo-phytodiénoïque
PBS	Tampon phosphate salin
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
POX	Peroxygénase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
TB	Milieu Terrific Broth
TBE	Tris-Borate-EDTA
YNB	Yeast Nitrogen Base

Avant-propos

L'hydroperoxyde lyase (HPL) est une enzyme présente chez les plantes supérieures et intervenant dans une voie d'oxydation des lipides, appelée voie de la lipoxygénase. Cette voie aboutit à la synthèse de composés appelés oxylipines, impliqués dans certains processus physiologiques ainsi que dans la réponse aux blessures ou aux pathogènes. La lipoxygénase (LOX) initie la voie en catalysant la dioxygénation régiospécifique des acides gras polyinsaturés à 18 carbones, notamment les acides linoléique et linoléique, pour former des 9- et/ou des 13-hydroperoxydes d'acides gras correspondants. Par la suite, l'HPL agit sur ces hydroperoxydes pour produire des aldéhydes volatils à 6 ou 9 carbones et un 9- ou un 12-oxoacide. Les HPL sont des enzymes hémiques appartenant à la famille des cytochromes P450, et classées plus particulièrement dans deux sous-familles en fonction de leur régiospécificité de substrat : CYP74B (13-HPL) et CYP74C (9-HPL et 9/13-HPL).

Les aldéhydes volatils produits par l'HPL sont en partie responsables de l'odeur caractéristique de l'herbe coupée dite "note verte", également retrouvée dans de nombreux fruits et légumes ainsi que dans des produits transformés tels que l'huile d'olive. Ces molécules à note verte sont très recherchées dans les industries agroalimentaires et cosmétiques en raison de leurs propriétés aromatisantes mais également antibactériennes. Compte tenu de la demande croissante en arômes naturels, et de la difficulté d'extraction des composés à partir des plantes, des processus biocatalytiques mimant *in vitro* les réactions de la voie de la LOX ont été développés. Des extraits végétaux sont utilisés comme sources de LOX et d'HPL pour convertir des huiles végétales préalablement hydrolysées par une lipase, en molécules à note verte d'origine naturelle. Des lipases commerciales et des farines de soja comme source de LOX sont déjà utilisées avec succès, tandis que de nombreux extraits végétaux présentant des activités HPL ont été testés. Cependant, de grandes quantités de matières premières sont nécessaires, l'activité HPL est très instable, et les extraits végétaux contiennent d'autres enzymes agissant sur les hydroperoxydes d'acides gras ainsi que des HPL de spécificités différentes, ce qui conduit à la formation de produits secondaires indésirables et à une perte de substrat. L'utilisation d'une HPL recombinante purifiée et spécifique dans de tels procédés biocatalytiques pourrait être une alternative intéressante pour permettre une production sélective et plus efficace de molécules à note verte naturelles.

Le laboratoire s'est intéressé à la production biotechnologique de molécules à note verte à la suite d'études menées sur l'implication des enzymes de la voie de la lipoxgénase dans la biosynthèse de l'arôme de l'huile d'olive. Ainsi, l'ADNc codant pour une HPL a été isolé au laboratoire à partir d'olives noires de la variété Leccino, et l'enzyme recombinante a été clonée et exprimée chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*). Afin d'éviter d'éventuelles difficultés de solubilisation de l'enzyme, l'HPL dépourvue de son peptide d'adressage chloroplastique a également été produite chez *E. coli*.

L'objectif de ce travail a été dans un premier temps de purifier et de caractériser biochimiquement les deux HPL recombinantes exprimées chez *E. coli*. Nous avons ensuite recherché des conditions susceptibles de préserver et d'améliorer l'activité enzymatique des HPL recombinantes purifiées. Dans le but d'éviter la formation de corps d'inclusion diminuant le rendement en HPL recombinante chez *E. coli*, des essais d'expression des HPL chez la levure *Pichia pastoris*, ont été effectués. L'optimisation de la production hétérologue de l'HPL recombinante, et l'amélioration de son efficacité catalytique, pourraient permettre d'envisager l'intégration de l'enzyme dans un processus complet et efficace de bioproduction de molécules à note verte, à plus grande échelle. Parallèlement, notre étude s'est portée sur la compréhension des relations structure-fonction de l'HPL. La modélisation de la structure tridimensionnelle de l'HPL d'olive, associée à la construction de mutants, pourrait permettre d'identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans le contrôle du mécanisme catalytique et de la régiospécificité. La modification de la spécificité réactionnelle de l'HPL par mutation pourrait constituer un avantage intéressant pour la production sélective de composés volatils.

Introduction Bibliographique

I. La voie de la lipoxigénase chez les plantes supérieures

La présence, chez les plantes, d'un mécanisme enzymatique responsable de l'oxydation des lipides est connue depuis 1932 (Andre et Hou 1932). Cette voie métabolique est aujourd'hui appelée communément "voie de la lipoxigénase". Elle met en œuvre l'action séquentielle de plusieurs enzymes dont les réactions permettent la transformation d'acides gras polyinsaturés (principalement ceux à 18 carbones) en composés nommés phyto-oxylipines, et impliqués dans de nombreux processus physiologiques, ainsi que dans les mécanismes de défense vis-à-vis de stress biotiques ou abiotiques. Ces métabolites incluent notamment des phyto-hormones : jasmonates et acide traumatique, des époxy-hydroxy-acides, des divinyl éthers, ainsi que des aldéhydes et alcools à courte chaîne carbonée.

I.1. Généralités

I.1.a) Activation et description de la voie

Chez les végétaux, la voie de la lipoxigénase est activée au cours de certaines phases du développement, comme la floraison, la formation du pollen, la tubérisation et la maturation des fruits (Howe et Schillmiller 2002 ; Hassan *et al.*, 2015). Elle est sous contrôle d'hormones végétales comme l'éthylène, l'acide abscissique et les cytokinines (Blee 1998). Cette voie est également activée suite à une infection par des microorganismes ou une blessure, qu'elle soit mécanique ou provoquée par un herbivore (Bate et Rothstein 1998 ; Feussner et Wasternack 2002 ; Howe et Schillmiller 2002 ; Huang et Schwab 2011 ; Hassan *et al.*, 2015). La plante peut détecter la présence d'un pathogène ou d'un ravageur par l'intermédiaire d'éliciteurs spécifiques ou de molécules signal émises par les autres plantes (Arimura *et al.*, 2000 ; Feussner et Wasternack 2002 ; Arimura *et al.*, 2010). Des facteurs abiotiques comme un choc osmotique ou thermique, une exposition aux UV, ou un stress hydrique peuvent également induire l'activation de cette voie (Grechkin 1998 ; Howe et Schillmiller 2002). La cascade réactionnelle activée en réponse à l'un de ces stimuli conduit à la production de phyto-oxylipines adaptées pour lutter contre le stress subi (Figure 1).

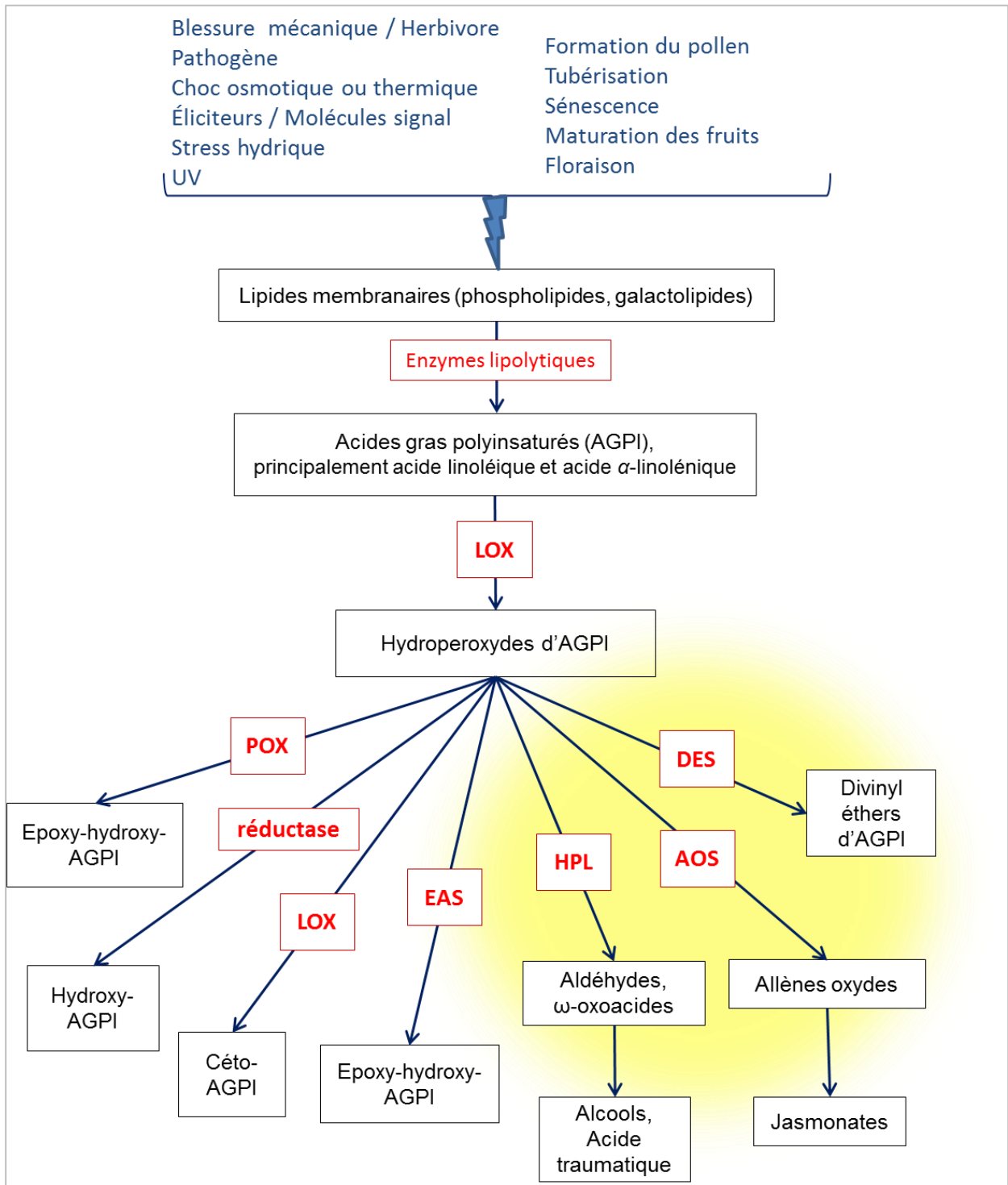


Figure 1 : La voie de la lipoxygénase chez les végétaux

Sur cette figure sont représentés, en noir les substrats et produits des réactions, et en rouge les enzymes impliquées (AOS : allène oxyde synthase ; DES : divinyl éther synthase ; EAS : époxyde alcool synthase ; HPL : hydroperoxyde lyase ; LOX : lipoxygénase ; POX : peroxygénase). Les réactions catalysées par les enzymes de la sous-famille CYP74 sont colorées en jaune.

La biosynthèse des phyto-oxylipines débute par l'action d'une lipoxygénase (LOX) sur un acide gras polyinsaturé à 18 carbones, préférentiellement l'acide linoléique (C18:2 ω -6) et l'acide α -linoléique (C18:3 ω -3). Ces acides gras sont généralement libérés à partir des phospholipides ou des galactolipides membranaires, par des phospholipases (A ou D) ou des galactolipases (Ishiguro *et al.*, 2001 ; Blee 2002 ; Hassan *et al.*, 2015). La LOX catalyse la dioxygénation régiospécifique au niveau du carbone 9 (9-LOX) ou du carbone 13 (13-LOX), de l'acide gras, pour former des 9- ou 13-hydroperoxydes correspondants (Vliegenthart et Veldink 1991 ; Feussner et Wasternack 2002). Ces hydroperoxydes sont des composés instables et réactifs, qui peuvent être substrats de nombreuses enzymes (Gardner *et al.*, 1991 ; Blee 1998). Ils sont au carrefour de plusieurs branches métaboliques qui vont conduire à former des composés finaux plus stables, agissant chez la plante comme molécules de signalisation et de défense (Blee 1998 ; Grechkin 1998 ; Schwab 2000 ; Griffiths 2015).

Les hydroperoxydes d'acide linoléique ou d'acide linoléique sont principalement métabolisés par trois enzymes : l'allène oxyde synthase (AOS), la divinyl éther synthase (DES) et l'hydroperoxyde lyase (HPL), regroupées dans la famille CYP74, appartenant aux cytochromes P450. L'AOS produit des allènes oxydes, pouvant être transformés en acide 12-oxo-phytodiénoïque (12-OPDA) qui est le précurseur des jasmonates incluant notamment l'acide jasmonique et son ester méthylique, le jasmonate de méthyle. La DES synthétise des divinyl éther d'acides gras. Enfin, l'action de l'HPL permet la production d'aldéhydes volatils pouvant être réduits en alcools, et d' ω -oxoacides, dont un précurseur de l'acide traumatique. D'autres enzymes métabolisent également les hydroperoxydes synthétisés par la LOX : une réductase peut réduire les hydroperoxydes en hydroxydes d'acides gras, qui sont moins réactifs, une peroxygénase (POX) ou une époxyde alcool synthase (EAS) peuvent transformer les hydroperoxydes d'acides gras en époxy-hydroxy-acides gras, qui pourront être des régioisomères identiques, mais différeront par leur stéréochimie, enfin, dans des conditions pauvres en oxygène, la LOX peut catalyser le clivage de la liaison O-O des hydroperoxydes pour former des radicaux alkoxy qui se réarrangent en cétodiènes (activité hydroperoxydase) (Figure 1).

La régulation de ces diverses voies enzymatiques en compétition pour les mêmes substrats (les 9- ou 13-hydroperoxydes) constitue un point de contrôle important pour le

végétal. Les oxylipines produites varient selon le stress subi ayant activé la synthèse de ces composés (Blee 2002 ; Feussner et Wasternack 2002).

1.1.b) Rôle des phyto-oxylipines

Les jasmonates, comprenant l'acide jasmonique et le jasmonate de méthyle issus de la branche AOS, sont des phyto-hormones impliquées dans des processus physiologiques tels que le développement de la fleur, la sénescence et la tubérisation (Wasternack 2007 ; Wasternack et Hause 2013). Ils sont capables d'induire l'expression de gènes codant pour des molécules de défense, comme des inhibiteurs de protéases qui inactivent les enzymes protéolytiques du tractus digestif des herbivores (Blee 1998 ; Wasternack 2007). Ils peuvent également intensifier la réponse de défense de la plante en stimulant leur propre synthèse et la production d'autres oxylipines via l'activation des gènes codant pour des enzymes de la voie de la lipoxygénase (LOX et AOS notamment) (Feussner *et al.*, 1995a ; Itoh *et al.*, 2002).

L'action de l'HPL produit un précurseur de l'acide traumatique. Suite à une lésion des tissus, l'acide traumatique stimule la multiplication des cellules autour de la blessure, entraînant la formation de cals protecteurs qui font obstacle à l'entrée des pathogènes (Zimmerman et Coudron 1979).

D'autres molécules comme les époxy, hydroxy, divinyl éthers, aldéhydes et alcools possèdent des propriétés antimicrobiennes (Blee 2002 ; Kishimoto *et al.*, 2008). Les aldéhydes et alcools volatils sont également capables d'agir comme molécules allélopathiques activant les mécanismes de défense des plantes situées à proximité (Bate et Rothstein 1998 ; Arimura *et al.*, 2001 ; Engelberth *et al.*, 2004).

1.2. Principales enzymes impliquées

1.2.a) Les enzymes lipolytiques

Les acides gras polyinsaturés transformés en oxylipines par la voie de la lipoxygénase proviennent généralement de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par des phospholipases (A ou D), ou celle des galactolipides membranaires par des galactolipases (Matsui *et al.*, 2000a ; Ishiguro *et al.*, 2001 ; Blee 2002 ; Hassan *et al.*, 2015). Les galactolipides, particulièrement les monogalactosyldiacylglycérols (MGDG) et les digalactosyldiacylglycérols (DGDG), sont présents dans les membranes des chloroplastes, et les phospholipides constituent la majeure partie de la membrane de la cellule végétale.

Si l'implication d'enzymes lipolytiques dans la voie de synthèse des oxylipines n'est pas remise en cause, des oxylipines liées à des lipides complexes ont cependant été mises en évidence. Il s'agit notamment de MGDG ou DGDG contenant des molécules de 12-OPDA appelés arabidopsides identifiés chez *Arabidopsis thaliana*, des résidus divinyl éther (linolipines), ou encore des précurseurs de l'acide traumatique (Stelmach *et al.*, 2001 ; Nakashima *et al.*, 2013 ; Mwenda et Matsui 2014). Ces oxylipines particulières résulteraient de l'action directe des enzymes de la voie de la lipoxygénase (LOX, AOS ou HPL) sur des acides gras estérifiés sans libération préalable par une enzyme lipolytique (Mosblech *et al.*, 2009 ; Nakashima *et al.*, 2011 ; Nakashima *et al.*, 2013). Les phospholipases ou les galactolipases pourraient agir dans un second temps, pour libérer les oxylipines liées aux lipides complexes (Mwenda et Matsui 2014).

I.2.b) Les lipoxygénases

- **Diversité**

Les LOX (LOX, EC 1.13.11.12) sont des dioxygénases à atome de fer non hémique, présentes chez les végétaux, les animaux, et chez certains procaryotes (Siedow 1991 ; Brash 1999). Chez les plantes, elles ont été identifiées dans différents organes : feuilles, fruits, racines et graines (Perez *et al.*, 1999 ; Porta et Rocha-Sosa 2002). Au niveau cellulaire, les LOX végétales sont généralement retrouvées dans la fraction soluble ou cytoplasmique mais peuvent également être localisées dans d'autres compartiments cellulaires tels que les chloroplastes ou les oléosomes (Feussner *et al.*, 1995a ; Feussner et Wasternack 2002 ; Porta et Rocha-Sosa 2002).

- **Mode d'action**

Les LOX catalysent la dioxygénation régio- et stéréospécifique des acides gras polyinsaturés contenant un système (1Z,4Z)-pentadiénique, pour former les hydroperoxydes correspondants (Hatanaka 1993 ; Fauconnier et Marlier 1997a ; Ivanov *et al.*, 2010). Généralement, ces enzymes agissent sur des acides gras libres, mais des études ont montré qu'elles sont également capables d'oxygéner les acides gras estérifiés au sein de lipides complexes (Feussner *et al.*, 1995b ; Fuller *et al.*, 2001 ; Mosblech *et al.*, 2009).

Selon le numéro de l'atome de carbone majoritairement oxygéné au cours de la catalyse, il est possible de distinguer plusieurs types de LOX végétales : les 9-LOX, les 13-LOX, et les 9/13-LOX générant un mélange de 9- et 13-hydroperoxydes (Martini et Iacazio 1995 ; Liavonchanka et Feussner 2006 ; Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). A partir de l'acide linoléique, les LOX synthétisent le 9-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (10Z,12E)-9-hydroperoxy-octadécadiénoïque, 9-HPOD) et/ou le 13-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (9Z,11E)-13-hydroperoxy-octadécadiénoïque, 13-HPOD). A partir de l'acide α -linoléique, elles synthétisent le 9-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (10E,12Z,15Z)-9-hydroperoxy-octadécatriénoïque, 9-HPOT) et/ou le 13-hydroperoxyde d'acide linoléique (acide (9Z,11E,15Z)-13-hydroperoxy-octadécatriénoïque, 13-HPOT) (Siedow 1991 ; Fauconnier et Marlier 1997a ; Liavonchanka et Feussner 2006) (Figure 2).

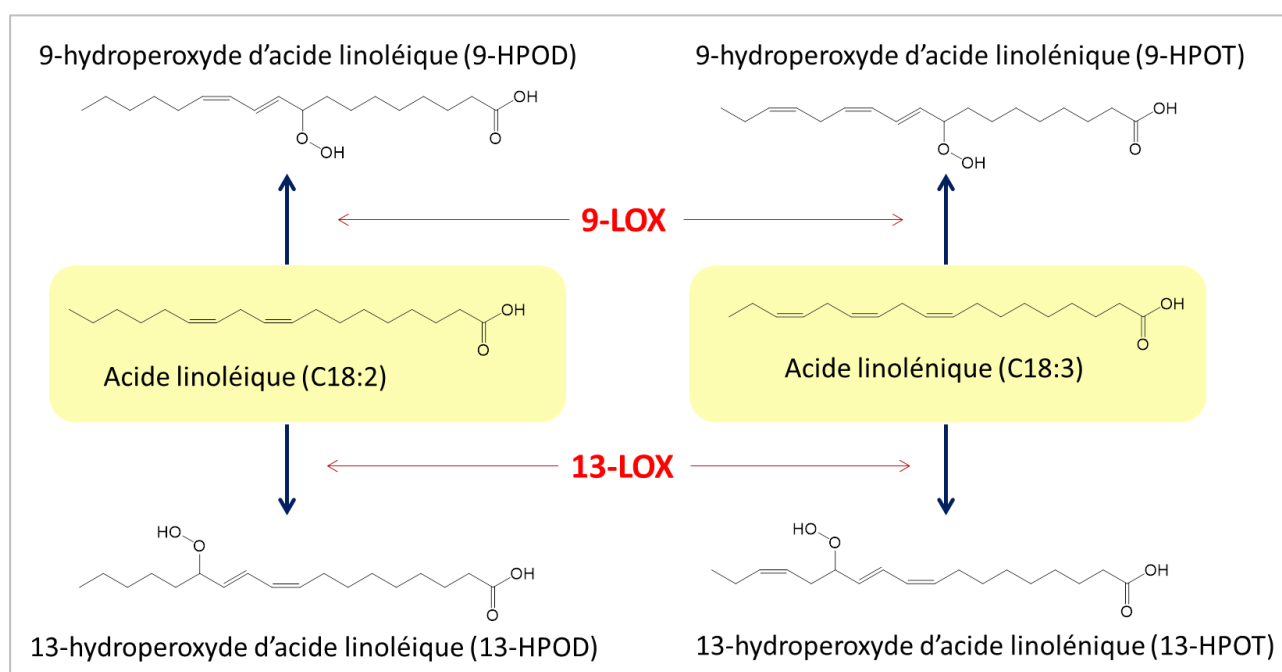


Figure 2 : Produits de l'action des 9-LOX et des 13-LOX sur l'acide linoléique et l'acide linoléique

Les 9-LOX produisent des 9-hydroperoxydes d'acide linoléique (9-HPOD) et des 9-hydroperoxydes d'acide linoléique (9-HPOT). Les 13-LOX produisent des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique (13-HPOD) et des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique (13-HPOT).

La LOX nécessite de l'oxygène en tant que co-substrat de la réaction. Le pH optimum d'action des LOX végétales est compris entre 5,5 et 9 (Vick et Zimmerman 1981).

- **Structure**

Les LOX sont des monomères de masse moléculaire estimée à 100 kDa (Brash 1999). La structure de la LOX1 de soja (n° PDB : 1YGE) cristallisée par Minor *et al.*, (1993), a servi de base à l'établissement d'une structure type commune à l'ensemble des LOX (Figure 3).

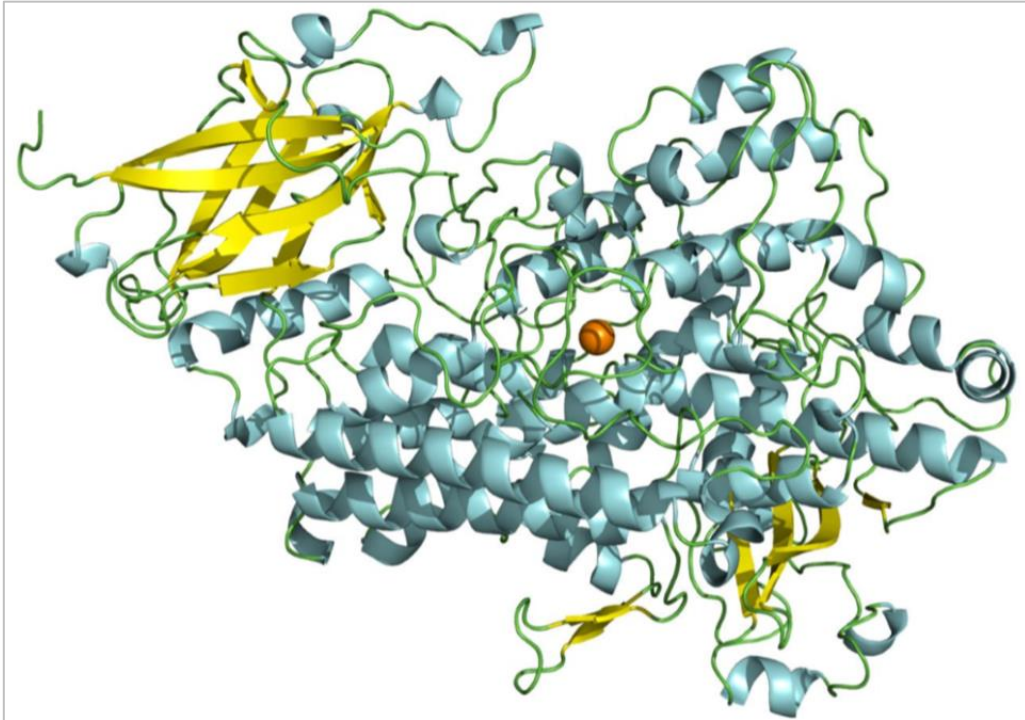


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la lipoxygénase 1 de soja (PDB : 1YGE)

Le domaine N-terminal, orienté dans le quadrant supérieur gauche, comporte une structure en tonneau β formée par deux couches de feuillets β antiparallèles représentés par les flèches jaunes. Le domaine C-terminal correspond au reste de la structure, majoritairement composé d'hélices α colorées en cyan, et contenant en son cœur l'atome de fer catalytique représenté par une sphère orange.

Cette structure est organisée en deux domaines distincts : (i) un domaine N-terminal composé de quatre feuillets β organisés en tonneau β , et (ii) un domaine C-terminal composé essentiellement d'hélices α , et contenant l'atome de fer catalytique, coordonné par trois résidus d'histidine, une isoleucine, une asparagine et une molécule d'eau.

I.2.c) Les enzymes de la sous-famille CYP74

L'AOS, l'HPL et la DES appartiennent à la sous famille CYP74 des cytochromes P450. Elles métabolisent les 9- ou les 13-hydroperoxydes d'acide linoléique ou d'acide linoléique produits par les LOX. Comme tous les cytochromes P450, elles possèdent un noyau hémique. En effet, le spectre d'absorption de ces enzymes après réduction par la dithionite et traitement au monoxyde de carbone (CO) montre une absorption maximale à environ 450 nm (bande de Soret), révélant la présence d'un hème *b* (Shibata *et al.*, 1995 ; Itoh et Vick 1999). Cependant, les CYP74 présentent des caractéristiques particulières : à la différence des autres P450, elles présentent une faible affinité pour le CO, agissent sans NADPH-réductase, ne nécessitent pas d'oxygène moléculaire et ne catalysent pas une réaction de monooxygénation (Delcarte *et al.*, 2000 ; Stumpe et Feussner 2006 ; Brash 2009).

- **Nomenclature**

Actuellement, les CYP74 se répartissent en quatre classes, essentiellement en fonction de leur séquence nucléotidique et leur spécificité de substrat (Matsui *et al.*, 1996 ; Stumpe et Feussner 2006 ; Brash 2009 ; Hughes *et al.*, 2009) (Figure 4).

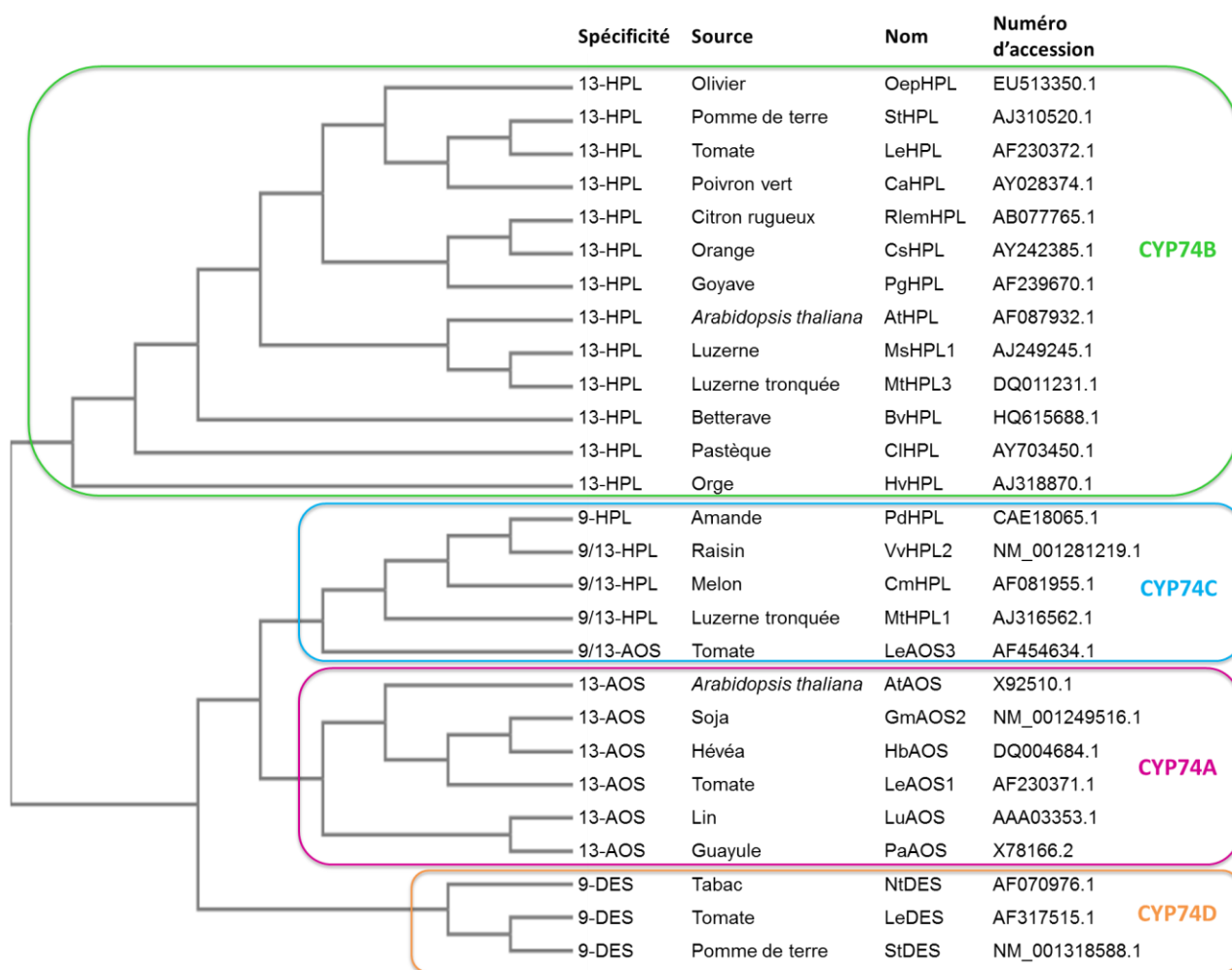


Figure 4 : Cladogramme basé sur la séquence protéique des enzymes des différentes classes de CYP74, réalisé à l'aide du logiciel ClustalW2-Phylogeny

Les classes CYP74A et CYP74B regroupent respectivement les AOS et les HPL spécifiques des 13-hydroperoxydes (13-AOS et 13-HPL), telles que les 13-AOS d'*Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2008) et de guayule (Li *et al.*, 2008), et les 13-HPL d'olive (Padilla *et al.*, 2010) et de tomate (Howe *et al.*, 2000). La classe CYP74C comprend les AOS et les HPL agissant sur les 9-hydroperoxydes comme la 9-HPL d'amande (Mita *et al.*, 2005), ou agissant à la fois sur les 9- et les 13-hydroperoxydes, comme la 9/13-AOS de tomate (Itoh *et al.*, 2002), et la 9/13-HPL de melon (Tijet *et al.*, 2001). Enfin, les DES telles que les DES de pomme de terre (Stumpe *et al.*, 2001) ou de tabac (Fammartino *et al.*, 2007) forment à elles seules la classe CYP74D.

- **Mode d'action**

L'AOS transforme les hydroperoxydes d'acide linoléique ou d'acide linoléique en allènes oxydes. Elle catalyse la première étape de la biosynthèse de l'acide jasmonique. En effet, à partir du 13-HPOT, l'AOS produit un allène oxyde : l'acide (12,13)-époxyoctadécatriénoïque (12,13-EOT), qui est cyclisé en acide 12-OPDA par une allène oxyde cyclase (AOC). Le 12-OPDA est réduit, puis subit trois cycles de β -oxydation pour former l'acide jasmonique et ses dérivés, parmi lesquels le jasmonate de méthyle (Itoh *et al.*, 2002 ; Hughes *et al.*, 2009). En l'absence d'AOC, les allènes oxydes instables produits par l'AOS peuvent s'hydrolyser spontanément en α - et γ -cétols (Figure 5).

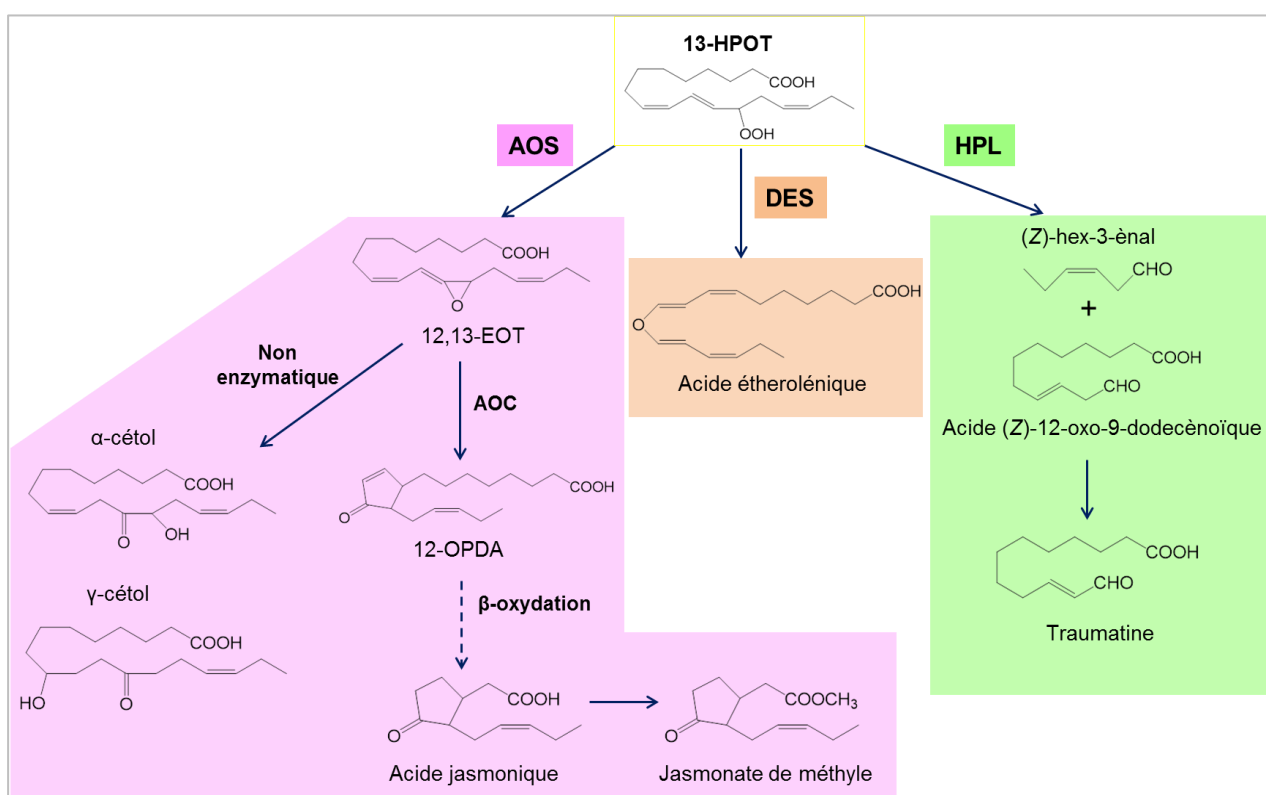


Figure 5 : Phyto-oxylipines produites par les enzymes de la famille CYP74 à partir du 13-HPOT.

Le 13-hydroperoxyde d'acide linoléique (13-HPOT) peut être métabolisé par les enzymes de la famille CYP74. L'allène oxyde synthase (AOS) produit un allène oxyde instable : l'acide (12,13)-époxyoctadécatriénoïque (12,13-EOT), pouvant s'hydrolyser spontanément en α - et γ -cétols, ou être cyclisé par l'allène oxyde cyclase (AOC) en acide 12-oxo-phytodiénoïque (12-OPDA), qui peut être converti en jasmonates après trois cycles de β -oxydation. La divinyl éther synthase (DES) génère l'acide étherolénoïque. L'hydroperoxyde lyase (HPL) produit un aldéhyde : le (Z)-hex-3-énal, et un oxoacide : l'acide (Z)-12-oxo-9-dodécénoïque qui est le précurseur de la traumatine (acide (E)-12-oxo-10-dodécénoïque).

L'action de l'HPL sur un 13-hydroperoxyde, permet la formation d'un aldéhyde à 6 carbones et d'un 12-oxoacide qui est le précurseur de la traumatine. Son action sur un 9-hydroperoxyde produit un aldéhyde à 9 carbones et un 9-oxoacide (Delcarte *et al.*, 2000).

La DES forme des divinyl éthers d'acides gras. Une dizaine de divinyl éthers se différenciant par les résidus liés à la chaîne principale, ont été identifiés (Grechkin 2002). Les principaux sont l'acide colnéléique et l'acide colnélénique produits respectivement à partir du 9-HPOD et du 9-HPOT. Le 13-HPOD et le 13-HPOT peuvent être transformés respectivement en acide étheroléique et en acide étherolénique.

- **Structure**

A ce jour, seules les structures cristallines de deux CYP74A : l'AOS d'*Arabidopsis thaliana* (CYP74A1) (PDB ID : 3LCI) et l'AOS de *Parthenium argentatum* (guayule) (CYP74A2) (PDB ID : 3DAN, 3DAM), ont été obtenues, respectivement par Lee *et al.*, (2008) et Li *et al.*, (2008). Ces AOS ont également été co-cristallisées avec des analogues de substrats : l'AOS de guayule a été co-cristallisée avec l'acide (9Z,11E)-13(S)-hydroxy-octadécadiénoïque (13(S)-HOD) (PDB ID : 3DBM), et l'AOS d'*Arabidopsis* avec le 13(S)-HOD (PDB ID : 2RCH) et l'acide (9Z,11E,15Z)-13(S)-hydroxy-octadécatriénoïque (13(S)-HOT) (PDB ID : 3DSI). Les structures tridimensionnelles de ces AOS peuvent apporter des éléments de réponse quant au mécanisme catalytique et à la spécificité réactionnelle des autres CYP74. En effet, les séquences en acides aminés des HPL, AOS et DES possèdent un taux d'identité compris entre 38 % et 57 %, selon les enzymes (Bate *et al.*, 1998 ; Wan *et al.*, 2013).

Les AOS de guayule et d'*Arabidopsis* présentent une structure secondaire composée de trois feuillets β et 15 hélices α (Figure 6).

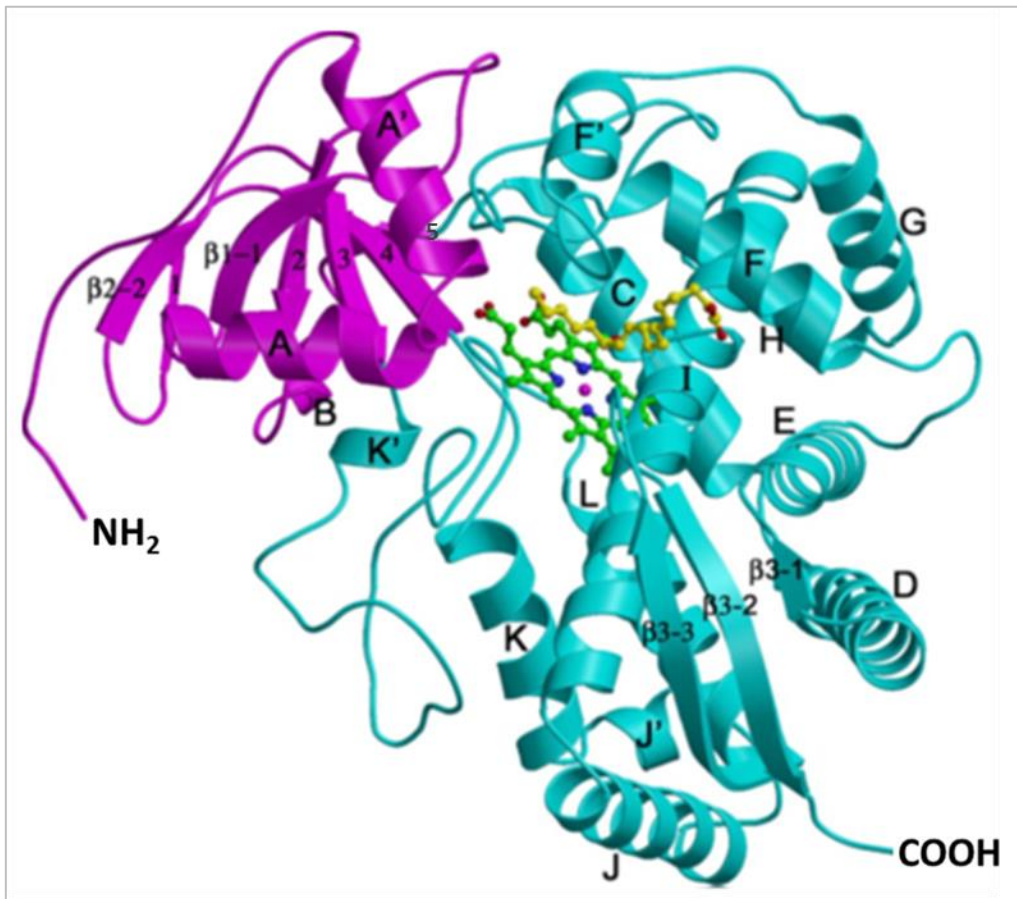


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'AOS de guayule (PDB ID : 3DBM), cristallisée par Li *et al.*, 2008

Les domaines α et β de l'AOS sont représentés en cyan et en violet respectivement. Le groupement héminique, à dominante verte, contient l'atome de fer représenté par une sphère rose. L'enzyme a été co-cristallisée avec un analogue du substrat : l'acide (9Z,11E)-13(S)-hydroxy-octadécadiénoïque (13(S)-HOD), coloré en jaune.

Li *et al.*, (2008) décrivent un domaine α prédominant, constitué en majorité d'hélices α , et un petit domaine β composé des feuillets $\beta 1$ et $\beta 2$, des hélices αA et A' et de l'hélice $3_{10} B$ (Figure 6).

- Liaison à l'hème

Le groupement héminique (hème *b*) est localisé entre les hélices I et L (Lee *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008). Il est constitué d'un cycle porphyrinique (noyau tétrapyrrolique) contenant un ion fer au centre, lié aux 4 atomes d'azote des noyaux pyrroles. Le fer est également lié au groupement $-SH$ d'un résidu cystéine (ligand proximal) très conservé chez tous les P450 (Peterson et Graham 1998 ; Tijet *et al.*, 2000 ; Noordermeer *et al.*, 2001b ; Lee *et al.*, 2008 ;

Zhu *et al.*, 2012). Le sixième ligand du fer (ligand distal) est l'atome d'oxygène du groupement –OH d'une molécule d'eau ou de la fonction hydroperoxyde du substrat (Noordermeer *et al.*, 2001b ; Lee *et al.*, 2008) (Figure 7).

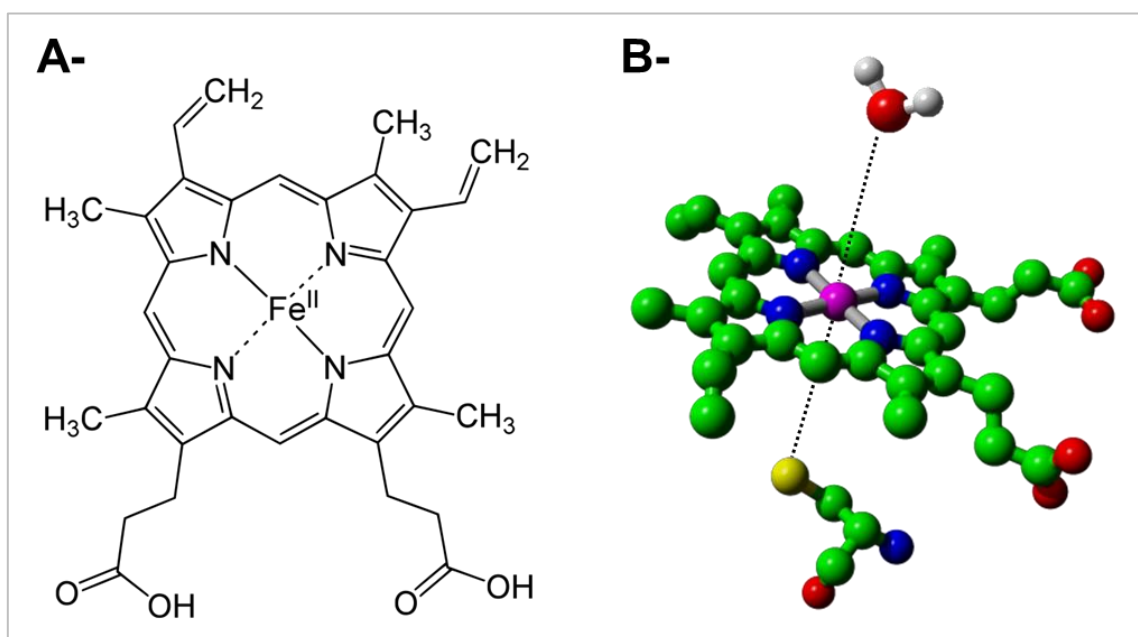


Figure 7 : Structure de l'hème b (A) et représentation tridimensionnelle schématique des ligands du fer chez les CYP74 (B)

Sur la figure B l'atome de fer est visible en violet. Il est lié aux atomes d'azote (en bleu) des noyaux pyrroles, ainsi qu'au groupement sulfhydryle (en jaune) d'un résidu cystéine de l'AOS. En l'absence du substrat le ligand distal de l'hème est une molécule d'eau.

Chez tous les P450, y compris les CYP74, la boucle de liaison à l'hème comporte les séquences conservées F/W-X-X-G, et C-X-G qui contient la cystéine proximale. Cependant, chez les CYP74, contrairement aux autres P450, une insertion de neuf acides aminés est remarquée après le motif F/W-X-X-G (Lee *et al.*, 2008 ; Brash 2009). Cette insertion empêcherait l'interaction avec une réductase, à la différence des autres P450 qui interagissent avec une NADPH-réductase (Lee *et al.*, 2008) (Figure 8).

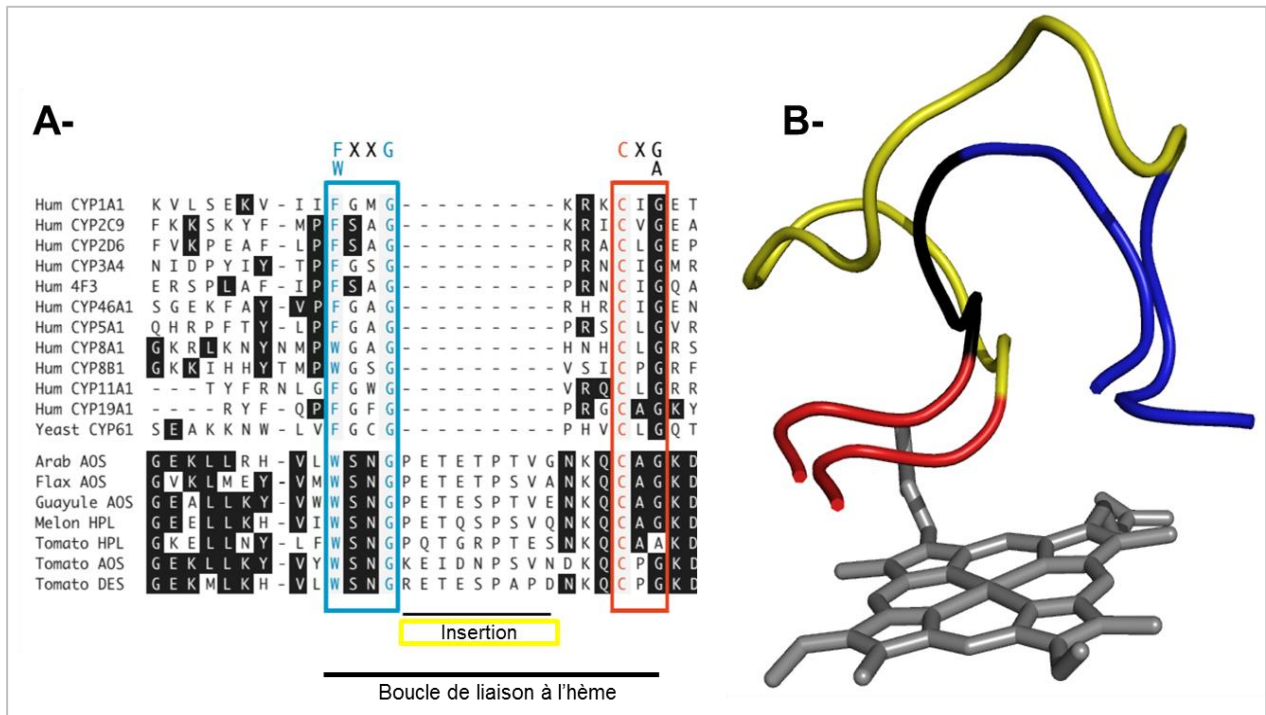


Figure 8 : Comparaison de la boucle de liaison à l'hème des CYP74 par rapport aux P450 classiques

(A) Alignement de séquences protéiques montrant une insertion de neuf acides aminés au niveau de la boucle de liaison à l'hème chez les CYP74 par rapport aux P450 classiques (Brash, 2009). Cette insertion se situe entre les motifs conservés F/W-X-X-G et C-X-G. (B) Modélisation tridimensionnelle des boucles de liaison à l'hème du cytochrome humain P450 2C9 (PDB ID : 1OG5) (en noir) et de l'AOS de guayule (PDB ID : 3 DAN) (en jaune). Les domaines conservés F/W-X-X-G et C-X-G sont montrés en bleu et en rouge respectivement. L'hème est coloré en gris.

Chez les AOS de guayule et d'*Arabidopsis*, au niveau de la partie C-terminale (R-X-C-X-G) du motif, la séquence K-Q-C-A-G est retrouvée (Lee *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008). Cette séquence comporte les résidus cystéine et glycine conservés et un résidu lysine formant des interactions ioniques avec le groupement propionate d'un cycle pyrrole de l'hème. Les résidus alanine et glycine établissent des interactions hydrophobes avec l'hème. D'autres interactions ioniques entre les cycles pyrroles et des résidus lysine et histidine de l'hélice C renforcent l'ancrage de l'hème dans la structure protéique et le contraignent dans le site actif (Li *et al.*, 2008).

- Localisation et entrée du site actif

Six sites de reconnaissance du substrat (SRS1 à 6) décrits chez les P450 (Gotoh 1992) peuvent être également identifiés chez les AOS (Li *et al.*, 2008). Ces sites correspondent aux régions qui composent le site actif de l'AOS, qui est formé par les hélices F (SRS2) et I (SRS4), et les boucles entre l'hélice C et β 1-5 (SRS1), entre les hélices F et F' (SRS3), entre l'hélice K et β 1-4 (SRS-5), et entre β 3-2 et β 3-3 (SRS-6). L'hélice I traverse l'intérieur de la structure et comporte des résidus impliqués dans la reconnaissance du substrat et la catalyse. L'hélice F se situe au niveau de la surface moléculaire, à l'entrée du site actif.

Les boucles entre les hélices F et F' et entre les feuillets β 3-2 et β 3-3 se font face à l'entrée du site actif. Li *et al.*, (2008) montrent que chez l'AOS de guayule, ces boucles sont très proches, formant un continuum, délimitant par conséquent deux entrées connectées au site catalytique (Figure 9).

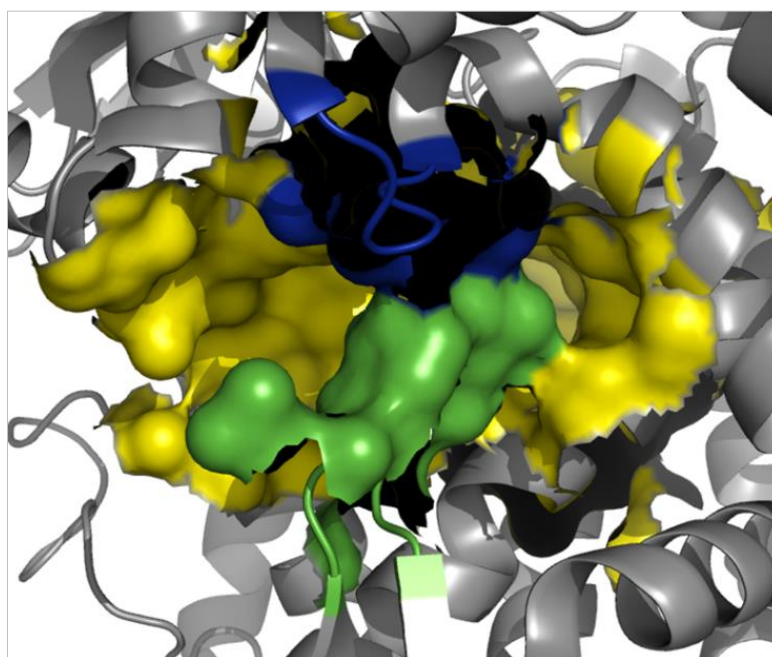


Figure 9 : Vue agrandie au niveau de l'entrée du site actif de l'AOS de guayule
Les parois du site actif de l'AOS de guayule cristallisée en l'absence du substrat (PDB ID : 3DAN), sont représentées en surface jaune. La boucle entre les hélices F et F' est colorée en bleu et celle entre les feuillets β 3-2 et β 3-3 est colorée en vert. Les surfaces correspondant à ces boucles se rejoignent et délimitent deux canaux connectés au site actif.

Les structures cristallines obtenues pour l'AOS de guayule en absence et en présence de l'analogue du substrat (13(S)-HOD) sont très proches, suggérant que le substrat n'induit pas de changement conformationnel majeur (Li *et al.*, 2008). En revanche, les structures cristallines de l'AOS d'*Arabidopsis* sous forme native ou complexée avec le 13(S)-HOD ou le 13(S)-HOT, semblent montrer des différences structurales plus importantes au niveau de cette région (Lee *et al.*, 2008) (Figure 10).

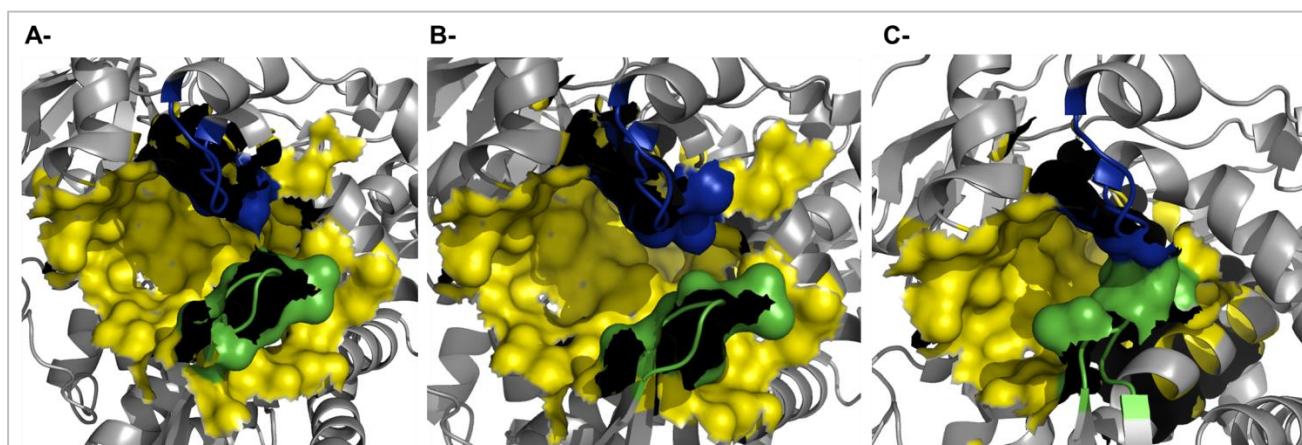


Figure 10 : Entrée du site actif de l'AOS d'*Arabidopsis* sous forme native (A) ou complexée avec le 13(S)-HOD (B) ou le 13(S)-HOT (C)

Les parois du site actif de l'AOS sont représentées en surface jaune. Les boucles entre les hélices F et F' et entre les feuillets β 3-2 et β 3-3 sont colorées respectivement en bleu et en vert. Au niveau de ces régions, des différences structurales sont visibles entre les structures cristallisées sous forme native (PDB ID : 3CLI) ou en présence de 13(S)-HOD (PDB ID : 2RCH) ou de 13(S)-HOT (PDB ID : 3DSI).

En effet, le facteur de température de la boucle entre β 3-2 et β 3-3 est très élevé ce qui suggère une flexibilité au niveau de cette région et la possibilité d'un léger changement conformationnel lors de la fixation du substrat ou de la libération des produits.

- Résidus du site catalytique

Le site catalytique se compose essentiellement de résidus hydrophobes. Chez l'AOS de guayule, les phénylalanines 92, 275 et 278, la leucine 459, et la valine 202 pointent vers la chaîne hydrocarbonée du 13(S)-HOD, et contribuent à établir un environnement hydrophobe (Li *et al.*, 2008) (Figure 11).

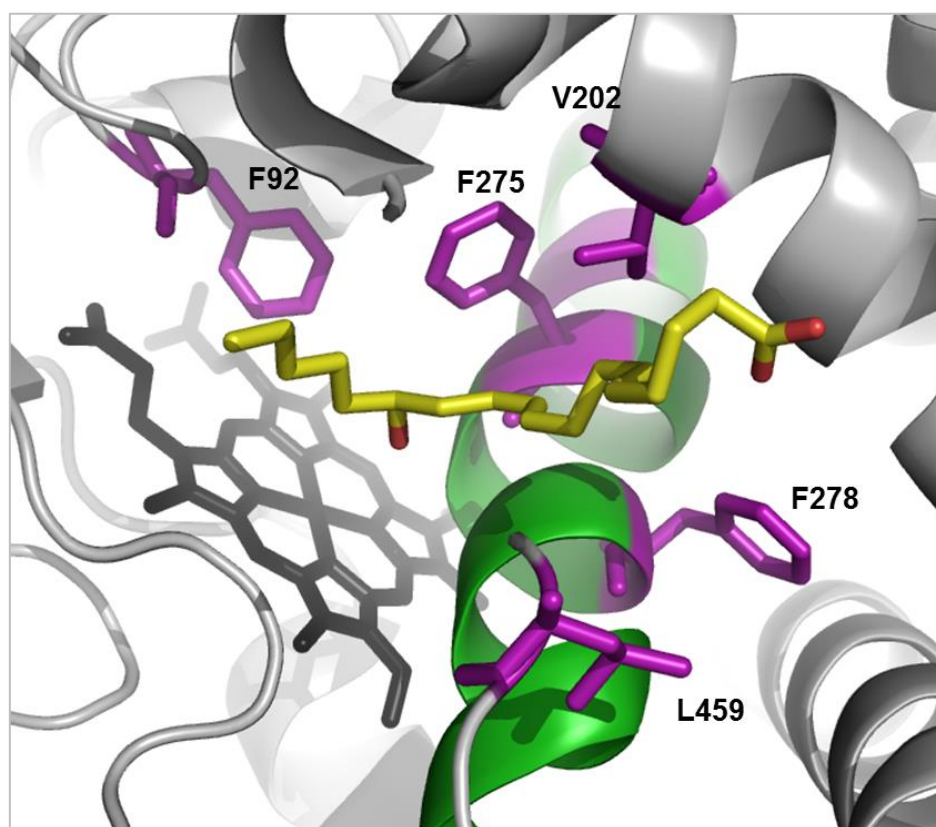


Figure 11 : Résidus hydrophobes du site actif de l'AOS de guayule

Cette figure est une vue agrandie du site catalytique de l'AOS de guayule co-cristallisée avec le 13(S)-HOD (PDB ID : 3DBM). La structure secondaire de l'enzyme apparaît en gris clair. Le 13(S)-HOD est représenté en jaune, et l'hème en noir. Les résidus hydrophobes F92, V202, F275, F278, et L459 colorés en violet, contribuent à établir un environnement hydrophobe au niveau du site actif. L'hélice I est colorée en vert.

L'hélice I comporte des résidus essentiels à la catalyse (Lee *et al.*, 2008 ; Brash 2009). Au niveau de la région centrale de cette hélice, la séquence F-N-T/S-X-G-G est conservée chez les AOS. Le résidu asparagine de cette séquence est conservé chez tous les CYP74. Cette asparagine se situe en position 321 chez l'AOS d'*Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2008), et en position 276 chez l'AOS de guayule (Li *et al.*, 2008). Elle joue un rôle crucial dans la fixation du substrat et la catalyse, en établissant des liaisons hydrogène avec la fonction hydroperoxyde du substrat. Sa substitution par une alanine ou une glutamine diminue de 95% l'activité enzymatique (Hughes *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2008). Cette asparagine établit une liaison hydrogène avec un résidu sérine 155 chez l'AOS d'*Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2008) et 110 chez l'AOS de guayule (Li *et al.*, 2008). Chez l'AOS de guayule, Li *et al.*, (2008) mettent en évidence une lysine 282 potentiellement impliquée dans une interaction ionique avec le groupement carboxyle du substrat, pouvant jouer un rôle dans la reconnaissance et

la fixation de ce dernier. K282 établit également une liaison hydrogène avec la sérine 199, qui à son tour peut établir une liaison hydrogène avec le substrat (Figure 12).

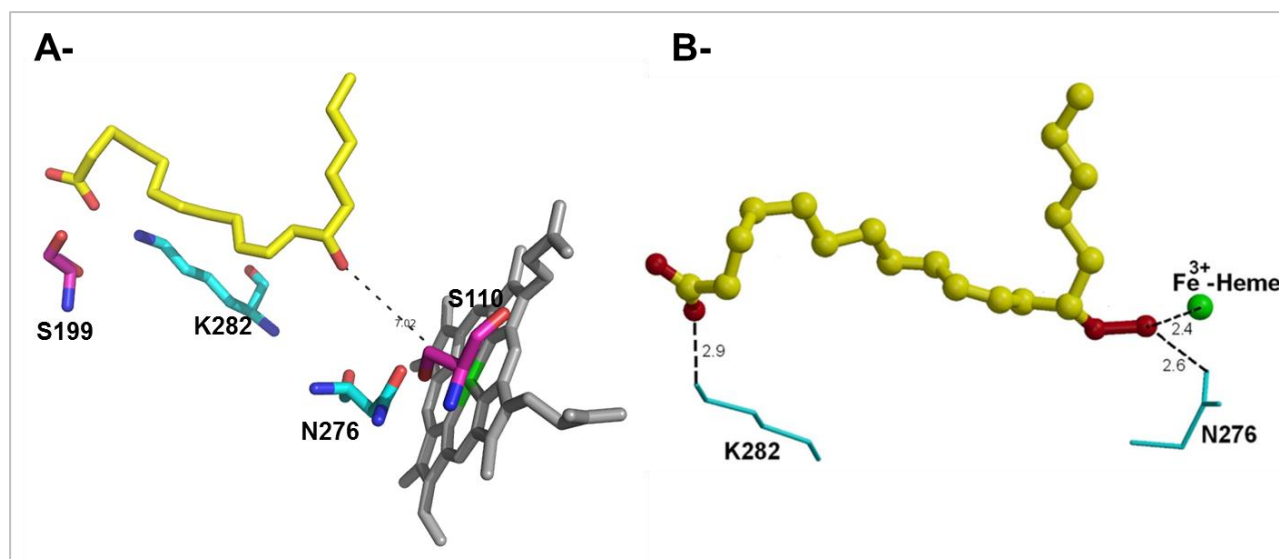


Figure 12 : Résidus catalytiques décrits par Li *et al.*, (2008) chez l'AOS de guayule
 (A) Représentation des résidus N276 et K282 (en cyan), et des résidus S110 et S199 (en rose) du site actif de l'AOS de guayule co-cristallisée avec le 13(S)-HOD (en jaune). L'hème est coloré en gris, avec en son centre l'atome de fer apparaissant en vert. (B) Modélisation du positionnement du 13(S)-HPOD (en jaune) dans le site actif de l'AOS de guayule, et des interactions potentielles (en pointillés) avec les résidus N276 et K282 (en cyan). L'atome de fer apparaît comme une sphère verte. Le groupement hydroperoxyde du 13(S)-HPOD se positionnerait à environ 2,4 Å de l'atome de fer, alors que le groupement hydroxyle du 13(S)-HOD se situe à environ 7 Å du fer.

- **Interconversions entre activités DES, AOS et HPL**

L'activité catalytique des enzymes de la classe CYP74 a pu être modifiée par des mutations ponctuelles. La DES de tabac et la DES de lin ont ainsi été converties en AOS en effectuant respectivement les mutations V379F et E292G (Toporkova *et al.*, 2013). Le mutant S297A de l'AOS de tomate possède une activité HPL, tandis que l'activité AOS a été diminuée de moitié (Toporkova *et al.*, 2008). Lee *et al.*, (2008) ont étudié le rôle du résidu F137 dans le mécanisme catalytique de l'AOS et démontré que la substitution de ce résidu par une leucine entraînait la formation de produits de l'HPL.

II. Les hydroperoxydes lyases de plantes supérieures

Tressl et Drawert (1973) ont mis en évidence, chez la banane, une activité « aldéhyde lyase » responsable de la transformation des hydroperoxydes d'acides linoléique et linolénique en aldéhydes à 6 ou 9 atomes de carbones et 12- ou 9-oxoacide. L'enzyme catalysant ces réactions a été appelée hydroperoxyde lyase (HPL) (Vick et Zimmerman 1976).

II.1. Diversité

A ce jour, l'HPL a été mise en évidence dans de nombreuses espèces végétales. L'enzyme est présente dans divers organes, aussi bien dans les tissus photosynthétiques que non-photosynthétiques. Elle a notamment été identifiée dans les feuilles de tomate (Fauconnier *et al.*, 1997) et de menthe (Gargouri *et al.*, 2004), les hypocotyles de tournesol (Itoh et Vick 1999), dans des fruits comme l'olive (Salas et Sanchez 1999 ; Padilla *et al.*, 2010), le poivron vert (Shibata *et al.*, 1995 ; Husson et Belin 2002) et le concombre (Matsui *et al.*, 2000c), et également dans les tubercules de pomme de terre (Mu *et al.*, 2012), les graines de soja (Matoba *et al.*, 1985) et le riz (Kuroda *et al.*, 2005).

II.2. Nomenclature

Les HPL de plantes supérieures peuvent être classées en fonction de leur régiospécificité, c'est-à-dire selon la position de la fonction hydroperoxyde du substrat sur lequel elles agissent (Grechkin 1998 ; Gargouri et Akacha 2008).

- ✓ Les HPL spécifiques des 13-hydroperoxydes (13-HPL) ont été mises en évidence notamment chez la tomate (Matsui *et al.*, 2000b ; Suurmeijer *et al.*, 2000), le tournesol (Itoh et Vick 1999), la pomme de terre (Mu *et al.*, 2012), la betterave (Rabetafika *et al.*, 2008), la pastèque (Fukushige et Hildebrand 2005) et l'olive (Salas et Sanchez 1999 ; Padilla *et al.*, 2010).
- ✓ Les HPL spécifiques des 9- hydroperoxydes (9-HPL) comprennent par exemple une HPL de poire (Kim et Grosch 1981), et l'HPL d'amande (Mita *et al.*, 2005).

- ✓ Enfin, les HPL à double spécificité c'est à dire agissant à la fois sur les 9- et les 13-hydroperoxydes (9/13-HPL), sont retrouvées notamment chez le riz (Kuroda *et al.*, 2005), le melon (Tijet *et al.*, 2001) et le concombre (Matsui *et al.*, 2000c).

Les 9-HPL et les 9/13-HPL sont classées, avec les AOS à double spécificité, parmi les CYP74C, tandis que les 13-HPL occupent, à elles seules, la classe des CYP74B.

La présence de 9- ou 13-HPL peut varier selon les organes d'une même plante. Par exemple, chez le concombre, les cotylédons présentent une activité 13-HPL prédominante, alors que dans les racines l'activité 9-HPL est majoritaire (Hatanaka *et al.*, 1988).

II.3. Localisation intracellulaire

La plupart des HPL de plantes supérieures sont liées à une membrane (Gardner 1991 ; Blee et Joyard 1996 ; Grechkin 1998 ; Noordermeer *et al.*, 2001a ; Gigot *et al.*, 2010). Les 13-HPL d'olive (Salas et Sanchez 1999), de tomate (Howe *et al.*, 2000) et d'*Arabidopsis thaliana* (Bate *et al.*, 1998) sont fixées aux membranes de l'enveloppe des chloroplastes. En effet, une séquence codant pour un peptide d'adressage chloroplastique situé à l'extrémité N-terminale de l'enzyme, a été mise en évidence chez la 13-HPL d'olive (Padilla *et al.*, 2010) et la 13-HPL d'*Arabidopsis thaliana* (Bate *et al.*, 1998). En revanche, ce peptide signal est absent chez la 13-HPL de tomate (Howe *et al.*, 2000 ; Froehlich *et al.*, 2001). Maucher *et al.*, (2000) et Froehlich *et al.*, (2001) ont émis l'hypothèse selon laquelle la présence ou l'absence de peptide signal impliquerait des voies d'adressage différentes, mais conduisant toutes deux à la localisation de l'enzyme au niveau de l'enveloppe des chloroplastes. Les 9- ou 9/13-HPL quant à elles, sont retrouvées au niveau des membranes de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Perez *et al.*, 1999) ou des corps lipidiques (Mita *et al.*, 2005 ; De Domenico *et al.*, 2007), mais les séquences d'adressage à ces compartiments cellulaires ne sont pas connues chez les HPL.

Deux voies pourraient aboutir à la synthèse d'aldéhydes volatils. La première serait cytosolique et concernerait les 9-hydroperoxydes, tandis que la seconde, relative aux 13-hydroperoxydes, se déroulerait en partie dans le chloroplaste (Blee 2002 ; Hughes *et al.*, 2009). La voie cytosolique débiterait par la libération d'acides gras polyinsaturés des membranes plasmiques sous l'action de phospholipases A ou D (Blee 2002). Ces acides

gras libres seraient ensuite métabolisés par des 9-LOX du cytosol ou de la membrane externe des chloroplastes, en 9-hydroperoxydes clivés enfin par des 9-HPL (Feussner et Wasternack 2002 ; Stumpe et Feussner 2006). Alternativement, les acides gras polyinsaturés pourraient être libérés des phospholipides ou galactolipides présents dans les thylakoïdes ou l'enveloppe des chloroplastes par des phospholipases A1 ou des galactolipases présentes dans ces plastes (Ishiguro *et al.*, 2001 ; Blee 2002). Après action de 13-LOX chloroplastiques, les 13-hydroperoxydes produits pourraient être métabolisés par les 13-HPL de l'enveloppe des chloroplastes (Froehlich *et al.*, 2001 ; Blee 2002).

II.4. Mode d'action

D'un point de vue réactionnel, les HPL présentent un pH optimum d'action compris entre 5,5 et 8 (Kim et Grosch 1981 ; Schreier et Lorenz 1982 ; Vick et Zimmerman 1987 ; Matsui *et al.*, 1989 ; Shibata *et al.*, 1995 ; Salas et Sanchez 1999 ; Mu *et al.*, 2012), et une température optimale allant de 20 à 45°C (Gigot *et al.*, 2010 ; Long *et al.*, 2010b ; Padilla *et al.*, 2010 ; Mu *et al.*, 2012).

II.4.a) Les substrats

Les substrats des HPL végétales doivent répondre à plusieurs exigences structurales. Ils doivent : (i) se présenter sous la forme d'une longue chaîne d'acide gras (plus de 12 carbones) avec un groupement carboxyle terminal, (ii) porter un groupement hydroperoxyde sur le C9 ou le C13, dans la configuration (S), et (iii) comporter un système diénique conjugué (*Z,E*) avec la double liaison adjacente au carbone porteur de la fonction hydroperoxyde (Hatanaka *et al.*, 1987 ; Hatanaka *et al.*, 1992 ; Fauconnier et Marlier 1997b ; Noordermeer *et al.*, 2001a).

Les 9(S)- et 13(S)-hydroperoxydes obtenus à partir de l'acide linoléique (acide (9*Z*,12*Z*)-octadécadiénoïque) et de l'acide α -linoléique (acide (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadécatriénoïque) constituent les principaux substrats naturels de ces enzymes. Le nombre et la position des insaturations ont une influence. Ainsi, les hydroperoxydes d'acide γ -linoléique (acide (6*Z*,9*Z*,12*Z*)-octadécatriénoïque) ne sont que faiblement transformés par l'HPL et le 15-hydroperoxyde d'acide arachidonique (acide 15-hydroperoxy-(5*Z*,8*Z*,11*Z*,13*E*)-éicosatétraénoïque, 15-HPETE) n'est pas un substrat de l'enzyme (Hatanaka *et al.*, 1982 ;

Hatanaka *et al.*, 1987 ; Hatanaka *et al.*, 1992). La présence du groupement carboxyle sur le substrat est essentielle. En effet, sa substitution par un méthyl ester ou un alcool diminue de moitié l'activité de l'HPL (Hatanaka *et al.*, 1982 ; Hatanaka *et al.*, 1987). L'HPL serait également capable de convertir les hydroperoxydes d'acides gras estérifiés au sein des MGDG (Nakashima *et al.*, 2013). L'activité HPL augmente avec le nombre de carbones pour des acides gras de 18 (substrats naturels) à 22 carbones, et diminue au-delà (Hatanaka *et al.*, 1992). Enfin, l'action de l'HPL serait stéréospécifique, privilégiant les hydroperoxydes de configuration (S) (Gardner 1991 ; Fauconnier et Marlier 1997b). Des études ont montré que seul l'isomère (S) de mélanges de 13(R)- et 13(S)-hydroperoxydes est converti en aldéhydes volatils par l'HPL (Kajiwara *et al.*, 1982 ; Matoba *et al.*, 1985).

II.4.b) Les produits

Chez les plantes supérieures, l'action de l'HPL aboutit au clivage des 9(S)- ou 13(S)-hydroperoxydes d'acide linoléique ou d'acide linolénique (9(S)- ou 13(S)-HPOD ou HPOT), au niveau de la liaison entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et le carbone insaturé (Delcarte *et al.*, 2000 ; Grechkin 2002) (Figure 13).

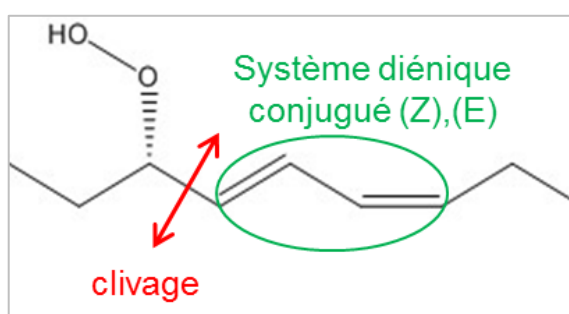


Figure 13 : Clivage des hydroperoxydes d'acides gras consécutif à l'action de l'HPL chez les plantes supérieures

Le clivage, représenté par une flèche rouge, s'effectue au niveau de la liaison entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et le carbone impliqué dans la double liaison du système diénique conjugué (Z),(E) entouré en vert sur la figure.

- L'action d'une 9-HPL sur un 9-hydroperoxyde produit une molécule d'acide 9-oxononanoïque et un aldéhyde à 9 carbones, pouvant être le (Z)-non-3-énal à partir du 9(S)-HPOD ou le (Z),(Z)-nona-3,6-diéнал à partir du 9(S)-HPOT (Kim et Grosch 1981 ; Gardner *et al.*, 1991 ; Grechkin 1998 ; Tijet *et al.*, 2001 ; Mita *et al.*, 2005) (Figure 14A).

- L'action d'une 13-HPL sur un 13-hydroperoxyde produit une molécule d'acide (*Z*)-12-oxo-9-dodécénoïque et un aldéhyde à 6 carbones, pouvant être l'hexanal à partir du 13(*S*)-HPOD ou le (*Z*)-hex-3-énal à partir du 13(*S*)-HPOT (Vick et Zimmerman 1976 ; Gardner *et al.*, 1991 ; Grechkin 1998 ; Salas et Sanchez 1999 ; Noordermeer *et al.*, 2000) (Figure 14B).

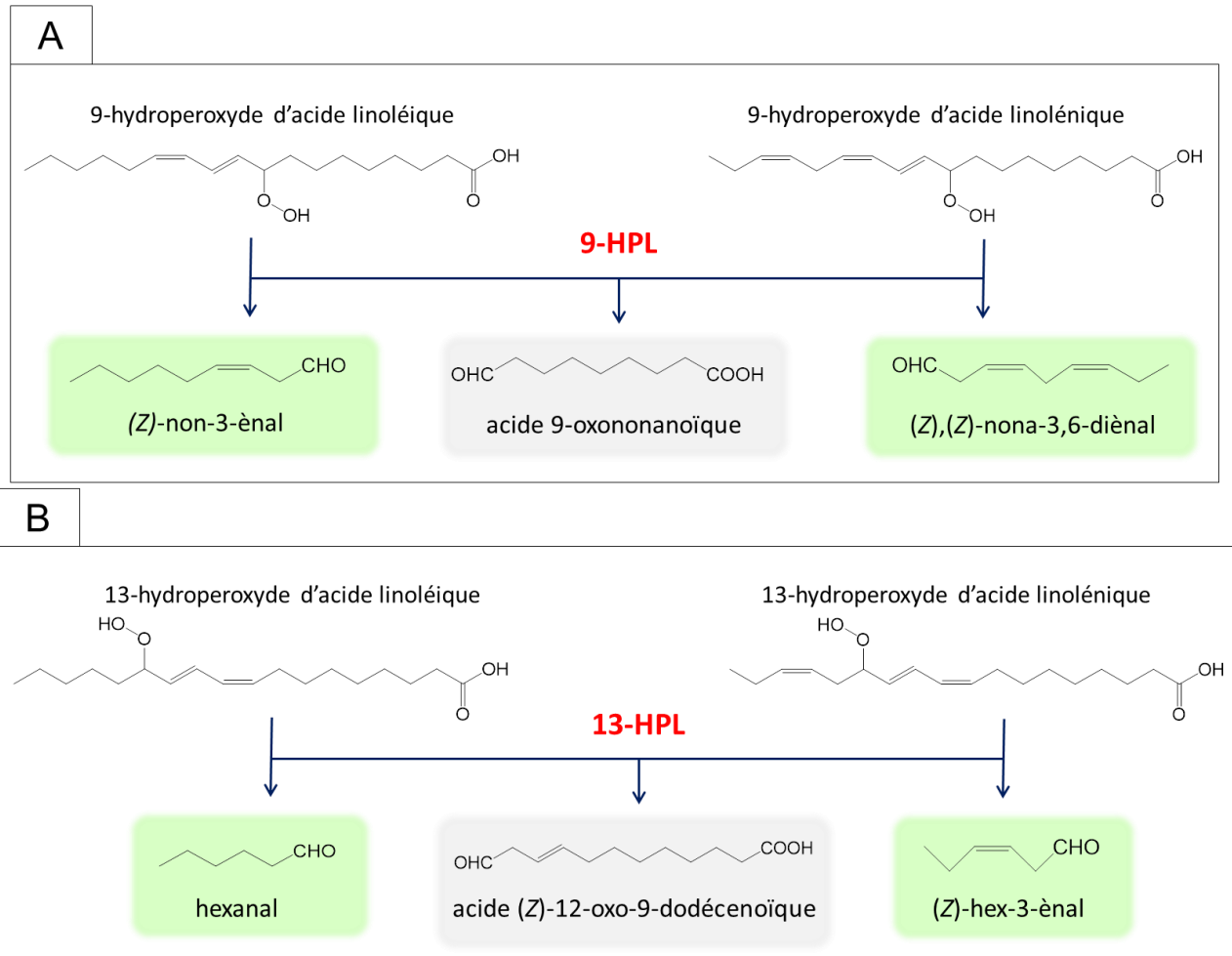


Figure 14 : Composés formés suite à l'action de 9-HPL (A) ou de 13-HPL (B) sur des 9- ou des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique

Les aldéhydes volatils à 6 ou 9 carbones sont colorés en vert, et les ω -oxoacides sont colorés en gris.

- Les HPL à double spécificité agissant à la fois sur les 9- et 13-hydroperoxydes produisent donc un mélange d'aldéhydes à 6 et 9 carbones et des 9- et 12-oxoacides (Tijet *et al.*, 2001 ; Kuroda *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2012).

II.4.c) Mécanisme réactionnel

En l'absence du substrat, l'atome de fer catalytique sous la forme Fe(III) est lié au groupement sulfhydryle (-SH) d'un résidu cystéine de l'HPL, et à une molécule d'eau. Un résidu asparagine établit des liaisons hydrogènes avec la molécule d'eau (Noordermeer *et al.*, 2001a) (Figure 15, étape 1). Les résidus cystéine et asparagine sont conservés chez toutes les HPL. Lors de l'arrivée du substrat dans le site actif de l'enzyme la molécule d'eau est éliminée. Le Fer (III) est alors coordonné avec l'atome d'oxygène terminal de la fonction hydroperoxyde du substrat. Des liaisons hydrogène sont établies entre le groupement amide de l'asparagine et les deux atomes d'oxygène de la fonction hydroperoxyde (Lee *et al.*, 2008) (Figure 15, étape 2). Il en résulte le clivage homolytique de la liaison O–O de l'hydroperoxyde, formant un radical alcoyle (RO•) et un complexe ferryl-hydroxo Fe(IV)-OH (Noordermeer *et al.*, 2000) (Figure 15, étape 3). Les liaisons hydrogènes entre l'asparagine et les oxygènes sont maintenues. Un réarrangement de la double liaison entre les carbones 11 et 12 du substrat crée une cyclisation autour de l'atome d'oxygène du radical, entraînant l'abstraction d'un hydrogène sur le C11. Un 12,13-époxyde avec un radical (C•) au niveau du C11 est ainsi généré (Lee *et al.*, 2008) (Figure 15, étape 4). Ce radical époxycarbonyl n'étant pas stabilisé, il y a scission de la liaison entre le C12 et le C13. Une double liaison s'établit entre le C11 et le C12, et le radical formé au niveau du C13 subit une oxygénation par fixation du groupement OH cédé par le fer (Grechkin et Hamberg 2004) (Figure 15, étape 5). Un hémiacétal instable est alors généré (Figure 15, étape 6), puis se clive spontanément pour former un aldéhyde à courte chaîne carbonée et un énol instable qui donne un ω -oxoacide (Grechkin *et al.*, 2003 ; Grechkin *et al.*, 2006) (Figure 15, étape 7).

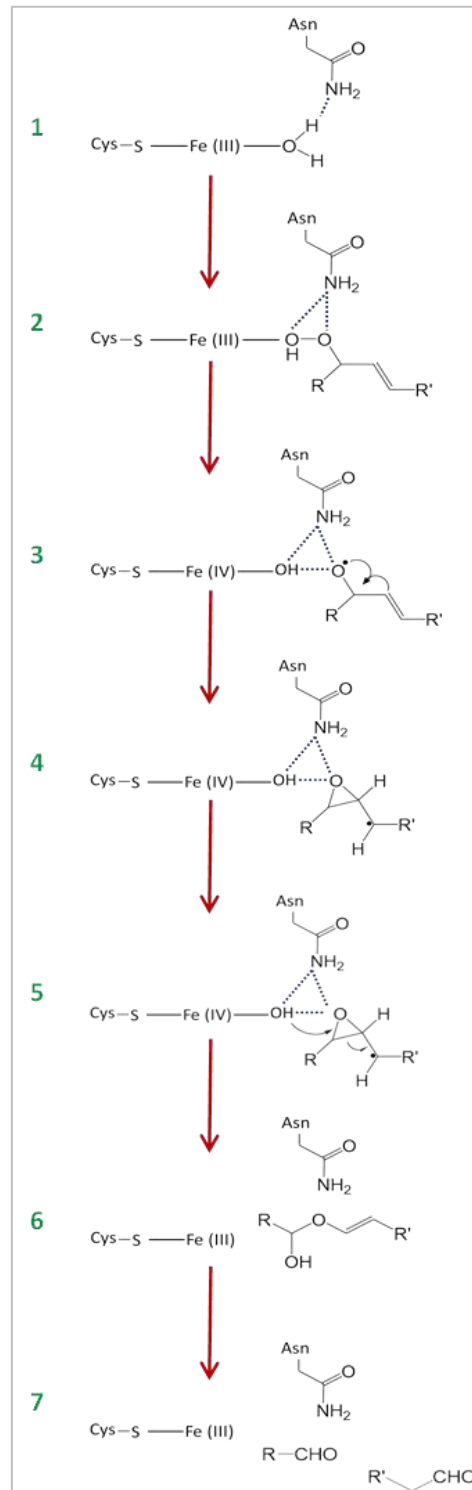


Figure 15 : Schéma du mécanisme réactionnel de l'HPL (Lee et al., 2008)

En l'absence de substrat, l'atome de fer de l'hème est coordonné avec un résidu cystéine et une molécule d'eau qui établit des liaisons hydrogène avec un résidu asparagine (1). L'arrivée du substrat décroche la molécule d'eau (2). Après le clivage de la liaison O-O de la fonction hydroperoxyde du substrat (3), un radical époxycarbonyl est généré (4). La formation d'une liaison entre les carbones 12 et 13 et l'oxygénation du carbone 13 (5) conduisent à la formation d'un hémiacétal (6) se clivant spontanément en aldéhyde et oxoacide (7). R et R' représentent les chaînes carbonées, respectivement vers les extrémités méthyle et carboxyle du substrat.

Les HPL agissent donc comme des isomérases pour catalyser le réarrangement homolytique des 9- et/ou 13-hydroperoxydes en hémicétals (Grechkin *et al.*, 2006). Le véritable produit de la réaction enzymatique de l'HPL est donc un hémicétal à courte durée de vie qui se dissocie spontanément en aldéhyde volatil et oxoacide (Grechkin *et al.*, 2003).

II.4.d) Inhibition

- **Inhibition irréversible par les intermédiaires réactionnels**

Lorsque la quantité d'hydroperoxydes est en excès par rapport à celle de l'HPL, la vitesse de réaction chute et devient nulle avant que la totalité du substrat ait été consommée (Matsui *et al.*, 2000b ; Suurmeijer *et al.*, 2000). Seul un nouvel ajout d'enzyme permet d'observer à nouveau une activité (Matsui *et al.*, 2000b). L'HPL subit donc une inhibition irréversible. Ce mécanisme d'inactivation suicide est un phénomène couramment retrouvé chez les cytochromes P450. Les études réalisées par Matsui *et al.*, (1992), Matsui *et al.*, (2000b), et Suurmeijer *et al.*, (2000) ont conclu que les hydroperoxydes reconnus spécifiquement par le site actif de l'HPL sont transformés en espèces radicalaires responsables de l'oxydation du groupement sulfhydryle (-SH) de la cystéine impliquée dans la liaison avec l'atome de fer catalytique. Le dithiothréitol (DTT) ainsi que les antioxydants organiques tels que l' α -tocophérol, le butylhydroxyanisole et le butylhydroxytoluène protègent l'HPL contre cette inactivation (Matsui *et al.*, 1992 ; Matsui *et al.*, 2000b), ce qui confirme que l'oxydation du groupement -SH contribue à l'inactivation de l'enzyme.

- **Inhibition par les aldéhydes α,β -insaturés**

L'HPL n'est pas inhibée par les produits directs de son action (hexanal ou (*Z*)-hex-3-*en*al par exemple) mais par les aldéhydes α,β -insaturés obtenus après isomérisation (notamment (*E*)-hex-2-*en*al), qui peuvent se lier au groupement sulfhydryle (Suurmeijer *et al.*, 2000 ; Long *et al.*, 2010b).

- **Inhibiteurs artificiels**

L'HPL peut être inhibée par des chélateurs de métaux tels que l'acide salicylique et le mésylate de déféroxamine (Desferal), connus pour inhiber les enzymes héminiques (Itoh et Vick 1999 ; Matsui *et al.*, 2000b ; Suurmeijer *et al.*, 2000). L'acide nordihydroguaiarétique inactive l'HPL en réduisant le fer catalytique sous sa forme active Fe(III), en forme inactive

Fe(II) (Kemal *et al.*, 1987 ; Long *et al.*, 2010b). Le pipéronylbutoxyde et le 2-méthyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone (Métyrapone), inhibiteurs des enzymes de la famille des cytochromes P450, inhibent également l'HPL (Itoh et Vick 1999 ; Suurmeijer *et al.*, 2000).

II.5. Structure et relations structure-fonction

La masse moléculaire des HPL varie entre 170 et 250 kDa (Vick et Zimmerman 1976 ; Schreier et Lorenz 1982 ; Olias *et al.*, 1990 ; Shibata *et al.*, 1995). Ces enzymes se présentent sous la forme de trimères (Shibata *et al.*, 1995 ; Fauconnier *et al.*, 1997 ; Husson et Belin 2002) ou de tétramères (Itoh et Vick 1999 ; Tijet *et al.*, 2000). Chaque sous unité possède une masse moléculaire généralement comprise entre 50 et 60 kDa (Olias *et al.*, 1990 ; Matsui *et al.*, 1991 ; Tijet *et al.*, 2000 ; Gomi *et al.*, 2003 ; Long *et al.*, 2010b).

Comme tous les CYP74, l'HPL est une protéine héminique comportant un hème *b* par sous unité (Shibata *et al.*, 1995 ; Matsui *et al.*, 1996 ; Itoh et Vick 1999). Les ligands du fer sont également identiques, avec notamment un résidu cystéine conservé représentant le ligand proximal (Tijet *et al.*, 2000 ; Noordermeer *et al.*, 2001b ; Psylinakis *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2012).

La structure secondaire de l'enzyme a été étudiée par dichroïsme circulaire (Santiago-Gomez *et al.*, 2008 ; Santiago-Gomez *et al.*, 2010 ; Panagakou *et al.*, 2013). Santiago-Gomez *et al.*, (2010) ont montré que la structure secondaire de l'HPL recombinante de poivron vert se compose de 13% d'hélices α , 29% de feuillets β , 5% de tours et 53% de pelote statistique.

A ce jour, aucune structure cristalline d'HPL n'a été obtenue. Des études *in silico* à l'aide d'outils de modélisation moléculaire sont donc réalisées. Un modèle tridimensionnel de l'HPL de luzerne tronquée a été construit par Hughes *et al.*, (2008), par homologie avec un cytochrome P450, une monooxygénase de lapin (CYP25C, PDB ID : 1DT6). Les six sites de reconnaissance du substrat (SRS) décrits chez les AOS et les autres P450, ont été identifiés chez cette HPL. La mise en évidence d'une poche hydrophobe pouvant correspondre au site catalytique, et un docking avec une molécule de 13-HPOT, ont permis de préciser la localisation des résidus du domaine central de l'hélice I (SRS 4), potentiellement impliqués dans la fixation du substrat. Ainsi, le résidu asparagine du SRS4, situé en position 285 chez

cette HPL de luzerne, conservé chez tous les CYP74 et décrit chez l'AOS comme un résidu clé dans le mécanisme catalytique de ces enzymes, est localisé à proximité du fer de l'hème et peut établir des liaisons hydrogène avec la fonction hydroperoxyde du substrat (Hughes *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2008) (Figure 16).

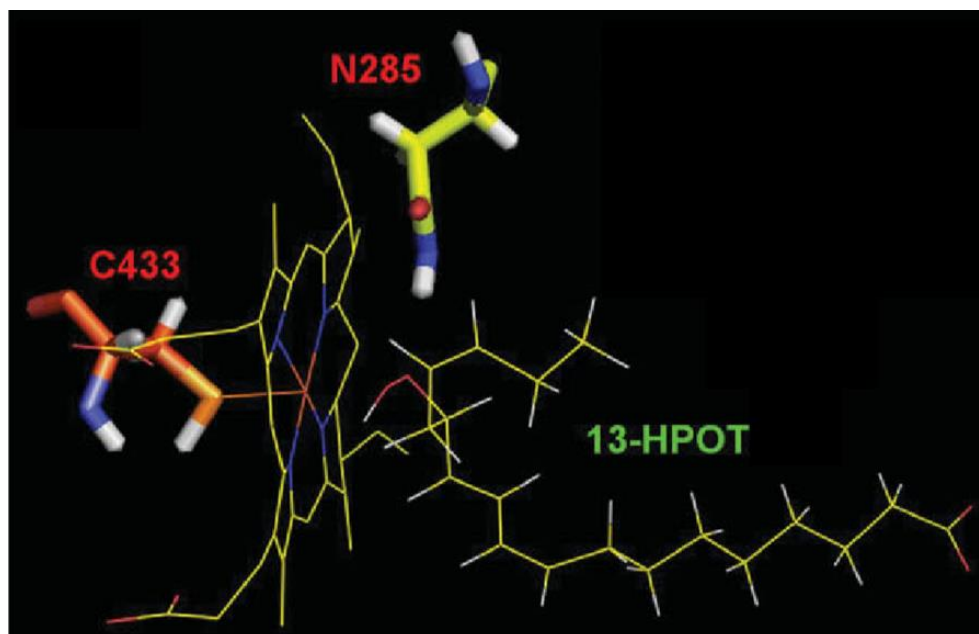


Figure 16 : Modèle tridimensionnel du site actif putatif de CYP74C3 (Hughes *et al.*, 2008)
L'HPL de luzerne tronquée (CYP74C3) a été modélisée par homologie avec une monooxygénase (CYP25C, PDB ID : 1DT6). Le site actif putatif a été identifié et un docking moléculaire avec un 13-HPOT a permis de cibler les résidus phénylalanine F287 et asparagine N285, impliqués respectivement dans le positionnement du substrat et la catalyse. Le résidu cystéine C433 est le ligand proximal de l'hème.

Chez l'HPL, le domaine central de l'hélice I est formé par la séquence consensus F-N-A-X-G-G. Par la présence du résidu alanine, cette séquence diffère de celle retrouvée chez l'AOS qui possède un résidu sérine ou thréonine à cette position (Toporkova *et al.*, 2008) (Figure 17).

Enzyme	Numéro d'accèsion	Séquence											
		*	*	*	*	*	*						
LeAOS3	AAN76867	289	L	A	G	F	N	S	Y	G	G	L	K
StAOS	CAI30876	289	L	A	G	F	N	S	Y	G	G	M	K
AtAOS	AED94842	317	A	T	C	F	N	T	W	G	G	M	K
PaAOS	CAA55025	269	A	V	C	F	N	T	F	G	G	V	K
LeAOS	AAF67141	308	A	T	C	F	N	S	F	G	G	M	K
LuAOS	AAA03353	332	A	V	C	F	N	S	W	G	G	F	K
MtAOS	CAC86897	320	A	T	C	F	N	S	F	G	G	M	K
LeHPL	AAF67142	280	I	L	G	F	N	A	F	G	G	F	S
CaHPL	AAK27266	285	I	L	G	F	N	A	F	G	G	F	T
PgHPL	AAK15070	298	I	L	G	F	N	A	F	G	G	F	S
MtHPL	CAC86898	278	T	L	G	F	N	A	F	G	G	L	T
CmHPL	AAK54282	276	L	A	G	F	N	A	Y	G	G	M	K

Figure 17 : Alignement des séquences en acides aminés du domaine central de l'hélice I d'AOS et d'HPL (d'après Toporkova *et al.*, 2008)

Les acides aminés appartenant à la séquence consensus F-N-T/S/A-X-G-G sont surmontés d'un astérisque. Le : Lycopersicon esculentum ; St : Solanum tuberosum ; At : Arabidopsis thaliana ; Pa : Parthenium argentatum ; Lu : Linum usitatissimum ; Mt : Medicago truncatula ; Ca : Capsicum annuum ; Pg : Psidium guajava ; Cm : Cucumis melo

La substitution chez la 9/13-AOS de la tomate, de la sérine 297 par un résidu alanine, permet la formation de produits de l'HPL, alors que l'activité AOS est fortement diminuée (Toporkova *et al.*, 2008). L'acide aminé présent à cette position pourrait donc être impliqué dans l'orientation du mécanisme catalytique vers la branche AOS ou la branche HPL.

D'autre part, sur la base d'alignements de séquences d'AOS et d'HPL, Lee *et al.*, (2008) ont constaté la substitution d'une phénylalanine chez l'AOS par une leucine chez l'HPL ainsi que la substitution d'une sérine chez l'AOS par une alanine ou une valine chez l'HPL (Figure 18).

Enzyme	Numéro d'accension		Séquence																			
AtAOS	AED94842	137	F	T	G	T	Y	M	P	S	T	E	L	T	G	G	Y	R	I	L	S	
PaAOS	CAA55025	92	F	T	G	T	Y	M	P	S	T	K	L	T	G	A	Y	R	V	L	S	
LuAOS	AAA03353	155	F	T	G	T	Y	M	P	S	T	E	L	T	G	G	Y	R	I	L	S	
MtAOS	CAC86897	143	F	T	G	T	Y	T	P	S	T	E	L	T	G	G	Y	R	V	L	S	
GmAOS	NP_001236445	138	F	T	G	T	F	M	P	S	T	Q	L	T	G	G	Y	R	V	L	S	
HbAOS	AAV27751	144	F	T	G	T	F	M	P	S	T	E	L	T	G	G	Y	R	I	L	S	
LeHPL	AAF67142	101	L	V	G	D	F	M	P	S	V	V	Y	T	G	D	M	R	V	C	A	
CaHPL	AAK27266	105	L	V	G	D	F	M	P	S	V	V	Y	T	G	D	M	R	V	C	A	
PgHPL	AAK15070	119	L	V	G	D	F	M	P	S	V	K	Y	T	G	N	I	R	V	C	A	
MtHPL1	CAC86898	97	L	D	G	T	F	M	P	S	T	D	F	F	G	G	Y	R	T	C	A	
CmHPL	AAK54282	96	L	D	G	T	Y	M	P	S	L	S	F	T	G	N	I	R	T	C	A	
AtHPL	AAC69871	118	L	I	G	D	F	R	P	S	L	G	F	Y	G	G	V	C	V	G	V	
HvHPL	CAC82980	104	L	I	G	P	Y	N	P	S	D	S	F	T	G	G	T	R	V	G	V	

Figure 18 : Aligement des séquences en acides aminés d'AOS et d'HPL (d'après Lee et al., 2008)

At : *Arabidopsis thaliana* ; *Pa* : *Parthenium argentatum* ; *Lu* : *Linum usitatissimum* ; *Mt* : *Medicago truncatula* ; *Gm* : *Glycine max* ; *Hb* : *Hevea brasiliensis* ; *Le* : *Lycopersicon esculentum* ; *Ca* : *Capsicum annum* ; *Pg* : *Psidium guajava* ; *Cm* : *Cucumis melo* ; *Hv* : *Hordeum vulgare*.

Le résidu phénylalanine 137 de l'AOS d'*Arabidopsis thaliana* a donc été substitué par un résidu leucine. Le mutant F137L, présentant une activité HPL, a ensuite été co-cristallisé avec une molécule de 13S-HOD (PDB ID : 3DSJ) (Lee et al., 2008). La Figure 19 montre la superposition des structures de l'AOS sauvage et de son mutant F137L, au niveau du site actif.

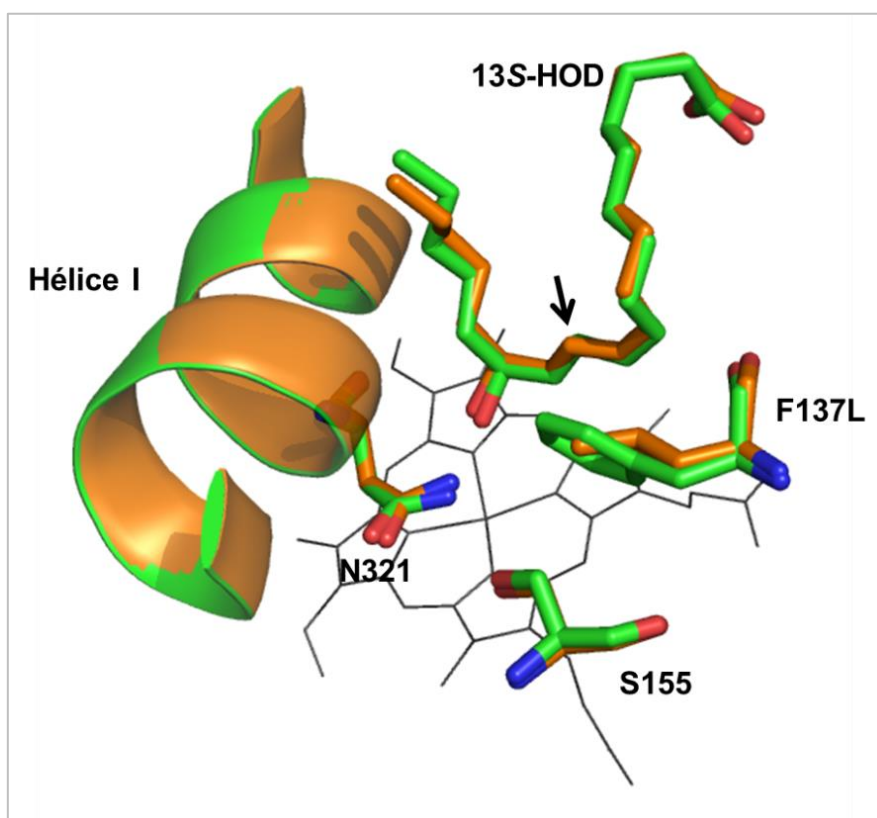


Figure 19 : Superposition de la structure de l'AOS d'*Arabidopsis thaliana* et de son mutant F137L au niveau du site actif (Lee et al., 2008).

Cette figure est une vue agrandie au niveau du site actif de l'AOS d'*Arabidopsis thaliana* (PDB ID : 2RCH, en vert) et de son mutant F137L (PDB ID : 3DSJ, en orange) présentant une activité HPL. Ces structures ont été co-cristallisées avec une molécule de 13S-HOD dont le carbone 11 est pointé par une flèche. L'hème est visible en gris foncé. Le résidu N321 de l'hélice I établit des liaisons hydrogène avec le fer de l'hème, la fonction hydroperoxyde du substrat et avec le résidu S155. Le résidu (F ou L) en position 137 serait responsable de l'orientation du mécanisme catalytique vers la branche AOS ou la branche HPL.

De la même manière, Lee et al., (2008) ainsi que Yoeun et al., (2016) ont effectué la substitution de la phénylalanine 92 par une leucine chez l'AOS de riz, ce qui a permis la production de 12-oxoacide par l'enzyme. L'implication du résidu à la position 137 dans le mécanisme catalytique et la spécificité réactionnelle de l'AOS et de l'HPL a été discutée (Lee et al., 2008). Les premières étapes des mécanismes catalytiques des deux enzymes sont identiques et aboutissent à la formation d'un époxyde avec un radical au niveau du carbone 11 (Lee et al., 2008 ; Brash 2009). Ils diffèrent cependant par la suite, principalement en fonction de la présence du résidu phénylalanine ou leucine 137 (Lee et al., 2008) (Figure 20).

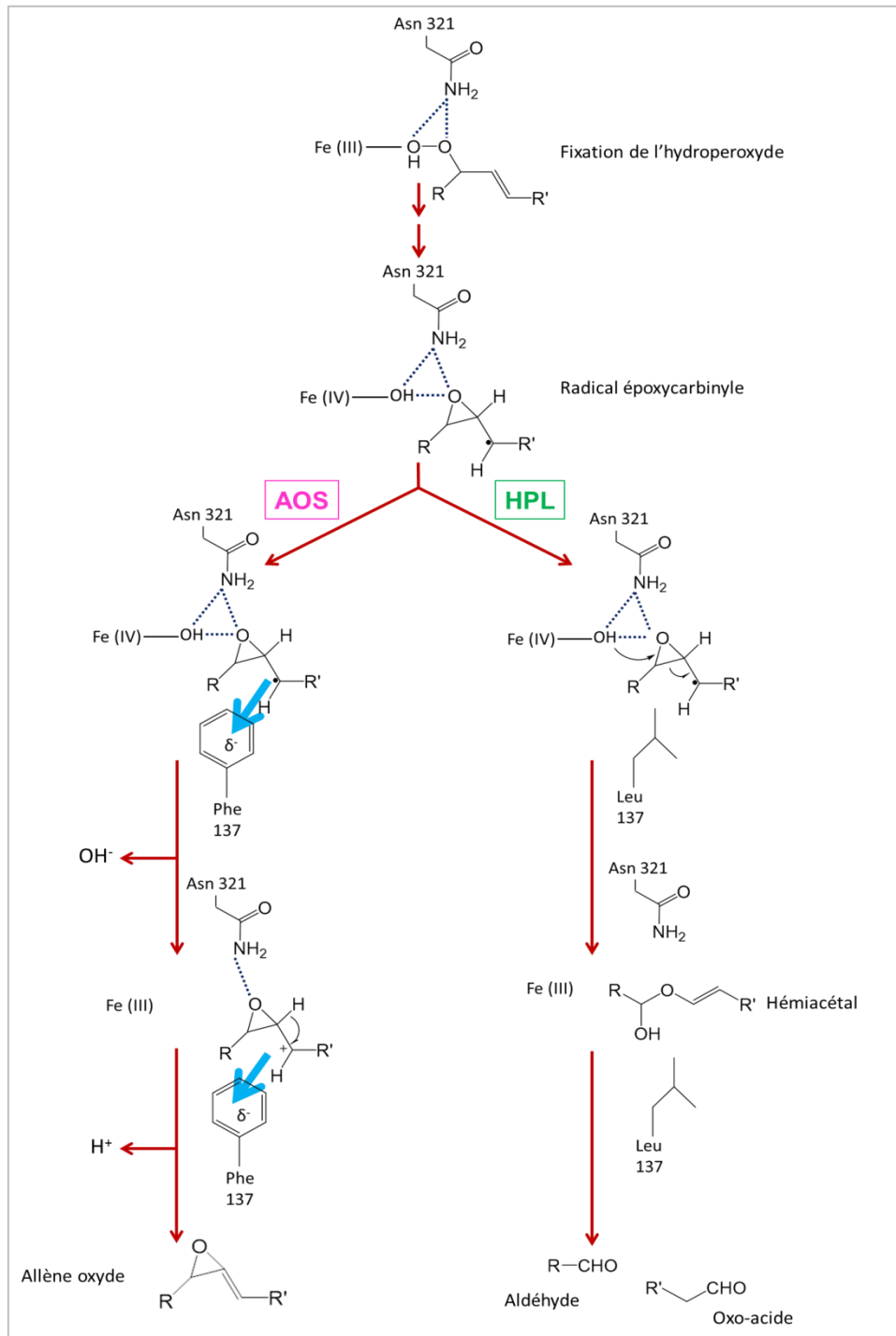


Figure 20 : Mécanismes réactionnels générant les produits de l'AOS ou de l'HPL (d'après Lee et al., 2008)

Dans les deux cas, les premières étapes sont identiques et aboutissent à la formation d'un radical époxycarbonyl. Le résidu asparagine 321 établit des liaisons hydrogène (en pointillés) avec les deux atomes d'oxygène de la fonction hydroperoxyde. La présence d'un résidu aromatique phénylalanine 137 rend possible l'oxydation du radical et stabilise le carbocation ainsi formé par des interactions cation- π (flèche bleue), ce qui favorise la formation d'un allène oxyde. La substitution de ce résidu par une leucine 137 ne permet pas la stabilisation du radical, ce qui oriente le mécanisme vers la formation de produits de l'HPL. R et R' représentent les chaînes carbonées, respectivement vers les extrémités méthyle et carboxyle du substrat.

Lee *et al.*, (2008) suggèrent que chez l'AOS, la présence du résidu phénylalanine 137 possédant un cycle aromatique stabilise le radical et rend possible son oxydation. Le carbocation formé est stabilisé grâce à des interactions cation- π avec le résidu F137, ce qui favorise la formation d'un allène oxyde. *A contrario*, la présence d'un résidu leucine à cette position n'entraîne pas de stabilisation du radical époxycarbinyloxyde, conduisant à la scission de la liaison entre les carbones du groupement époxyde, et orientant ainsi le mécanisme vers la formation d'un hémiacétal instable qui est le produit de l'HPL.

La construction d'un double mutant F137L/S155A de l'AOS d'*Arabidopsis thaliana* a permis de constater l'augmentation de l'activité HPL par rapport au simple mutant F137L (Lee *et al.*, 2008). En effet, à la différence de la sérine, l'alanine n'établit pas de liaison hydrogène avec le résidu N321. Dans le cas du mécanisme catalytique de l'AOS, l'établissement de cette liaison hydrogène pourrait favoriser l'abstraction de l'atome d'hydrogène du carbocation pour former un allène oxyde. Chez l'HPL, cette interaction est absente, et la refixation du groupement OH cédé par le fer participe à la formation de l'hémiacétal (Lee *et al.*, 2008).

II.6. Stabilité de l'HPL

L'HPL est souvent décrite comme une enzyme peu stable (Hall *et al.*, 2008 ; Akacha *et al.*, 2010 ; Gigot *et al.*, 2010). Suurmeijer *et al.*, (2000) montrent que l'HPL de tomate s'inactive après 24h à 4°C. Itoh et Vick (1999) ont remarqué une perte de 50% de l'activité de l'HPL de tournesol après conservation durant 48h à 4°C. Après 5 semaines de stockage à 4°C, seulement 12% de l'activité initiale de l'HPL de menthe est retrouvée (Akacha *et al.*, 2010). De plus, l'enzyme est sensible à la congélation (Akacha *et al.*, 2010 ; Long *et al.*, 2010a). L'activité de l'HPL d'*Amaranthus tricolor* diminue de 31,4% après 24h de stockage à -20°C (Long *et al.*, 2010a). Néanmoins, des composés tels que le glycérol (Suurmeijer *et al.*, 2000 ; Long *et al.*, 2010a), le saccharose (Suurmeijer *et al.*, 2000) ou le dithiothréitol (Hornostaj et Robinson 2000), peuvent être employés comme « cryoprotecteurs ». La lyophilisation en présence d'un lyoprotecteur tel que le KCl, peut également être utilisée comme moyen de conservation de l'enzyme. La lyophilisation des HPL de menthe et de *Penicillium camemberti* en présence de KCl a permis de préserver l'activité enzymatique durant plus de quatre semaines (Hall *et al.*, 2008 ; Akacha *et al.*, 2010). La stabilisation par

le KCl pourrait être attribuée à une élévation de la force ionique, ce qui conduit à une augmentation des interactions hydrophobes au sein de la protéine (Hall *et al.*, 2008).

D'autre part, l'ajout de sels, de sucres ou de polyols serait un moyen efficace pour stabiliser l'enzyme et améliorer l'activité catalytique (Gianfreda et Scarfi 1991 ; Koeduka *et al.*, 2003). Koeduka *et al.*, (2003) montrent que l'ajout de KCl 2 M, de NaCl 1 M ou de Na₂SO₄ 0,5 M dans le milieu réactionnel, permet d'augmenter l'activité spécifique de l'HPL d'orge recombinante purifiée. Par exemple, en présence de KCl 2 M, l'activité de l'enzyme est augmentée de plus de 5 fois. La présence de cations monovalents (potassium et sodium) contenus dans ces sels induirait un réarrangement spatial autour de l'hème dans le site actif de l'HPL (Koeduka *et al.*, 2003). Par ailleurs, la glycine semble être également un additif efficace. La présence de glycine à 10% (w/v) augmente de 2,5 fois l'efficacité catalytique de l'HPL d'un extrait de feuille de menthe (Akacha *et al.*, 2010).

L'ajout dans le milieu réactionnel, de composés visant à stabiliser l'HPL et/ou à augmenter son activité, pourrait permettre une augmentation de la production par l'enzyme, d'aldéhydes volatils ayant un intérêt industriel.

III. Les molécules à note verte

Les molécules à note verte désignent l'ensemble des aldéhydes à 6 et 9 atomes de carbones produits par la branche HPL de la voie de la LOX, ainsi que les alcools et esters correspondants. Elles sont produites par les plantes, généralement en réponse à des stimuli d'agression, et elles agissent comme phytoalexines dans les réactions de défense et la signalisation cellulaire. Elles sont en grande partie responsables de l'odeur de l'herbe fraîchement coupée, appelée « note verte ». Leurs propriétés antimicrobiennes et surtout aromatisantes sont particulièrement recherchées dans de nombreux secteurs industriels.

III.1. Production des molécules à note verte chez les plantes

III.1.a) Formation lors de la voie de la lipoxygénase

Au cours de la voie de la lipoxygénase, les actions successives de la LOX et de l'HPL sur l'acide linoléique et l'acide linoléinique aboutissent à la production d'aldéhydes à 6 ou 9

atomes de carbones, qui sont exclusivement de conformation *Z*. Ces molécules peuvent subir une isomérisation vers la forme isomérique *E*, qui peut se produire de manière spontanée en fonction des facteurs physiques du milieu (pH, température), ou être favorisée par une activité isomérase (Fauconnier et Marlier 1997a ; Grechkin 1998 ; Noordermeer *et al.*, 1999). Les aldéhydes peuvent également être réduits en alcools par une alcool déshydrogénase (ADH, EC 1.1.1.1) NAD-dépendante (Gigot *et al.*, 2010 ; Matsui *et al.*, 2012 ; Mwenda et Matsui 2014).

L'action d'une 13-HPL sur un 13-HPOD permet la formation d'hexanal, pouvant être converti en hexanol par l'ADH (Hughes *et al.*, 2009). L'action d'une 13-HPL sur un 13-HPOT aboutit à la libération de (*Z*)-hex-3-éanal, qui peut être réduit en (*Z*)-hex-3-énoïl par l'ADH, ou isomérisé en (*E*)-hex-2-éanal puis transformé par l'ADH en (*E*)-hex-2-énoïl (Hatanaka *et al.*, 1987 ; Blee 1998) (Figure 21).

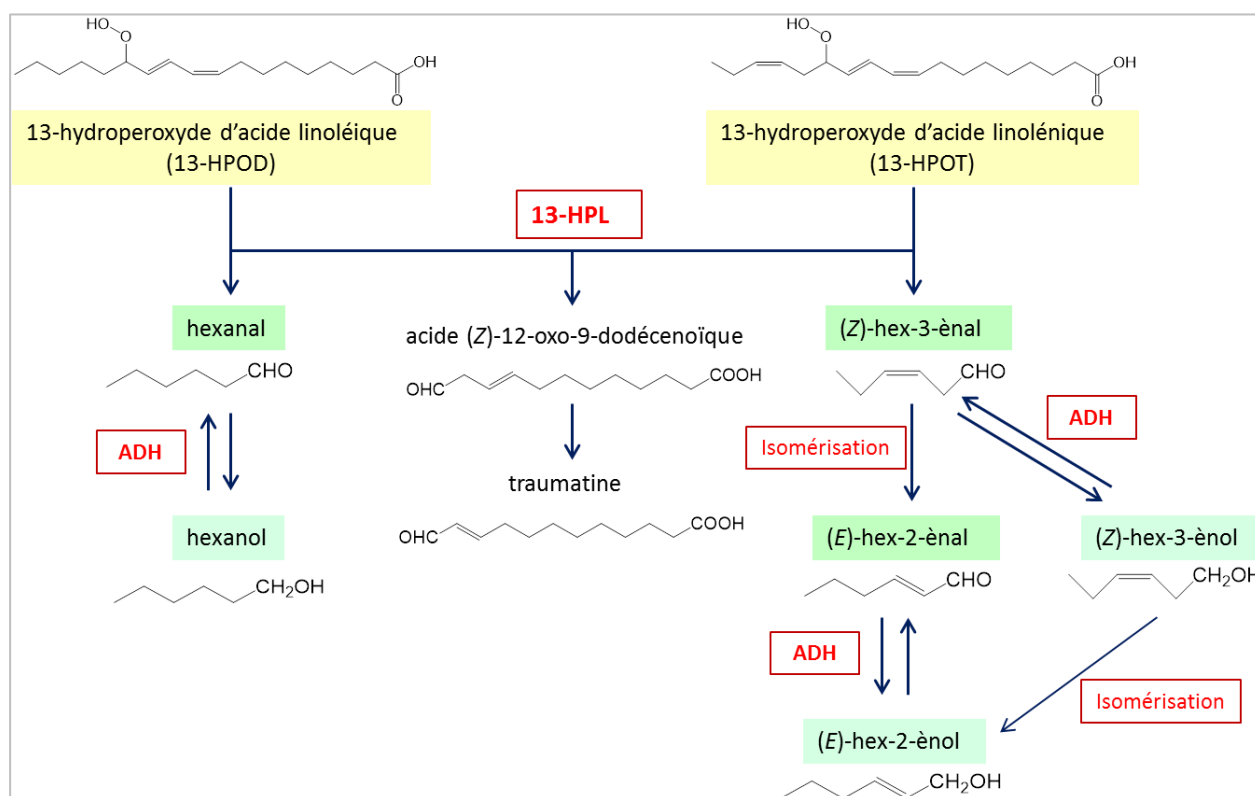


Figure 21 : Formation des composés volatils responsables de l'arôme par la branche HPL de la voie de la lipoxygénase, à partir de 13-hydroperoxydes

HPL : hydroperoxyde lyase ; *ADH* : alcool déshydrogénase. Les aldéhydes et alcools produits sont colorés respectivement en vert et en bleu. L'isomérisation peut se produire spontanément ou grâce à l'action d'une isomérase.

A partir du 9-HPOD, une 9-HPL produit une molécule de (*Z*)-non-3-énal qui peut être réduite en (*Z*)-non-3-énol par l'ADH, ou isomérisée en (*E*)-non-2-énal, puis transformée par l'ADH en (*E*)-non-2-énol. Si le substrat est le 9-HPOT, une molécule de (*Z*),(*Z*)-nona-3,6-dièneal est produite puis réduite en (*Z*),(*Z*)-nona-3,6-diénoal par l'ADH, ou isomérisée en (*E*),(*Z*)-nona-3,6-dièneal, puis transformée par l'ADH en (*E*),(*Z*)-nona-3,6-diénoal (Hatanaka *et al.*, 1986 ; Fauconnier et Marlier 1997a ; Hughes *et al.*, 2009) (Figure 22).

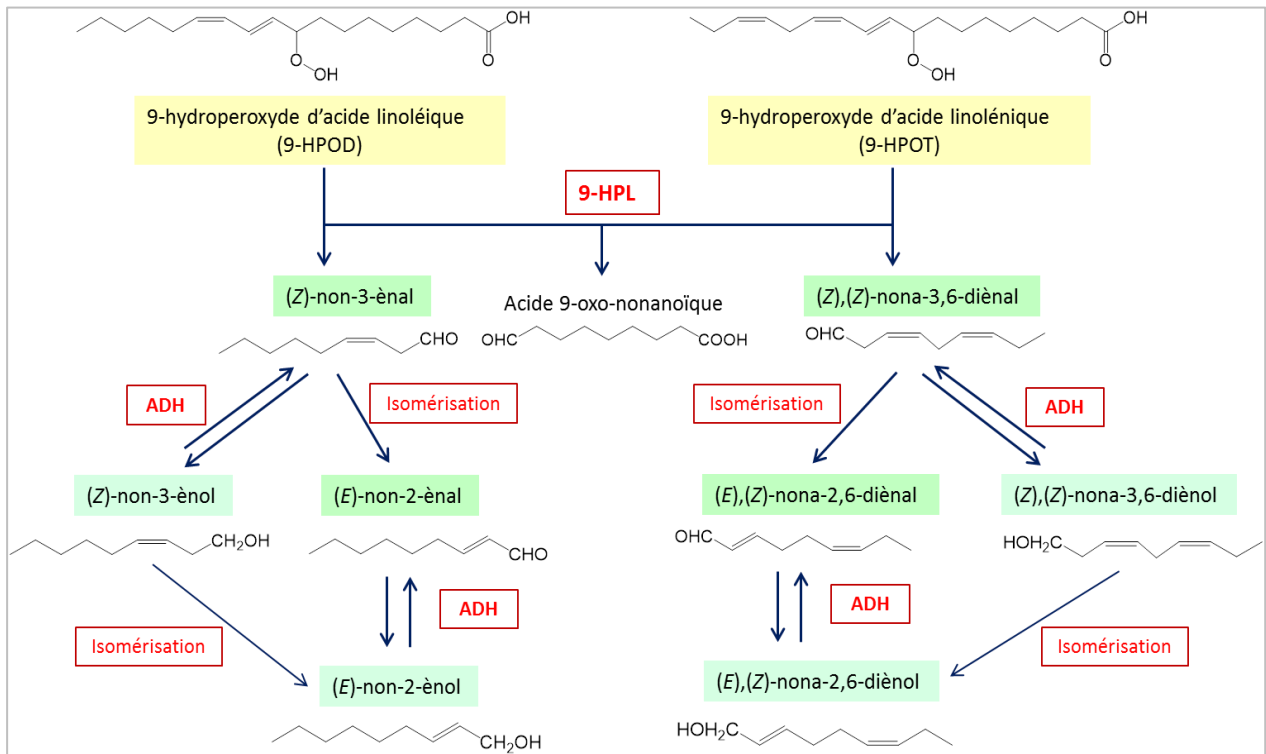


Figure 22 : Formation des composés volatils responsables de l'arôme par la branche HPL de la voie de la lipoxygénase, à partir de 9-hydroperoxydes

HPL : hydroperoxyde lyase ; *ADH* : alcool déshydrogénase. Les aldéhydes et alcools produits sont colorés respectivement en vert et en bleu. L'isomérisation peut se produire spontanément ou grâce à l'action d'une isomérase.

Les alcools à courte chaîne carbonée ainsi produits peuvent être transformés en esters correspondants par une alcool acétyle transférase (AAT), à l'aide de l'acétyl-coenzyme A (D'Auria *et al.*, 2007 ; Mwenda et Matsui 2014). L'AAT catalyse notamment la synthèse d'acétate de (*Z*)-hex-3-ényle à partir du (*Z*)-hex-3-énol (D'Auria *et al.*, 2007).

III.1.b) Fonctions biologiques

Les molécules à note verte, en particulier les aldéhydes et alcools volatils, agissent, au niveau de la plante, comme molécules de signalisation ou comme moyen de défense face à des microorganismes pathogènes ou des insectes ravageurs.

- **Effets sur les microorganismes**

Les aldéhydes à 6 et 9 atomes de carbones, notamment le (*E*)-hex-2-èneal et le (*Z*)-hex-3-èneal, exercent une activité bactéricide contre un large spectre de bactéries Gram + et Gram - (Nakamura et Hatanaka 2002). Croft *et al.*, (1993) ont montré l'effet létal du (*E*)-hex-2-èneal sur la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Les aldéhydes produits par l'HPL présentent également une activité antifongique. Matsui *et al.*, (2006) et Kishimoto *et al.*, (2008) ont mis en évidence le rôle de ces molécules dans la défense contre *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum*. Kubo *et al.*, (2003) ont montré l'action fongicide des aldéhydes α,β -insaturés sur *Saccharomyces cerevisiae*. L'action antimicrobienne de ces aldéhydes pourrait s'expliquer par la capacité de leur carbone α,β -insaturé à se complexer avec des groupements nucléophiles (sulfhydryle ou amines) des membranes, déstabilisant la bicouche lipidique et désorganisant la structure des protéines membranaires (pores, protéines de transport) (Kubo *et al.*, 1995 ; Kubo *et al.*, 2003).

- **Effet sur les insectes herbivores**

A la suite d'une attaque par un insecte herbivore, les feuilles lésées activent la formation de composés volatils à note verte. Ces composés agissent directement comme molécules répulsives mais peuvent également prévenir les plantes voisines afin qu'elles se prémunissent d'une éventuelle attaque (Arimura *et al.*, 2000 ; Arimura *et al.*, 2001 ; Matsui 2006) (Figure 23).

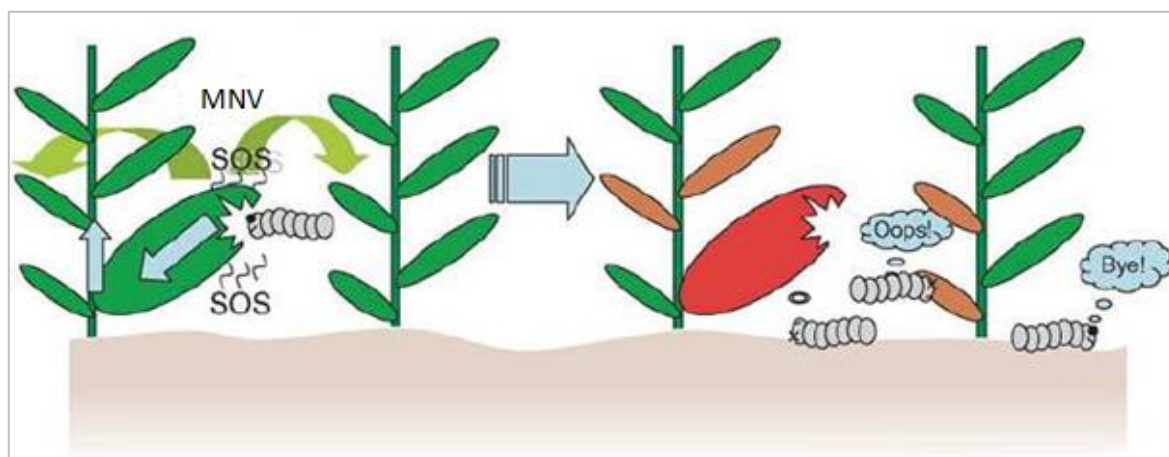


Figure 23 : Mécanisme de défense des plantes contre les herbivores (Matsui *et al.*, 2006).
 À la suite d'une attaque herbivore, les feuilles lésées activent la formation de molécules volatiles à note verte (MNV), qui vont induire des réponses de défense (représentées en rouge) chez la plante attaquée mais également s'étendre aux plantes voisines pour les prévenir d'une attaque imminente.

Les molécules volatiles issues de l'action de l'HPL sont également impliquées dans les mécanismes de défense indirects vis-à-vis des insectes herbivores, via un système d'interactions tritrophiques plante-herbivore-carnivore/parasite (Hassan *et al.*, 2015). En effet, suite à l'attaque d'un ravageur, elles sont synthétisées et vont attirer des ennemis naturels de l'herbivore tels que des insectes carnivores ou des guêpes parasites (Matsui 2006 ; Chehab *et al.*, 2008).

- **Effet sur les plantes**

Les composés en C6 et C9 émis par une plante en réponse à l'infection par un phytopathogène ou à l'attaque d'un herbivore stimulent les mécanismes de défense de la plante attaquée, mais agissent également comme substances allélopathiques et éliciteurs vis-à-vis d'autres plantes (Arimura *et al.*, 2010). Étant volatils, ils sont transportés par l'air jusqu'aux plantes avoisinantes qui lorsqu'elles reçoivent ce signal, activent leurs mécanismes de défense afin de se protéger plus rapidement et plus efficacement (Engelberth *et al.*, 2004 ; Baldwin 2010 ; Hassan *et al.*, 2015). Ces molécules sont capables d'activer l'expression des gènes codant pour la LOX et l'AOS entraînant la production de jasmonates, ainsi que d'autres voies enzymatiques comme la voie des phénylpropanoïdes produisant également des composés organiques volatils de défense (Bate et Rothstein 1998 ; Arimura *et al.*, 2001 ; Gomi *et al.*, 2003 ; Engelberth *et al.*, 2004).

Les aldéhydes volatils, et notamment le (*E*)-hex-2-èneal, transmis par l'air ou le sol peuvent inhiber la germination, le développement racinaire et la croissance des plantules avoisinantes (Arimura *et al.*, 2010).

Les composés à note verte peuvent donc agir comme molécules signal impliquées dans la communication intra-plante et inter-plante (Figure 24).

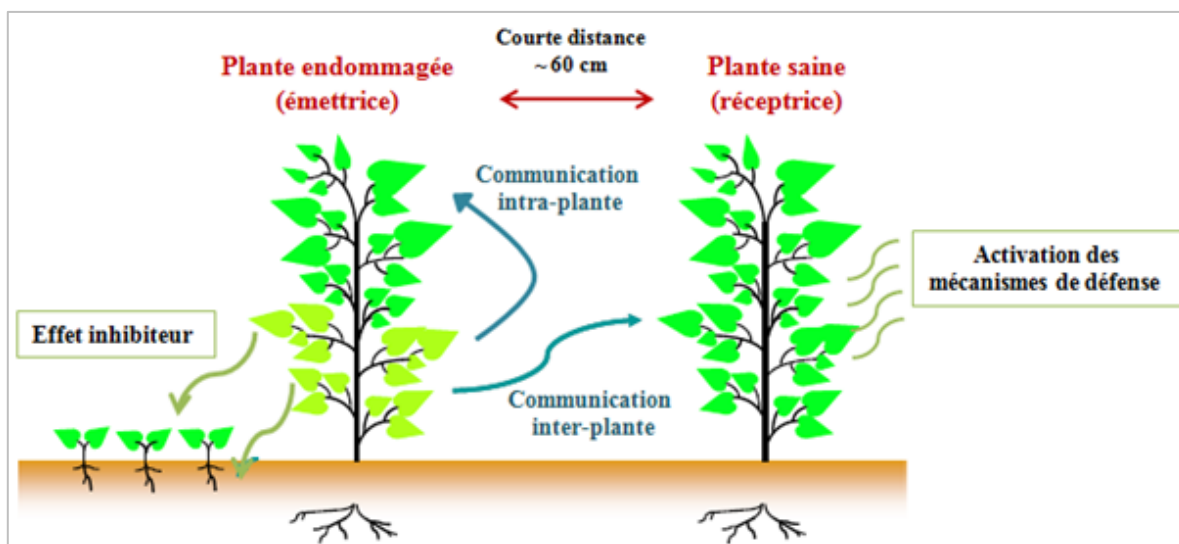


Figure 24 : Communication intra- et inter-plante médiée par les composés à note verte (Arimura *et al.*, 2010).

En plus de leurs fonctions biologiques, les produits formés suite à l'action de l'HPL possèdent des propriétés aromatisantes intéressantes au niveau industriel.

III.2. Production industrielle des molécules à note verte

III.2.a) Intérêt industriel et utilisation

Les aldéhydes et alcools volatils à 6 et 9 carbones sont responsables de l'odeur fraîche des feuilles vertes et de l'herbe coupée, appelée « note verte » dans le domaine des arômes et parfums (Hatanaka *et al.*, 1986 ; Hatanaka 1993). Ces molécules à note verte sont également caractéristiques de nombreux fruits et légumes tels que la pomme, le melon ou le concombre et contribuent à l'arôme de certains produits tels que le vin, le thé et l'huile d'olive (Angerosa *et al.*, 2004 ; Zhu *et al.*, 2012 ; Hassan *et al.*, 2015). La variation des concentrations des différents composés conduit à une saveur particulière caractérisant le

tissu végétal ou le produit transformé (Gargouri et Akacha 2008). Chaque molécule est caractérisée par une odeur spécifique (Tableau I).

Tableau I : Flaveurs attribuées aux aldéhydes et alcools volatils formés par la voie de la lipoxigénase (Gargouri et Akacha 2008 ; Gigot *et al.*, 2010)

FONCTION	NOM DU COMPOSE	FLAVEURS
ALDEHYDES	hexanal	Vert, pomme, herbe coupée
	(Z)-hex-3-énal	Feuilles vertes, pomme verte, herbe coupée
	(E)-hex-2-énal	Amande, vert, pomme verte, herbe coupée
	(Z)-non-3-énal	Concombre
	(E)-non-2-énal	Citrus gras
	(Z),(Z)-nona-3,6-diénal	Melon, concombre, poivré
	(E),(Z)-nona-2,6-diénal	Légume vert, concombre
ALCOOLS	hexanol	Fruité, doux, herbe coupée
	(Z)-hex-3-énol	Banane, feuille verte
	(E)-hex-2-énol	Vert tranchant, fruité
	(E)-non-2-énol	Melon
	(Z),(Z)-nona-3,6-diéniol	Pastèque
	(E),(Z)-nona-2,6-diéniol	Vert herbacé, concombre amer

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

Les principaux constituants de la note verte fraîche sont le (E)-hex-2-énal dit « aldéhyde de feuille », et le (Z)-hex-3-énol dit « alcool de feuille ».

Les molécules à note verte sont utilisées dans les secteurs alimentaire et cosmétique, pour donner un caractère vert et frais aux produits auxquels elles sont ajoutées. Elles entrent dans la composition des parfums et autres produits cosmétiques (crèmes, produits d'hygiène, ...) et des aliments type chewing-gums ou boissons gazeuses. Elles sont également ajoutées aux plats cuisinés pour restaurer le caractère frais et les saveurs perdues lors de la stérilisation, et améliorer la durée de conservation en raison de leurs activités antimicrobiennes (Lanciotti *et al.*, 2004). Le marché mondial des flaveurs et fragrances s'élève à 23 milliards d'euros (2014) dont 900 millions concernent les molécules à note verte. La production des composés volatils de la note verte représente donc un enjeu

important pour l'industrie. Chaque année, plus de 50 tonnes de (*E*)-hex-2-énal et 250 tonnes de (*Z*)-hex-3-énol sont produits.

III.2.b) Moyens de production à l'échelle industrielle

- Arômes synthétiques

Au niveau industriel, la majeure partie des molécules à note verte (~90%) est produite par synthèse chimique (Schwab *et al.*, 2008). Cette méthode de production est peu coûteuse et permet d'obtenir des rendements importants, pour un produit final pur à 95%. Les aldéhydes et alcools volatils sont formés par combinaison de molécules d'éthylène et oxydations dirigées. L'éthylène est produit à partir du naphta issu de la distillation fractionnée du pétrole. Les molécules obtenues, qualifiées de « nature identiques », sont des équivalents chimiques des arômes naturels produits par les plantes.

Néanmoins, ces dernières années, les consommateurs sont de plus en plus demandeurs de produits d'origine naturelle, qu'ils considèrent plus « sains » et plus « sûrs » que les arômes synthétiques (Schwab 2000 ; Schwab *et al.*, 2008). L'approche permet également une substitution des ressources pétrochimiques par des ressources agrochimiques renouvelables.

- Substances aromatisantes naturelles

La notion de « substance aromatisante naturelle » est définie au niveau international par le Codex alimentarius comme une « substance obtenue au moyen de procédés physiques, enzymatiques ou microbiologiques, à partir de matériaux d'origine végétale ou animale », et au niveau européen par le paquet « agent d'amélioration » qui stipule que « la partie aromatisante de l'arôme doit être exclusivement d'origine naturelle (présente dans un substrat végétal ou animal) ». Les molécules à note verte naturelles sont des composés à haute valeur ajoutée. Leur prix de vente se situe entre 750 et 3 000 \$ par litre selon la molécule, tandis que les molécules synthétiques sont commercialisées à 25-50 \$ par litre (Schrader *et al.*, 2004 ; Schwab *et al.*, 2008). Les produits alimentaires ou cosmétiques contenant ces arômes naturels pourront bénéficier du label « naturel », gagnant en visibilité et suscitant la confiance des consommateurs.

- Procédés d'extraction

Face à la demande croissante, et du fait de la faible abondance des composés dans les végétaux, l'extraction des molécules à note verte directement à partir des plantes s'avère peu rentable et très coûteuse. Par conséquent, afin de répondre aux exigences du marché, des procédés biotechnologiques reproduisant *in vitro* les réactions de la voie de la lipoxygénase, ont été développés.

- Procédés biotechnologiques

Les triglycérides contenus dans une huile végétale choisie pour sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés sont d'abord hydrolysés par une lipase. Puis, des extraits végétaux sous forme de farines ou de broyats de feuilles ou de pulpes sont utilisés comme source de LOX et d'HPL pour synthétiser les composés à note verte, qui sont enfin extraits et purifiés. Les réactions de bioconversion sont illustrées sur la Figure 25.

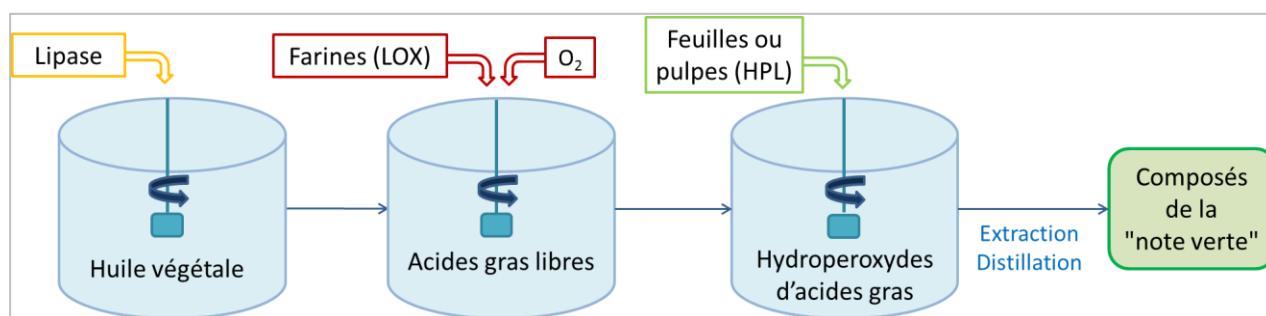


Figure 25 : Procédé de production biocatalytique de composés à note verte

Plusieurs procédés de bioproduction ont déjà été publiés (Gargouri *et al.*, 2004 ; Nemeth *et al.*, 2004 ; Rabetafika *et al.*, 2008 ; Akacha et Gargouri 2009) ou brevetés (Muller *et al.*, 1995). La plupart de ces procédés utilisent l'huile de tournesol riche en acide linoléique, et l'huile de lin riche en acide linoléique, hydrolysées par une lipase commerciale, et des farines de soja comme source de lipoxygénase. Des réactions de conversion à grande échelle des substrats lipidiques en hydroperoxydes ont été mises au point. Les actions des lipases et des LOX peuvent être effectuées successivement ou couplées au sein d'un bioréacteur diphasique. Dans ces systèmes, la lipase intervient au niveau de l'interface huile/eau, et les acides gras libérés restent dans la phase organique, qui sert de réservoir de substrat pour les LOX produisant les hydroperoxydes stockés dans

la phase aqueuse (Gargouri et Akacha 2008). Concernant la synthèse des composés volatils, plusieurs sources d'HPL ont été testées : feuilles de menthe (Gargouri *et al.*, 2004), poivron vert (Nemeth *et al.*, 2004), goyave (Muller *et al.*, 1995) et betterave (Rabetafika *et al.*, 2008), notamment.

Toutefois l'utilisation de ces extraits végétaux présente des inconvénients. De grandes quantités de matière végétale dont l'approvisionnement dépend de la période de récolte et des aléas climatiques, sont nécessaires et beaucoup de déchets sont générés. Par exemple, le processus de bioconversion décrit par Gigot (2011), utilise 830 Kg d'huile de lin, 150 Kg de farines de soja et 6,4 T de feuilles de betterave, pour produire 22,5 Kg d'hexanal (Figure 26).

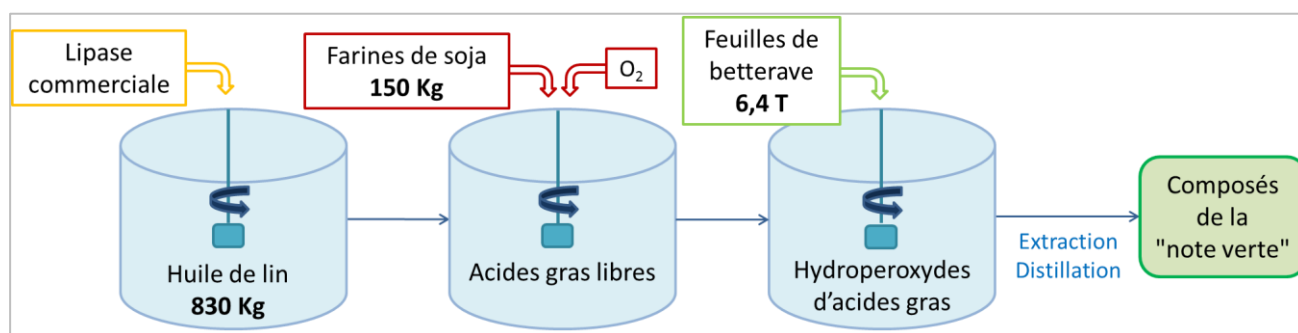


Figure 26 : Exemple de procédé avec estimation quantitative des matières premières nécessaires (Gigot 2011)

Par ailleurs, les extraits végétaux peuvent contenir de nombreuses enzymes dont certaines utilisent les mêmes substrats que la LOX et l'HPL, ce qui entraîne une perte de substrat et génère des produits secondaires, et par conséquent diminue le rendement en molécules d'intérêt. De plus, des LOX et HPL de différentes spécificités sont présentes, générant un mélange de composés à 6 et 9 carbones, alors que les industriels recherchent une utilisation séparée de ces arômes.

Ces inconvénients peuvent être contournés en utilisant des enzymes purifiées et régiospécifiques, permettant une production efficace et sélective du ou des composé(s) volatil(s) désiré(s) grâce à des synthèses dirigées. Cela permet également de s'affranchir de la dépendance au végétal, ce qui offre des avantages techniques en termes d'approvisionnement en matériel végétal et de traitement des déchets.

Des LOX commerciales telles que la 13-LOX de soja ou la 9-LOX de pomme de terre sont disponibles et représentent des sources peu onéreuses de LOX spécifiques, efficaces pour la synthèse d'hydroperoxydes. En revanche, il n'existe pas d'HPL commerciale ; c'est la raison pour laquelle de nombreuses HPL ont été clonées en vue de leur utilisation en tant qu'outil biotechnologique.

- Utilisation d'HPL recombinantes comme outils biotechnologiques

Le principe de production d'arômes par des enzymes recombinantes reste la catalyse enzymatique à partir de substrats d'origine naturelle, donc les molécules produites bénéficieront de l'appellation « substances aromatisantes naturelles » et pourront être intégrées dans des produits labellisés.

Des HPL de différentes espèces végétales ont été clonées et exprimées chez des organismes procaryotes ou eucaryotes, dans le but de produire de grandes quantités d'enzyme. Les 13-HPL de luzerne, de pomme de terre, de betterave et d'olive et la 9-HPL d'amande ont été clonées et exprimées chez la bactérie *Escherichia coli* (Noordermeer *et al.*, 2002 ; Mita *et al.*, 2005 ; Gigot *et al.*, 2010 ; Padilla *et al.*, 2010 ; Mu *et al.*, 2012). Noordermeer *et al.*, (2002) ont décrit un procédé biocatalytique de production d'aldéhydes à 6 carbones à partir d'huiles hydrolysées de carthame et de lin, en utilisant des farines de soja comme source de 13-LOX et la 13-HPL recombinante de luzerne. La culture chez *E. coli* a permis un rendement de 3 000 et 8 000 unités d'HPL par litre de culture et des taux de conversion de 50% et 26% pour le 13-HPOD et le 13-HPOT respectivement. Bourel *et al.*, (2004) et Santiago-Gomez *et al.*, (2009) ont obtenu 1200 à 1800 unités d'HPL de poivron vert par litre de milieu de culture lors de l'expression chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Une autre levure : *Pichia pastoris* a été utilisée par Atwal *et al.*, (2005) pour exprimer l'HPL de tomate. Buchhaupt *et al.*, (2012) ont décrit un procédé de production d'aldéhydes et d'alcools à 6 carbones par la levure *Saccharomyces cerevisiae* co-exprimant la 13-LOX2 de soja et la 13-HPL de pastèque. Une autre stratégie consiste à utiliser la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* pour transférer les gènes codant et surexprimer les enzymes de la voie de la lipoxygénase chez une plante. Ainsi, le gène codant pour la 13-HPL de pastèque a été utilisé pour surexprimer l'enzyme chez *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum* (Fukushige et Hildebrand 2005 ; Huang *et al.*, 2010).

L'utilisation d'une HPL recombinante en tant qu'outil biotechnologique dans un procédé biocatalytique de bioconversion d'un substrat lipidique en molécules à note verte représente donc une alternative attrayante.

IV. Problématique scientifique et objectifs

Depuis plusieurs années le laboratoire s'intéresse à l'étude des enzymes de la voie de la lipoxygénase, en particulier la LOX et l'HPL, pour leur implication dans la formation des arômes fruité et vert de l'huile d'olive. Dans le cadre du projet européen Eurotransbio BioSF «Biocatalyzed Synthesis of Fragrances» (ETB 2009-94) du 7^{ème} PCRD, l'objectif du laboratoire a été la production biocatalytique de molécules à note verte grâce à l'utilisation d'enzymes recombinantes. L'ADNc codant pour l'hydroperoxyde lyase a donc été isolé à partir d'olives de la variété Leccino récoltées au stade noir. L'enzyme (désignée par HPL_{wt}) a été clonée et exprimée chez la bactérie *E. coli*. Afin d'améliorer la solubilité de l'enzyme, la séquence d'adressage de l'HPL à la membrane des chloroplastes a été supprimée et l'enzyme dépourvue de ce peptide de transit (désignée par HPL_{del}) a également été exprimée chez *E. coli*.

Au cours de mon travail, j'ai purifié les deux enzymes recombinantes, puis déterminé leurs propriétés biochimiques (pH optimum, température optimale, paramètres cinétiques). Différentes conditions de conservation ont été testées afin d'augmenter la stabilité des enzymes purifiées et préserver l'activité enzymatique à long terme, ce qui pourrait permettre l'utilisation de l'HPL dans des réactions de bioconversion plusieurs semaines après sa purification. Nous avons également évalué l'influence de l'ajout, dans le milieu réactionnel, de composés chimiques (KCl, NaCl, Na₂SO₄, glycérol, glycine) susceptibles d'augmenter l'activité enzymatique des HPL recombinantes purifiées, ce qui pourrait améliorer l'efficacité des réactions de synthèse des aldéhydes à note verte.

Parallèlement, un système d'expression eucaryote, la levure *Pichia pastoris*, a été testé pour la sécrétion ou l'expression intracellulaire des HPL recombinantes. L'utilisation de la levure pourrait augmenter la quantité d'enzymes solubles par rapport au système bactérien qui entraîne la formation de corps d'inclusion. De plus, la possibilité de sécréter les

enzymes recombinantes dans le milieu de culture permettrait de faciliter l'étape de purification voire de s'en affranchir. Dans ce cas, les levures ne sont pas lysées et peuvent être remises en suspension dans le milieu d'induction pour produire à nouveau des enzymes recombinantes.

Cette optimisation de la production hétérologue de l'HPL d'olive est nécessaire afin d'obtenir de plus grandes quantités d'enzyme soluble et active, et d'envisager son utilisation dans un processus complet et efficace de biotransformation, pouvant par la suite être adapté à l'échelle industrielle.

Nous nous sommes également intéressés à l'étude des relations structure-fonction de l'HPL. Aucune structure cristalline de l'HPL n'étant disponible, un modèle de la structure tridimensionnelle de l'HPL d'olive a été construit. L'analyse de la structure modélisée, associée à la comparaison des séquences en acides aminés d'HPL et autres CYP74 de spécificités différentes a permis de cibler des résidus d'acides aminés potentiellement impliqués dans le contrôle de la spécificité réactionnelle de l'HPL. La modification de ces résidus par mutagenèse dirigée puis la caractérisation biochimique des mutants de l'HPL exprimés chez *E. coli*, devraient nous renseigner sur le rôle joué par ces résidus dans le contrôle de la régiospécificité de l'HPL d'olive. De plus, la possibilité de modifier la régiospécificité de l'HPL par mutation pourrait constituer un avantage intéressant pour la production sélective d'aldéhydes volatils à 6 ou à 9 carbones.

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

I.1. Hydroperoxyde lyases d'intérêt

L'ADNc codant pour l'HPL d'olive (HPL $_{wt}$) (Annexe, Figure A) a été obtenu au laboratoire par transcription inverse d'ARNm extraits à partir d'olives noires de la variété Leccino, récoltées 20 semaines après la floraison, puis cloné dans le vecteur d'expression pQE-30. L'HPL $_{wt}$ possède un peptide signal d'adressage chloroplastique à son extrémité N-terminale, suggérant une localisation chloroplastique de l'enzyme (Bate *et al.*, 1998 ; Froehlich *et al.*, 2001). La séquence codant pour l'HPL d'olive dépourvue de ce peptide (HPL $_{del}$) a également été clonée dans ce vecteur.

La séquence nucléotidique codant pour l'HPL $_{wt}$ a été optimisée pour l'expression chez la levure *Pichia pastoris*. L'optimisation consiste à remplacer les codons rares par des codons préférentiellement lus par la levure. La séquence optimisée (HPL $_{opt}$) a été fournie par Genscript® (Annexe, Figure B).

La séquence nucléotidique codant pour l'HPL de feuilles de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (HPL $_{Le}$) a été obtenue par synthèse de gène effectuée par Genscript®, et fournie directement dans un vecteur pPICZ α . Cette séquence est identique à celle décrite par Atwal *et al.*, (2005) (numéro d'accèsion GenBank AY028373.1, Annexe, Figure C).

I.2. Souches bactériennes, levures et plasmides

La souche bactérienne *Escherichia coli* M15 ainsi que le vecteur pQE-30 ont été fournis par la société QIAGEN. La souche bactérienne *Escherichia coli* TOP10F', la levure *Pichia pastoris* de souche X-33, la levure *Pichia pastoris* GS115/pPICZ/lacZ jouant le rôle de témoin d'expression, ainsi que les vecteurs pPICZ α A, pPICZ α B et pPICZB utilisés ont été fournis dans le kit EasySelect™ *Pichia* Expression (Invitrogen, Life Technologies).

II. Composés chimiques et réactifs

Les composés tels que le NaCl, le KCl, le Na₂SO₄, le Na₂HPO₄, le NaH₂PO₄, le K₂HPO₄, le KH₂PO₄, le RbCl, le CaCl₂, et le MgSO₄, ainsi que la glycine, le glycérol, la benzamidine, la DNase I, l'IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside), le lysozyme, le Triton X-100, l'acide δ -aminolevulinique, le PMSF (Fluorure de phénylméthylsulfonyle), la BSA

(Albumine sérique bovine) et les tampons TBE (Tris-Borate-EDTA) et TAE (Tris-Acétate-EDTA), ont été fournis par la société Sigma-Aldrich. Les antibiotiques tels que l'ampicilline et la kanamycine ainsi que les constituants des milieux de culture : LB broth, tryptone, extrait de levure, YNB (*yeast nitrogen base*) avec sulfate d'ammonium et sans acide aminé, peptone, sont également fournis par cette société. Les endonucléases de restriction telles que *Bam*HI, *Xma*I, *Pme*I, *Xho*I, *Xba*I et *Eco*RI, ainsi que leurs tampons de réaction, sont fournis par la société New England Biolabs. La T4 ADN ligase, les dNTP et le PCR Master Mix contenant la *Taq* ADN polymérase sont fournis par la société Promega. La *Pfu* ADN polymérase a été fournie par la société Stratagene. Les amorces utilisées dans ce travail sont fournies par la société Eurofins, et indiquées dans le Tableau A en annexe.

III. Production d'hydroperoxyde lyases recombinantes chez la bactérie *Escherichia coli*

III.1. Obtention de clones bactériens recombinants

Les ADNc codant pour l'HPL*wt* (type sauvage) et l'HPL*del* (dépourvue du signal d'adressage chloroplastique) sont insérés dans le vecteur d'expression pQE-30 (Qiagen), au niveau des sites de restriction *Sph*I et *Xma*I. Le vecteur pQE-30 permet l'insertion de six résidus d'Histidine au niveau de la partie N-terminale de l'enzyme lors de l'expression. Cette étiquette polyHistidine permet la détection de la protéine recombinante par un anticorps anti-polyHistidine, et sa purification par chromatographie d'affinité. La carte du vecteur pQE-30 est présentée sur la Figure 27.

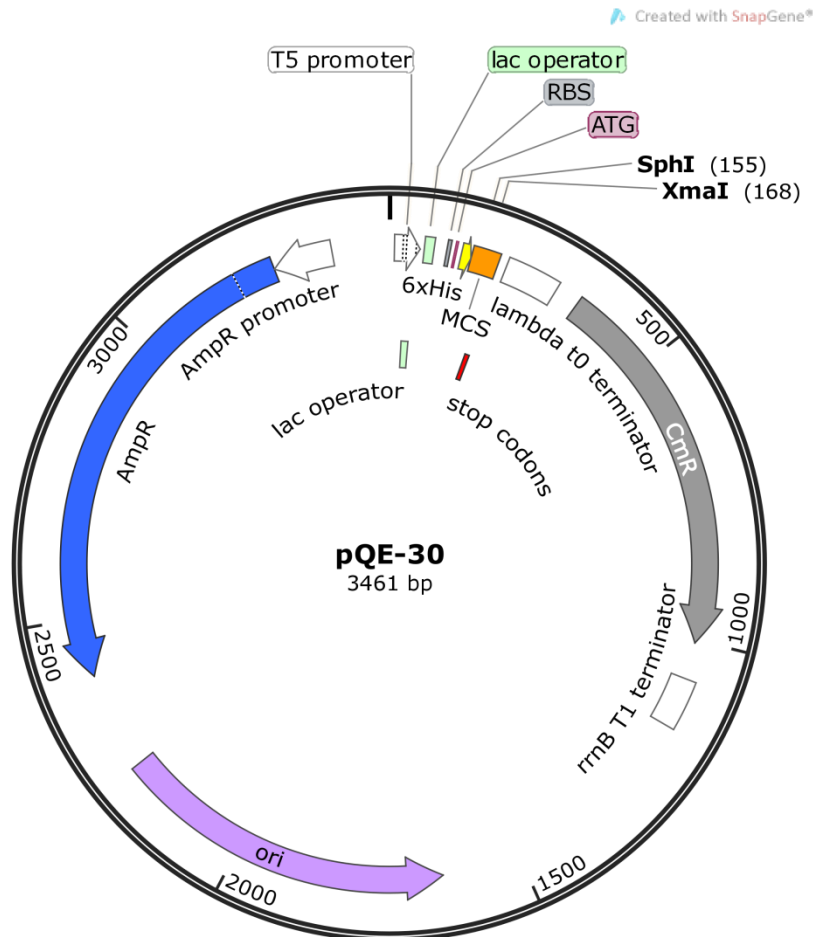


Figure 27 : Vecteur pQE-30 (Qiagen)

Le vecteur pQE30 porte un gène de résistance à l'ampicilline (en bleu). Il permet l'insertion d'une étiquette polyHistidine (en jaune) à l'extrémité N-terminale de la protéine recombinante. Ce plasmide contient également les sites de restriction *SphI* et *XmaI*, utilisés pour l'insertion des séquences nucléotidiques codant pour l'HPLwt ou l'HPLdel.

La souche bactérienne utilisée pour l'expression des protéines recombinantes est *E. coli* M15 (Qiagen). Ces bactéries contiennent le plasmide pREP-4, portant un gène de résistance à la kanamycine et le gène *lacI*, codant pour le répresseur de l'opéron lactose. Ce répresseur est inactivé par l'ajout d'IPTG, qui lève donc l'inhibition de la synthèse de la protéine recombinante.

III.2. Expression et purification des enzymes recombinantes

III.2.a) Expression chez *E. coli* M15

Une colonie bactérienne *E. coli* M15 transformée avec le vecteur d'expression pQE-30 recombinant, est mise en culture en milieu liquide LB Broth en présence d'ampicilline 50

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ et de kanamycine $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Un volume de 24 mL de cette pré-culture est ensuite utilisé pour ensemencer 400 mL de milieu TB (*Terrific Broth medium*) (tryptone 12 g.L^{-1} , extrait de levure 24 g.L^{-1} , glycérol 0,4%, KH_2PO_4 0,17 M, K_2HPO_4 0,72 M, ampicilline $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycine $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La culture est incubée à 37°C jusqu'à atteindre une absorbance de 0,6 mesurée à 600 nm. L'expression est induite par ajout d'IPTG (0,5 mM). De l'acide δ -aminolevulinique (2,5 mM), un précurseur de l'hème, est également ajouté à la culture, qui est incubée à 15°C durant 48 heures.

III.2.b) Lyse bactérienne

Les cultures sont centrifugées à 7000 g pendant 30 minutes à 4°C . Le surnageant est éliminé, et les culots bactériens sont remis en suspension dans 20 mL d'un tampon de lyse à pH7, composé de tampon phosphate de sodium 50 mM contenant $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ de lysozyme, 500 mM de NaCl et 0,1% de Triton X-100, puis congelés au moins une nuit à -80°C . Avant la purification de l'enzyme recombinante, ils sont décongelés à température ambiante, et la lyse est poursuivie par l'ajout de DNaseI $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$, MgSO_4 50 mM, benzamidine 1 mM, PMSF 1 mM et emulgène 1%. Après une incubation de 30 min sous agitation à 4°C suivie d'une centrifugation à 12000 g pendant 30 min à 4°C , la fraction soluble du lysat bactérien (20 mL) est recueillie en vue de la purification de l'HPL recombinante, et le culot de lyse est remis en suspension dans 20 mL de tampon PBS (tampon phosphate à pH7,3, contenant 8,1 mM de Na_2HPO_4 , 1,47 mM de KH_2PO_4 , 137 mM de NaCl et 2,7 mM de KCl).

III.2.c) Purification par chromatographie d'affinité

La purification de l'HPL recombinante est réalisée par chromatographie d'affinité sur Äkta purifier (GE Healthcare) (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography). La totalité de la fraction soluble du lysat bactérien est chargée sur une colonne contenant 1 mL de résine de cobalt TALON Superflow Metal Affinity (Clontech) préalablement équilibrée avec un tampon A (tampon phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM, pH7). Le principe de la purification repose sur l'interaction spécifique de l'étiquette polyHistidine ajoutée à l'extrémité N-terminale de l'HPL recombinante, avec le cobalt de la résine. La majeure partie des protéines bactériennes sont éluées lors du lavage avec le tampon A. Deux lavages avec 40 mM et 100 mM d'imidazole dans le tampon A, sont effectués afin d'éluier les protéines liées

de manière aspécifique à la résine. Enfin, l'élution de l'HPL recombinante est réalisée avec 200 mM d'imidazole dans le tampon A. Les fractions contenant l'enzyme pure et présentant une activité HPL sont réunies.

III.3. Caractérisation biochimique

III.3.a) Détermination du pH optimum et de la température optimale

L'activité HPL a été mesurée à des températures allant de 5 à 45°C, et avec une gamme de pH allant de 5 à 9, dans différents tampons : tampon acétate de sodium 50 mM (pH5 et 5,5), tampon phosphate de sodium 50 mM (pH5,5 à 8) et tampon borate de sodium 50 mM (pH8 à 9).

III.3.b) Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de l'HPL_{wt} et de l'HPL_{del} ont été déterminés pour 1 µg d'enzyme pure, à l'aide des équations de Michaelis-Menten en utilisant des concentrations comprises entre 7 µM et 121 µM de 13-HPOD et 8 µM et 175 µM de 13-HPOT.

IV. Optimisation des conditions de conservation et amélioration de l'activité de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive

IV.1. Stockage à basse température

Différentes températures de conservation (4 °C; -20 °C; -80 °C) des enzymes purifiées ont été testées sur une période de 5 semaines. Différentes concentrations de glycérol (10, 20, 30 et 40%) ont été ajoutées aux extraits enzymatiques purs qui sont conservés à -20°C et à -80°C.

IV.2. Amélioration de l'activité enzymatique par ajout de composés chimiques

L'effet, sur l'activité enzymatique, de divers composés chimiques comprenant le NaCl, le KCl, le Na₂SO₄, la glycine et le glycérol, a été évalué. Dans un premier temps, différents

tampons de réactions contenant des concentrations allant de 0 à 2 M pour le NaCl, le KCl, et le Na₂SO₄ et de 0 à 20% pour la glycine et le glycérol, ont été utilisés pour les mesures des activités enzymatiques. Dans un second temps, les effets des différents composés ont été comparés en prenant en compte, pour chaque composé, la concentration ayant engendré la plus forte augmentation d'activité. L'effet de ces composés sur les paramètres cinétiques des enzymes a également été étudié.

V. Production d'hydroperoxyde lyases recombinantes chez la levure *Pichia pastoris*

Parallèlement à l'utilisation du système *E. coli*, nous avons choisi de tester un système d'expression eucaryote : la levure *Pichia pastoris*, pour la sécrétion ou la production intracellulaire d'HPL recombinantes.

V.1. Avantages de l'utilisation de la levure

Pichia pastoris est un organisme eucaryote unicellulaire, et est qualifiée de « levure non conventionnelle ». Elle bénéficie néanmoins d'une bonne caractérisation génétique et physiologique. Son utilisation en tant que système d'expression hétérologue offre les avantages des systèmes eucaryotes, à savoir un meilleur repliement des protéines recombinantes donc une meilleure solubilité, et la possibilité de modifications post traductionnelles (glycosylation, carboxylation, acylation, ponts disulfures). Les levures sont beaucoup moins coûteuses que les systèmes eucaryotes supérieurs (insectes, mammifères). De plus, elles sont faciles à manipuler et leur croissance est assez rapide (temps de doublement lors de la phase logarithmique ~2h). Au niveau des modifications post traductionnelles, *P. pastoris* montre une majorité de N-glycosylation avec ajout de résidus mannose mais la longueur des chaînes d'oligosaccharides est assez courte (8 à 14 résidus mannose par chaîne), ce qui limite les risques d'hyper glycosylation de la protéine recombinante. En outre, *P. pastoris* est classée comme « Organisme GRAS » (Generally Recognized As Safe) par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA), ce qui constitue un avantage dans le cadre d'une production de molécules aromatisantes destinées à l'industrie alimentaire.

La possibilité de sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture par la levure permet d'éviter la formation de corps d'inclusion, phénomène d'agrégation des protéines qui constitue le principal obstacle lors de la production chez *E. coli*. De plus, un des principaux avantages de l'utilisation de *P. pastoris* pour la sécrétion de protéines recombinantes réside dans le fait qu'elle sécrète peu de protéines natives. Les protéines d'intérêt sécrétées sont donc majoritaires, ce qui facilite leur purification à partir du milieu de culture.

V.2. Système *Pichia pastoris*

V.2.a) Généralités

P. pastoris est une levure méthylotrophe, c'est-à-dire capable d'utiliser le méthanol comme source de carbone (Cregg *et al.*, 1985). Le métabolisme du méthanol se déroule dans les peroxysomes et débute par l'oxydation du méthanol en formaldéhyde et peroxyde d'hydrogène (Cereghino et Cregg 2000). Cette réaction est catalysée par l'alcool oxydase (AOX). Cette enzyme peut être codée par deux gènes : AOX1 ou AOX2, mais la majorité des AOX produites par *P. pastoris* est codée par AOX1 (Cereghino et Cregg 2000 ; Cregg *et al.*, 2000). L'AOX a une faible affinité pour le dioxygène, donc la levure compense en produisant de grandes quantités d'enzyme. Le promoteur du gène AOX1 (P_{AOX1}) régulant cette production est généralement utilisé pour produire des protéines hétérologues chez *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 2000). L'expression d'AOX1 est contrôlée au niveau de la transcription par un mécanisme de répression/dérépression, auquel s'ajoute un mécanisme d'induction par le méthanol (Cregg *et al.*, 2000). L'ajout de glucose dans le milieu de culture entraîne une répression tandis que son remplacement par le glycérol permet une dérépression.

V.2.b) Souche et plasmides utilisés

La souche de *P. pastoris* X-33 (Invitrogen, Life technologies) de génotype sauvage, a été utilisée pour l'expression intracellulaire ou la sécrétion des enzymes recombinantes.

Les vecteurs pPICZ et pPICZ α (Invitrogen, Life technologies) (Figure 28), utilisés respectivement pour l'expression intracellulaire et la sécrétion de l'enzyme dans le milieu de culture, sont des vecteurs navettes.

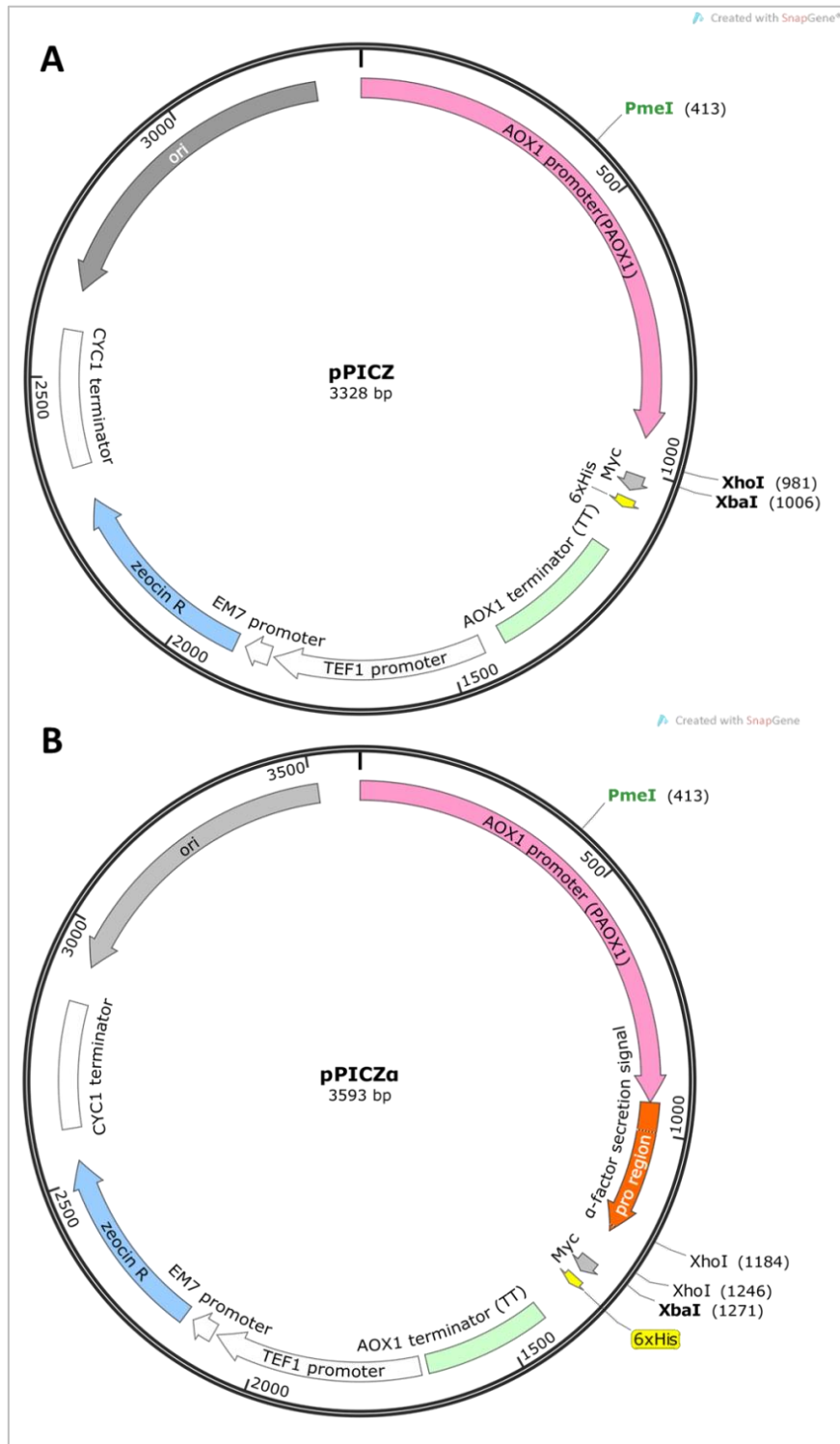


Figure 28 : Carte des plasmides de type pPICZ (A) et pPICZα (B) (Invitrogen, Life technologies)
 Les vecteurs de type pPICZ et pPICZα comportent notamment une origine de répliation chez les bactéries (en gris), un gène de résistance à la zéocine (en bleu), le promoteur (en rose) et le terminateur (en vert clair) du gène AOX1. Ces plasmides permettent l'insertion d'une étiquette polyHistidine (en jaune) en C-terminal de l'enzyme recombinante. Seuls les vecteurs de type pPICZα possèdent un signal de sécrétion appelé facteur α (en orange). Les sites de restriction XhoI et XbaI seront utilisés pour le clonage. Les vecteurs seront linéarisés au niveau du site PmeI.

Ces vecteurs comportent des séquences (notamment l'origine pUC) nécessaires à la maintenance et la réplication chez *E. coli*. Ils portent le gène de résistance à un antibiotique : la zéocine, utilisée pour la sélection des clones transformés, aussi bien chez *E. coli* que chez *P. pastoris*. Le promoteur fort utilisé pour contrôler l'expression de l'enzyme recombinante est P_{AOX1} , inductible par le méthanol. Les plasmides portent également le terminateur de transcription d'AOX1 (TT). Les séquences P_{AOX1} et TT sont également présentes dans le génome des levures X-33. Les plasmides comportent enfin les séquences codant pour l'épitope *c-myc* et un peptide polyHistidine (6xHis) offrant la possibilité d'un marquage épitopique du côté C-terminal de la protéine recombinante (Figure 28).

Les vecteurs de type pPICZ α comportent également une séquence permettant l'ajout, à l'extrémité N-terminale de la protéine, d'un peptide appelé facteur α , servant de signal de sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture. Ce peptide naturellement présent chez *Saccharomyces cerevisiae*, est constitué d'une pré-séquence de 19 acides aminés suivie d'une pro-séquence de 67 résidus, comportant un site de clivage nommé Kex2 (Glu-Lys-Arg), reconnu par une endopeptidase (Lin-Cereghino *et al.*, 2013). Lors de la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique (RE), la pré-séquence est clivée par des peptidases, puis dans l'appareil de Golgi, une endopeptidase clive la pro-séquence au niveau de Kex2 (après Arg) (Brake *et al.*, 1984 ; Lin-Cereghino *et al.*, 2013).

Lors de la transformation des levures, le vecteur recombinant préalablement linéarisé au niveau de la région P_{AOX1} , est intégré au génome de *P. pastoris* X-33 par recombinaison homologue au niveau des régions P_{AOX1} et/ou TT. Si la recombinaison s'effectue au niveau de l'une de ces régions (P_{AOX1} ou TT), le gène AOX1 de la levure est conservé. Les levures présentant cette construction sont dites Mut⁺. Elles sont capables d'oxyder rapidement le méthanol. La recombinaison peut également se produire à la fois au niveau des régions P_{AOX1} et TT, ce qui conduit au remplacement du gène AOX1 de la levure par la cassette d'expression. Les levures, alors dites Mut^S, oxydent plus lentement le méthanol (Figure 29).

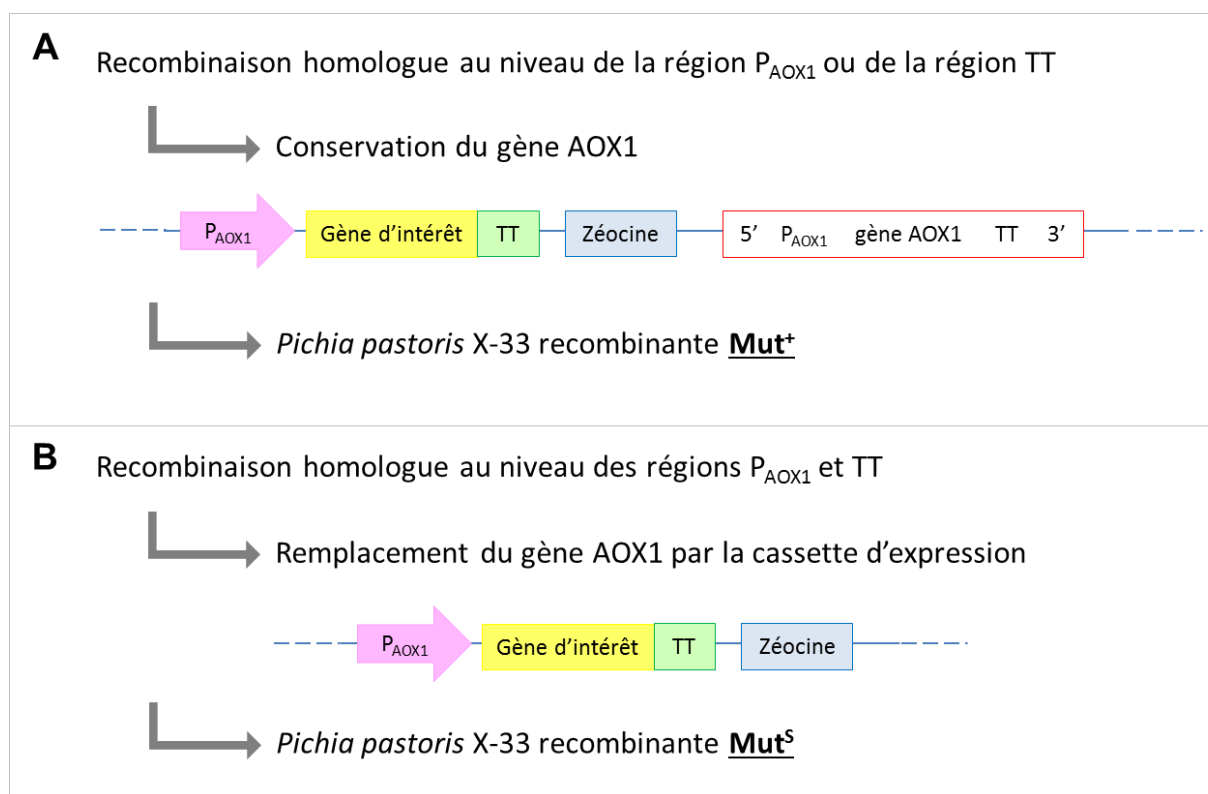


Figure 29 : Phénomènes de recombinaisons homologues chez *Pichia pastoris*, générant des levures de type Mut⁺ (A) ou Mut^S (B)

Les recombinaisons homologues s'effectuent au niveau du promoteur du gène AOX1 (P_{AOX1}) (en rose) et/ou du terminateur (TT) (en vert) présents sur les vecteurs, ainsi que dans le génome de *Pichia pastoris*. Elles permettent l'intégration, dans le génome de la levure, de la cassette d'expression contenant le gène d'intérêt (en jaune) encadré par les séquences P_{AOX1} et TT, et du gène de résistance à la zéocine (en bleu). Le gène AOX1 (encadré en rouge) des levures peut être conservé (Mut⁺) ou remplacé par la cassette d'expression (Mut^S). Les portions du génome de *Pichia pastoris* non impliquées dans ces phénomènes de recombinaison sont représentées en pointillés.

Plusieurs recombinaisons successives au niveau des régions P_{AOX1} ou TT peuvent avoir lieu et conduire à l'insertion multiple de plusieurs copies du plasmide recombinant. Les levures possèdent alors le phénotype Mut⁺.

V.2.c) Construction géniques et plasmidiques

Différentes constructions géniques comportant l'ADNc codant pour l'HPL_{wt}, l'HPL_{del}, l'HPL_{opt}, ou l'HPL_{Le} (HPL de tomate) qui a déjà été exprimée et sécrétée chez *P. pastoris* (Atwal *et al.*, 2005), ont été réalisées avant d'être intégrées, au niveau des sites de restriction *Xho*I et *Xba*I, dans les vecteurs de type pPICZα ou pPICZ, en vue de la sécrétion ou de l'expression intracellulaire des HPL recombinantes (Tableau II).

Tableau II : Constructions géniques réalisées en vue de l'expression des HPL recombinantes chez *Pichia pastoris*.

Numéro de la construction	Construction génique	Vecteur	Cassette d'expression	Expression
1		pPICZα		Sécrétion
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10		pPICZ		Intracellulaire
11				
12				

Les vecteurs pPICZα et pPICZ ont été utilisés respectivement pour la sécrétion et l'expression intracellulaire de l'HPL recombinante : HPL d'olive sauvage (HPLwt), HPL d'olive dépourvue du peptide de transit chloroplastique (HPLdel) ou HPL de tomate (HPLLε). Différentes constructions géniques numérotées de 1 à 12 ont été intégrées dans ces vecteurs. En plus de la séquence codant pour l'HPL d'intérêt, les cassettes d'expression peuvent comporter : la séquence codant pour le peptide α permettant la sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture, la séquence Kex2 codant pour un signal de clivage du peptide α, la séquence codant pour une étiquette polyHistidine (6xHis) ou la séquence codant pour un site de clivage reconnu par une entérokinase (D4KA).

Toutes ces constructions ont été réalisées par PCR, à l'exception de la construction numéro 6 contenant la séquence de l'HPLLε fournie par Genscript® déjà intégrée dans le vecteur pPICZα. Au cours des réactions de PCR, les sites de restriction *Xho*I et *Xba*I ont été ajoutés respectivement en 5' et 3' des séquences codant pour les HPL. L'amplification par PCR a été réalisée avec 2 unités de Pfu DNA polymérase (Promega) dans 50 µL de mélange réactionnel final contenant 0,4 à 0,6 ng d'ADNc et 10 pmoles de chacun des oligonucléotides (Annexe, Tableau A). Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans 50 mL de tampon TBE 1X (89 mM Tris-borate, 1

mM EDTA) contenant $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de bromure d'éthidium (BET), purifiés à l'aide du kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), puis hydrolysés par les enzymes *XhoI* et *XbaI* durant 20h à 37°C. Les vecteurs (pPICZ α ou pPICZ) ont été digérés par ces mêmes enzymes durant 2h à 37°C. Les produits de digestion ont été purifiés grâce au kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN).

Les constructions 1 à 9 ont été réalisées en vue d'être intégrées dans des vecteurs pPICZ α . Les cassettes d'expression générées comporteront donc le peptide α permettant la sécrétion de l'enzyme recombinante, suivi du site de clivage Kex2. Ce site Kex2 se trouvant en aval du site *XhoI* sur les vecteurs, il a donc été nécessaire de le recréer par PCR en incluant la séquence Kex2 au niveau de l'amorce sens utilisée pour l'ajout du site *XhoI*. Les différentes constructions géniques diffèrent toutefois selon les séquences ajoutées en amont des séquences codant pour les HPL. Les constructions 1, 2 et 3 comportent, en N-terminal de l'enzyme recombinante, une séquence codant pour six résidus d'histidine constituant l'épitope polyHistidine (6xHis), ainsi qu'une séquence codant pour un site de clivage formé de quatre résidus d'acide aspartique, d'une lysine et d'une alanine (D₄KA) reconnu par une entérokinase, ce qui permet le clivage de cet épitope (Hosfield et Lu 1999). L'étiquette polyHistidine a été ajoutée préférentiellement du côté N-terminal de l'enzyme car le domaine C-terminal de l'HPL joue un rôle important pour son activité catalytique, et sa modification pourrait entraîner une diminution de cette activité. Concernant les constructions suivantes, les séquences susceptibles de gêner la reconnaissance du peptide α ont été supprimées. La construction 4 est dépourvue du signal D₄KA, et la construction 5 permet l'insertion de l'épitope *c-myc* et de l'étiquette polyHistidine présents sur le vecteur, du côté C-terminal de l'enzyme recombinante. La construction 6 fournie par Genscript® et contenant la séquence de l'HPLLe décrite par Atwal *et al.*, (2005), a été utilisée comme témoin d'expression. Cette construction ne comporte pas l'étiquette polyHistidine. De même, les constructions 7, 8 et 9 contenant respectivement les séquences codant pour l'HPL $_{wt}$, l'HPL $_{opt}$ et l'HPL $_{del}$, ne contiennent pas l'étiquette polyHistidine.

Enfin, en vue de l'expression intracellulaire des HPL recombinantes, les constructions 10, 11 et 12 comportant une étiquette polyHistidine s'insérant du côté N-terminal de l'HPL $_{wt}$, l'HPL $_{opt}$ et l'HPL $_{del}$ respectivement, ont été intégrées dans le vecteur pPICZ.

La ligation des constructions géniques dans les vecteurs pPICZ α ou pPICZ est réalisée à 4°C durant 16h, dans 10 μ L de milieu réactionnel contenant 1 unité de T4 ADN ligase (Promega), 1 μ L de tampon ligation concentré 10X, 50 ng de plasmide et 65 ng de la construction génique d'intérêt.

V.2.d) Transformation des bactéries *E. coli* TOP10F' et criblage des clones recombinants

Lors de la transformation, 2 μ L du mélange de ligation sont mis en contact durant 30 minutes dans la glace, avec 100 μ L de bactéries *E. coli* TOP10 F' préalablement rendues compétentes. Le mélange est chauffé 45 secondes à 42°C (choc thermique) puis refroidi dans la glace pendant 2 minutes. Après ajout de 250 μ L de milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levures 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, glucose 20 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,0), les bactéries sont mises en culture environ une heure à 37°C sous agitation (250 rpm). La sélection des bactéries transformées est réalisée sur milieu LB Low Salt Agar (tryptone 1%, 0,5% extrait de levure, NaCl 0,5%, agar 15 g.L⁻¹, pH 7,5) additionné en zéocine (50 μ g.mL⁻¹).

Le criblage des bactéries recombinantes a été réalisé par PCR sur colonie, à l'aide d'amorces s'hybridant sur la séquence de l'HPL. Plusieurs colonies sont sélectionnées puis relancées dans du milieu LB Low Salt liquide, zéocine 50 μ g.mL⁻¹. L'ADN plasmidique est extrait à partir de 4 mL de culture bactérienne liquide, en utilisant le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Enfin, un séquençage de l'insert est réalisé par la société GATC Biotech, à l'aide des amorces 5'AOX1 et 3'AOX1 (Annexe, tableau A), s'hybridant respectivement sur P_{AOX1} et TT.

V.2.e) Préparation de l'ADN plasmidique

Afin de garantir une transformation efficace de la levure *Pichia pastoris*, l'ADN plasmidique recombinant doit préalablement être linéarisé, et sa quantité doit être comprise entre 5 et 10 μ g dans un volume n'excédant pas 10 μ L. Dans le but de multiplier le vecteur recombinant, une colonie TOP10F' recombinante est cultivée dans 100 mL de milieu de culture LB Low Salt, zéocine 50 μ g.mL⁻¹, durant une nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est extrait en utilisant le kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega), et élué dans 800 μ L d'eau stérile. Afin de concentrer la solution, une précipitation alcoolique est réalisée, en utilisant 0,1 volume d'acétate de sodium 3M et 2,5 volumes d'éthanol absolu. La précipitation

s'effectue durant 30 minutes à -80°C . L'ADN est ensuite récupéré dans le culot après centrifugation à 14 000 g pendant 15 minutes et à 4°C . Les culots sont d'abord lavés à l'éthanol 70%, puis séchés et repris dans 10 μL d'eau stérile. 10 μg d'ADN plasmidique sont digérés par 100 unités d'endonucléase de restriction *PmeI*, dont l'unique site de coupure se situe au niveau de la région P_{AOX1} . Après une incubation durant 2 h à 37°C , la réaction est stoppée par ajout d'EDTA 10 mM. Une précipitation alcoolique est à nouveau effectuée, et le culot d'ADN plasmidique linéarisé est repris dans 5 μL d'eau stérile.

V.2.f) Transformation intégrative de *Pichia pastoris*

En vue de la transformation, les levures *Pichia pastoris* X-33 sont d'abord rendues électrocompétentes. Pour cela, une préculture est incubée une nuit dans 5 mL de milieu d'YPD (extrait de levure 1%, peptone 2% et glucose 2%). Un volume de 500 μL de cette préculture sert à inoculer 500 mL d'YPD. La culture est placée à 30°C sous agitation (250 rpm) jusqu'à atteindre une absorbance à 600 nm comprise entre 1,3 et 1,5. La culture subit ensuite quatre centrifugations de 5 minutes à 1500 g et 4°C à la suite desquelles le culot est repris successivement dans 500 mL d'eau stérile à 4°C , 250 mL d'eau stérile à 4°C , 20 mL de sorbitol 1 M à 4°C et 1 mL de sorbitol 1 M à 4°C . Ces cellules électrocompétentes sont ensuite utilisées pour la transformation.

80 μL de levures compétentes sont mélangées avec 5 μg d'ADN plasmidique linéarisé. Le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm préalablement refroidie, puis incubé 5 minutes dans la glace. L'électroporation est effectuée en utilisant un électroporateur Bio-Rad paramétré à 2000 Volt, 25 μF et 200 Ohms. Après le choc électrique, 1 mL de sorbitol froid 1 M est immédiatement ajouté. Le contenu de la cuve est ensuite incubé durant 1h30 à 30°C sans agitation, avant d'être étalé sur boîtes de milieu YPDS (extrait de levure 1%, peptone 2%, glucose 2%, sorbitol 1 M et agar 2%), additionné en zéocine à 100 ou 500 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. L'augmentation de la concentration en zéocine peut permettre la sélection de clones de levures contenant de multiples copies du vecteur recombinant. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C jusqu'à l'apparition de colonies (5 à 6 jours).

V.2.g) Sélection des clones recombinants et criblage Mut⁺/Mut^S

Une extraction d'ADN génomique est d'abord réalisée à partir d'une douzaine de clones, selon le protocole décrit par Lööke *et al.*, (2011). Chaque colonie de levure est mise en suspension dans 100 µL d'un mélange composé d'acétate de lithium 200 mM et de SDS 1%. Après une incubation de 15 minutes à 70°C, 600 µL d'éthanol 96% à -20°C sont ajoutés. Le mélange est vortexé puis centrifugé à 15 000 g durant 3 minutes à température ambiante. Le culot est repris dans 100 µL de tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Une deuxième centrifugation permet la sédimentation des débris cellulaires, tandis que le surnageant contenant l'ADN est récupéré.

A partir de l'ADN génomique ainsi extrait, une réaction de PCR est réalisée avec un couple d'amorces s'hybridant sur l'HPL. Si la séquence de l'HPL est amplifiée, alors la colonie testée est recombinante.

Les phénomènes de recombinaison homologue permettant l'intégration du plasmide recombinant dans le génome de *Pichia pastoris* peuvent aboutir à la suppression du gène AOX1 de la levure (Mut^S) ou à son maintien (Mut⁺). Une autre réaction de PCR est réalisée à partir de l'ADN génomique, avec le couple d'amorces 5'AOX1 et 3'AOX1 s'hybridant respectivement au niveau des régions P_{AOX1} et TT. Si la colonie testée est recombinante, cette PCR permet l'obtention d'un fragment à environ 2 100 pb encadré par les sites d'hybridation des amorces 5'AOX1 et 3'AOX1, et comprenant la séquence de l'HPL au sein de la cassette d'expression. De plus, si la colonie testée est Mut⁺, le gène AOX1 de la levure (2 200 pb) sera également amplifié (ce qui n'est pas le cas si la colonie est Mut^S). Les tailles de la cassette d'expression et du gène AOX1 sont proches et ne peuvent pas être correctement distinguées sur gel d'agarose. Une hydrolyse du produit de PCR par l'enzyme de restriction *EcoRI* est donc effectuée. *EcoRI* présente un site de coupure dans la séquence de l'HPL, mais n'hydrolyse pas le gène AOX1. Seul le fragment portant la cassette d'expression est donc clivé, ce qui permettra de révéler la présence ou l'absence du gène AOX1 et donc le criblage Mut⁺/Mut^S par migration des produits d'hydrolyse sur gel d'agarose 1% dans 50 mL de tampon TBE 1X contenant 0,6 µg.mL⁻¹ de BET. Par ailleurs, la séquence des amplifiats obtenus par PCR est vérifiée par séquençage.

La détermination du phénotype Mut est également vérifiée par comparaison de la croissance des colonies sur milieux MD (minimal dextrose) (*yeast nitrogen base* avec sulfate d'ammonium et sans acides aminés (YNB 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, glucose 2%) et MM (minimal methanol) (YNB 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, méthanol 0,5%) après 48h d'incubation à 30°C. Les levures Mut^s utilisent lentement le méthanol, donc leur croissance sur milieu MM est plus lente que sur milieu MD. Les levures Mut⁺ montrent une croissance identique sur les deux types de milieu. Le criblage Mut⁺/Mut^s est nécessaire car le protocole d'expression mis en place par la suite est choisi en fonction de la capacité du transformant à utiliser le méthanol.

V.2.h) Expression des HPL recombinantes chez *P. pastoris* X-33

Le protocole d'expression de l'HPL recombinante chez une levure *Pichia pastoris* X-33 Mut⁺ débute par la mise en culture d'une colonie dans 25 mL de milieu BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) (phosphate de potassium 100 mM pH 6, YNB 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, glycérol 1%, extrait de levure 1% et peptone 2%) en vue de la sécrétion, ou MG (*Minimal Glycerol Medium*) (YNB 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, glycérol 1%) en vue de l'expression intracellulaire des HPL recombinantes. La culture est incubée à 30°C sous agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une absorbance à 600 nm comprise entre 2 et 6. Après une centrifugation à 2000 g durant 5 minutes à 4°C, les cellules sont suspendues dans un volume de milieu d'induction BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) (phosphate de potassium 100 mM pH 6, YNB 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, méthanol 0,5%, extrait de levure 1% et peptone 2%), ou MM (*Minimal Methanol*) (YNB 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, méthanol 0,5%), de manière à obtenir une absorbance à 600 nm égale à 1 (environ 50 à 200 mL de milieu).

Si l'expression est réalisée chez une levure Mut^s, une colonie est utilisée pour inoculer 100 mL de milieu BMGY ou MG. Après une incubation à 30°C sous agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une absorbance à 600 nm comprise entre 2 et 6, une centrifugation à 2000 g durant 5 minutes à 4°C est effectuée. Les cellules sont suspendues dans un volume de 10 à 20 mL ($1/10^e$ à $1/5^e$ du volume initial) de milieu d'induction BMMY ou MM.

Quel que soit le phénotype Mut, l'expression est réalisée à 30°C sous agitation (250 rpm). Différents temps d'induction ont été testés (24h, 48h, 72h et 96h). Toutes les 24h, 0,5% de méthanol est ajouté à la culture afin de maintenir l'induction.

V.2.i) Analyse des transcrits par RT-PCR

Afin de s'assurer de la présence de transcrits correspondant à la cassette d'expression d'intérêt, une extraction des ARN totaux a été réalisée. Chaque culot obtenu sur 10 mL de culture de levures après différents temps d'induction (24h, 48h, 72h, et 96h) a été repris dans 400 µL de tampon AE (acétate de sodium 50 mM pH 5,3, EDTA 1 mM). La solution a été vortexée durant 20 secondes après avoir ajouté 0,1 volume de SDS 10%, puis vortexée à nouveau après l'ajout d'un volume de phénol à pH 4,3 à -20°C. Le mélange a été incubé 4 minutes à 65°C avant d'être plongé dans un mélange glace/éthanol jusqu'à ce que des cristaux se forment. Après une centrifugation de 2 minutes à 16 000 g à 4°C, la phase aqueuse a été récupérée et ajoutée à un volume de mélange phénol:chloroforme (1:1). La solution a été vortexée 20 secondes puis centrifugée à nouveau 2 minutes à 16 000 g à 4°C. Après prélèvement de la phase aqueuse, les acides nucléiques ont été précipités durant 30 minutes à -80°C en ajoutant 0,1 volume d'acétate de sodium 3M à pH 5,3 et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -20°C. L'ARN a ensuite été récupéré dans le culot par centrifugation à 16 000 g pendant 15 minutes, à 4°C. Les culots ont d'abord été lavés à l'éthanol 80%, puis séchés et repris dans 20 µL d'eau-DEPC (diéthyl pyrocarbonate).

Une transcription inverse a été réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux extraits, d'un oligo(dT)₁₈ et de la PowerScript reverse Transcriptase (Clontech). Les ADNc ont été utilisés dans des réactions de PCR avec les oligonucléotides spécifiques des HPL, et les produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose 1% dans 50 mL de tampon TBE 1X contenant 0,6 µg.mL⁻¹ de BET.

V.2.j) Analyse de l'expression des HPL recombinantes

A différents temps d'induction (24h, 48h, 72h et 96h), un volume de 10 mL de culture est prélevé, puis centrifugé à 14 000 g durant 5 minutes à température ambiante. Les surnageants de culture sont concentrés et les culots de levures sont gelés dans un mélange glace-éthanol, avant d'être stockés au moins une nuit à -80°C. Ces culots sont ensuite

décongelés et la lyse est réalisée en ajoutant 1 mL de tampon de lyse (tampon phosphate de sodium 50 mM pH7,4, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, glycérol 5%) ainsi qu'un volume de billes de verre (de diamètre 0,5 mm). Ensuite, huit cycles de 30 secondes d'agitation au vortex et 30 secondes d'incubation dans la glace sont effectués. Après une centrifugation à 5 000 g durant 5 minutes à 4°C, la fraction soluble est récupérée. Les fractions récupérées après lyse cellulaire ainsi que les surnageants de culture, sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. L'activité HPL de ces fractions est également mesurée.

VI. Etude des relations structure-fonction de l'hydroperoxyde lyase

La stratégie choisie pour réaliser cette étude a été fondée sur la construction et l'analyse d'un modèle tridimensionnel de la structure de la 13-HPL d'olive, associées à la comparaison des séquences en acides aminés d'HPL de spécificités différentes ainsi que d'autres CYP74. Des résidus d'acides aminés de la 13-HPL d'olive ont été sélectionnés et modifiés par mutagenèse dirigée, afin de préciser leur implication dans le mécanisme catalytique et la spécificité réactionnelle de l'enzyme.

VI.1. Identification des acides aminés d'intérêt et choix des mutations

VI.1.a) Alignement de séquences en acides aminés

Les alignements de séquences ont été réalisés à l'aide des programmes Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) et Multalin (Corpet 1988). Le pourcentage d'identité entre les différentes séquences primaires en acides aminés a été déterminé à l'aide de l'outil SMS (Sequence manipulation suite, identity and similarity) (Stothard 2000). L'alignement de la structure secondaire et de la séquence peptidique de la 13-HPL d'olive, avec les séquences peptidiques d'AOS et de P450 11A1, 2C9 et BM-3, a été réalisé avec l'outil ESPript 3.0 (Robert et Gouet 2014).

VI.1.b) Modélisation de la structure tridimensionnelle

Un modèle de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive a été construit à l'aide du serveur I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement). La modélisation par I-TASSER débute par l'identification de structures cristallines pouvant servir de matrices, à partir de la bibliothèque PDB (Protein Data Bank), grâce à une approche par reconnaissance des repliements (Protein Threading). I-TASSER utilise l'outil LOMETS (Local Meta-Threading-Server) qui est un ensemble de neuf programmes de reconnaissance des repliements (FFAS-3D, HHsearch, MUSTER, pGenTHREADER, PPAS, PRC, PROSPECT2, SP3, et SPARKS-X). I-TASSER sélectionne ensuite les 10 meilleures matrices. Le modèle tridimensionnel est enfin construit par des simulations itératives d'assemblages de fragments, basées sur les structures cristallines des matrices (Zhang 2008 ; Roy *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2015). Les régions non alignées lors de ce processus sont modélisées *ab initio* en tenant compte des différents champs de force qui s'exercent (contraintes stériques et interactions) (Wu *et al.*, 2007 ; Roy *et al.*, 2010). L'algorithme REMO permet enfin de générer les modèles structurels finaux grâce à l'optimisation des réseaux de liaison hydrogène (Li et Zhang 2009).

Différents serveurs informatiques ont été testés pour réaliser une minimisation de l'énergie de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive. Il s'agit notamment des serveurs CHARMMing (Miller *et al.*, 2008) utilisant le champ de force CHARMM, ModRefiner (Xu et Zhang 2011) et Nomad-Ref (Lindahl *et al.*, 2006) utilisant le champ de force Gromos96, et YASARA minimization (Krieger *et al.*, 2009) qui se base notamment sur le champ de force AMBER.

La qualité stéréochimique des modèles a été évaluée par la suite logicielle Protein Structure Validation Software (PSVS) (Bhattacharya *et al.*, 2007) composée notamment des logiciels Molprobity et PDB validation. MolProbity (Chen *et al.*, 2010) permet notamment de vérifier si les combinaisons des angles dièdres ϕ et ψ sont bien situées dans les zones autorisées du diagramme de Ramachandran, et rechercher d'éventuelles collisions entre atomes liés ou non liés. PDB validation (Berman *et al.*, 2000) estime la déviation des angles et des longueurs de liaison des atomes par comparaison avec les valeurs standards de la banque de données établie par Engh et Huber (1991).

Des modèles tridimensionnels de la 9-HPL d'amande (Mita *et al.*, 2005), de la 13-HPL de pomme de terre (Mu *et al.*, 2012), et de la 9/13-HPL de raisin (Zhu *et al.*, 2012) ont également été construits de la même manière, à l'aide de I-TASSER.

Les programmes PyMol (DeLano 2002) et YASARA View (Krieger et Vriend 2014) ont été utilisés pour la visualisation des modèles et des mutations, et la comparaison avec d'autres structures tridimensionnelles. La similarité structurale entre deux structures tridimensionnelles a été évaluée par superposition des structures grâce au serveur TM-align (Zhang et Skolnick 2005). L'outil CASTp (Dundas *et al.*, 2006) a permis d'identifier les cavités présentes à l'intérieur de la protéine, susceptibles de correspondre au site actif de l'enzyme. CASTp calcule également pour chaque cavité, l'aire et le volume de la surface accessible au solvant (surface de Richards) et de la surface moléculaire (surface de Connolly). Le calcul utilise une molécule de solvant sonde de rayon 1,4 Å (taille d'une molécule d'eau). L'outil MEMEBED (*membrane protein orientation predictor*) (Nugent et Jones 2013) associé au serveur PSIPRED (*protein sequence analysis workbench*) a été utilisé pour la prédiction des domaines d'interaction avec la membrane chez la 13-HPL d'olive.

VI.2. Obtention de mutants de la 13-HPL d'olive par mutagenèse dirigée

Les études *in silico* ont permis de cibler des résidus d'acides aminés d'intérêt. Ceux-ci ont été étudiés *in vitro* : ils ont été modifiés par mutagenèse dirigée sur le vecteur recombinant pQE-30 contenant la séquence de l'HPL*wt*.

VI.2.a) Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été effectuée à l'aide du kit QuickChangeTM Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent). 10 ng d'ADN plasmidique pQE-30 –HPL*wt*, 1 µL de la solution de dNTP fournie, 125 ng de chacune des amorces sens et antisens portant la mutation (Annexe, Tableau A), 1,5 µL de QuickSolution Reagent, 1 µL de QuickChange Lightning Enzyme (PfuUltra High Fidelity DNA polymerase) et 5 µL de tampon de réaction 10X sont mélangés, dans un volume final de 50 µL. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 95°C 2 min (1 cycle) ; 95°C 20 s, 60°C 10 s, 68°C 3 min (18 cycles) ; 68°C 4 min

(1 cycle). Une fois l'amplification terminée, 2 μL de l'enzyme *DpnI* fournie dans le kit sont ajoutés aux 50 μL de produit de PCR. L'incubation avec *DpnI* est effectuée durant 5 minutes à 37°C. L'enzyme *DpnI* hydrolyse les brins d'ADN méthylés produits in vivo, qui sont les brins d'ADN plasmidique ayant servi de matrice et qui ne portent pas la mutation.

VI.2.b) Transformation des bactéries *E. coli* M15

Un volume de 2 μL de produit de PCR traité par *DpnI* est ajouté à 100 μL de bactéries *E. coli* M15 préalablement rendues compétentes. Après une incubation de 20 min dans la glace, un choc thermique à 42°C est appliqué durant 90 secondes. 500 μL de milieu de culture Psi Broth (LB Broth contenant 4 mM de MgSO_4 et 10 mM de KCl) sont ajoutés aux bactéries, qui sont ensuite incubées à 37°C durant 90 min à 250 rpm. Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu LB agar, ampicilline 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycine 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et mises en culture une nuit à 37°C. Plusieurs colonies sont sélectionnées pour être relancées dans du milieu liquide LB Broth, ampicilline 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycine 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. L'ADN plasmidique est extrait à partir de 4 mL de culture bactérienne liquide, en utilisant le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). La séquence nucléotidique de l'insert est vérifiée par séquençage réalisé par la société GATC Biotech, à l'aide des amorces pQE-for et pQE-rev.

Un clone recombinant contenant la mutation d'intérêt est sélectionné pour l'expression de l'enzyme recombinante mutée. Après purification par chromatographie d'affinité sur colonne de résine de cobalt, la caractérisation biochimique du mutant est effectuée.

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

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12%, en présence de SDS 0,1% (SDS-PAGE), puis colorées au bleu de Coomassie (EZ Blue™ Gel Staining Reagent, Sigma-Aldrich) ou transférées sur membrane de nitrocellulose (Bio-rad). Cette membrane est ensuite saturée durant 30 minutes dans une solution de PBS (Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,3) contenant 5 % de lait écrémé, puis incubée en présence d'anticorps anti-polyHistidine conjugués à la peroxydase

(Sigma-Aldrich), dilués au 1/4000^e. La révélation est effectuée en présence de 1,3 mM de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich) dans un tampon PBS contenant 0,01% de H₂O₂.

VIII. Détermination des activités enzymatiques

VIII.1. Synthèse des hydroperoxydes d'acides gras

Le 13-HPOD et le 13-HPOT ont été synthétisés selon le protocole expérimental décrit par Vick (1991) et adapté par Fauconnier (communication personnelle). Le mélange réactionnel (volume final de 30 mL) contient 70 mM de tampon borate de sodium à pH 9, 6,35 mM d'acide linoléique ou d'acide linoléique, 11 mM de NaOH et 30 unités de lipoxygénase de soja commerciale (Sigma-Aldrich). La réaction, qui débute par addition de l'acide gras, se déroule pendant 30 min à 4°C sous oxygénation légère et est arrêtée par acidification (pH3) suite à l'ajout d'HCl 1 M. Après extraction à l'éther et évaporation du solvant, le produit obtenu est repris dans du méthanol.

La synthèse des hydroperoxydes est contrôlée par chromatographie sur couche mince dans le solvant heptane/éther diéthylique/acide acétique (55/45/1) et révélée par vaporisation du mélange acétate de cuivre saturé/acide phosphorique 80%. La quantité d'hydroperoxydes formés est déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 234 nm et en utilisant le coefficient d'extinction molaire $\epsilon=25000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, correspondant aux diènes conjugués (Perez *et al.*, 1999).

VIII.2. Mesure des cinétiques enzymatiques

Le mélange réactionnel standard (volume final 1 mL) contient 10 μL de l'extrait protéique et 43 μM d'hydroperoxydes d'acides gras, dans 50 mM de tampon phosphate au pH optimum de l'enzyme et incubé à la température optimale d'action de l'enzyme. La réaction démarre lors de l'ajout du substrat. L'activité enzymatique est suivie sur 30 secondes, en mesurant la décroissance de l'absorbance à 234 nm en fonction du temps, ce qui correspond au clivage du système diénique des hydroperoxydes. Une unité d'activité hydroperoxyde lyase est la quantité d'enzyme qui catalyse le clivage d'une micromole

d'hydroperoxyde par minute. Elle est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire des hydroperoxydes, $\epsilon=25000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

IX. Détermination de la concentration en protéines

La quantité de protéines dans les extraits purs est déterminée par la mesure de l'absorbance à 280 nm et calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire de l'enzyme déterminé à l'aide du serveur Protein Calculator. La concentration des autres extraits protéiques a été déterminée par la méthode de Bradford (1976) en réalisant une gamme étalon avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

X. Traitement statistique des données

L'influence de l'ajout dans le milieu réactionnel, de composés chimiques (NaCl, KCl, Na_2SO_4 , glycérol, et glycine) sur l'activité de l'HPL a été quantifiée grâce à une analyse de variance, effectuée selon un modèle en randomisation totale à un facteur, à l'aide du logiciel Statgraphics. Pour chacun des paramètres, les moyennes de trois déterminations de l'activité spécifique ont été comparées à l'aide du test de Newman-Keuls.

Résultats et Discussion

I. Purification et caractérisation d'hydroperoxyde lyases recombinantes exprimées chez la bactérie *Escherichia coli*

Au cours de travaux préliminaires réalisés au laboratoire, la séquence d'ADNc de l'HPL d'olive (HPL_{wt}), ainsi que la séquence d'ADNc de l'HPL d'olive délétée du peptide de transit chloroplastique, ont été clonées dans la bactérie *Escherichia coli*. Nous avons ensuite réalisé l'expression des enzymes recombinantes chez *E. coli* M15, leur purification par chromatographie d'affinité, ainsi que leur caractérisation biochimique.

I.1. Expression des enzymes recombinantes et purification par chromatographie d'affinité

Les HPL (HPL_{wt}, HPL_{del}) ont été exprimées chez les bactéries *E.coli* M15 comme protéines de fusion portant une étiquette polyHistidine à l'extrémité N-terminale de l'enzyme. Après centrifugation du milieu de culture, le culot bactérien est récupéré puis les bactéries sont lysées. Une seconde centrifugation permet la séparation de la fraction soluble du lysat bactérien et du culot de lyse. La purification des enzymes recombinantes est réalisée à partir de la fraction soluble du lysat bactérien, par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine contenant du cobalt (Talon Superflow Metal Affinity, Clontech) en FPLC sur Äkta purifier. La colonne est équilibrée avec 50 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7 contenant 300 mM de NaCl, puis l'élution est réalisée en trois paliers successifs à l'aide du tampon d'équilibrage additionné d'imidazole de concentration 40 mM, 100 mM et 200 mM (Figure 30).

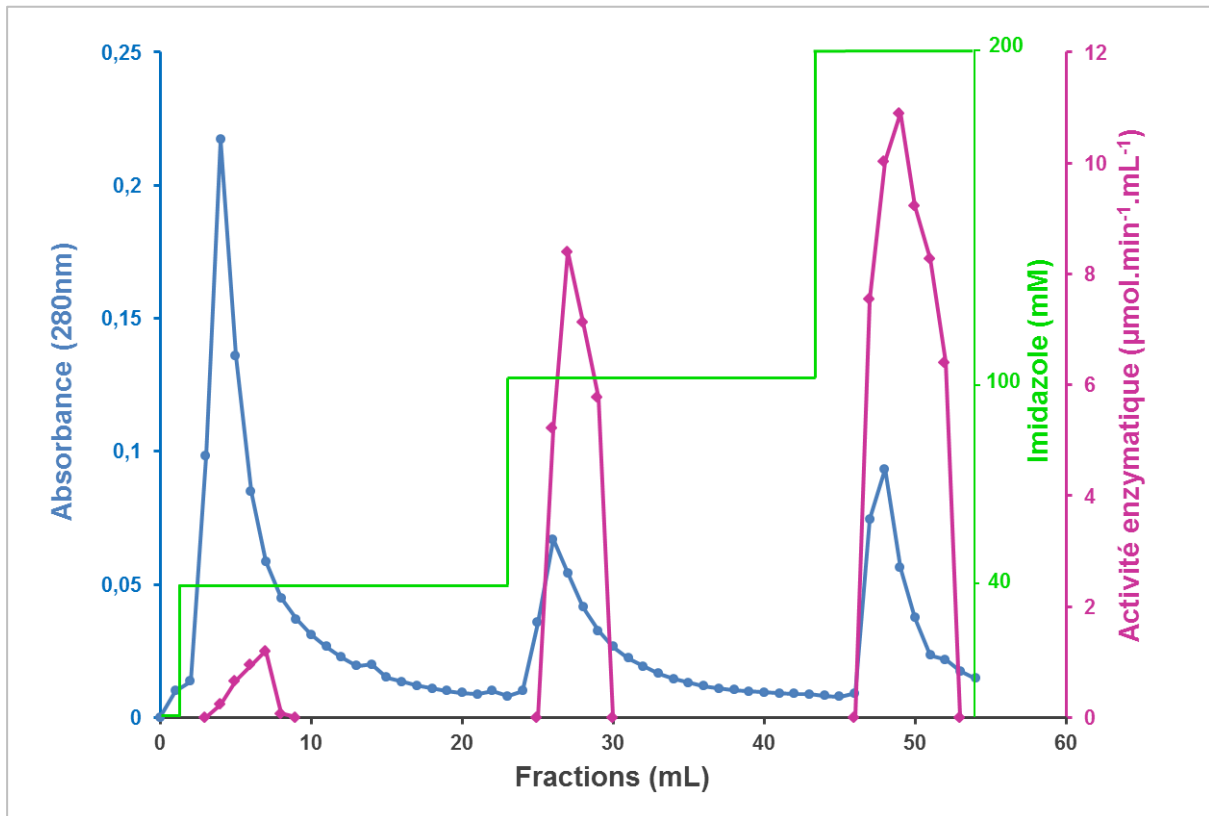


Figure 30 : Profil d'éluion des hydroperoxydes lyases recombinantes lors de la chromatographie d'affinité sur colonne de résine au cobalt (Talon Superflow Metal Affinity). La fraction soluble du lysat bactérien (20 mL) est chargée sur colonne de résine au cobalt ($h= 1,2$ cm, $D= 1,1$ cm). Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par trois paliers d'imidazole (40 mM, 100 mM et 200 mM) à un débit de $1,25$ mL.min⁻¹.

Pour chacun des trois paliers d'éluion, les fractions présentant une activité HPL sont réunies.

La répartition des enzymes recombinantes entre la fraction soluble du lysat bactérien et le culot de lyse, ainsi que les étapes de purification des HPL recombinantes, ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en présence de SDS et par immunoempreinte (Figure 31).

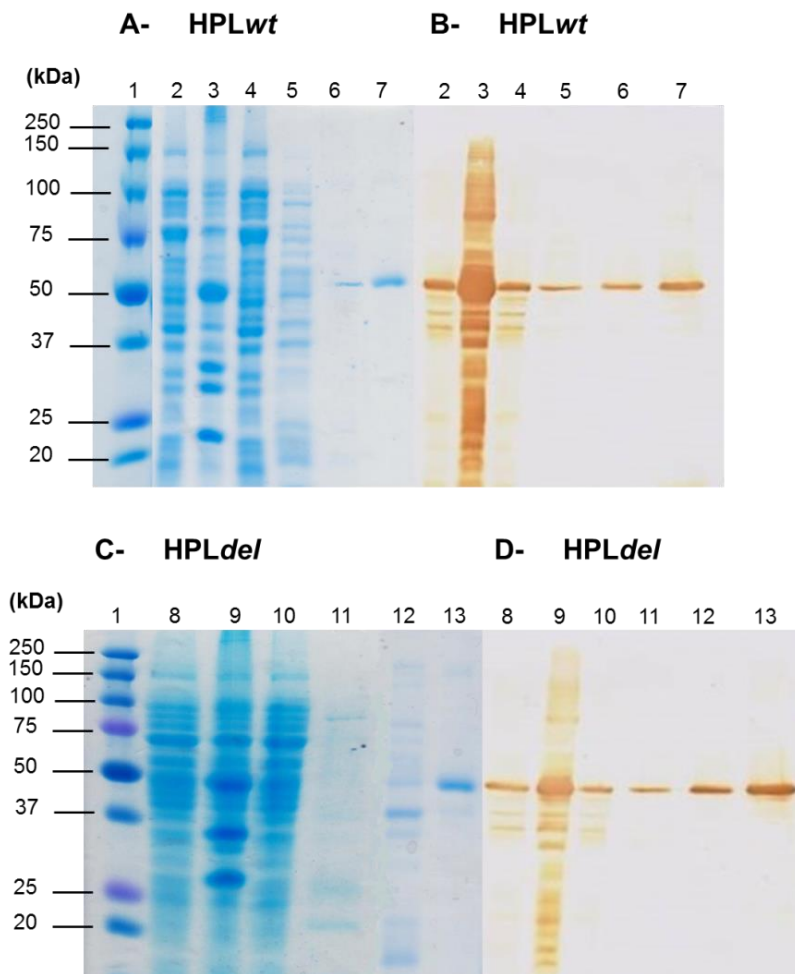


Figure 31 : Analyse des étapes de purification de l'HPLwt (A et B) et de l'HPLdel (C et D) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % et par immunoempreinte

Les protéines ont été séparées par électrophorèse puis colorées au bleu de Coomassie (EZ Blue™ Gel Staining Reagent) (A et C) ou transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-polyhistidine (B et D). Les pistes 2 à 7 correspondent à l'HPLwt, et les pistes 8 à 13 correspondent à l'HPLdel.

1 : Marqueur de masse moléculaire ; 2 et 8 : fraction soluble du lysat bactérien ; 3 et 9 : culot de lyse ; 4 et 10 : fraction non retenue sur la colonne ; 5 et 11 : fractions éluées à 40 mM d'imidazole ; 6 et 12 : fractions éluées à 100 mM d'imidazole ; 7 et 13 : fractions éluées à 200 mM d'imidazole.

Les fractions éluées à 40 mM, 100 mM et 200 mM d'imidazole contiennent l'HPL recombinante puisque nous observons une bande à environ 50 kDa révélée par l'anticorps anti-polyHistidine, correspondant à la masse moléculaire d'une sous-unité de l'enzyme. Nous constatons également que les HPL (*wt* et *del*) sont purs dans les fractions éluées à 200 mM d'imidazole puisqu'aucune autre bande n'est visible après coloration des protéines au bleu de Coomassie (Figure 31, pistes 7 et 13). Cependant, nous observons la présence d'une

fraction non négligeable d'HPL dans les culots (Figure 31, pistes 3 et 9) qui est probablement sous forme de corps d'inclusion.

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

Tableau III : Tableau de purification de l'HPL_{wt} et de l'HPL_{del}.

HPL	Fraction	Protéines totales (mg)	Activité totale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Activité spécifique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines)	Rendement	Facteur de purification
HPL _{wt}	Extrait brut Surnageant de lyse	310,91 \pm 20,48	105,25 \pm 2,62	0,34 \pm 0,01	100	1
	Elution à 200mM d'imidazole	0,52 \pm 0,02	36,40 \pm 1,07	70,05 \pm 0,81	34,58	206,03
HPL _{del}	Extrait brut Surnageant de lyse	208,05 \pm 8,64	105,50 \pm 10,83	0,44 \pm 0,09	100	1
	Elution à 200mM d'imidazole	0,51 \pm 0,03	32,49 \pm 3,03	63,93 \pm 1,60	30,80	145,30

Les activités enzymatiques ont été mesurées en utilisant le 13-HPOT comme substrat. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations \pm l'écart type.

A partir de 400 mL de milieu de culture, nous avons purifié 0,52 \pm 0,02 mg d'HPL_{wt} ayant une activité spécifique de 70,05 \pm 0,81 U.mg⁻¹ de protéines et 0,51 \pm 0,03 mg d'HPL_{del} ayant une activité spécifique de 63,93 \pm 1,60 U.mg⁻¹ de protéines. La délétion du peptide de transit chloroplastique n'a donc pas permis d'augmenter la quantité d'enzyme purifiée.

I.2. Caractérisation biochimique des enzymes recombinantes

L'activité de l'HPL_{wt} et de l'HPL_{del} a été testée en présence de 9- et de 13-hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide α -linoléique. Aucune activité enzymatique n'a été détectée sur les 9-hydroperoxydes. Les deux enzymes recombinantes sont spécifiques des 13-hydroperoxydes ; ce sont donc des 13-HPL.

1.2.a) Détermination du pH optimum et de la température optimale

Le pH optimum et la température optimale de l'HPLwt et de l'HPLdel ont été déterminés en utilisant le 13-HPOD et le 13-HPOT comme substrats. Pour cela, l'activité HPL a été mesurée à des températures comprises entre 5 et 45°C, et dans une gamme de pH de 5 à 9 (Figures 32 et 33).

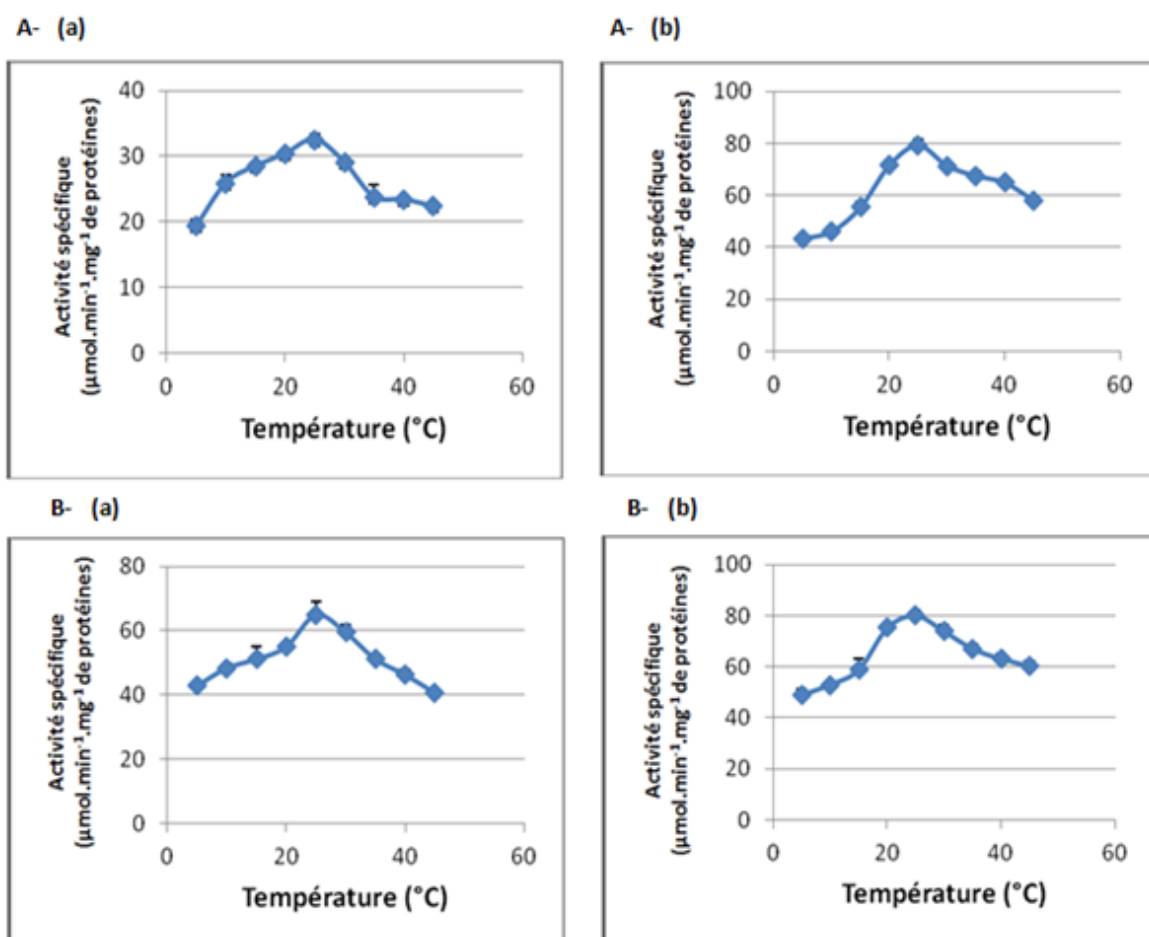


Figure 32 : Influence de la température sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B), avec le 13-HPOD (a) ou le 13-HPOT (b) comme substrat
 Les résultats représentent la moyenne de deux déterminations \pm l'écart type.

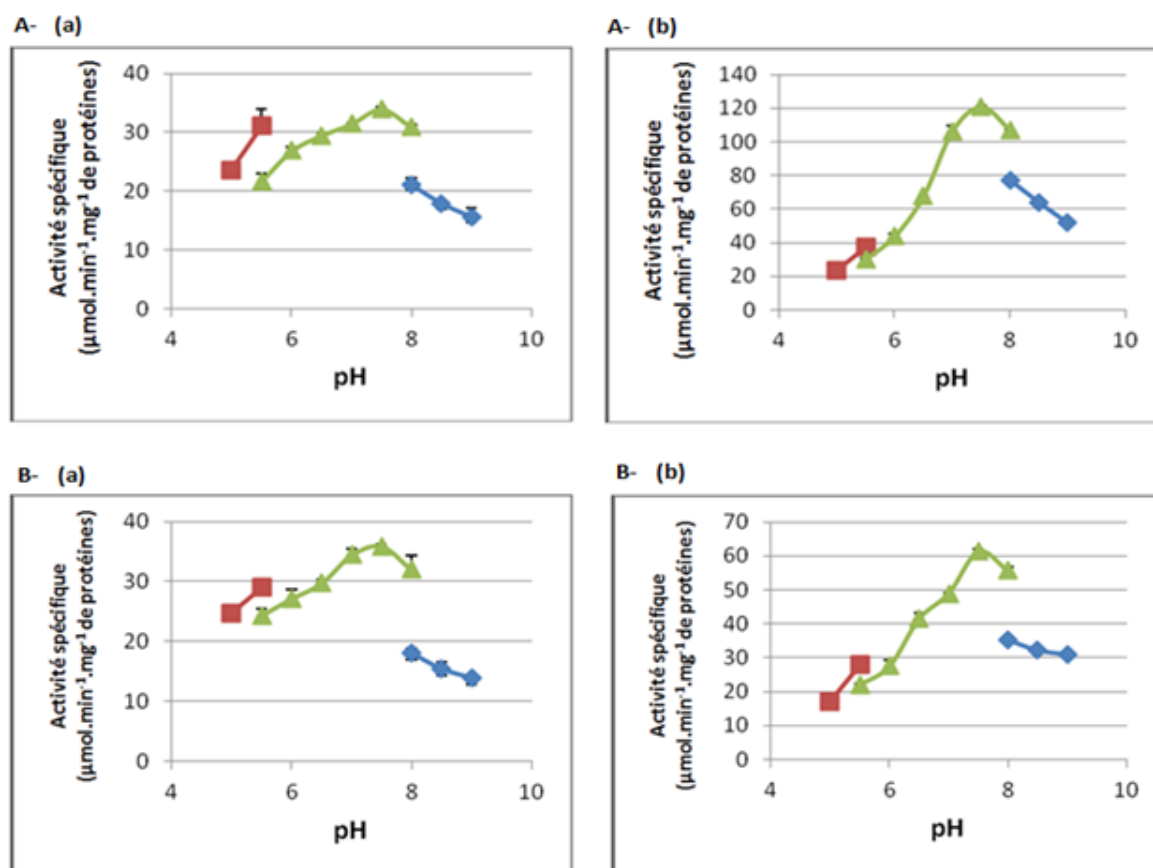


Figure 33 : Influence du pH sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A) et l'HPLdel (B), avec le 13-HPOD (a) ou le 13-HPOT (b) comme substrat

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

Les deux enzymes présentent un pH optimum de 7,5 et une température optimale de 25 °C, quel que soit le substrat utilisé. Les mêmes valeurs ont été obtenues pour l'HPL de feuilles de thé (Matsui *et al.*, 1991) et l'HPL de pomme de terre (Mu *et al.*, 2012). Nous constatons également qu'au moins 80% de l'activité spécifique maximale des HPLwt et HPLdel est conservée entre pH7 et pH8, et à des températures comprises entre 20°C et 30°C. Des résultats similaires ont été obtenus pour les HPL partiellement purifiées à partir de pulpe d'olive de la variété Picual (Salas et Sanchez 1999) ou de feuilles d'oliviers (Akacha et Gargouri 2009). Akacha et Gargouri (2009) ont également montré une production d'aldéhydes à 6 carbones optimale à pH6,5 et à 20°C. En revanche, Padilla *et al.*, (2010) ont signalé un pH optimum compris entre 8 et 9 et une température optimale de 45 °C pour l'HPL recombinante d'olive de la variété Picual.

I.2.b) Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de l'HPL*wt* et de l'HPL*del* ont été déterminés pour le 13-HPOD et pour le 13-HPOT, à l'aide des équations de Michaelis-Menten (Tableau IV).

Tableau IV : Paramètres cinétiques des HPL *wt* et HPL *del* recombinantes purifiées.

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

Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations \pm l'écart type.

Les deux enzymes présentent un Km plus faible pour le 13-HPOD (43,10 μM et 43,22 μM pour l'HPL*wt* et l'HPL*del* respectivement) que pour le 13-HPOT (152,75 μM et 173,85 μM pour l'HPL*wt* et l'HPL*del* respectivement). Cependant, l'HPL*wt* et l'HPL*del* présentent respectivement une augmentation du kcat de 21,4 et 22,5 fois, avec le 13-HPOT (564,95 s^{-1} pour l'HPL*wt* et 402,62 s^{-1} pour l'HPL*del*) par rapport au 13-HPOD (28,38 s^{-1} pour l'HPL*wt* et 17,89 s^{-1} pour l'HPL*del*). L'efficacité catalytique (kcat/Km) des deux HPL est significativement plus importante pour le 13-HPOT que pour le 13-HPOD (augmentation de 6 fois pour l'HPL*wt* et de 5,5 fois pour l'HPL*del*). En outre, l'HPL*wt* agit plus efficacement sur le 13-HPOT et le 13-HPOD que l'HPL*del* (respectivement 3,71 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ et 2,36 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ pour le 13-HPOT et 0,62 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ et 0,43 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ pour le 13-HPOD).

L'HPL d'olive de la variété Picual agit également plus efficacement sur le 13-HPOT que sur le 13-HPOD (Padilla *et al.*, 2010). Les valeurs de kcat/Km calculées à partir des données de Padilla *et al.*, (2010) sont de 0,348 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ pour le 13-HPOT et 0,159 $\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ pour le 13-HPOD. Nos résultats montrent donc que l'HPL*wt* et l'HPL*del* clonées à partir de la variété Leccino, agissent 10,66 fois et 6,78 fois plus efficacement sur le 13-HPOT et 3,9 fois et 2,7 fois plus efficacement sur le 13-HPOD que l'HPL d'olive de la variété Picual clonée par Padilla *et al.*, (2010).

Au laboratoire, l'HPL wt et l'HPL del ont été utilisées comme biocatalyseurs pour la production d'aldéhydes volatils à note verte (hexanal et (Z)-hex-3-ènal) à partir d'hydroperoxydes d'acide linoléique et d'acide linoléique (Jacopini *et al.*, 2016). Les aldéhydes produits ont été extraits, puis identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. L'HPL wt et l'HPL del ont respectivement permis la production de 5,61 mM et 3,93 mM d'hexanal, correspondant à des taux de conversion de 93,5% et 65,5%, et la production de 4,39 mM et 1,8 mM de (Z)-hex-3-ènal, correspondant à des taux de conversion de 73% et 45%. Ces taux de conversion peuvent être considérés comme de bons rendements au regard de ceux décrits dans la littérature : 25 à 86% lorsque des extraits de plantes sont utilisés comme source d'enzyme (Márczy *et al.*, 2002 ; Gargouri *et al.*, 2004 ; Nemeth *et al.*, 2004 ; Rabetafika *et al.*, 2008 ; Akacha et Gargouri 2009) et 43 à 65% avec une HPL recombinante (Noordermeer *et al.*, 2002 ; Gigot *et al.*, 2012). L'HPL wt et l'HPL del semblent donc être des candidats intéressants pour leur utilisation en tant qu'outils biotechnologiques dans des processus de bioproduction de composés à note verte.

II. Optimisation des conditions de conservation et amélioration de l'activité de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive

Afin de conserver l'activité enzymatique des HPL purifiées (wt et del) dans le temps, différentes conditions de stockage (réfrigération, congélation en présence de cryoprotecteur) ont été testées. Dans le but d'améliorer l'activité de ces enzymes en vue de leur utilisation en tant qu'outils biotechnologiques dans des procédés de production de molécules à note verte, l'influence de différents composés chimiques sur l'activité enzymatique a également été testée.

II.1.a) Stockage à basse température

Différentes températures de conservation (4°C ; -20°C ; -80°C) des deux HPL recombinantes purifiées ont été testées, sur une période de cinq semaines. Différentes concentrations de glycérol (10, 20, 30 et 40%) utilisé comme cryoprotecteur, ont été ajoutées lors du stockage à -20°C et à -80°C (Figure 34).

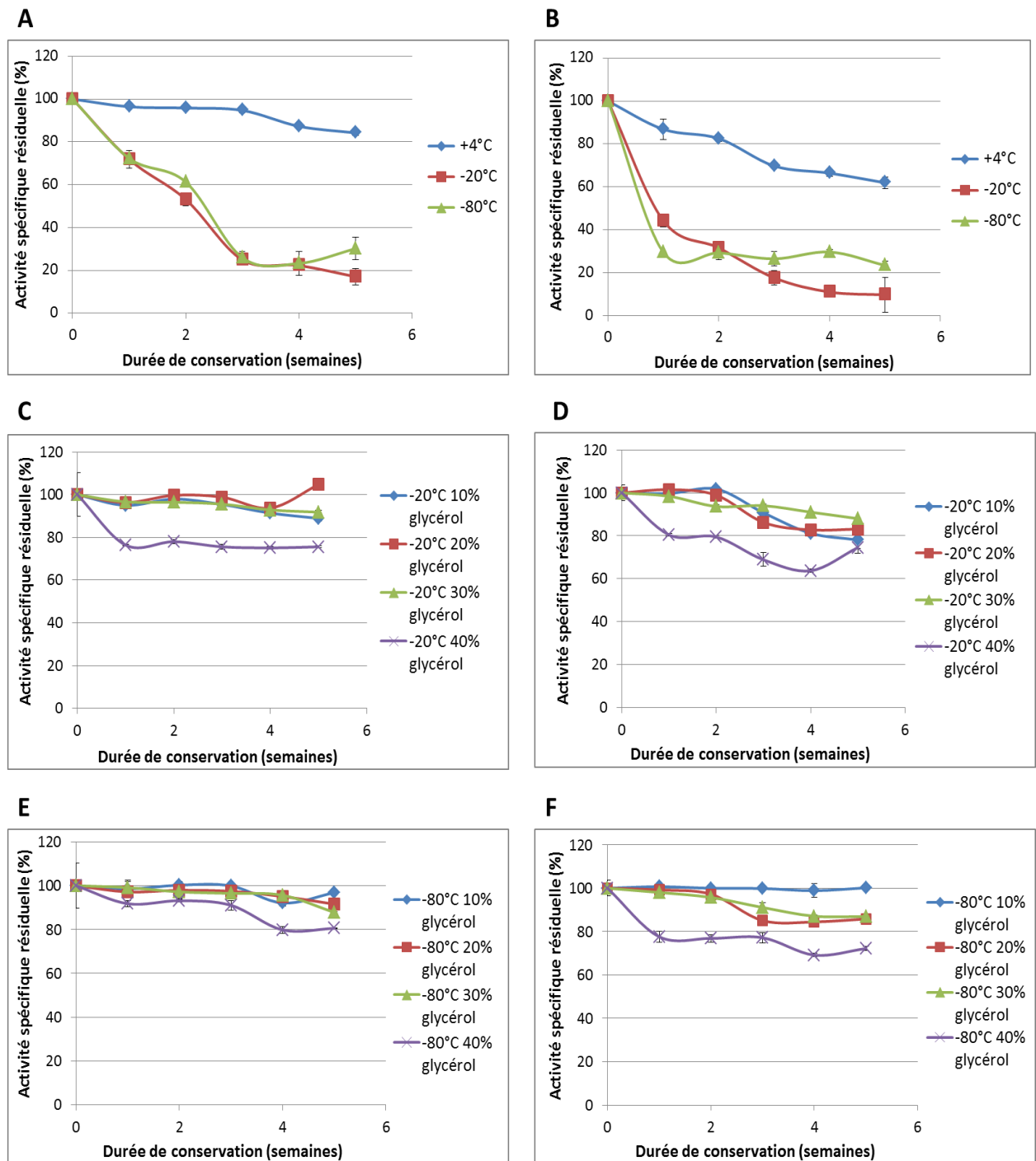


Figure 34 : Stabilité de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F) au cours d'un stockage de cinq semaines à basse température

Les enzymes ont été stockées durant 5 semaines à différentes températures : +4°C, -20°C et -80°C (A et B). L'effet cryoprotecteur du glycérol à différentes concentrations : 10, 20, 30 et 40% a été étudié au cours du stockage à -20°C (C et D) et à -80°C (E et F). L'activité HPL a été mesurée chaque semaine, en utilisant le 13-HPOT comme substrat. L'activité spécifique résiduelle est définie comme le pourcentage de l'activité spécifique de l'HPL ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéine) après stockage (1 à 5 semaine(s)), comparée à celle avant stockage (0 semaine). Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations indépendantes \pm l'écart type.

En l'absence de glycérol, il apparaît clairement que l'activité enzymatique des HPL purifiées est mieux préservée à 4°C qu'à -20°C et -80°C (Figure 34, A et B). Les deux HPL sont relativement stables durant les 5 semaines de stockage à 4°C, puisque respectivement 84% et 62% des activités spécifiques de l'HPL_{wt} et de l'HPL_{del}, sont conservés. Toutefois, l'HPL_{wt} montre une meilleure stabilité que l'HPL_{del} (après 3 semaines à 4°C, seuls 5% de l'activité de l'HPL_{wt} sont perdus contre 30% pour l'HPL_{del}). Noordermeer *et al.*, (2002) ont montré que l'HPL recombinante de luzerne peut être stockée à 4°C durant un mois sans perte significative d'activité.

Lors de la congélation à -20°C et à -80°C sans cryoprotecteur, l'HPL_{wt} et l'HPL_{del} s'inactivent rapidement. Dans ces conditions, l'activité enzymatique des deux HPL est réduite de près de 80%, en seulement trois semaines (Figure 34, A et B). Cette perte d'activité pourrait être causée par des changements du microenvironnement de la protéine lors du processus de congélation-décongélation, qui modifient sa conformation native de manière irréversible (Singh *et al.*, 2009). Lors de la congélation, la transformation de l'eau en cristaux de glace exclut les solutés et entraîne (i) leur concentration progressive (cryoconcentration) dans le mélange non gelé (incluant les protéines), (ii) l'augmentation de la force ionique, ce qui réduit la solubilité des protéines et déstabilise leur structure en perturbant les liaisons ioniques, et (iii) des changements de pH (Hanafusa 1972 ; Pikal-Cleland *et al.*, 2000 ; Cao *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2009 ; Kolhe *et al.*, 2010). Ces phénomènes peuvent conduire à la dénaturation et à l'agrégation des protéines (Pikal-Cleland *et al.*, 2000 ; Singh *et al.*, 2009 ; Kolhe *et al.*, 2010). De plus, l'interaction des protéines avec la surface des cristaux de glace provoque une dénaturation à l'interface, causée par l'affaiblissement des liaisons hydrophobes et la rupture des liaisons hydrogène intramoléculaires (Hanafusa 1972 ; Chang *et al.*, 1996 ; Cao *et al.*, 2003).

L'addition de cryoprotecteurs comme le glycérol, permet de minimiser ces phénomènes et éviter la dénaturation de la protéine au cours du processus de congélation/décongélation. Suurmeijer *et al.*, (2000) et Long *et al.*, (2010a) suggèrent que le glycérol permet de maintenir l'HPL dans un état liquide pendant le stockage à température inférieure à -20°C, permettant ainsi d'éviter des dommages lors de la congélation. Lors du stockage à -20°C et -80°C en présence de glycérol, les activités des deux activités HPL sont conservées (Figure 32, C à F). En effet, durant les 5 semaines de stockage à -20°C ou à -

80°C en présence de 10%, 20% ou 30% de glycérol, environ 90% à 100% de l'activité de l'HPL wt (Figure 34, C et E) et 80% à 100% de l'activité de l'HPL del (Figure 34, D et F) sont conservés. Les conditions optimales de conservation sont l'ajout de 10% de glycérol lors du stockage à -80°C, puisque la totalité de l'activité spécifique des deux HPL est préservée après 5 semaines (Figure 34, E et F). Des résultats similaires ont été obtenus par Long *et al.*, (2010a) pour l'HPL purifiée à partir des feuilles d'*Armanthus tricolor*, dont l'activité diminue de 62% lors du stockage durant 20 jours à -20°C sans glycérol, tandis que 80% de l'activité est conservée en présence du glycérol. Vagenende *et al.*, (2009) montrent que le glycérol exerce un effet stabilisateur en agissant comme interface amphiphile entre la surface hydrophobe et le solvant polaire, ce qui empêche la dénaturation et l'agrégation des protéines.

La possibilité de conserver l'activité des HPL recombinantes représente un avantage pour leur utilisation potentielle dans un procédé industriel de bioconversion.

II.2. Amélioration de l'activité enzymatique par ajout de composés chimiques

L'effet de composés chimiques (NaCl, KCl, Na₂SO₄, glycine et glycérol) sur l'activité enzymatique de l'HPL wt et de l'HPL del a été évalué. En effet, leur addition dans le milieu réactionnel peut provoquer des modifications de l'interaction entre l'enzyme et le solvant aqueux, induisant des changements conformationnels pouvant avoir des effets sur la stabilité et l'activité de l'enzyme.

II.2.a) Effets de différents composés chimiques sur l'activité enzymatique

- **Effet de la concentration du composé**

L'effet de sels tels que le NaCl, le KCl, et le Na₂SO₄, à différentes concentrations (0 ; 0,15 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 M) sur l'activité spécifique de l'HPL wt et de l'HPL del a été étudié. Les deux enzymes étant plus efficaces sur le 13-HPOT, les activités enzymatiques ont été mesurées uniquement sur ce substrat (Figure 35).

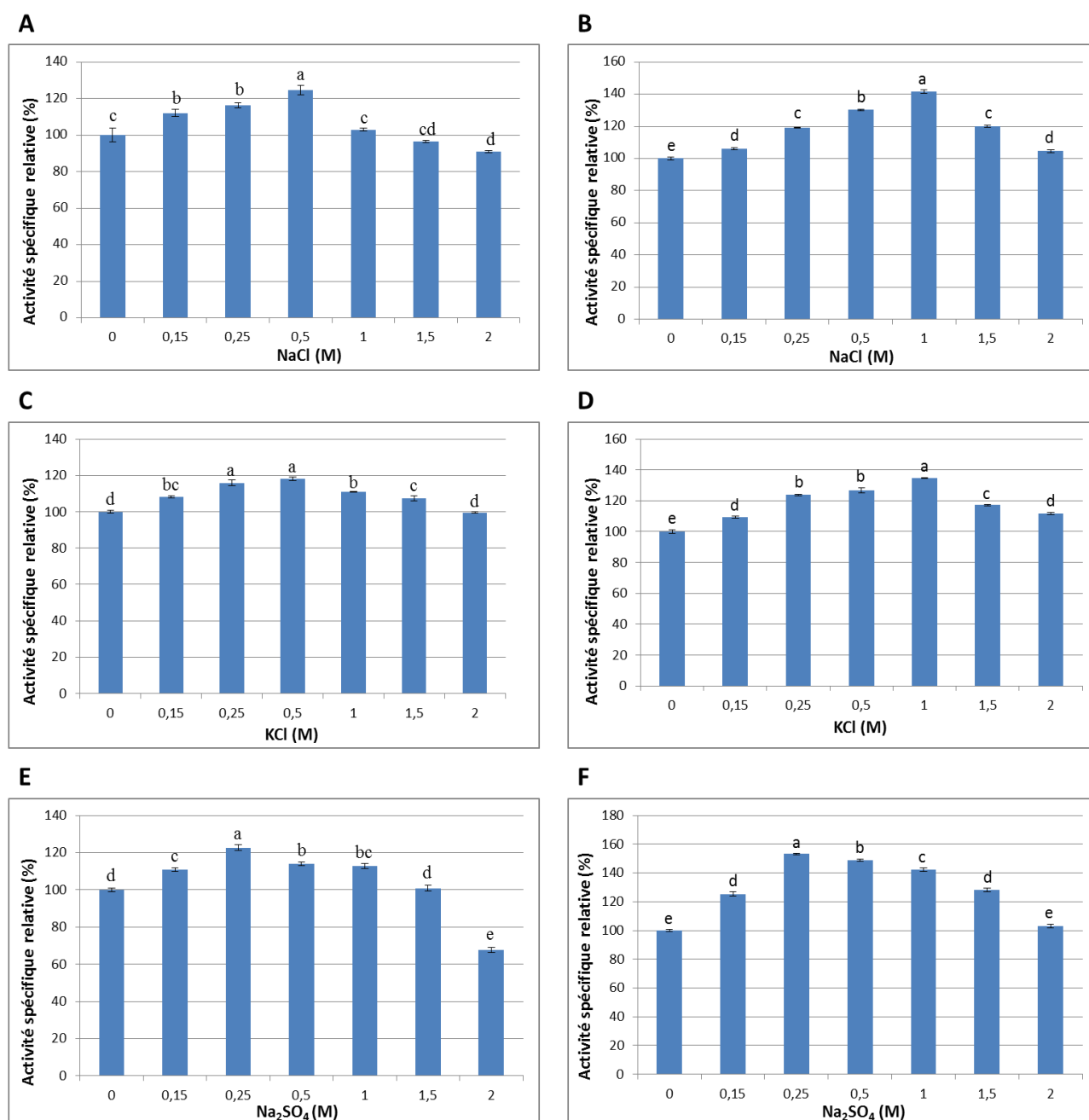


Figure 35 : Effet de la concentration en sels sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A, C, E) et de l'HPLdel (B, D, F)

L'activité enzymatique des HPL a été déterminée dans un tampon phosphate 50 mM à pH7,5 en présence de concentrations en NaCl (A et B), KCl (C et D) ou Na₂SO₄ (E et F) allant de 0 à 2 M. L'activité spécifique relative a été définie en tant que pourcentage de l'activité spécifique de l'HPL ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines) en présence de sel par rapport à celle du témoin (sans sel). Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations indépendantes \pm l'écart type. Les barres surmontées d'une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,001$).

Nous remarquons que l'augmentation de la concentration en sels conduit à une augmentation de l'activité enzymatique de l'HPL $_{wt}$ jusqu'à une activité maximale obtenue avec 0,5 M de NaCl (augmentation de 24,5%), 0,5 M de KCl (augmentation de 18%) et 0,25 M de Na₂SO₄ (augmentation de 22,6%) (Figure 35 A, C et E). De la même manière, l'addition de sels dans le mélange réactionnel améliore l'activité de l'HPL $_{del}$ jusqu'à une augmentation de 41,5% avec 1 M de NaCl, 33% avec 1 M de KCl et 53,2% avec 0,25 M de Na₂SO₄ (Figure 35 B, D et F). Au-delà de ces concentrations, l'activité spécifique diminue.

Ces résultats montrent donc que l'ajout de sels dans le milieu réactionnel a un effet significatif sur l'activité des HPL, mais cet effet semble être dépendant de la concentration du sel. A faible concentration, les sels augmentent la solubilité des protéines en milieu aqueux (effet « salting in ») tandis qu'à forte concentration, ils entraînent une diminution de cette solubilité (effet « salting out ») (Arakawa et Timasheff 1982 ; Collins 2004 ; Ruckenstein et Shulgin 2006 ; Yang *et al.*, 2010 ; Duong-Ly et Gabelli 2014). Pour de faibles concentrations en sels, les ions minéraux interagissent avec les charges de surface de la protéine, et apportent avec eux leur propre couche de solvation. Moins de molécules d'eau sont alors nécessaires pour interagir avec la surface de la protéine et le nombre de molécules d'eau "libre" est augmenté. Cela contribue à affaiblir les forces d'attraction entre les protéines (pouvant entraîner une agrégation et la précipitation) et à augmenter la solubilité de l'enzyme. En revanche, lorsque la concentration en sels est plus élevée, la compétition entre les ions et les protéines pour la liaison aux molécules d'eau conduit à une diminution du nombre de molécules d'eau disponibles pour interagir avec la surface hydrophile de la protéine. Les nombreux ions attirent les molécules d'eau pour former leur propre couche de solvation, au détriment de la sphère de solvation essentielle pour l'activité enzymatique et la solubilité. Les interactions protéine-protéine (interactions hydrophobes notamment) sont alors plus importantes que les interactions solvant-soluté, et les protéines peuvent s'agréger et précipiter. La valeur seuil de transition entre ces deux effets antagonistes est fonction de la nature du sel, de l'enzyme, et du pH du tampon utilisé.

L'effet de la glycine et du glycérol à différentes concentrations (0 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20%) a également été testé sur l'activité des deux HPL recombinantes (Figure 36).

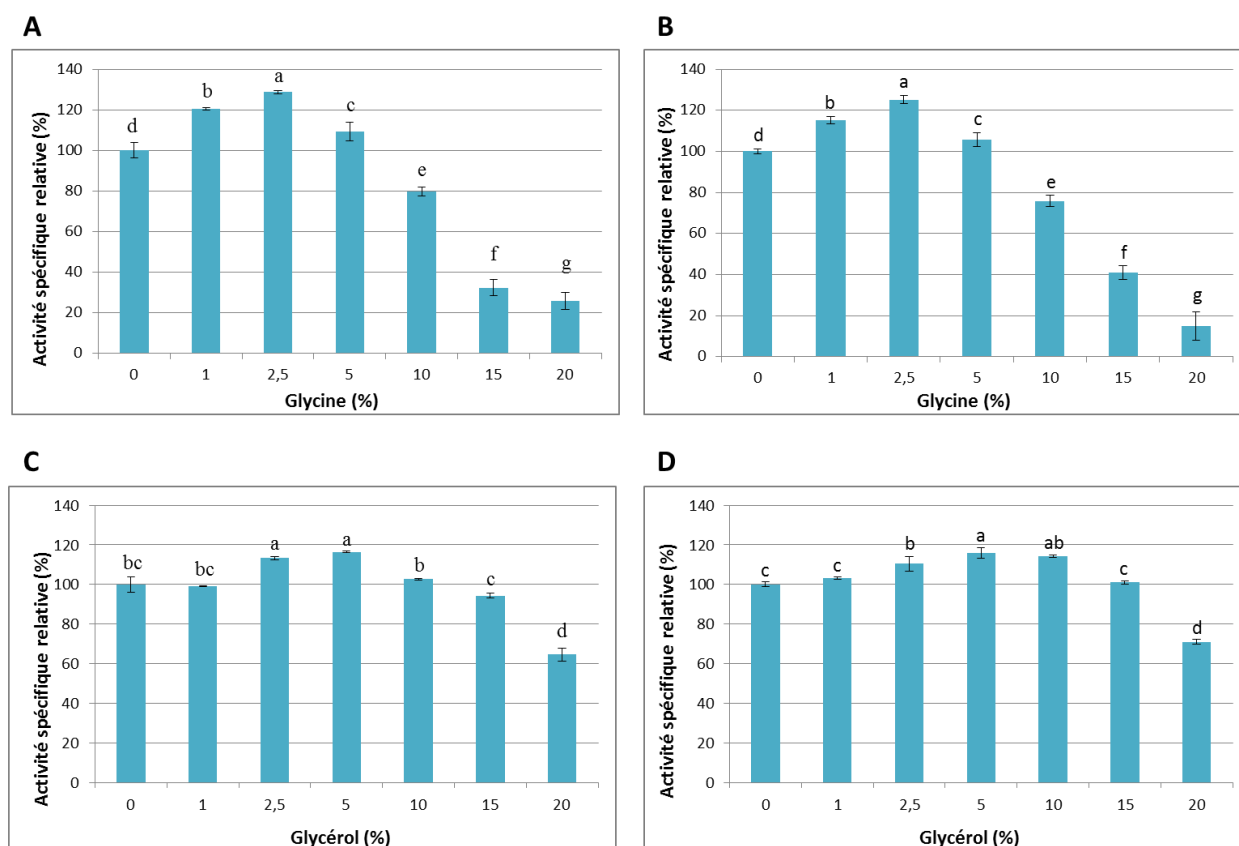


Figure 36 : Effet de la concentration en glycine et en glycérol sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A et C) et de l'HPLdel (B et D)

L'activité enzymatique des HPL a été déterminée dans un tampon phosphate 50 mM à pH7,5 en présence de concentrations en glycine (A et B) et glycérol (C et D) allant de 0 à 20%. L'activité spécifique relative a été définie en tant que pourcentage de l'activité spécifique de l'HPL ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines) en présence de glycine ou de glycérol par rapport à celle du témoin (sans ajout de composé). Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations indépendantes \pm l'écart type. Les barres surmontées d'une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,001$).

Comme pour les sels, l'effet de la glycine et du glycérol sur l'activité spécifique des HPL est dépendant de la concentration. L'ajout de glycine dans le milieu réactionnel augmente de manière significative l'activité des deux enzymes pour des concentrations de 1, 2,5 et 5%. Les activités spécifiques maximales sont obtenues en présence de 2,5% de glycine, conduisant à une augmentation de l'activité de l'HPLwt et de l'HPLdel, de 28,7% et de 23,7% respectivement (Figure 36 A et B). Cependant, des concentrations en glycine égales à 10, 15 et 20%, entraînent une forte diminution de l'activité enzymatique. En présence de 5 % de glycérol, l'activité spécifique est augmentée de 16,4% pour l'HPLwt (Figure 36 C) et de 15,9% pour l'HPLdel (Figure 36 D). Pour des concentrations supérieures à 15% de glycérol, l'activité spécifique est significativement diminuée.

- ***Effets comparés des différents composés***

L'effet des différents composés (NaCl, KCl, Na₂SO₄, glycine et glycérol) a été comparé, en prenant en compte pour chacun, la concentration ayant entraîné la plus forte augmentation de l'activité des HPL (Figure 37).

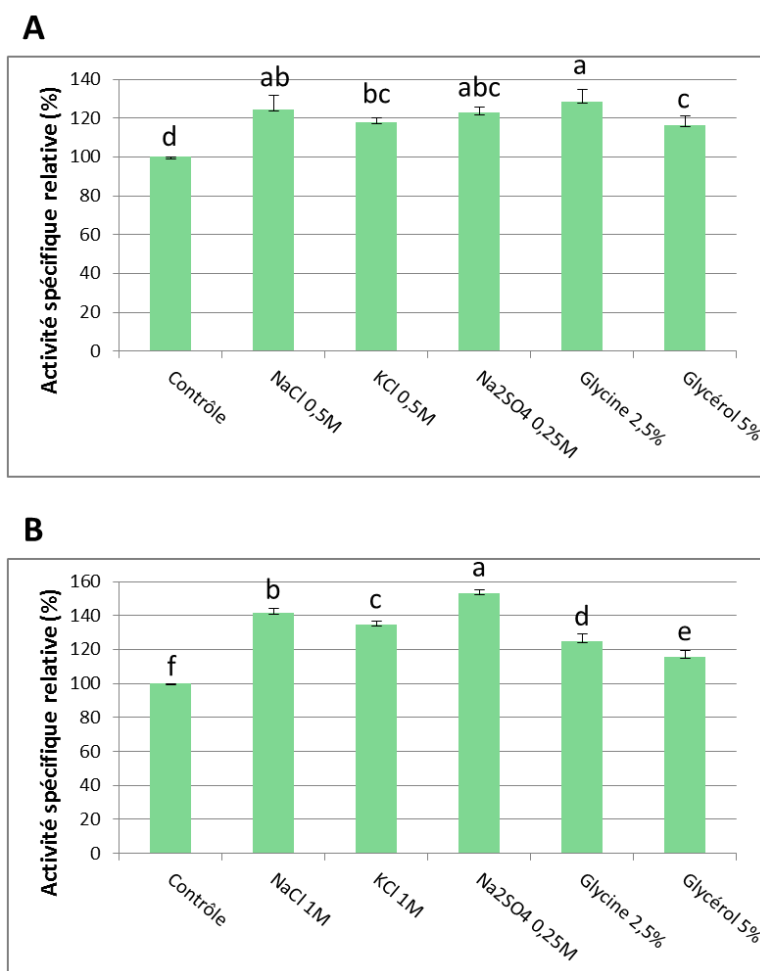


Figure 37 : Effets comparés des différents composés chimiques sur l'activité spécifique de l'HPLwt (A) et de l'HPLdel (B)

L'activité enzymatique des HPL a été déterminée dans un tampon phosphate 50 mM à pH7,5 en présence des différents composés chimiques (NaCl, KCl, Na₂SO₄, glycine et glycérol) à la concentration ayant engendré la plus forte augmentation d'activité. L'activité spécifique relative a été définie en tant que pourcentage de l'activité spécifique de l'HPL ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines) en présence de composé chimique par rapport à celle du témoin (sans ajout de composé). Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations indépendantes \pm l'écart type. Les barres surmontées d'une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,001$).

La glycine 2,5%, le NaCl 0,5 M, et le Na₂SO₄ 0,25 M sont les trois composés permettant les plus fortes augmentations significatives de l'activité spécifique de l'HPLwt,

avec une augmentation maximale de 28,7% de l'activité en présence de glycine (Figure 37 A). Akacha *et al.*, (2010) ont montré que l'addition de glycine 10% augmente l'activité spécifique HPL dans un extrait enzymatique de feuilles de menthe. Ils suggèrent que la glycine augmenterait les interactions hydrophobes intramoléculaires, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'activité. Concernant l'HPL~~del~~, nos résultats indiquent que le composé le plus efficace est le Na₂SO₄ 0,25 M, qui augmente significativement l'activité spécifique de l'enzyme de 53,2% (Figure 37 B). L'activité de l'HPL~~del~~ est également fortement augmentée (de 41,5%) en présence de NaCl 1M (Figure 35 B). Mu *et al.*, (2012) montrent que le NaCl et le KCl 1M permettent d'augmenter de plus de 25% l'activité de l'HPL recombinante de pomme de terre. Koeduka *et al.*, (2003) estiment que la présence de NaCl 1 M, de KCl 1 M ou de Na₂SO₄ 0,5 M multiplie respectivement par 3, 3,5 et 4, l'activité de l'HPL recombinante d'orge. Ils suggèrent que l'amélioration de l'activité de l'HPL par les sels contenant des cations monovalents tels que le sodium et le potassium, serait liée à un effet global sur la conformation de l'enzyme. De plus, ils montrent que le taux d'inactivation de l'HPL par le 13-HPOT est augmenté en présence de KCl 1,5 M. Or, d'après Matsui *et al.*, (2000b) cette inactivation est la conséquence de la dégradation de l'hème, qui est essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme. Koeduka *et al.*, (2003) concluent donc que la présence de sel pourrait également engendrer un réarrangement spatial à proximité de l'hème.

II.2.b) Effet sur les paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques des deux HPL recombinantes ont été déterminés à partir des équations de Michaelis-Menten, en présence des composés ayant entraîné les plus fortes augmentations d'activité : la glycine à 2,5% et le NaCl 0,5 M pour l'HPL~~wt~~ et Na₂SO₄ 0,25 M et le NaCl 1M pour l'HPL~~del~~ (Tableau V).

Tableau V : Paramètres cinétiques de l'HPLwt (A) et de l'HPLdel (B) en présence de composés chimiques

A-					
Substrats		Km (μM)	Vm ($\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$)	kcat (s^{-1})	kcat/Km ($\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
13-HPOD	Contrôle	43,10 \pm 4,46	0,48 \pm 0,06	26,38 \pm 3,01	0,62
	Contrôle + glycine 2,5%	64,41 \pm 1,70	0,78 \pm 0,03	42,03 \pm 1,18	0,65
	Contrôle + NaCl 0,5 M	58,63 \pm 7,00	2,46 \pm 0,05	133,86 \pm 2,38	2,28
13-HPOT	Contrôle	152,75 \pm 10,36	10,35 \pm 0,68	564,95 \pm 36,89	3,71
	Contrôle + glycine 2,5%	137,28 \pm 5,52	10,83 \pm 0,15	587,40 \pm 11,98	4,28
	Contrôle + NaCl 0,5 M	258,29 \pm 42,97	10,61 \pm 0,75	579,06 \pm 41,02	2,24
B-					
Substrats		Km (μM)	Vm ($\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$)	kcat (s^{-1})	kcat/Km ($\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
13-HPOD	Contrôle	43,22 \pm 7,87	0,34 \pm 0,01	17,89 \pm 0,53	0,43
	Contrôle + Na ₂ SO ₄ 0,25 M	61,28 \pm 8,27	0,89 \pm 0,03	46,83 \pm 1,37	0,76
	Contrôle + NaCl 1 M	65,27 \pm 10,85	1,39 \pm 0,04	73,18 \pm 2,14	1,12
13-HPOT	Contrôle	173,85 \pm 27,70	7,65 \pm 0,07	402,62 \pm 3,66	2,36
	Contrôle + Na ₂ SO ₄ 0,25 M	243,15 \pm 41,02	16,03 \pm 0,58	843,26 \pm 31,31	3,47
	Contrôle + NaCl 1 M	449,13 \pm 45,57	13,35 \pm 0,64	701,64 \pm 31,89	1,56

*Les valeurs du contrôle ont été déterminées dans du tampon phosphate 50 mM pH7,5. Les valeurs représentent les moyennes de trois déterminations indépendantes \pm l'écart type.

La présence de glycine, de Na₂SO₄ ou de NaCl induit une augmentation des valeurs du kcat des deux enzymes pour le 13-HPOD, alors que les valeurs de Km ne sont pas affectées (Tableau V). En effet, en utilisant le 13-HPOD comme substrat, le kcat de l'HPLwt est augmenté de 1,8 fois et de 5,8 fois en présence de glycine et de NaCl respectivement, et le kcat de l'HPLdel est augmenté de 2,6 fois et de 4,1 fois en présence de Na₂SO₄ et de NaCl respectivement. L'efficacité catalytique (kcat/Km) des deux enzymes vis-à-vis du 13-

HPOD est également augmentée en présence des composés chimiques, et cette augmentation est la plus importante en présence de NaCl.

Concernant le 13-HPOT, la présence de glycine, de Na₂SO₄ ou de NaCl induit une augmentation des valeurs du kcat de l'HPL~~del~~ mais semble avoir assez peu d'effet sur l'HPL_{wt} (Tableau V). En effet, pour l'HPL~~del~~, le kcat augmente de 2,1 fois et de 1,7 fois en présence de Na₂SO₄ et de NaCl respectivement, alors que pour l'HPL_{wt} les valeurs de kcat en absence et en présence de glycine et NaCl sont assez similaires. En outre, les valeurs de Km des deux enzymes ne semblent que très peu modifiées par la présence des composés chimiques. Koeduka *et al.*, (2003) montrent également une augmentation de la valeur du Vmax, alors que valeur du Km de l'HPL recombinante d'orge n'est pas modifiée lors de l'addition de KCl à 1,5 M. Ceci suggère que les composés chimiques exercent leur effet sur les enzymes elles-mêmes, plutôt que sur la partition des substrats dans le microenvironnement de l'enzyme.

L'influence sur la production d'aldéhydes à 6 carbones, de l'ajout dans le milieu réactionnel, de glycine 2,5% ou de NaCl 0,5 M pour l'HPL_{wt} et de Na₂SO₄ 0,25 M ou de NaCl 1M pour l'HPL~~del~~, a été étudiée au laboratoire. Les résultats ont montré que la présence de ces composés chimiques permet la production de quantités d'aldéhydes équivalentes aux quantités obtenues en l'absence de ces composés, tout en diminuant de 1,5 à 2,5 fois la quantité d'enzyme utilisée (Jacopini *et al.*, soumis). Les taux de conversion obtenus, variant de 47% à 94%, peuvent être considérés comme de bons rendements au regard de ceux décrits dans la littérature, compris entre 25 et 86% (Márczy *et al.*, 2002 ; Noordermeer *et al.*, 2002 ; Rabetafika *et al.*, 2008). Cette étude semble donc apporter des résultats intéressants en vue de l'utilisation des HPL recombinantes d'olive dans des processus biocatalytiques. Cependant, lors de l'expression chez *E. coli*, une grande quantité d'HPL produite est piégée dans les corps d'inclusion. L'adaptation des réactions de bioconversion à plus grande échelle nécessite donc l'obtention de plus grandes quantités d'HPL recombinante soluble.

III. Production d'hydroperoxyde lyases recombinantes chez la levure *Pichia pastoris*

Parallèlement au système bactérien *E. coli*, nous avons utilisé un système d'expression eucaryote commercialisé par Invitrogen, qui comprend les vecteurs pPICZ α et pPICZ, et la souche *P. pastoris* X-33, pour réaliser l'expression des HPL recombinantes d'olive. Plusieurs constructions géniques ont été réalisées, puis insérées dans les vecteurs pPICZ α en vue de la sécrétion, ou pPICZ pour l'expression intracellulaire des HPL. Les vecteurs recombinants ont ensuite été multipliés chez *E. coli* avant d'être intégrés dans le génome de *P. pastoris* par recombinaison homologue.

III.1. Obtention de levures *Pichia pastoris* recombinantes

III.1.a) Clonage et multiplication des plasmides recombinants chez les bactéries

La séquence codant pour l'HPL d'olive (HPL w_t , HPL d_{el} ou HPL o_{pt}) a été amplifiée par PCR à l'aide d'oligonucléotides (Annexe, Tableau A), contenant les sites de clonage *Xho*I et *Xba*I, ainsi que les différentes séquences pouvant être ajoutées aux extrémités selon les constructions (signal Kex2, étiquette polyHistidine, signal D₄KA). L'analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose a montré, pour chaque construction, la présence d'une bande d'environ 1 500 pb correspondant à la taille attendue de l'amplifiat.

Après purification, le fragment de 1 500 pb a été digéré par les enzymes de restriction *Xho*I et *Xba*I, puis inséré dans le vecteur pPICZ α ou pPICZ, préalablement hydrolysé par les mêmes enzymes. Le vecteur recombinant obtenu a ensuite été utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* TOP10F'. Le criblage des bactéries recombinantes a été réalisé par PCR sur colonie, à l'aide d'amorces s'hybridant aux extrémités 5' et 3' de la séquence des HPL. Les colonies transformées par un vecteur recombinant montrent une bande à la taille attendue de 1 500 pb après électrophorèse sur gel d'agarose. La séquence de l'insert a été vérifiée par séquençage à partir des plasmides extraits de minicultures des colonies recombinantes sélectionnées, à l'aide des amorces 5'AOX1 et 3'AOX1 (Annexe, tableau A), s'hybridant respectivement sur les séquences P_{AOX1} et TT du vecteur.

III.1.b) Intégration des plasmides recombinants dans le génome des levures

Afin de garantir une transformation efficace de la levure *P. pastoris*, l'ADN recombinant doit être linéaire et sa quantité doit être comprise entre 5 et 10 µg, dans un volume n'excédant pas 10 µL. Les plasmides recombinants sont donc d'abord multipliés chez *E. coli* puis extraits par lyse alcaline, à partir d'une culture de 100 mL. L'ADN plasmidique est ensuite concentré par précipitation alcoolique et repris dans un volume de 10 µL d'eau stérile, avant d'être linéarisé au niveau du site de restriction de *PmeI*. La linéarisation des plasmides recombinants est vérifiée par électrophorèse des produits d'hydrolyse sur gel d'agarose. Une bande d'environ 5 000 pb correspondant à la taille du vecteur (3 593 pb pour pPICZα et 3 328 pb pour pPICZ) additionnée à celle de l'insert (environ 1 500 pb) est obtenue pour chaque plasmide recombinant (Figure 38).

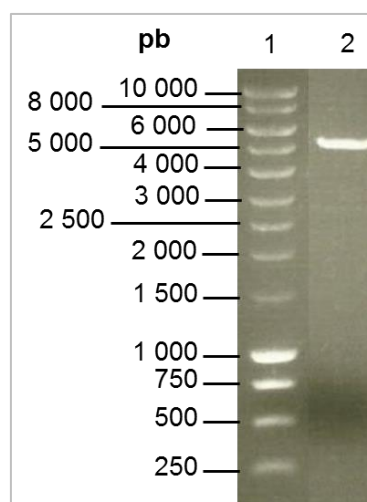


Figure 38 : Analyse sur gel d'agarose du plasmide recombinant linéarisé par l'action de *PmeI*
 Piste 1 : marqueur de taille ; Piste 2 : plasmide recombinant linéarisé

Les vecteurs recombinants linéaires sont purifiés puis concentrés à nouveau par précipitation alcoolique et repris dans 5 µL d'eau stérile, avant d'être utilisés pour transformer les levures *P. pastoris* X-33. Le criblage des colonies recombinantes est réalisé par PCR après extraction de l'ADN génomique des levures, à l'aide d'oligonucléotides s'hybridant aux extrémités de la séquence codant pour l'HPL. Si la colonie testée est recombinante, une bande d'environ 1 500 pb correspondant à la séquence de l'HPL est donc visible lors de l'analyse des produits d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 39).

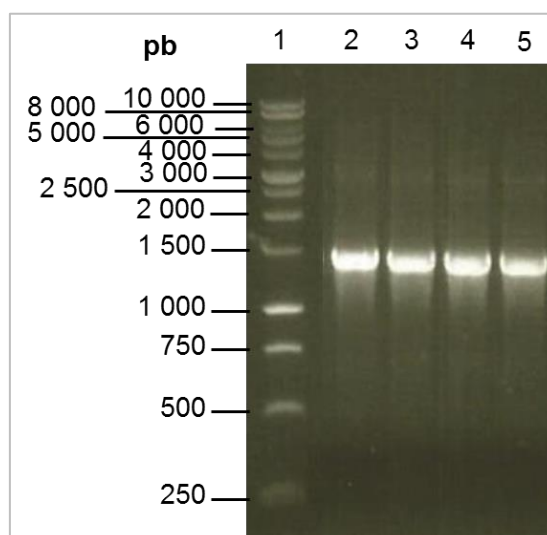


Figure 39 : Analyse sur gel d'agarose des amplifiats obtenus par PCR lors du criblage des clones de *Pichia pastoris* recombinants

Piste 1 : marqueur de taille ; Pistes 2 à 5 : clones de levure contenant la séquence de l'HPL d'olive

Lors de la transformation, l'intégration de la cassette d'expression dans le génome de la levure se fait par recombinaison homologue au niveau des régions P_{AOX1} et/ou TT, pouvant conduire à la suppression du gène AOX1 de la levure (Mut^S) ou à sa conservation (Mut^+). La détermination du phénotype Mut des levures recombinantes est nécessaire car le protocole d'expression est choisi en fonction de la capacité du transformant à utiliser le méthanol. Une PCR est donc réalisée à partir de l'ADN génomique extrait des levures recombinantes, à l'aide des amorces 5'AOX1 et 3'AOX1, s'hybridant respectivement sur P_{AOX1} et TT. Les colonies étant recombinantes, quel que soit le phénotype Mut, un fragment à environ 2 100 pb correspondant à la cassette d'expression incluant la séquence de l'HPL, est amplifié. De plus, si la colonie testée est Mut^+ , le gène AOX1 de la levure d'une taille égale à 2 200 pb sera également amplifié. Cependant, ce fragment ne peut être distingué de celui à 2 100 pb sur gel d'agarose. Ainsi, afin de déterminer le génotype Mut, les produits obtenus par PCR à l'aide des amorces 5'AOX1 et 3'AOX1, sont digérés par *EcoRI*. Cette enzyme présente un site de coupure au niveau de la séquence de l'HPL mais n'hydrolyse pas le gène AOX1 de la levure. Lors de l'analyse des fragments de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose, si la colonie testée est Mut^S , deux bandes correspondant à la cassette d'expression hydrolysée par *EcoRI* (à environ 800 pb et 1 200 pb) sont observées, et si la colonie testée est Mut^+ , une troisième bande correspondant au gène AOX1 (à 2 100 pb), est présente (Figure 40).

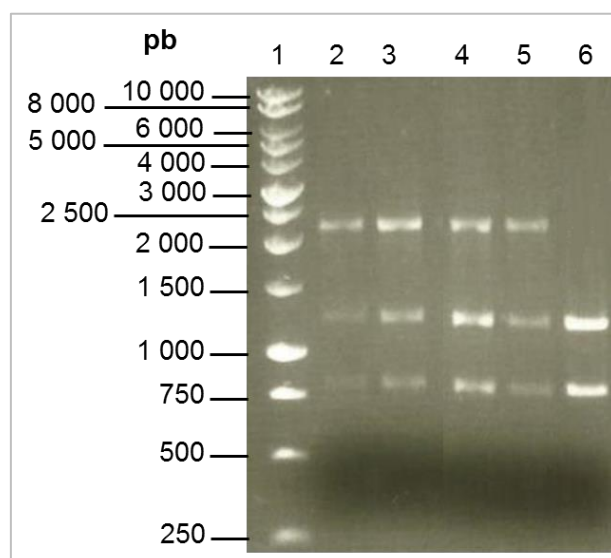


Figure 40 : Analyse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion des produits de PCR par *EcoRI*, pour la détermination du phénotype Mut

Piste 1 : marqueur de taille ; Pistes 2 à 6 : fragments obtenus après digestion par *EcoRI* des produits de PCR sur l'ADN génomique des levures recombinantes, à l'aide des amorces 5'AOX1 et 3'AOX1.

Les pistes 2 à 5 montrent des profils de digestion caractéristiques des levures Mut⁺, et la piste 6 correspond à une levure Mut^S.

La séquence de l'insert a également été vérifiée par séquençage des fragments amplifiés par PCR. Les levures recombinantes sont ensuite testées pour la sécrétion ou l'expression intracellulaire des HPL recombinantes.

III.2. Expression des HPL recombinantes chez *Pichia pastoris*

III.2.a) Essais de sécrétion des HPL recombinantes

Des constructions géniques contenant les ADNc codant pour l'HPL^{wt} ou pour l'HPL^{del}, ont été réalisées par PCR, respectivement à l'aide des couples d'amorces *XhoI*Kex26xHisD₄KAHPL^{wf}for et *XbaI*stopHPL^{rev}, et *XhoI*Kex26xHisD₄KAHPL^{del}for et *XbaI*stopHPL^{rev} (Annexes, Tableau A). Après ligature dans le vecteur pPICZα, la cassette d'expression générée permet l'insertion, à l'extrémité N-terminale de l'enzyme, du peptide α permettant la sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture, du site Kex2 permettant clivage du peptide α, de l'étiquette polyHistidine (6xHis) et du site de clivage D₄KA reconnu par une entérokinase (Figure 41).

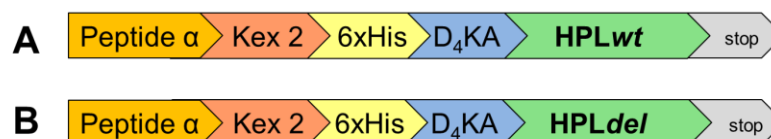


Figure 41 : Cassettes d'expression contenant les séquences codant pour l'HPLwt (A) ou l'HPLdel (B)

Cette cassette d'expression contient les séquences codant pour le peptide α , le site de clivage Kex2, l'étiquette polyHistidine et le site de clivage D_4KA , en amont de la séquence codant pour l'HPLwt ou pour l'HPLdel.

Après transformation des levures par ces constructions, nous obtenons uniquement des clones Mut⁺. L'expression des HPL recombinantes est ensuite conduite selon le protocole recommandé par le kit EasySelect™ Pichia Expression (Invitrogen, Life technologies). Un culot cellulaire est obtenu à partir de la culture d'une colonie de levure dans le milieu BMGY, qui contient du glycérol. L'induction de l'expression est réalisée par reprise de ce culot dans le milieu BMMY contenant 0,5% de méthanol. Elle est suivie pendant 96h. Du méthanol à la concentration finale de 0,5%, est ajouté toutes les 24h et 2 mL de culture sont prélevés toutes les 12h. Ces fractions sont centrifugées afin de séparer surnageants de culture et culots de levures. Les culots et les surnageants sont enfin analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoempreinte à l'aide d'un anticorps anti-polyHistidine. Six clones recombinants de *P. pastoris* X-33 ont été utilisés pour l'expression de chacune des deux HPL. Cependant, aucune bande n'est révélée par l'anticorps anti-polyHistidine et aucune activité HPL n'est détectée dans les surnageants de culture, et cela même après des essais de concentration des fractions et de purification sur résine de cobalt (Talon metal affinity, Clontech) en batch. Les constructions réalisées n'ont donc pas permis la sécrétion de l'HPL dans le milieu de culture. La Figure 42 montre l'analyse des culots de levures. Seules les fractions prélevées à 48h, et concernant des clones avec un profil d'expression différent, sont montrées.

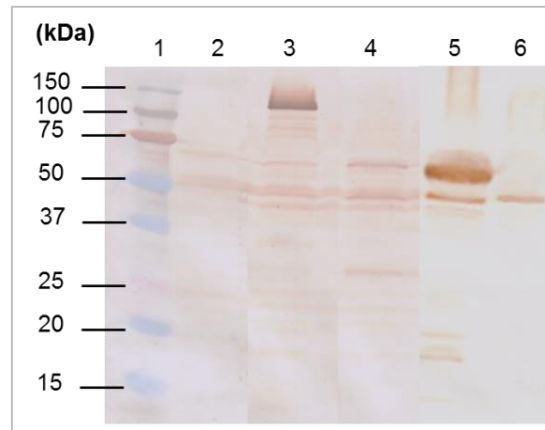


Figure 42 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPLwt ou l'HPLdel

La piste 1 correspond au marqueur de taille. Les pistes 2 à 6 correspondent aux fractions récupérées après 48h d'expression. Piste 2 : levures X-33 transformées par un vecteur pPICZ α vide (témoin négatif) ; Piste 3 : levures GS115/pPICZ/lacZ Mut+ exprimant la β -galactosidase (témoin positif d'expression Mut+) ; Piste 4 : levures X-33 transformées par la construction contenant la séquence de l'HPLwt ; Pistes 5 et 6 : clones différents de levures X-33 transformées par la construction contenant la séquence de l'HPLdel.

Les levures GS115/pPICZ/lacZ de phénotype Mut⁺, sont fournies par le kit EasySelect™ Pichia Expression, comme témoin positif puisqu'elles permettent l'expression intracellulaire de la β -galactosidase. Nous avons effectivement observé une bande à 100 kDa correspondant à la taille attendue de la β -galactosidase, et qui est révélée par l'anticorps anti-polyHistidine dans le culot de levures (Figure 42, piste 3). Une bande d'intensité assez faible est visible à 50 kDa, correspondant à la taille d'une sous unité de l'HPL (Figure 42, pistes 4 à 6). De plus, pour un des clones exprimant l'HPLdel, nous observons également une bande à 60 kDa de plus forte intensité (Figure 42, piste 5). Pour l'autre clone exprimant l'HPLdel, la bande à 60 kDa n'a pas été retrouvée (Figure 42, piste 6). Le niveau d'expression de l'HPL recombinante semble donc dépendre du clone transformé, ce qui pourrait s'expliquer par une différence au niveau du nombre de copies de la cassette d'expression intégrées dans le génome de la levure. En outre, une taille de 60 kDa correspond à la taille de l'HPLdel ajoutée à celle du peptide α . Le peptide α n'aurait donc pas été clivé, ni au niveau du pré-signal dans le réticulum endoplasmique, ni au niveau du site Kex2 de la pro-séquence dans l'appareil de Golgi. L'HPL recombinante n'aurait donc pas suivi la voie sécrétoire, ce qui pourrait expliquer sa présence dans le culot de levures. Les levures ont été lysées par traitement avec des billes de verre après reprise dans un tampon de lyse. Cependant, aucune activité HPL n'a pu être détectée.

Afin de vérifier que l'enzyme n'est pas dégradée par des enzymes protéolytiques, nous avons réalisé des cultures en présence et en absence de caséine hydrolysée. La présence de caséine hydrolysée dans le milieu de culture réduirait l'activité protéolytique en jouant le rôle de substrat préférentiel des protéases (Clare *et al.*, 1991 ; Sinha *et al.*, 2005). Nous avons également induit les cultures à l'aide de 0,5 ou 1% de méthanol afin de tester l'effet de la concentration en inducteur sur le niveau d'expression (Wu *et al.*, 2011). Quelles que soient les conditions, nous constatons l'absence d'HPL dans les surnageants, alors que dans les culots, une faible bande de taille estimée à 50 kDa est observée (Figure 43).

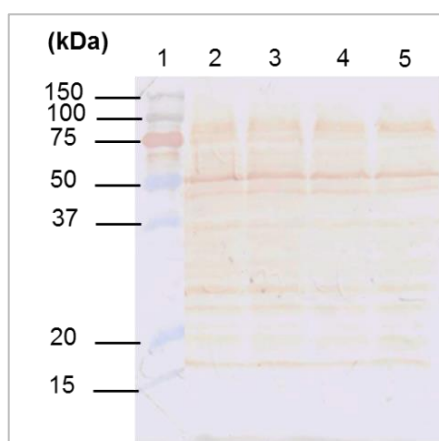


Figure 43 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPLwt

La piste 1 correspond au marqueur de taille. Les pistes 2, 3, 4 et 5 correspondent aux fractions récupérées après 48h d'expression dans différentes conditions. L'expression est induite par 0,5% de méthanol (pistes 2 et 4) ou par 1% de méthanol (pistes 3 et 5). Les cultures sont réalisées en absence (pistes 2 et 3) ou en présence (pistes 4 et 5) de caséine hydrolysée.

La dégradation des HPL recombinantes par les protéases ne semble donc pas être en cause.

Une des hypothèses pouvant expliquer l'obtention de la bande à 60 kDa lors de l'expression de l'HPL~~del~~, serait que la présence de l'étiquette polyHistidine et de la séquence D₄KA en aval du site de clivage Kex2, à l'extrémité N-terminale de l'enzyme recombinante, pourrait gêner la reconnaissance de ce site, et donc empêcher le clivage du peptide α . Nous avons donc effectué deux constructions géniques différentes. La première construction est dépourvue du signal D₄KA, et est réalisée par PCR à l'aide des amorces *Xho*I Kex26xHisHPL~~del~~ et *Xba*I stopHPL~~rev~~ (Annexe, Tableau A). Pour la seconde construction, les amorces *Xho*I Kex2HPL~~del~~ et *Xba*I HPL~~rev~~ sont utilisées (Annexe,

Tableau A). L'amorce antisens ne présente pas de codon stop après la séquence codant pour l'HPL~~del~~. Cette construction permettra donc la formation d'une cassette d'expression incluant les séquences codant pour l'épitope *myc* et l'étiquette polyHistidine, qui sont présentes sur le vecteur et qui s'inséreront à l'extrémité C-terminale de l'HPL~~del~~ recombinante (Figure 44).

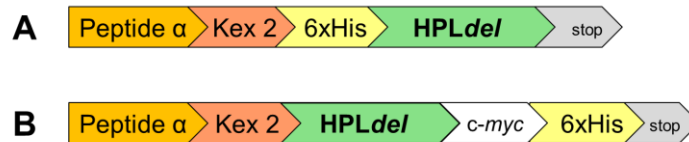


Figure 44 : Cassettes d'expression contenant la séquence codant pour l'HPL~~del~~, dépourvue de signal de clivage D₄KA (A) ou permettant l'insertion de l'étiquette polyHistidine à l'extrémité C-terminale de l'enzyme (B)

Après transformation des levures, nous obtenons des clones transformés Mut⁺ pour les deux constructions et un clone transformé Mut^S pour la construction avec l'étiquette polyHistidine à l'extrémité C-terminale. L'expression est réalisée comme précédemment, et les surnageants de culture et les culots de levures sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoempreinte. Quels que soient la construction et le clone testés, l'HPL n'est pas présente dans les surnageants. Dans les culots, une bande est toujours présente à 50 kDa (Figure 45).

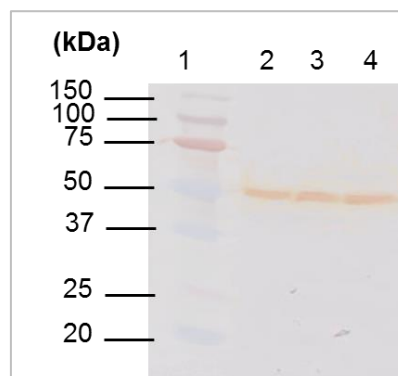


Figure 45 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL~~del~~

La piste 1 correspond au marqueur de taille. Les pistes 2, 3 et 4 correspondent aux fractions récupérées après 48h d'induction de l'expression de l'HPL~~del~~. Piste 2 : construction sans D₄KA.

Piste 3 : construction avec l'étiquette polyHistidine du côté C-terminal, clone Mut⁺. Piste 4 : construction avec l'étiquette polyHistidine du côté C-terminal, clone Mut^S.

Ces constructions n'ont donc pas permis de résoudre les problèmes de sécrétion de l'enzyme recombinante. Par ailleurs, le niveau d'expression de l'HPL reste assez faible.

Ce faible niveau d'expression pourrait d'abord s'expliquer au niveau traductionnel. Dans la séquence nucléotidique de l'HPL, sont présentes des séquences riches en AT, telles que les séquences AATTATTTTT et ATTTTTATA, pouvant entraîner un arrêt prématuré de la transcription (Romanos *et al.*, 1992 ; Scorer *et al.*, 1993). En effet, ces séquences ressemblent à la séquence consensus TTTTATA qui est un signal de polyadénylation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dont le génotype est très proche de celui de *P. pastoris* (Scorer *et al.*, 1993). Afin de s'assurer de la présence de transcrits correspondant à la cassette d'expression d'intérêt, une extraction des ARN totaux a été réalisée à partir des culots de levures exprimant l'HPLwt, après différents temps d'induction (24h, 48h, 72h, et 96h). Après transcription inverse, les ADNc obtenus ont été utilisés dans une réaction de PCR à l'aide d'oligonucléotides s'hybridant sur la séquence codant pour le peptide α et à l'extrémité 3' de la séquence de l'HPLwt. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 46).

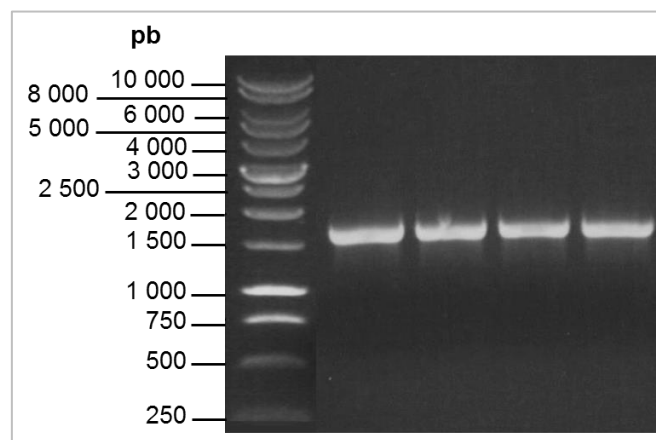


Figure 46 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats obtenus par RT-PCR à partir des ARN totaux extraits des levures *P. pastoris* exprimant l'HPLwt

Les oligonucléotides utilisés pour la réaction de PCR s'hybrident sur la séquence codant pour le peptide α et à l'extrémité 3' de la séquence de l'HPLwt. La piste 1 correspond au marqueur de taille.

Les pistes 2, 3, 4 et 5 correspondent à des temps d'induction de 24h, 48h, 72h, et 96h respectivement.

Dès 24h d'induction, nous obtenons des fragments de taille attendue, soit environ 1 600 pb, correspondant à la séquence de l'HPLwt et aux séquences situées en amont (D4KA, 6xHis, Kex2, ainsi qu'une partie du peptide α), indiquant la présence de transcrits

correspondant à la cassette d'expression dans son intégralité. La transcription n'est donc pas arrêtée prématurément.

Par ailleurs, le faible niveau d'expression constaté pourrait s'expliquer par une faible efficacité de traduction. En effet, la séquence de l'HPL $_{wt}$ contient des codons peu fréquents chez *P. pastoris*, ce qui peut entraîner une diminution de l'efficacité de la traduction, voire même le désengagement de la machinerie ribosomique (Plotkin et Kudla 2011 ; Novoa et Ribas de Pouplana 2012). Une séquence de l'HPL $_{wt}$ optimisée pour l'expression chez *P. pastoris*, nous a été fournie par la société Genscript®. Cette séquence notée HPL $_{opt}$ code pour les mêmes acides aminés mais les codons rares ont été remplacés par des codons préférentiellement lus par *P. pastoris*, dans le but d'une amélioration de l'efficacité de la traduction. Ainsi, l'index d'adaptation des codons (CAI, codon adaptation index) (Sharp et Li 1987) a été augmenté de 0,68 à 0,84 après optimisation. Le pourcentage en GC a été ajusté afin d'augmenter la durée de vie des ARNm. Les séquences inversement répétées pouvant induire des structures secondaires en tige et boucle au niveau de l'ARNm ont été supprimées, facilitant ainsi la fixation des ribosomes et améliorant la stabilité des ARNm. La construction génique contenant la séquence de l'HPL $_{opt}$ a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces *Xho*I Kex2 6xHis HPL $_{opt}$ for et *Xba*I stop HPL $_{opt}$ rev (Annexe, Tableau A), puis insérée dans le vecteur pPICZ α . La cassette d'expression obtenue est présentée sur la Figure 47.



Figure 47 : Cassette d'expression contenant la séquence codant pour l'HPL $_{opt}$
 Cette cassette d'expression permet l'insertion, à l'extrémité N-terminale de l'HPL $_{opt}$, du peptide α permettant la sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture, de la séquence Kex2 codant pour un signal de clivage du peptide α , de la séquence codant pour une étiquette polyHistidine (6xHis) et de la séquence codant pour un site de clivage reconnu par une entérokinase (D4KA).

Après transformation des levures, nous obtenons des clones Mut+. L'expression de l'HPL $_{opt}$ recombinante est induite par 0,5% de méthanol et pendant 48h. Après centrifugation, les surnageants de culture et les culots de levures sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoempreinte à l'aide d'un anticorps anti-polyHistidine. L'HPL n'est pas détectée dans les surnageants de culture. De plus,

l'optimisation de la séquence n'a pas permis d'amélioration visible de la synthèse de l'enzyme recombinante par rapport à l'HPL wt (Figure 48).

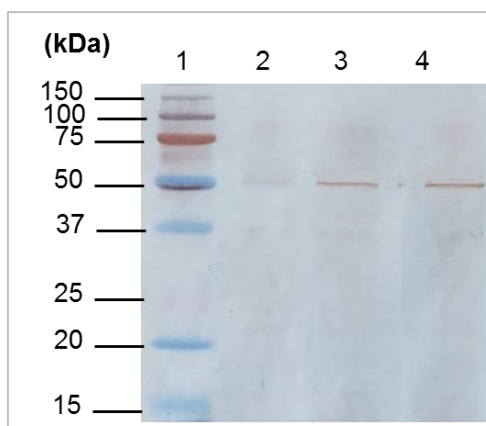


Figure 48 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL opt

La piste 1 correspond au marqueur de taille. Les pistes 2, 3 et 4 correspondent aux fractions récupérées après 48h d'expression, respectivement chez des levures X-33 transformées par un vecteur pPICZ α vide, chez des levures X-33 transformées par la construction contenant la séquence de l'HPL wt , et chez des levures X-33 transformées par la construction contenant la séquence de l'HPL opt .

Atwal *et al.*, (2005) ont montré la sécrétion, chez *Pichia pastoris*, de l'HPL recombinante de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (HPLLe) (numéro d'accension GenBank AY028373.1). Comme pour nos constructions, la séquence de l'HPLLe est insérée dans le vecteur pPICZ α contenant le peptide α servant de signal de sécrétion de l'enzyme recombinante. En revanche, la seule différence avec nos constructions est que l'HPLLe recombinante produite ne contient pas d'étiquette polyHistidine. La construction effectuée par Atwal *et al.*, (2005), contenant la séquence de l'HPLLe insérée dans le pPICZ α nous a été fournie par synthèse de gène par Genscript®. Sur le même modèle, des constructions contenant les séquences codant pour l'HPL wt , l'HPL del et l'HPL opt ont été réalisées, respectivement à l'aide des couples d'amorces *Xho*I Kex2HPL wf for et *Xba*I stopHPLrev, *Xho*I Kex2HPL del for et *Xba*I stopHPLrev, et *Xho*I Kex2HPL opt for et *Xba*I stopHPL opt rev (Annexes, Tableau A). Après insertion dans le vecteur pPICZ α , les cassettes d'expression générées ne permettent pas l'insertion d'une étiquette polyHistidine au niveau des enzymes recombinantes (Figure 49).



Figure 49 : Cassettes d'expression contenant la séquence codant pour l'HPLLe (A), l'HPLwt (B), l'HPLopt (C), ou l'HPLdel (D)

Ces cassettes d'expression permettent l'insertion, à l'extrémité N-terminale de l'enzyme recombinante, du peptide α permettant la sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture, et de la séquence Kex2 codant pour un signal de clivage du peptide α .

Après transformation des levures, nous obtenons des clones transformés Mut⁺. L'expression est conduite comme précédemment. Les surnageants de culture et les culots de levures sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 50).

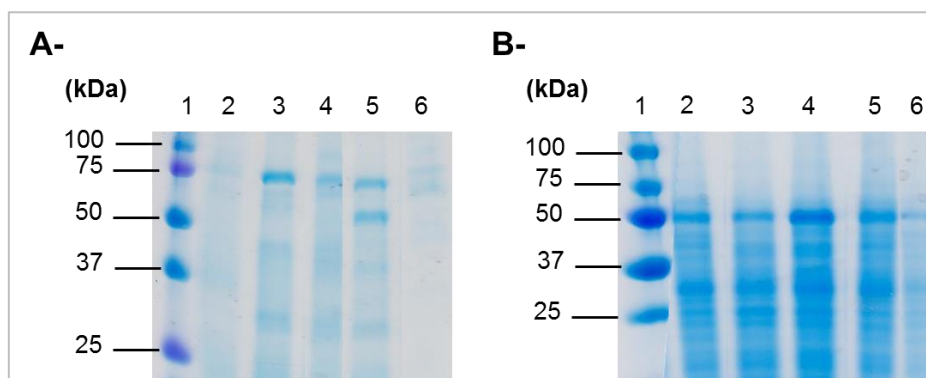


Figure 50 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12%, des surnageants de culture (A) et des culots de levures (B) exprimant les HPL recombinantes
 La piste 1 correspond au marqueur de taille. Les pistes 2 à 6 correspondent aux fractions récupérées après 48h d'expression, respectivement chez des levures X-33 transformées par la construction contenant la séquence de l'HPLwt, l'HPLdel, l'HPLopt et l'HPLLe, ou par un vecteur pPICZa vide.

Nous constatons que seule la construction contenant la séquence de l'HPLLe permet l'obtention d'une bande à 50 kDa dans le surnageant de culture (Figure 50 A, piste 5), et la détection d'une activité HPL égale à $0,52 (\pm 0,05) \text{ U.mg}^{-1}$ de protéines. Atwal *et al.*, (2005) ont obtenu une activité de $0,37 \text{ U.mg}^{-1}$ de protéines lors de la sécrétion de l'HPLLe dans le milieu de culture. En revanche, les constructions contenant les séquences de l'HPLwt, l'HPLdel et l'HPLopt n'ont pas permis la sécrétion des enzymes dans le milieu de culture ; aucune bande n'est visible à 50 kDa (Figure 50 A, pistes 2, 3, 4 et 6) et aucune activité HPL

n'est détectée. Une bande de 50 kDa pouvant correspondre à une sous unité d'HPL est de nouveau retrouvée dans les culots (Figure 50 B).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les difficultés d'expression des HPL d'olive recombinantes. Le peptide α utilisé dans notre étude comme signal de sécrétion fait partie des peptides signaux permettant une translocation post-traductionnelle (Damasceno *et al.*, 2012). Les protéines sont donc entièrement traduites avant d'être libérées des ribosomes et dirigées vers le réticulum endoplasmique (RE) (Brodsky 1998). Les polypeptides néosynthétisés doivent être dans une conformation non repliée ou partiellement repliée avant leur translocation à travers la membrane du RE. Cependant, certains peuvent être mal repliés et s'agréger, ou bien adopter leur conformation native, empêchant la reconnaissance du peptide signal et donc le passage dans le RE (Damasceno *et al.*, 2012). Ce phénomène pourrait expliquer la présence de la bande à 60 kDa observée par immunoempreinte et correspondant à l'HPL α recombinante portant le peptide α . Après leur translocation, les protéines peuvent également être retenues dans le RE à cause d'un mauvais repliement, souvent dû à un niveau insuffisant de protéines chaperonnes. Leur accumulation peut conduire à l'activation de la voie EARD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*) qui élimine les protéines mal repliées par dégradation dans le protéasome (Romanos *et al.*, 1992 ; Damasceno *et al.*, 2012 ; Ahmad *et al.*, 2014). Enfin, une autre hypothèse est une maturation incomplète de l'endopeptidase Kex2 pouvant entraîner l'accumulation des protéines dans le RE ou dans l'appareil de golgi (Kelle *et al.*, 2014). Yang *et al.*, (2013) ont pu augmenter la sécrétion de protéases recombinantes chez *P. pastoris* en augmentant le nombre de copies de Kex2.

Dans une étude portant sur l'expression de la LOX de *Pleurotus sapidus* chez *P. pastoris*, Kelle *et al.*, (2014) ont utilisé le peptide α comme signal de sécrétion de l'enzyme recombinante. Cependant, aucune activité LOX n'est retrouvée ni dans les surnageants de culture ni dans les culots de levures. Kelle *et al.*, (2014) concluent que l'incorporation du peptide α ne conduit pas à l'expression d'une LOX fonctionnelle. En revanche, ils montrent l'expression intracellulaire de la LOX dépourvue du peptide α . Le peptide α pourrait donc ne pas être adapté pour l'expression de certaines enzymes recombinantes, comme l'HPL recombinante d'olive.

Nous avons également tenté de vérifier si la levure *P. pastoris* permet l'expression intracellulaire d'HPL recombinantes fonctionnelles.

III.2.b) Expression intracellulaire

Pour réaliser l'expression intracellulaire de l'HPL_{wt}, de l'HPL_{opt} et de l'HPL_{del}, leurs ADNc ont été intégrés dans le vecteur pPICZ. Après insertion dans le génome de la levure *P. pastoris* X-33, ce vecteur permet l'expression d'une protéine recombinante contenant une étiquette polyHistidine à son extrémité N-terminale. L'induction de l'expression des enzymes recombinantes est réalisée à l'aide du milieu MM contenant 0,5% de méthanol, et elle est suivie sur un temps de 72h. Toutes les 24h, du méthanol à la concentration finale de 0,5%, est ajouté, et un volume de 20 mL de culture est prélevé. Ces fractions sont centrifugées afin de récupérer les culots de levures, qui sont lysés par traitement avec les billes de verre après reprise dans 2 mL de tampon de lyse. Après centrifugation, la fraction soluble est récupérée puis analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoempreinte à l'aide d'un anticorps anti-polyHistidine (Figure 51).

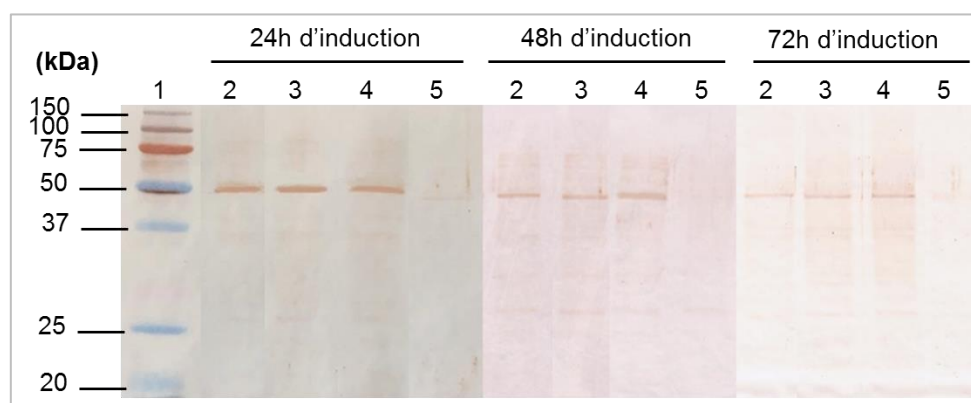


Figure 51 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% et immunoempreinte, des culots de levures exprimant l'HPL_{wt}, l'HPL_{del} ou l'HPL_{opt}

La piste 1 correspond au marqueur de taille. Les pistes 2, 3, 4 et 5 correspondent à l'analyse des culots de levures X-33 transformées respectivement par la construction contenant la séquence de l'HPL_{wt}, l'HPL_{opt} et l'HPL_{del} ou par un vecteur pPICZ vide.

L'HPL_{wt}, l'HPL_{opt} et l'HPL_{del} sont exprimées par *P. pastoris* après 24h, 48h et 72h d'induction, puisque nous observons une bande à environ 50 kDa révélée par l'anticorps anti-polyHistidine, correspondant à la masse moléculaire d'une sous-unité de l'enzyme (Figure 51). De plus, une activité HPL a été détectée dans la fraction soluble après la lyse des levures (Figure 52).

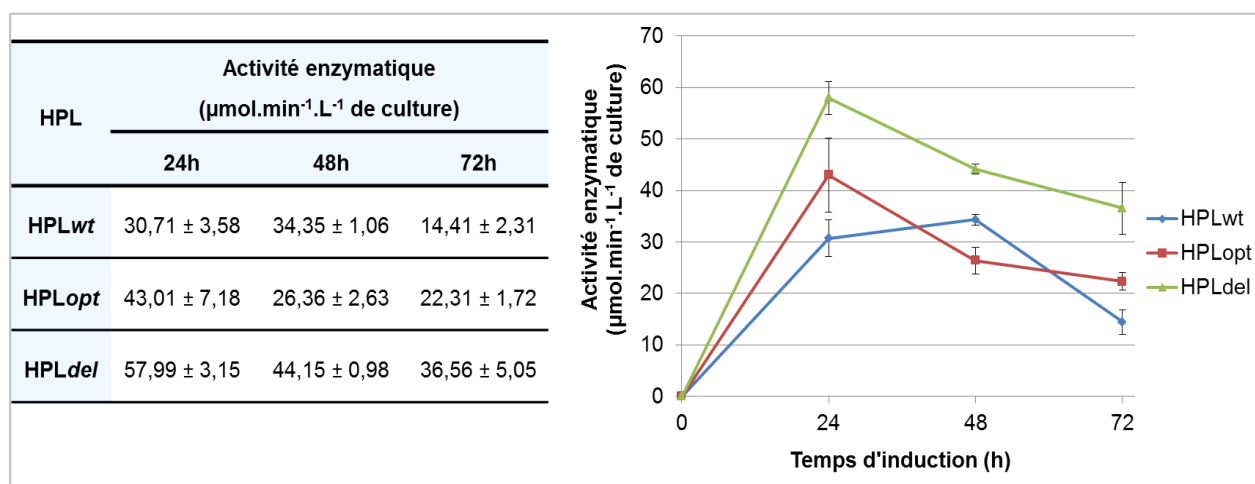


Figure 52 : Expression intracellulaire de l'HPLwt, de l'HPLopt et de l'HPLdel chez *Pichia pastoris* X-33

L'activité HPL a été mesurée dans la fraction soluble du lysat cellulaire, en utilisant le 13-HPOT comme substrat, et à différents temps d'induction : 24h, 48h et 72h. Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations indépendantes \pm l'écart type.

L'activité enzymatique de l'HPLdel et de l'HPLopt est maximale après 24h d'induction (respectivement 43,01 et 57,99 U.L⁻¹ de culture), puis diminue au-delà (Figure 52). L'activité de l'HPLwt est maximale à 48h d'induction mais n'est que légèrement supérieure à l'activité déterminée après 24h (respectivement 34,35 et 30,71 U.L⁻¹ de culture). Au-delà de 48h elle diminue (Figure 52). Un temps d'induction de 24h semble donc pouvoir être utilisé pour l'expression intracellulaire des HPL recombinantes chez *P. pastoris* X-33. Nous constatons également que l'activité maximale, égale à 57,99 U.L⁻¹ de culture, est obtenue lors de l'expression de l'HPLdel, après 24h d'induction (Figure 52). L'HPLdel, à la différence de l'HPLwt et de l'HPLopt, est dépourvue du peptide de transit chloroplastique, ce qui pourrait entraîner une meilleure solubilité de l'enzyme et donc expliquer l'activité plus élevée mesurée dans le surnageant de lyse lors de l'expression de l'HPLdel. Néanmoins, cette activité enzymatique reste faible au regard des valeurs citées dans la littérature. En effet, Bourel *et al.*, (2004) et Santiago-Gomez *et al.*, (2008) ont obtenu respectivement 1 200 et 1 800 U.L⁻¹ de milieu de culture lors de l'expression de l'HPL de poivron vert chez la levure *Yarrowia lipolytica*.

L'HPL d'olive n'a donc pas pu être sécrétée chez *P. pastoris* X-33 en utilisant le peptide α comme signal de sécrétion. D'autres séquences signal pourraient donc être utilisées. Des constructions contenant les séquences signal de sécrétion de l' α -amylase

d'*Aspergillus niger*, du lysozyme de la poule, ou de l'albumine sérique humaine, en amont de la séquence codant pour l'HPL_{wt}, l'HPL_{del} ou l'HPL_{opt}, ont déjà été réalisées. Elles ont ensuite été intégrées dans des vecteurs de type pPINK-HC, permettant la sélection de clones contenant un assez grand nombre copies du plasmide recombinant, puis clonées dans des bactéries *E. coli* TOP10F'. Les plasmides recombinants pourront ensuite être insérés dans le génome de levures *P. pastoris* Pink (kit PichiaPink™ Expression System, Invitrogen). En revanche, l'utilisation de la souche *P. pastoris* X-33 a permis l'expression intracellulaire de l'HPL d'olive. Les enzymes recombinantes sont fonctionnelles mais il est nécessaire d'optimiser les conditions d'expression, par exemple en utilisant des milieux de culture complexes favorisant l'accumulation de biomasse, ou en augmentant la concentration de méthanol. Nous envisageons également d'utiliser un autre système d'expression : la levure *Yarrowia lipolytica*.

IV. Etude des relations structure-fonction de l'hydroperoxyde lyase

La stratégie choisie pour réaliser cette étude a été fondée sur (i) la modélisation de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive, (ii) l'analyse de ce modèle et sa comparaison avec les structures tridimensionnelles d'autres enzymes de la famille CYP74 ou de P450 classiques, et (iii) l'analyse des alignements des séquences en acides aminés de ces enzymes. A partir de ces observations, des résidus d'acides aminés ont été ciblés, puis modifiés par mutagenèse dirigée, afin d'étudier leur implication dans le mécanisme catalytique et la spécificité réactionnelle de l'HPL.

IV.1. Modélisation de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive

IV.1.a) Construction et validation du modèle tridimensionnel

A ce jour, aucune structure cristalline d'HPL n'a été obtenue. Il est donc nécessaire de recourir aux méthodes computationnelles pour prédire la structure tridimensionnelle de cette enzyme. Deux autres enzymes : les AOS de guayule et d'*Arabidopsis thaliana*, appartenant comme l'HPL à la classe CYP74, ont été cristallisées. Les pourcentages d'identité entre les

séquences protéiques de la 13-HPL d'olive, et des AOS de guayule ou d'*Arabidopsis thaliana* sont respectivement de 38% et 39%. Nous avons choisi une approche de modélisation de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive par reconnaissance des repliements (*Threading*) à l'aide du serveur I-TASSER (Roy *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2015). A la différence de la modélisation par homologie qui traite les matrices comme des séquences et qui est donc basée uniquement sur une homologie de séquences protéiques, la modélisation par *Threading* traite les matrices comme des structures et tient compte à la fois des informations de séquence et de structure (type de repliement) pour réaliser la modélisation. Ainsi, la modélisation par *Threading* se révèle efficace y compris lorsque l'identité de séquence est faible ($\leq 30\%$) (Roy *et al.*, 2010 ; Kelley *et al.*, 2015).

La confiance de la prédiction de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive effectuée par I-TASSER, est représentée par le *C-score*. Cette valeur dépend de la qualité des alignements de *Threading* et de la convergence des simulations d'assemblages structuraux (Roy *et al.*, 2010). Le *C-score* peut varier de -5 à 2, avec une valeur seuil de -1,5 au-delà de laquelle le modèle est considéré comme correct. Concernant le modèle de la 13-HPL d'olive, la valeur du *C-score* est égale à -0,42, ce qui révèle un repliement correct de la structure.

Les serveurs informatiques CHARMMing (Miller *et al.*, 2008), ModRefiner (Xu et Zhang 2011), Nomad-Ref (Lindahl *et al.*, 2006) et YASARA minimization (Krieger *et al.*, 2009) ont été utilisés pour réaliser une minimisation de l'énergie de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive. L'évaluation des structures minimisées obtenues, à l'aide de l'outil PSVS a montré une meilleure qualité stéréochimique de la structure minimisée avec YASARA minimization. En effet, l'analyse des diagrammes de Ramachandran établis avec MolProbity (Chen *et al.*, 2010) a montré que cette minimisation a permis l'amélioration de la qualité de la structure protéique. Pour le modèle initialement construit par I-TASSER, ce diagramme montre 83,1% de résidus placés dans des zones énergétiquement très favorables, 12% dans des zones autorisées et 4,9% dans des régions non favorables (Annexe, Figure D), alors qu'après minimisation 93% des résidus se situent dans les zones très favorables, 4,9% dans les zones autorisées et 2,1% dans des régions non favorables (Annexe, Figure E). La valeur du *clashscore* calculée par MolProbity et représentant le nombre d'affrontements stériques pour 1000 atomes (hydrogènes inclus) (Chen *et al.*, 2010), a été abaissé de 19,63 à 2,47

après minimisation (Annexe, Figure F). La valeur du RMSD (*root-mean-square-deviation*) pour toutes les liaisons covalentes et tous les angles de liaison, a été calculée à l'aide du logiciel PDB validation (Berman *et al.*, 2000), par rapport aux valeurs standards définies par Engh et Huber (1991). Le RMSD par rapport à la norme est de 0,004 Å pour la longueur des liaisons covalentes et de 1,4 degrés pour les angles de liaison.

Le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive et sa conformation minimisée obtenue avec YASARA minimization, ont été superposés (Figure 53).

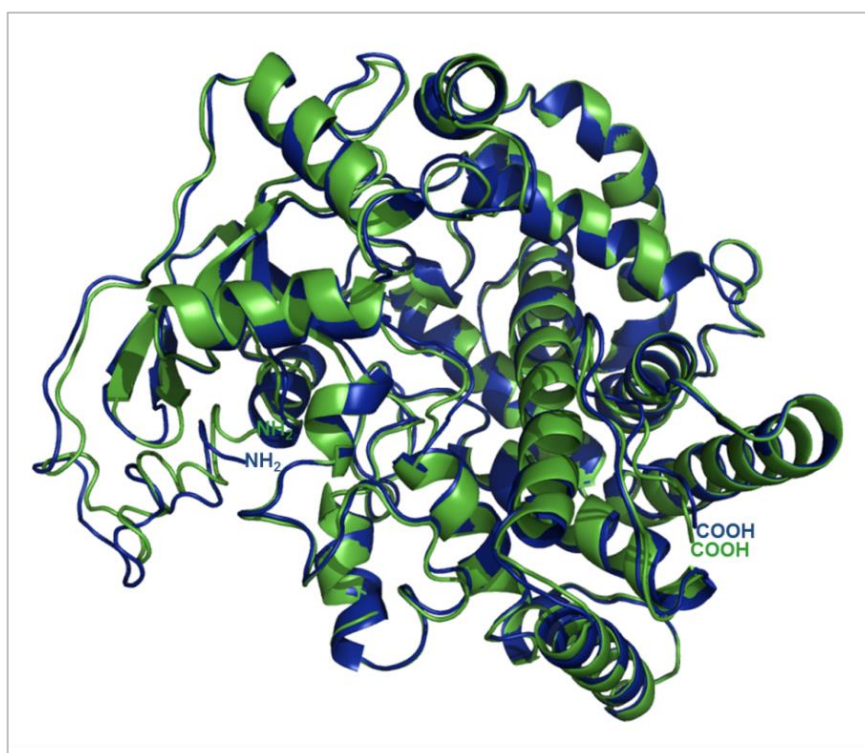


Figure 53 : Superposition du modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive et de sa structure minimisée

Le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive construit avec I-TASSER est représenté en vert. La conformation obtenue après minimisation avec YASARA minimization est représentée en bleu.

La superposition de deux structures protéiques a pu être évaluée grâce à deux mesures : le *TM-score* qui varie de 0 à 1 et rend compte de la similarité entre les deux structures, et le RMSD qui représente ici la distance moyenne entre les atomes censés être superposés. La superposition du modèle tridimensionnel et de sa conformation minimisée a montré un *TM-score* de 0,99139 et un RMSD de 0,74 Å. Ces valeurs de *TM-score* élevé et de RMSD faible montrent que les deux structures sont assez proches. Ceci atteste de la

bonne qualité du modèle obtenu grâce à I-TASSER. Néanmoins, la minimisation à l'aide du serveur YASARA minimization ayant permis l'amélioration de la qualité stéréochimique de la structure, le modèle minimisé a donc été retenu pour la suite de l'étude.

IV.1.b) Etude de la structure tridimensionnelle modélisée

Le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive présente une structure constituée d'un domaine α prédominant, formé uniquement d'hélices α , et d'un petit domaine β constitué de deux feuillets β et de trois hélices (Figure 54).



Figure 54 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive
Les domaines α et β de l'enzyme sont représentés respectivement en cyan et violet.

La 13-HPL d'olive adopte un repliement similaire au repliement caractéristique des P450, tout comme les AOS cristallisées de guayule et d'*Arabidopsis thaliana* et les P450 classiques (Peterson et Graham 1998 ; Lee *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008). En effet, la superposition de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive avec la structure des AOS cristallisées de guayule (PDB ID : 3DAN) et d'*Arabidopsis thaliana* (PDB ID : 3CLI) montre respectivement un RMSD de 1,01 et 1,08 Å, un TM-score de 0,962 et 0,968 avec

une identité de séquence égale à 38 et 39%. La superposition avec des P450 humains comme le P450 2C9 (PDB ID : 1OG5) et le P450 11A1 (PDB ID : 3NA1), ou bactériens comme le P450 BM-3 (PDB ID : 2HPD) montre respectivement un RMSD de 3,81, 3,61 et 3,54 Å, un TM-score de 0,758, 0,772 et 0,793 avec une identité de séquence égale à 11, 12,9 et 13%. Ainsi, bien que le pourcentage d'identité entre les séquences protéiques de la 13-HPL d'olive et les P450 classiques soit faible, le repliement tridimensionnel reste similaire. Sur le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive, nous avons donc pu identifier les hélices et les feuillets par analogie avec la structure de ces enzymes, en suivant la topologie générale des éléments de structure secondaire de tous les P450, décrite par Peterson et Graham (1998) (Figure 55).

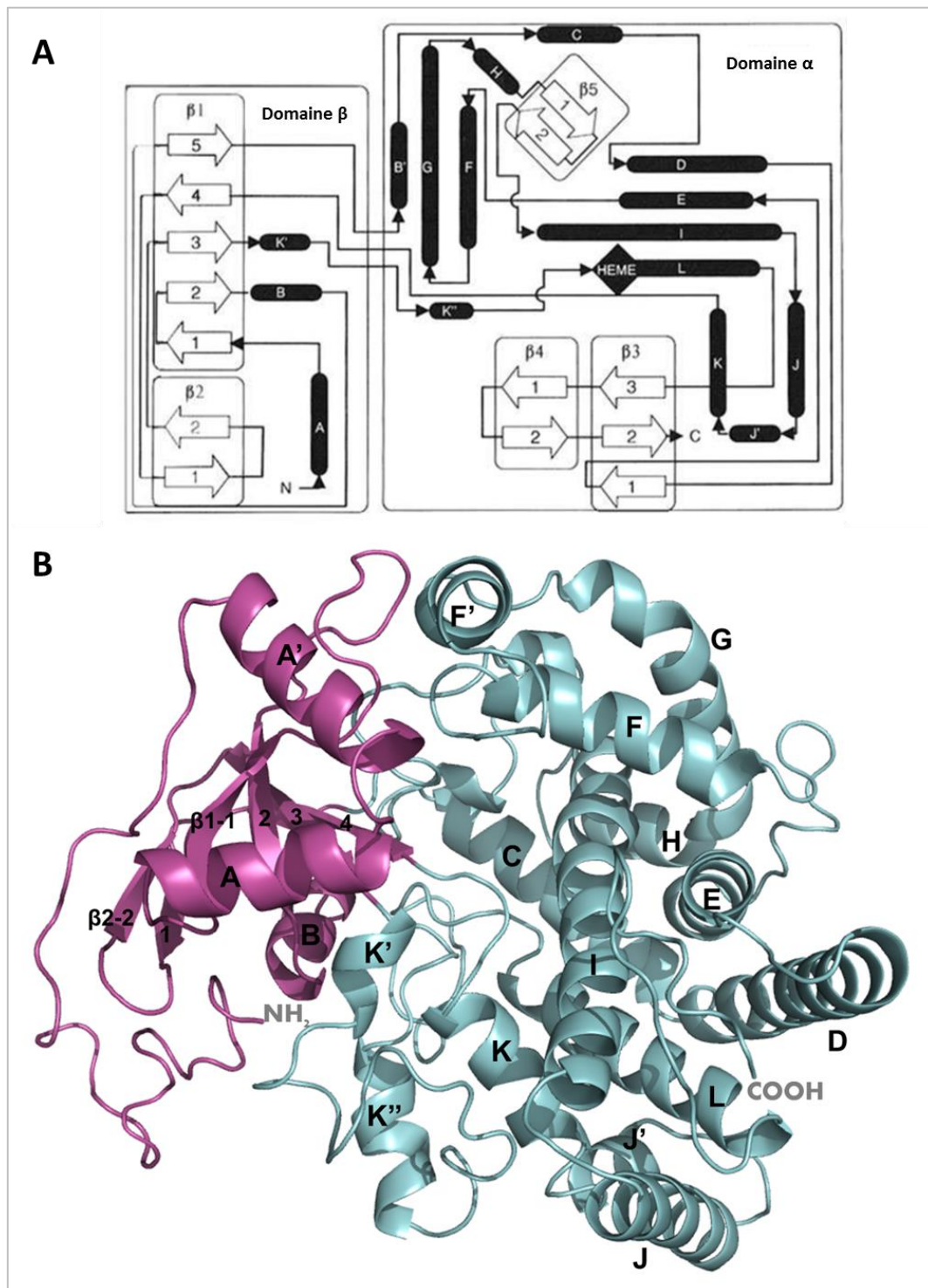


Figure 55 : Topologie générale des éléments de structure secondaire des P450 (Peterson et Graham 1998) (A) et structure tridimensionnelle de la 13-HPLd'olive (B)

(A) Les hélices sont représentées par des barres noires et désignées par des lettres. Les brins β des feuillets sont représentés par des flèches et désignés par des chiffres. L'hème est représenté par un carré noir.

(B) Les domaines α et β de la 13-HPL d'olive sont représentés respectivement en cyan et violet. Les hélices et les brins β ont été identifiés par analogie avec la structure générale des P450. Le brin β 1-5 n'étant pas visible, il n'est pas identifié sur la figure.

Cependant, l'HPL partage, avec l'AOS, quelques différences structurales avec la topologie générale décrite par Peterson et Graham (1998). En effet, l'HPL et l'AOS possèdent une hélice α , identifiée comme A', en aval de l'hélice A, mais pas d'hélice B'. De plus, à la différence du modèle de Peterson et Graham (1998), nous avons choisi d'inclure l'hélice K' dans le domaine α , comme décrit chez l'AOS de guayule par Li *et al.*, (2008).

Une fois les éléments de structure secondaire identifiés, l'outil MEMEBED (Nugent et Jones 2013) a été utilisé pour prédire les domaines de liaison à la membrane de la 13-HPL d'olive. Les domaines membranaires putatifs identifiés correspondent à des régions constituées en majorité d'acides aminés hydrophobes, et incluent notamment les hélices A' et F' ainsi qu'une partie de l'hélice G (Figure 56).

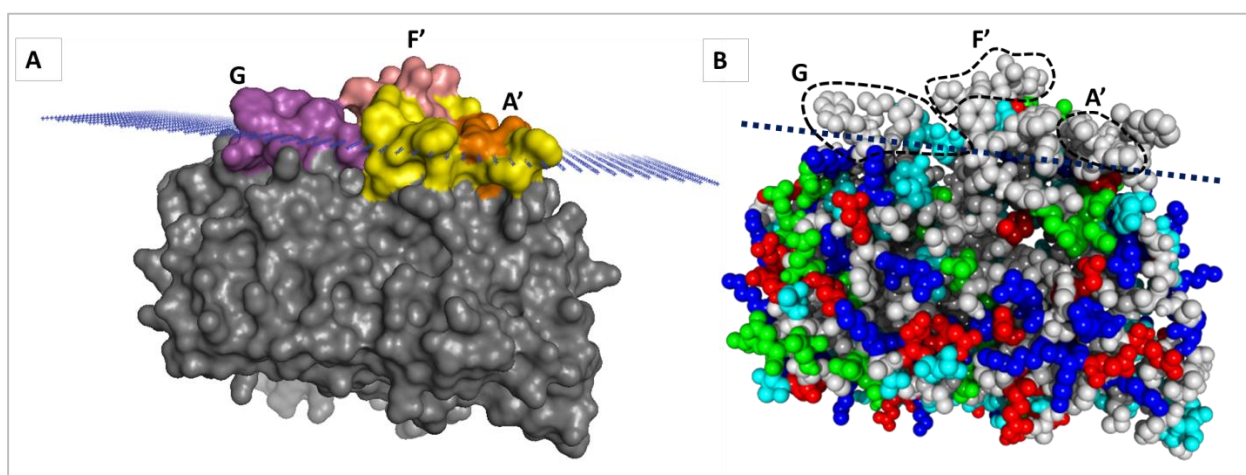


Figure 56 : Domaines putatifs de liaison à la membrane de la 13-HPL d'olive

Les domaines de liaison à la membrane ont été identifiés grâce à l'aide de l'outil MEMEBED. La limite putative entre les domaines membranaires et cytosoliques est matérialisée par des pointillés bleus.

(A) Représentation de la surface accessible au solvant. Les domaines membranaires putatifs comprennent les hélices A' (en orange), F' (en rose) et G (en violet) ainsi que des boucles (en jaune).

(B) Représentation atomique. Les atomes des acides aminés hydrophobes sont colorés en blanc, ceux des acides aminés dont la chaîne latérale possède un groupement polaire, en vert ou cyan, et ceux des acides aminés chargés positivement ou négativement, en bleu ou rouge.

Ces domaines correspondent aux régions de liaison à la membrane identifiées chez l'AOS d'*Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2008).

Un alignement de la structure secondaire et de la séquence peptidique de la 13-HPL d'olive, avec les séquences peptidiques des AOS de guayule et d'*Arabidopsis thaliana*, et des P450 11A1, 2C9 et BM-3, a été réalisé avec l'outil ESPript 3.0 (Figure 57).

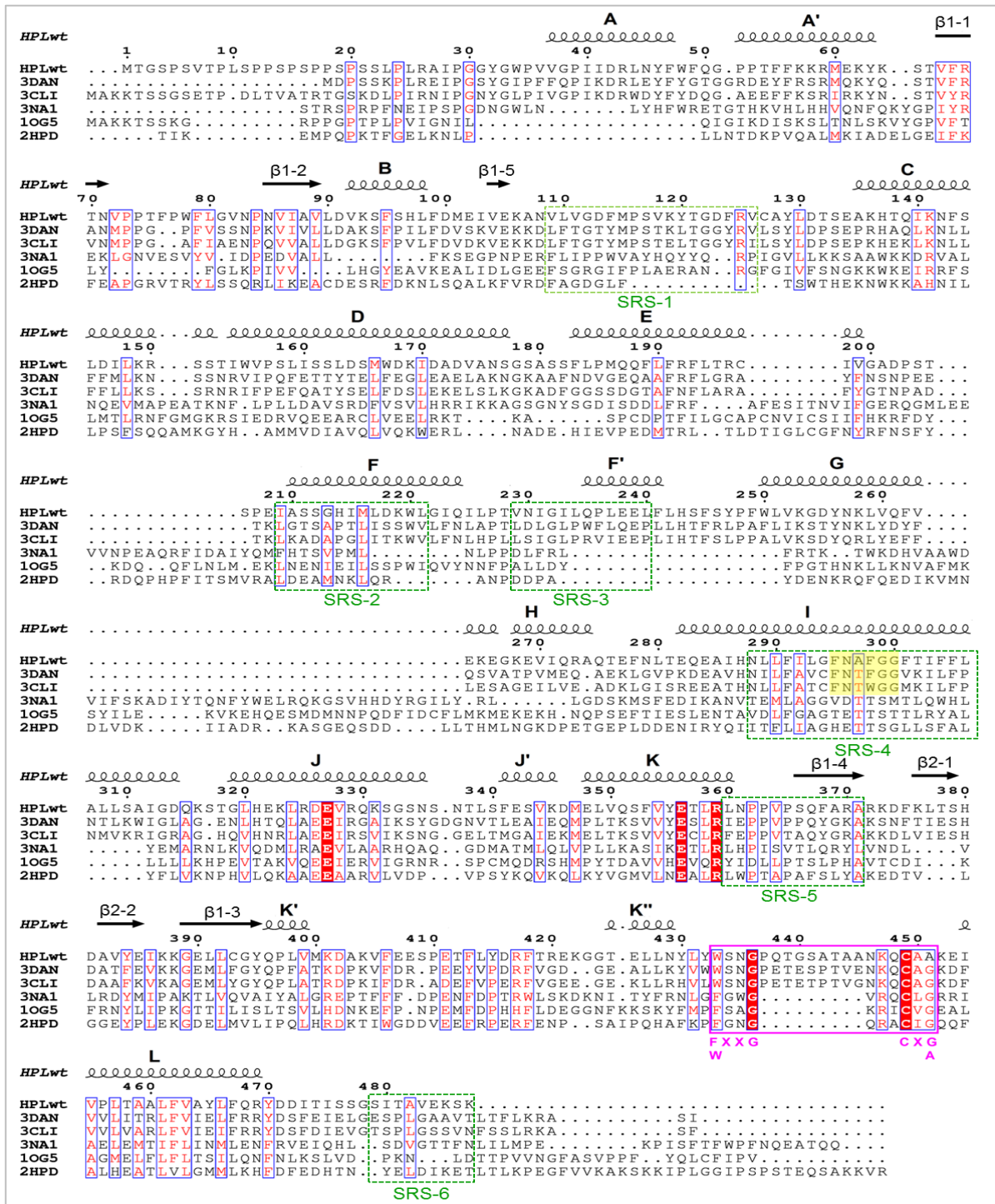


Figure 57 : Alignement de la structure secondaire et de la séquence peptidique de la 13-HPL d'olive avec les séquences peptidiques d'AOS et autres P450 cristallisés, à l'aide de l'outil ESPrpt 3.0

Les séquences peptidiques de la 13-HPL d'olive (HPLwt), de l'AOS de guayule (PDB ID : 3DAN), de l'AOS d'Arabidopsis thaliana (PDB ID : 3CLI), du P450 11A1 (PDB ID : 3NA1), du P450 2C9 (PDB ID : 1OG5), et du P450 BM-3 (PDB ID : 2HPD) ont été alignées. La structure secondaire du modèle de la 13-HPL d'olive est représentée au-dessus de l'alignement. Les séquences protéiques conservées sont encadrées en bleu et les acides aminés qui les composent figurent en rouge. La boucle de liaison à l'hème, encadrée en rose, contient les motifs caractéristiques FW-X-X-G et C-X-G. Les SRS sont encadrés en vert. Le motif F-N-T/S/A-X-G-G caractéristique des CYP74 est coloré en jaune.

Cet alignement a permis l'identification, chez la 13-HPL d'olive, des six SRS décrits chez l'AOS (Li *et al.*, 2008) et les P450 classiques (Gotoh 1992). Ainsi, la région entre le brin β 1-5 et l'hélice C, est identifiée comme le SRS-1. Le SRS-2 se situe au niveau de l'hélice F. Le SRS-3 comprend une partie de la boucle entre F et F' ainsi que la partie N-terminale de l'hélice F'. Le SRS-4 est situé au cœur de l'hélice I. Le SRS-5 s'étend de l'hélice K jusqu'au brin β 1-4, et le SRS-6 est retrouvé au niveau de la boucle à l'extrémité C-terminale de l'enzyme.

La boucle de liaison à l'hème de la 13-HPL d'olive est constituée des acides aminés compris entre les résidus tryptophane 433 et alanine 451. Aux extrémités N-terminale et C-terminale de cette boucle, les motifs F/W-X-X-G et C-X-G/A très conservés chez les P450, sont retrouvés (Li *et al.*, 2008 ; Brash 2009). Le résidu cystéine du motif C-X-G/A relie l'apoprotéine à l'atome de fer de l'hème, par son groupement –SH (Peterson et Graham 1998 ; Lee *et al.*, 2008). L'alignement de séquence de la Figure 57 montre, chez l'HPL et les AOS, l'insertion de neuf acides aminés après le motif F/W-X-X-G, ce qui est caractéristique de la famille CYP74 par rapport aux P450 classiques (Lee *et al.*, 2008 ; Brash 2009). Cette insertion conduit au réarrangement d'une région de la surface macromoléculaire qui est utilisée par les P450 classiques (monooxygénases) pour l'interaction avec le partenaire redox (réductase) ; l'allongement de la boucle autour de l'hème chez les CYP74 a donc pour conséquence d'empêcher cette interaction (Lee *et al.*, 2008). Certains P450 considérés comme ancestraux (notamment CYP152) et ayant une activité peroxygénase présentent également une insertion au niveau de la boucle de liaison à l'hème. Lee *et al.*, (2008) mettent en évidence une hypothèse évolutive : en l'absence d'oxygène moléculaire dans l'atmosphère, les P450 ancestraux utilisaient l' H_2O_2 comme oxydant (activité peroxygénase), puis, l'apparition de grandes quantités d'oxygène moléculaire dans l'atmosphère leur a permis d'acquérir une capacité à fixer l'oxygène en recrutant des partenaires redox (activité monooxygénase).

La superposition du modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive avec les structures cristallisées des AOS de guayule et d'*Arabidopsis thaliana*, a permis de préciser la localisation de l'hème au sein de l'apoprotéine. L'hème se positionne entre les hélices I et L, comme chez tous les P450 (Peterson et Graham 1998 ; Li *et al.*, 2008). Le résidu cystéine 449 représente le ligand proximal de l'atome de fer de l'hème. D'autres interactions

maintiennent l'hème dans la structure. En effet, les résidus histidine 137 et lysine 141 positionnés sur l'hélice C, ainsi que la lysine 447 située sur la boucle de liaison à l'hème et la lysine 106 située sur la boucle entre les hélices B et C, établissent des liaisons ioniques avec les groupements propionates de l'hème. Les résidus alanine 450 et 451 établissent des interactions hydrophobes avec l'hème (Figure 58).

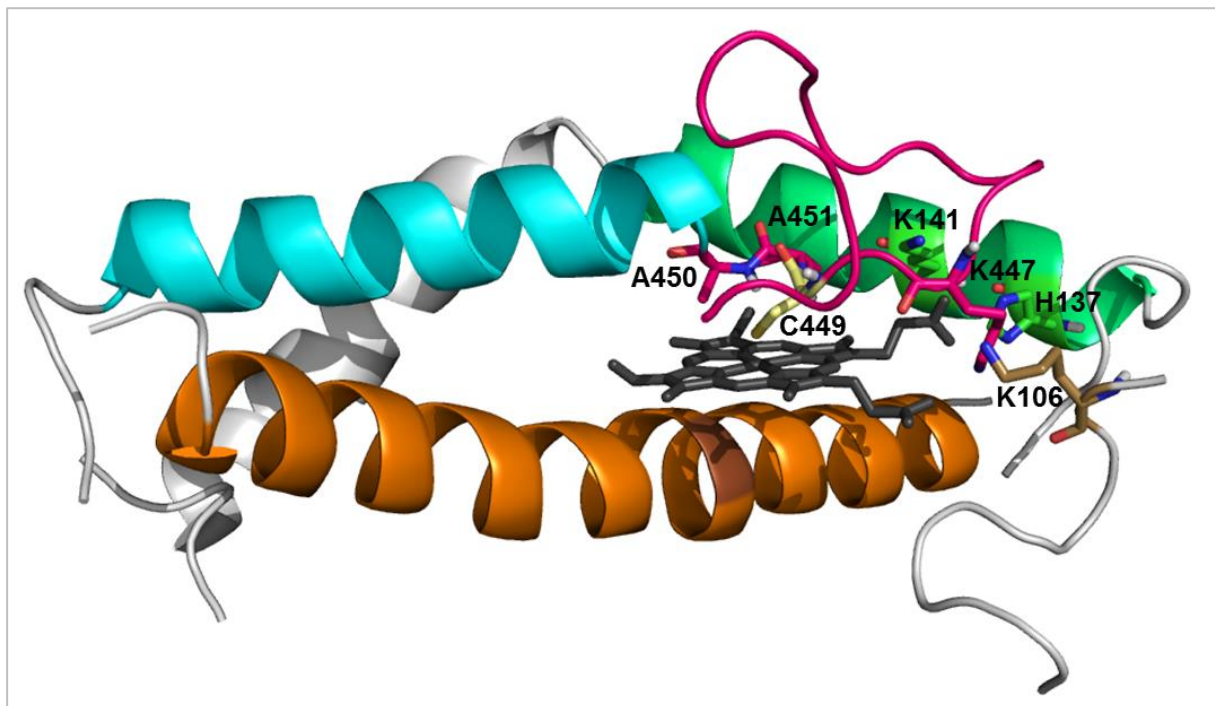


Figure 58 : Positionnement de l'hème au sein de la structure tridimensionnelle modélisée de la 13-HPL d'olive

L'hème (en noir) se positionne entre les hélices I (en orange) et L (en cyan). La boucle de liaison à l'hème (en rose) comprend le résidu cystéine 449 (en jaune) qui est le ligand proximal du fer de l'hème, ainsi que les résidus alanine 450 et 451 qui maintiennent des interactions hydrophobes avec l'hème. Le résidu lysine 447 de cette boucle, le résidu lysine 106, ainsi que l'histidine 137 et la lysine 141 de l'hélice C (en vert) établissent des liaisons ioniques avec les groupements propionates de l'hème.

A partir du modèle tridimensionnel, l'analyse des cavités avec CASTp a montré une cavité principale dont la surface accessible au solvant présente une aire de 1499 Å² et un volume de 1581 Å³. Cette cavité contient l'hème, et pourrait donc correspondre au site actif de l'enzyme (Figure 59).

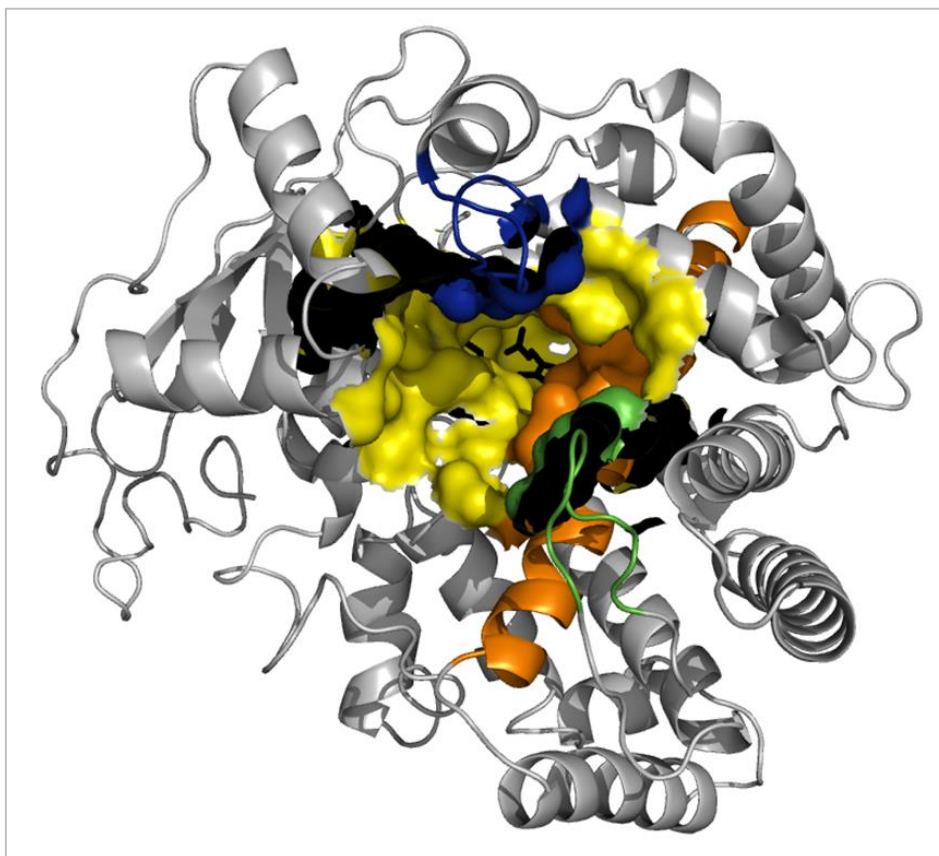


Figure 59 : Site actif putatif de la 13-HPL d'olive

Le serveur CASTp a permis l'identification d'une cavité principale dont la surface accessible au solvant est montrée sur cette figure. Cette cavité contient l'hème (en noir) et pourrait donc correspondre au site actif de l'enzyme. La boucle entre les hélices F et F' (en bleu) et la boucle à l'extrémité C-terminale de l'enzyme (en vert) sont situées à l'entrée de la cavité. L'hélice I (en orange) traverse le site actif putatif. Les autres structures qui composent la cavité sont colorées en jaune.

Le site actif putatif est délimité par les régions correspondant aux six SRS identifiés. La boucle entre les hélices F et F' (SRS-3) ainsi que la boucle à l'extrémité C-terminale de l'enzyme (SRS-2) se font face, à l'entrée du site. Chez l'AOS d'*Arabidopsis thaliana*, un léger changement d'orientation spatiale de ces boucles est visible lors de la cristallisation de l'enzyme en absence ou en présence d'analogues du substrat (13(S)-HOD et 13(S)-HOT) (Lee *et al.*, 2008). Li *et al.*, (2008) ont montré que le facteur de température des atomes de l'AOS de guayule est assez élevé (30 \AA^2 en moyenne) au niveau de la boucle entre les hélices F et F', et très élevé (55 \AA^2 en moyenne) au niveau de la boucle à l'extrémité C-terminale de l'enzyme, ce qui suggère une flexibilité conformationnelle de ces boucles.

L'hélice I borde le site actif putatif. Au niveau de la partie centrale de cette hélice, au sein du SRS-4, l'HPL présente la séquence F²⁹⁵-N²⁹⁶-A²⁹⁷-F²⁹⁸-G²⁹⁹-G³⁰⁰. Les résidus

phénylalanine 295, asparagine 296 et les deux résidus glycine 299 et 300 de ce motif sont très conservés chez tous les CYP74 (Hughes *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008). Le résidu alanine 297 est conservé uniquement chez les HPL (Toporkova *et al.*, 2008). Sur le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive, le résidu asparagine 296 se positionne à l'aplomb de l'atome de fer catalytique de l'hème, à une distance de 3,44 Å de celui-ci. Ce résidu asparagine a été décrit pour être impliqué dans la fixation du substrat et le mécanisme catalytique des CYP74, via l'établissement de liaisons hydrogène entre son groupement amide et les atomes d'oxygène de la fonction hydroperoxyde du substrat (Lee *et al.*, 2008) (Figure 60).

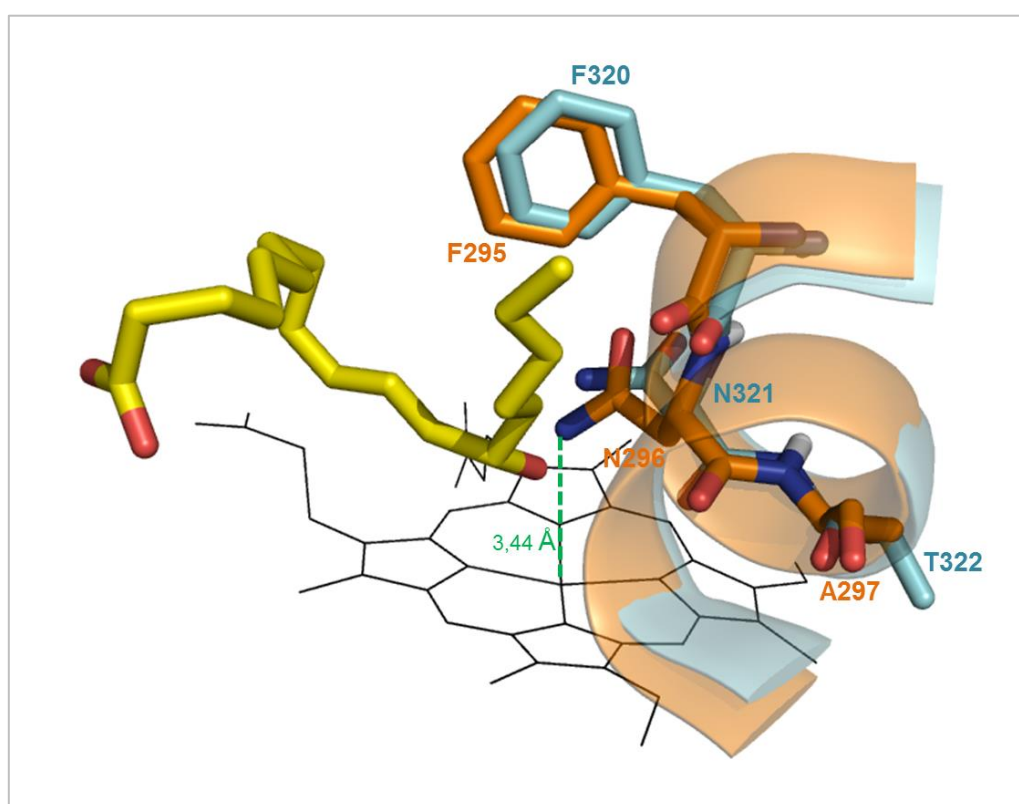


Figure 60 : Résidus du domaine central de l'hélice I

Cette figure montre la superposition, au niveau du domaine central de l'hélice I, du modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive (en orange) avec la structure tridimensionnelle de l'AOS d'*Arabidopsis thaliana* (en bleu), co-cristallisée avec une molécule de 13S-HOD (en jaune) (PDB ID : 2RCH). L'hème est représenté en noir. Le groupement amide du résidu asparagine 296 de la 13-HPL d'olive se situe à 3,44 Å de l'atome de fer de l'hème.

L'étude de la structure tridimensionnelle modélisée de la 13-HPL d'olive a été combinée à l'analyse d'alignements de séquences de CYP74 de spécificités différentes, afin d'identifier

des résidus d'acides aminés impliqués dans le contrôle de la spécificité réactionnelle de l'enzyme.

IV.2. Identification de résidus potentiellement impliqués dans la spécificité réactionnelle de l'hydroperoxyde lyase

Un alignement de la séquence protéique de la 13-HPL d'olive avec les séquences d'HPL de régiospécificités différentes : 9/13-HPL, 9-HPL et autres 13-HPL, a été réalisé. L'analyse de cet alignement a montré la présence d'un résidu sérine ou thréonine chez les 13-HPL, correspondant au résidu T302 chez la 13-HPL d'olive, qui est remplacé par un résidu lysine conservé chez les 9- et 9/13-HPL (Figure 61).

HPL	Régiospécificité	Numéro d'accèsion	Séquence
HPLwt	13-HPL	-	295 F N A F G G F T I F F
OepHPL	13-HPL	ACD43482	295 F N A F G G F T I F L
StHPL	13-HPL	CAC44040	290 F N A F G G F T I F L
LeHPL	13-HPL	AAK27265	286 F N A F G G F S I F L
CaHPL	13-HPL	AAK27266	290 F N A F G G F T I F L
BvHPL	13-HPL	ADV29797	301 F N A F G G F S I F L
PgHPL	13-HPL	AAK15070	304 F N A F G G F S I F L
ClHPL	13-HPL	AAU12570	295 F N A Y G G F S L F F
AtHPL	13-HPL	AAC69871	304 F N A Y G G F S V F L
RlemHPL	13-HPL	BAC55161	312 F N A F G G F S I F V
HvHPL	13-HPL	CAC82980	292 F N A F G G F S V F L
PdHPL	9-HPL	CAE18065	286 F N A F G G M K L L F
CmHPL	9/13-HPL	AAK54282	282 F N A Y G G M K V L F
VvHPL2	9/13-HPL	NP_001268148	292 F N A C G G M K T L F
CsHPL	9/13-HPL	AAF64041	279 F N A Y G G M K V L F
OsHPL	9/13-HPL	BAG97978	297 F N A F G G F K I F L

Figure 61 : Alignement des séquences en acides aminés d'HPL de régiospécificités différentes
HPLwt : HPL d'olive (variété *Leccino*) ; *Oep* : *Olea europaea* (variété *Picual*) ; *St* : *Solanum tuberosum* ; *Le* : *Lycopersicon esculentum* ; *Ca* : *Capsicum annuum* ; *Bv* : *Beta vulgaris* ; *Pg* : *Psidium guajava* ; *Cl* : *Citrullus lanatus* ; *At* : *Arabidopsis thaliana* ; *Rlem* : *Citrus jambhiri* ; *Hv* : *Hordeum vulgare* ; *Pd* : *Prunus dulcis* ; *Cm* : *Cucumis melo* ; *Vv* : *Vitis vinifera* ; *Cs* : *Cucumis sativus* ; *Os* : *Oryza sativa*.

Le résidu T302 est localisé au niveau de la région centrale de l'hélice I. Lors de la superposition du modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive, avec la molécule de 13(S)-HOD co-cristallisée avec l'AOS de guayule, ce résidu apparaît proche de l'extrémité carboxyle du 13(S)-HOD. L'AOS de guayule comporte à cette position, un résidu K282, décrit par Li *et al.*, (2008) pour être impliqué dans une liaison ionique avec le groupement

carboxyle du substrat, et jouant un rôle dans la reconnaissance et la fixation de ce dernier. Des modèles de la structure tridimensionnelle de la 9-HPL d'amande (Mita *et al.*, 2005), de la 13-HPL de pomme de terre (Mu *et al.*, 2012) et de la 9/13-HPL de raisin (Zhu *et al.*, 2012) ont été construits à l'aide du serveur I-TASSER, puis superposés avec la 13-HPL d'olive et l'AOS de guayule (Figure 62).

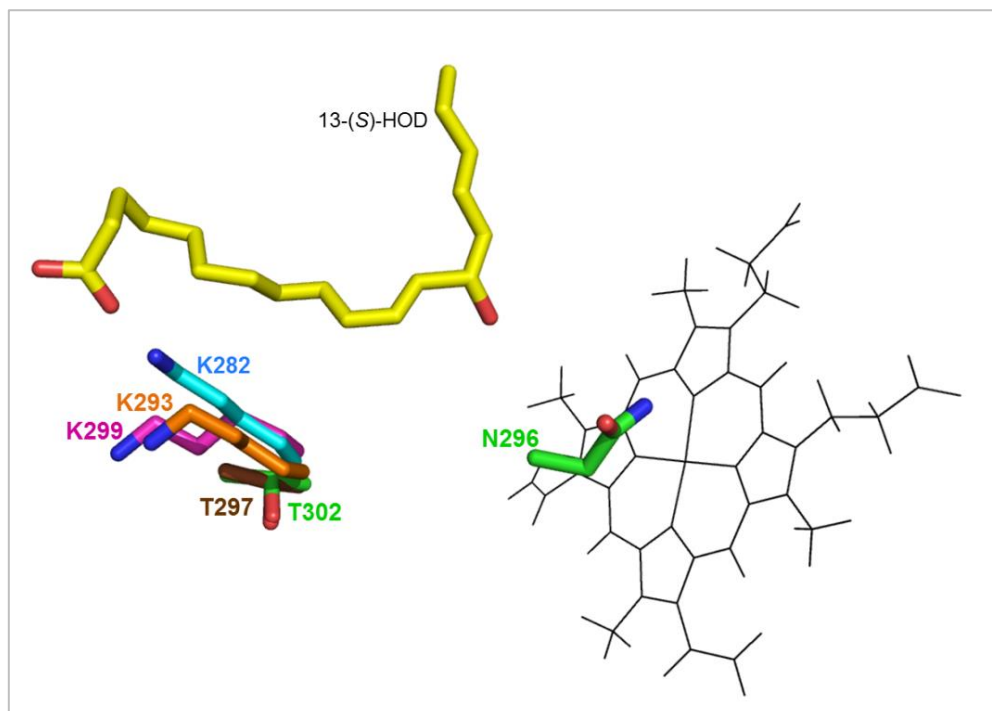


Figure 62 : Implication du résidu en position 302 dans le contrôle de la régiospécificité de l'HPL
 Les modèles tridimensionnels de la 13-HPL d'olive (en vert), de la 13-HPL de pomme de terre (en marron), de la 9-HPL d'amande (en orange) et de la 9/13-HPL de raisin (en rose) ont été superposés avec la structure de l'AOS de guayule (en cyan) co-cristallisée avec le 13(S)-HOD (en jaune). L'hème est représenté en noir.

La thréonine 302 de l'HPL d'olive conservée chez les 13-HPL a donc été substituée par mutagenèse dirigée par une lysine conservée chez les 9- et 9/13-HPL, et dont la chaîne latérale chargée positivement pourrait établir une liaison ionique avec l'extrémité carboxylate du substrat. Le mutant T302K de la 13-HPL d'olive (HPL $_{wt}$) a été exprimé chez *E. coli*, puis purifié à partir de la fraction soluble du lysat bactérien, par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine de cobalt, dans les mêmes conditions que l'HPL $_{wt}$. Les étapes de purification des HPL recombinantes, ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en présence de SDS et par immunoempreinte (Figure 63).

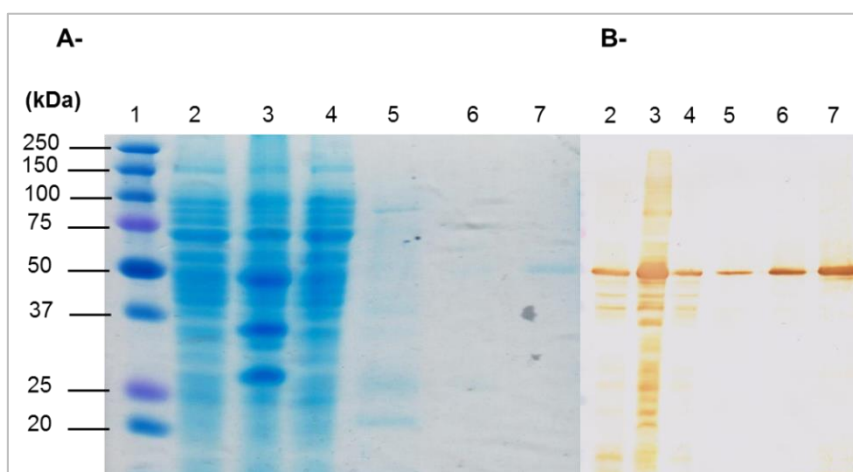


Figure 63 : Analyse des étapes de purification du mutant T302K par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% coloré au bleu de Coomassie (A) et par immunoempreinte (B)

1 : Marqueur de masse moléculaire ; 2 : fraction soluble du lysat bactérien ; 3 : culot de lyse ; 4 : fraction non retenue sur la colonne ; 5 : fractions éluées à 40 mM d'imidazole ; 6 : fractions éluées à 100 mM d'imidazole ; 7 : fractions éluées à 200 mM d'imidazole.

Comme pour l'HPL $_{wt}$, les fractions éluées à 40 mM, 100 mM et 200 mM d'imidazole contiennent l'HPL recombinante puisque nous observons une bande à environ 50 kDa révélée par l'anticorps anti-polyhistidine, correspondant à la masse moléculaire d'une sous-unité de l'enzyme (Figure 63 B, pistes 5 à 7). De plus, l'enzyme mutée est pure dans les fractions éluées à 200 mM d'imidazole puisqu'aucune autre bande n'est visible après coloration des protéines au bleu de Coomassie (Figure 63 A, piste 7).

Le tableau VI compare les purifications de l'HPL $_{wt}$ et du mutant T302K.

Tableau VI : Tableau de purification de l'HPL $_{wt}$ et du mutant T302K

HPL	Fraction	Protéines totales (mg)	Activité totale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Activité spécifique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines)	Rendement	Facteur de purification
HPL $_{wt}$	Extrait brut Surnageant de lyse	310,91 \pm 20,48	105,25 \pm 2,62	0,34 \pm 0,01	100	1
	Elution à 200mM d'imidazole	0,52 \pm 0,02	36,40 \pm 1,07	70,05 \pm 0,81	34,58	206,03
T302K	Extrait brut Surnageant de lyse	400,93 \pm 5,10	147,67 \pm 4,40	0,36 \pm 0,02	100	1
	Elution à 200mM d'imidazole	0,45 \pm 0,02	33,75 \pm 2,52	74,18 \pm 3,25	22,86	206,05

Les activités enzymatiques ont été mesurées en utilisant le 13-HPOT comme substrat. Les valeurs représentent la moyenne de trois déterminations \pm l'écart type.

A partir de 400 mL de milieu de culture, une quantité légèrement plus élevée d'HPLwt (0,52 mg) a été purifiée par rapport au mutant T302K (0,45 mg). L'activité spécifique des enzymes purifiées est similaire (70,05 U.mg⁻¹ de protéines pour l'HPLwt et 74,18 U.mg⁻¹ de protéines pour le mutant T302K).

Le mutant T302K a ensuite été caractérisé au niveau biochimique. Il présente, comme l'HPLwt, un pH optimum d'action de 7,5 et une température optimale de 25°C. Sa spécificité réactionnelle a également été étudiée, et comparée avec l'HPLwt (Tableau VII).

Tableau VII : Régiospécificité de l'HPLwt et du mutant T302K

	Activité spécifique (µmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ de protéines)			
	13-HPOT	13-HPOD	9-HPOT	9-HPOD
HPLwt	97,92 ± 6,66	20,85 ± 2,83	nd	nd
HPLT302K	106,35 ± 2,52	23,98 ± 2,02	7,48 ± 0,98	nd

*Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations ± l'écart type.
nd, non détectée*

L'HPLwt et le mutant T302K agissent sur les 13-hydroperoxydes et l'activité spécifique déterminée est similaire (respectivement 97,92 et 106,35 U.mg⁻¹ de protéines pour le 13-HPOT et 20,85 et 23,98 U.mg⁻¹ de protéines pour le 13-HPOD). Comme pour l'HPLwt, le substrat préférentiel du mutant T302K est le 13-HPOT. Par ailleurs, le mutant T302K a une activité de 7,48 U.mg⁻¹ de protéines sur le 9-HPOT tandis que l'HPLwt n'est pas active sur ce substrat. Cependant, aucune activité de l'HPLwt ni du mutant T302K n'est détectée sur le 9-HPOD. Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats serait que d'autres résidus interviendraient dans le mécanisme de la régiospécificité, en jouant un rôle dans la reconnaissance et le positionnement du substrat dans le site actif.

Les paramètres cinétiques du mutant T302K ont été déterminés pour le 13-HPOD et le 13-HPOT, puis comparés à ceux de l'HPLwt (Tableau VIII).

Tableau VIII : Paramètres cinétiques de l'HPL wt et du mutant T302K.

HPL	Substrats	Km (μM)	Vm ($\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$)	kcat (s^{-1})	kcat/Km ($\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
HPL wt	13-HPOD	43,10 \pm 4,46	0,48 \pm 0,06	26,38 \pm 3,01	0,62
	13-HPOT	152,75 \pm 10,36	10,35 \pm 0,68	564,95 \pm 36,89	3,71
HPL T302K	13-HPOD	48,14 \pm 3,99	0,51 \pm 0,05	27,22 \pm 2,85	0,57
	13-HPOT	200,22 \pm 18,91	10,51 \pm 0,63	570,61 \pm 29,73	2,85

Les résultats représentent la moyenne de trois déterminations \pm l'écart type.

Les valeurs de Km et de Vm du mutant T302K ne sont pas différentes des valeurs déterminées pour l'HPL wt . La mutation T302K ne semble donc pas avoir d'effet majeur sur l'affinité de l'enzyme pour le 13-HPOD et le 13-HPOT, ni sur la vitesse de réaction. Les valeurs de kcat de l'HPL wt et du mutant sont également similaires (respectivement 26,38 et 27,22 pour le 13-HPOD, et 564,95 et 570,61 pour le 13-HPOT). Ces résultats confirment donc que la mutation T302K ne modifie pas l'efficacité catalytique de l'enzyme sur les 13-hydroperoxydes (13-HPOD et 13-HPOT). En revanche, les paramètres cinétiques du mutant T302K n'ont pas pu être déterminés sur le 9-HPOT car nous ne disposons pas de ce substrat en quantité suffisante. Nous envisageons donc de mettre au point les conditions de synthèse du 9-HPOT par la 9-LOX de pomme de terre (Royo *et al.*, 1996).

La substitution de la thréonine 302 de la 13-HPL d'olive par une lysine, a donc permis la détection d'une activité sur le 9-HPOT. Le résidu lysine pourrait, à la différence de la thréonine, établir une liaison ionique avec le groupement carboxylate du substrat. L'établissement de cette liaison pourrait être nécessaire au positionnement et à la fixation d'un 9-hydroperoxyde dans le site actif de l'enzyme. La caractérisation biochimique du mutant T302K doit être achevée, et d'autres acides aminés pourraient être modifiés par mutagenèse dirigée afin de vérifier leur implication dans le contrôle de la régiospécificité de l'HPL.

Conclusion et Perspectives

Le laboratoire s'intéresse à la production biotechnologique de molécules à note verte grâce à l'utilisation des enzymes de la voie de la lipoxygénase. Dans le but d'utiliser une HPL recombinante dans les réactions de bioconversion, l'ADNc codant pour une HPL d'olive (HPL*wt*) a été isolé à partir d'olives noires de la variété Leccino, et cloné chez *E. coli*. Afin d'éviter d'éventuelles difficultés de solubilisation de l'enzyme, l'HPL dépourvue de son peptide d'adressage chloroplastique (HPL*del*) a également été clonée. L'HPL*wt* et l'HPL*del* ont été exprimées chez *E. coli*.

Au cours de ce travail, les deux enzymes recombinantes ont été purifiées par chromatographie d'affinité et caractérisées biochimiquement. Elles sont spécifiques des 13-hydroperoxydes (13-HPL), présentent une activité maximale à pH 7,5 et à 25°C, et agissent plus efficacement sur le 13-HPOT que sur le 13-HPOD (kcat/Km respectivement égal à 3,68 et à 0,54 s⁻¹.μM⁻¹). Par ailleurs, l'étude de la stabilité de l'HPL*wt* et de l'HPL*del* au cours du temps a montré que les enzymes sont relativement stables durant 5 semaines à 4°C (respectivement 84% et 62% de l'activité spécifique conservés). Lors de la congélation, le glycérol peut être utilisé comme cryoprotecteur puisque la totalité de l'activité des deux enzymes est conservée après 5 semaines de stockage à -80°C en présence de glycérol 10%. De plus, l'ajout de composés chimiques tels que le NaCl, le Na₂SO₄ et la glycine a permis d'augmenter l'activité spécifique des deux enzymes. Lors d'essais de synthèse d'aldéhydes volatils par les HPL recombinantes réalisés au laboratoire, l'ajout de ces composés dans le milieu réactionnel a permis la production de quantités d'aldéhydes équivalentes aux quantités obtenues en l'absence de ces composés, tout en diminuant de 1,5 à 2,5 fois la quantité d'enzyme utilisée.

Afin d'envisager l'utilisation de l'HPL recombinante dans un procédé industriel de biotransformation, sa production chez *E. coli* devra, dans un premier temps, être optimisée pour obtenir de plus grandes quantités d'enzyme soluble et active. En effet, les résultats obtenus ont montré qu'une grande quantité d'HPL produite est piégée dans la cellule, probablement sous la forme de corps d'inclusion. Différentes températures de culture pré- et post-induction seront testées en combinaison avec différentes durées de culture et différentes concentrations d'inducteur (IPTG ou lactose). Lors de l'expression de l'enzyme, l'efficacité de traduction pourrait être optimisée grâce à l'utilisation de codons préférentiellement lus par *E. coli*. Nous envisageons également de tester un système

d'expression bactérien différent, tel que le système d'expression T7 combinant des vecteurs de type pET et différentes souches d'*E. coli* : ArcticExpress(DE3), BL21 Star(DE3), Rosetta (DE3) ou Lemo21(DE3). L'expression de l'enzyme recombinante pourra alors être induite par ajout de l'inducteur dans le milieu, mais l'utilisation d'un milieu auto-inductible pourra également être testée. Dans un second temps, nous envisageons de réaliser, au laboratoire, une production à plus grande échelle à l'aide d'un fermenteur. L'adaptation des conditions réactionnelles pour des plus grandes quantités nous permettra ensuite d'intégrer la 13-HPL recombinante d'olive dans un processus de biocatalyse complet faisant intervenir une lipase commerciale et une 13-LOX commerciale (LOX de soja). Afin de proposer le procédé le mieux adapté et le plus performant, différentes conditions de biotransformations seront testées : composition du milieu réactionnel, température, pH, durée des réactions enzymatiques ... Nous envisageons également d'étudier l'utilisation simultanée, en combinaison ou séquentielle des différentes enzymes. En collaboration avec les équipes de Chimie du projet Ressources Naturelles de l'Université, différentes méthodes de récupération des aldéhydes volatils pourront être testées, comme l'extraction par flux d'air suivie du piégeage des molécules sur un réfrigérant, qui peut être adaptée dans le cadre d'une extraction continue concomitante de la réaction enzymatique dans un bioréacteur. Nous allons également nous intéresser au transfert de la mise en œuvre des procédés biotechnologiques depuis le stade laboratoire jusqu'à l'échelle pilote.

Dans le but d'éviter la formation de corps d'inclusion, et de faciliter voire de s'affranchir de l'étape de purification des enzymes recombinantes, des essais de sécrétion de l'HPL d'olive (HPL_{wt}, HPL_{del}, ou HPL_{opt}) ont été réalisés chez la levure *P. pastoris* X-33. Différentes constructions géniques ont été effectuées puis intégrées dans un vecteur de type pPICZ α , contenant la séquence du peptide α comme signal de sécrétion des enzymes recombinantes dans le milieu de culture. Cependant, aucune de ces constructions n'a permis la sécrétion de l'HPL dans le milieu de culture, probablement en raison de difficultés des protéines recombinante à emprunter et suivre la voie sécrétoire malgré la présence du peptide α , s'accompagnant de la dégradation des protéines. En revanche, les HPL_{wt}, HPL_{del} et HPL_{opt} ont pu être exprimées de manière intracellulaire chez *P. pastoris* X-33. Une activité HPL maximale de 58 unités par litre de culture a été mesurée à 24h d'induction.

D'autres séquences signal pourraient permettre la sécrétion de l'HPL recombinante d'olive chez *P. pastoris*. Des constructions contenant les séquences signal de sécrétion de l' α -amylase d'*Aspergillus niger*, du lysozyme de la poule, ou de l'albumine sérique humaine, en amont de la séquence codant pour l'HPL_{wt}, l'HPL_{del} ou l'HPL_{opt}, ont déjà été réalisées puis intégrées dans des vecteurs de type pPINK-HC, ensuite clonés dans des bactéries *E. coli* TOP10F'. Les plasmides recombinants pourront ensuite être insérés dans le génome de levures *P. pastoris* Pink (kit PichiaPink™ Expression System, Invitrogen). L'expression intracellulaire de l'HPL d'olive chez *P. pastoris* X-33 devra être optimisée : utilisation de milieux de culture complexes favorisant l'accumulation de biomasse, variation de la concentration de méthanol, avant d'envisager la purification de l'HPL. Nous avons également développé une collaboration avec le Dr Jean-Marc Nicaud (INRA, UMR1319, Jouy-en-Josas) pour obtenir une levure *Yarrowia lipolytica* exprimant la 13-HPL d'olive. De plus, la production d'une levure *Yarrowia lipolytica* co-exprimant la 13-LOX d'olive et la 13-HPL d'olive est également envisagée, ce qui pourrait permettre d'effectuer simultanément les réactions de synthèse des hydroperoxydes et leur dégradation en aldéhydes à note verte. L'intérêt de ce couplage dans un procédé de bioconversion pourra ainsi être évalué.

Parallèlement, notre étude s'est portée sur la compréhension des relations structure-fonction de l'HPL. A ce jour, aucune structure cristalline de l'HPL n'est disponible. La structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive a donc été modélisée grâce à des méthodes computationnelles, à l'aide du serveur I-TASSER, puis une minimisation a été effectuée avec l'outil YASARA minimization. L'utilisation d'une approche combinant l'étude du modèle tridimensionnel et l'analyse d'alignements de séquences a permis de localiser le site actif putatif et de cibler des résidus d'acides aminés potentiellement impliqués dans le contrôle de la régiospécificité de l'HPL. Ainsi, une thréonine en position 302 chez l'HPL d'olive et conservée chez les 13-HPL a été substituée par mutagenèse dirigée par une lysine conservée chez les 9- et 9/13-HPL, et pouvant interagir avec l'extrémité carboxylate du substrat. Le mutant T302K a été exprimé chez *Escherichia coli*, puis purifié par chromatographie d'affinité. Il présente une efficacité catalytique sur les 13-hydroperoxydes similaire à celle de l'HPL sauvage, mais il est également actif sur le 9-hydroperoxyde d'acide linoléique.

Nous allons poursuivre l'étude des relations structure-fonction de l'HPL d'olive. D'autres résidus d'acides aminés pourraient en effet, être impliqués dans le contrôle de la régiospécificité de l'HPL, en favorisant le recrutement de 9- ou de 13-hydroperoxydes, et/ou leur stabilisation dans le site actif. Grâce au modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive, nous avons identifié deux résidus d'intérêt qui sont localisés à proximité de la thréonine 302 (Figure 64).

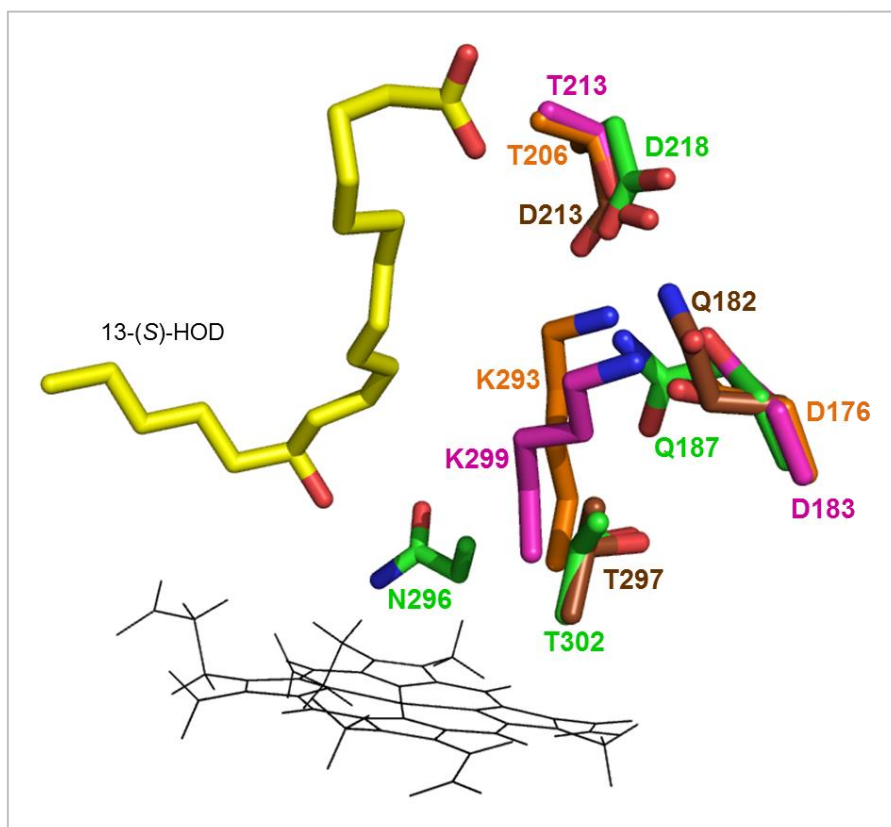


Figure 64 : Résidus potentiellement impliqués dans le contrôle de la spécificité réactionnelle de l'HPL

Les modèles tridimensionnels de la 13-HPL d'olive (en vert), de la 13-HPL de pomme de terre (en marron), de la 9-HPL d'amande (en orange) et de la 9/13-HPL de raisin (en rose) ont été superposés avec la structure de l'AOS de guayule co-cristallisée avec le 13(S)-HOD (en jaune). L'hème est représenté en noir.

Tout d'abord, la 13-HPL d'olive comporte un résidu acide aspartique 218, comme la 13-HPL de pomme de terre, alors que la 9-HPL d'amande et la 9/13-HPL de raisin possèdent un résidu thréonine à cette position. La construction du double mutant de l'HPL d'olive D218T/T302K pourrait d'une part éviter que la charge négative de l'acide aspartique ne gêne le positionnement du groupement carboxylate du substrat à proximité, et d'autre

part des interactions pourraient s'établir entre la thréonine 218, la lysine 302 et le groupement carboxylate du substrat. Par ailleurs, la 13-HPL d'olive comporte un résidu glutamine 187, comme la 13-HPL de pomme de terre, tandis que la 9-HPL d'amande et la 9/13-HPL de raisin possèdent un résidu acide aspartique à cette position, qui peut établir une liaison ionique avec le résidu lysine de ces HPL. Le double mutant de l'HPL d'olive Q187D/T302K pourra être réalisé afin de tester l'influence de cette interaction. Enfin, le triple mutant Q187D/D218T/T302K pourra être étudié. Les résultats de la caractérisation biochimique des doubles mutants D218T/T302K et Q187D/T302K et du triple mutant Q187D/D218T/T302K devraient nous renseigner sur le rôle joué par ces résidus dans le contrôle de la régiospécificité de l'HPL d'olive. Des études de *docking* et de dynamique moléculaire en collaboration avec le Dr Isabelle André (LISBP-INSA, CNRS 5504, Toulouse) devraient également être réalisées. Ces études devraient nous permettre de mieux comprendre le mécanisme catalytique de l'enzyme et de préciser les résidus impliqués dans ce mécanisme.

Références Bibliographiques

- Ahmad M., Hirz M., Pichler H. et Schwab H.** (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5301-5317.
- Akacha N.B. et Gargouri M.** (2009). Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide-lyase from olive leaves and alcohol-dehydrogenase from yeast in liquid/gas reactor. *Process Biochemistry*, 44, 1122-1127.
- Akacha N.B., Karboune S., Gargouri M. et Kermasha S.** (2010). Activation and stabilization of the hydroperoxide lyase enzymatic extract from mint leaves (*Mentha spicata*) using selected chemical additives. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 160, 901-911.
- Andre E. et Hou K.-W.** (1932). Présence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja. *Comptes rendus de l'académie des sciences (Paris)*, 194, 645-647.
- Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposito S. et Montedoro G.** (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054, 17-31.
- Arakawa T. et Timasheff S.N.** (1982). Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, 21, 6545-6552.
- Arimura G.-I., Ozawa R., Horiuchi J.-I., Nishioka T. et Takabayashi J.** (2001). Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 1049-1061.
- Arimura G.-I., Shiojiri K. et Karban R.** (2010). Acquired immunity to herbivory and allelopathy caused by airborne plant emissions. *Phytochemistry*, 71, 1642-1649.
- Arimura G., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Boland W. et Takabayashi J.** (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 406, 512-515.
- Atwal A.S., Bisakowski B., Richard S., Robert N. et Lee B.** (2005). Cloning and secretion of tomato hydroperoxide lyase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 40, 95-102.
- Baldwin I.T.** (2010). Plant volatiles. *Current Biology*, 20, R392-R397.
- Bate N.J. et Rothstein S.J.** (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal*, 16, 561-569.
- Bate N.J., Sivasankar S., Moxon C., Riley J.M., Thompson J.E. et Rothstein S.J.** (1998). Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology*, 117, 1393-1400.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N. et Bourne P.E.** (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242.

- Bhattacharya A., Tejero R. et Montelione G.T.** (2007). Evaluating protein structures determined by structural genomics consortia. *Proteins*, 66, 778-795.
- Blee E. et Joyard J.** (1996). Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiology*, 110, 445-454.
- Blee E.** (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research*, 37, 33-72.
- Blee E.** (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, 7, 315-322.
- Bourel G., Nicaud J.-M., Nthangeni B., Santiago-Gomez P., Belin J.-M. et Husson F.** (2004). Fatty acid hydroperoxide lyase of green bell pepper: cloning in *Yarrowia lipolytica* and biogenesis of volatile aldehydes. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 293-299.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brake A.J., Merryweather J.P., Coit D.G., Heberlein U.A., Masiarz F.R., Mullenbach G.T., Urdea M.S., Valenzuela P. et Barr P.J.** (1984). Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 81, 4642-4646.
- Brash A.R.** (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 23679-23682.
- Brash A.R.** (2009). Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*, 70, 1522-1531.
- Brodsky J.L.** (1998). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *International Review of Cytology*, 178, 277-328.
- Buchhaupt M., Guder J.C., Etschmann M.M.W. et Schrader J.** (2012). Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 159-168.
- Cao E., Chen Y., Cui Z. et Foster P.R.** (2003). Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 684-690.
- Cereghino J.L. et Cregg J.M.** (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24, 45-66.

- Chang B.S., Kendrick B.S. et Carpenter J.F.** (1996). Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1325-1330.
- Chehab E.W., Kaspi R., Savchenko T., Rowe H., Negre-Zakharov F., Kliebenstein D. et Dehesh K.** (2008). Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *Public Library of Science ONE*, 3, e1904.
- Chen V.B., Arendall W.B., Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S. et Richardson D.C.** (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66, 12-21.
- Clare J.J., Romanes M.A., Rayment F.B., Rowedder J.E., Smith M.A., Payne M.M., Sreekrishna K. et Henwood C.A.** (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 105, 205-212.
- Collins K.D.** (2004). Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, 34, 300-311.
- Corpet F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16, 10881-10890.
- Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y. et Madden K.R.** (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 3376-3385.
- Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J. et Higgins D.R.** (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology*, 16, 23-52.
- Croft K., Juttner F. et Slusarenko A.J.** (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology*, 101, 13-24.
- D'auria J.C., Pichersky E., Schaub A., Hansel A. et Gershenzon J.** (2007). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 49, 194-207.
- Damasceno L.M., Huang C., Jr. et Batt C.A.** (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 31-39.
- De Domenico S., Tsesmetzis N., Di Sansebastiano G.P., Hughes R.K., Casey R. et Santino A.** (2007). Subcellular localisation of *Medicago truncatula* 9/13-hydroperoxide lyase

reveals a new localisation pattern and activation mechanism for CYP74C enzymes. *BMC Plant Biology*, 7, 58-70.

Delano W.L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. (DeLano Scientific).

Delcarte J., Fauconnier M.-L., Hoyaux P., Jacques P., Thonart P. et Marlier M. (2000). Revue bibliographique : L'hydroperoxyde lyase. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 4, 157-167.

Dundas J., Ouyang Z., Tseng J., Binkowski A., Turpaz Y. et Liang J. (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*, 34, W116-118.

Duong-Ly K.C. et Gabelli S.B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 85-94.

Engelberth J., Alborn H.T., Schmelz E.A. et Tumlinson J.H. (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 101, 1781-1785.

Engh R.A. et Huber R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 47, 392-400.

Fammartino A., Cardinale F., Göbel C., Mène-Saffrané L., Fournier J., Feussner I. et Esquerré-Tugayé M.-T. (2007). Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco. *Plant Physiology*, 143, 378-388.

Fauconnier M.-L. et Marlier M. (1997a). Les lipoxygénases du soja. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 1, 125-141.

Fauconnier M.-L. et Marlier M. (1997b). Fatty acid hydroperoxides pathway in plants. A review. *Grasas y Aceites*, 48, 30-37.

Fauconnier M.L., Perez A.G., Sanz C. et Marlier M. (1997). Purification and characterization of tomato leaf (*Lycopersicon esculentum* mill.) hydroperoxide lyase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4232-4236.

Feussner I., Hause B., Vörös K., Parthier B. et Wasternack C. (1995a). Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. Salome). *The Plant Journal*, 7, 949-957.

Feussner I., Wasternack C., Kindl H. et Kühn H. (1995b). Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 11849-11853.

- Feussner I. et Wasternack C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275-297.
- Froehlich J.E., Itoh A. et Howe G.A.** (2001). Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology*, 125, 306-317.
- Fukushige H. et Hildebrand D.F.** (2005). Watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase greatly increases C6 aldehyde formation in transgenic leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2046-2051.
- Fuller M.A., Weichert H., Fischer A.M., Feussner I. et Grimes H.D.** (2001). Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388, 146-154.
- Gardner H.W.** (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1084, 221-239.
- Gardner H.W., Weisleder D. et Plattner R.D.** (1991). Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine max.* *Plant Physiology*, 97, 1059-1072.
- Gargouri M., Drouet P. et Legoy M.D.** (2004). Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves. Volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids. *Journal of Biotechnology*, 111, 59-65.
- Gargouri M. et Akacha N.B.** (2008). Voie de la lipoxygénase : valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*.
- Gianfreda L. et Scarfi M.R.** (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 100, 97-128.
- Gigot C., Ongena M., Fauconnier M.-L., Wathelet J.-P., Du Jardin P. et Thonart P.** (2010). The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnology Agronomy and Society and Environment*, 14, 451-460.
- Gigot C.** (2011). Développement d'un procédé biotechnologique de production de molécules à note verte à partir de feuilles de betteraves Thèse de Doctorat, Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech.
- Gigot C., Ongena M., Fauconnier M.-L., Muhovski Y., Wathelet J.-P., Du Jardin P. et Thonart P.** (2012). Optimization and scaling up of a biotechnological synthesis of natural green leaf volatiles using *Beta vulgaris* hydroperoxide lyase. *Process Biochemistry*, 47, 2547-2551.

- Gomi K., Yamasaki Y., Yamamoto H. et Akimitsu K.** (2003). Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in Citrus. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1219-1231.
- Gotoh O.** (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 83-90.
- Grechkin A.N.** (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research*, 37, 317-352.
- Grechkin A.N.** (2002). Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, 457-470.
- Grechkin A.N., Mukhtarova L.S. et Hamberg M.** (2003). Detection of an enol intermediate in the hydroperoxide lyase chain cleavage reaction. *FEBS Letters*, 549, 31-34.
- Grechkin A.N. et Hamberg M.** (2004). The "heterolytic hydroperoxide lyase" is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1636, 47-58.
- Grechkin A.N., Bruhlmann F., Mukhtarova L.S., Gogolev Y.V. et Hamberg M.** (2006). Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 1419-1428.
- Griffiths G.** (2015). Biosynthesis and analysis of plant oxylipins. *Free Radical Research*, 49, 565-582.
- Hall C.E., Karboune S., Florence H. et Kermasha S.** (2008). Stabilization of an enzymatic extract from *Penicillium camemberti* containing lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities. *Process Biochemistry*, 43, 258-264.
- Hanafusa N.** (1972). Denaturation of enzyme protein by freezing-thawing and freeze-drying of myosin and some other muscle proteins, Institute of low temperature science Hokkaido University. 1-20.
- Hassan M.N., Zainal Z. et Ismail I.** (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 727-739.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Sekiya J., Imoto M. et Inouye S.** (1982). Participation and properties of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in volatile C6-aldehyde formation from C18-Unsaturated. Fatty acids in isolated tea chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 23, 91-99.
- Hatanaka A., Kajiwara T. et Sekiya J.** (1986). Fatty Acid Hydroperoxide Lyase in Plant Tissues. *Biogenesis of Aromas*, American Chemical Society. 317, 167-175.

- Hatanaka A., Kajiwara T. et Sekiya J.** (1987). Biosynthetic pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44, 341-361.
- Hatanaka A., Kajiwara T. et Matsui K.** (1988). Concentration of hydroperoxide lyase activities in root of cucumber seedling. *Zeitschrift für Naturforschung*, 43c, 308-310.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Matsui K. et Toyota H.** (1992). Substrate specificity of tea leaf hydroperoxide lyase. *Zeitschrift für Naturforschung*, 47c, 379-677.
- Hatanaka A.** (1993). The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 34, 1201-1218.
- Hornostaj A.R. et Robinson D.S.** (2000). Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds. *Food Chemistry*, 71, 241-247.
- Hosfield T. et Lu Q.** (1999). Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)4Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. *Analytical Biochemistry*, 269, 10-16.
- Howe G.A., Lee G.I., Itoh A., Li L. et Derocher A.E.** (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiology*, 123, 711-724.
- Howe G.A. et Schillmiller A.L.** (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 230-236.
- Huang F.-C., Studart-Witkowski C. et Schwab W.** (2010). Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana benthamiana* using a viral vector system. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 783-795.
- Huang F.C. et Schwab W.** (2011). Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. *BMC Biotechnology*, 11, 30-44.
- Hughes R.K., Yousafzai F.K., Ashton R., Chechetkin I.R., Fairhurst S.A., Hamberg M. et Casey R.** (2008). Evidence for communality in the primary determinants of CYP74 catalysis and of structural similarities between CYP74 and classical mammalian P450 enzymes. *Proteins*, 72, 1199-1211.
- Hughes R.K., De Domenico S. et Santino A.** (2009). Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *ChemBioChem*, 10, 1122-1133.
- Husson F. et Belin J.M.** (2002). Purification of hydroperoxide lyase from green bell pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits for the generation of C6-aldehydes in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1991-1995.

- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I. et Okada K.** (2001). The defective in anther dehiscence1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13, 2191-2210.
- Itoh A. et Vick B.A.** (1999). The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1436, 531-540.
- Itoh A., Schillmiller A.L., Mccaig B.C. et Howe G.A.** (2002). Identification of a jasmonate-regulated allene oxide synthase that metabolizes 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 46051-46058.
- Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'donnell V., Kuhn H. et Walther M.** (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 503, 161-174.
- Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini De Caraffa V., Gambotti C., Vincenti S., Desjobert J.-M., Muselli A., Costa J., Berti L. et Maury J.** (2016). Olive recombinant hydroperoxide lyase, an efficient biocatalyst for synthesis of green leaf volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179, 671-683.
- Kajiwara T., Sekiya J., Asano M. et Hatanaka A.** (1982). Enantioselectivity of enzymatic cleavage reaction of 13-hydroperoxylinolenic acid to C6-aldehyde and C12-oxo acid in tea chloroplasts. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 3087-3088.
- Kelle S., Zelena K., Krings U., Linke D. et Berger R.G.** (2014). Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 95, 233-239.
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N. et Sternberg M.J.E.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10, 845-858.
- Kemal C., Louis-Flamberg P., Krupinski-Olsen R. et Shorter A.L.** (1987). Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry*, 26, 7064-7072.
- Kim I.S. et Grosch W.** (1981). Partial purification and properties of a hydroperoxide lyase from fruits of pear. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1220-1225.
- Kishimoto K., Matsui K., Ozawa R. et Takabayashi J.** (2008). Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in Arabidopsis against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 69, 2127-2132.
- Koeduka T., Stumpe M., Matsui K., Kajiwara T. et Feussner I.** (2003). Kinetics of barley FA hydroperoxide lyase are modulated by salts and detergents. *Lipids*, 38, 1167-1172.

- Kolhe P., Amend E. et Singh S.K.** (2010). Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. *Biotechnology Progress*, 26, 727-733.
- Krieger E., Joo K., Lee J., Lee J., Raman S., Thompson J., Tyka M., Baker D. et Karplus K.** (2009). Improving physical realism, stereochemistry and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*, 77, 114-122.
- Krieger E. et Vriend G.** (2014). YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30, 2981-2982.
- Kubo A., Lunde C.S. et Kubo I.** (1995). Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1629-1633.
- Kubo I., Fujita K., Kubo A., Nihei K. et Lunde C.S.** (2003). Modes of antifungal action of (2E)-alkenals against *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3951-3957.
- Kuroda H., Oshima T., Kaneda H. et Takashio M.** (2005). Identification and functional analyses of two cDNAs that encode fatty acid 9-/13-hydroperoxide lyase (CYP74C) in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 1545-1554.
- Lanciotti R., Gianotti A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E. et Gardini F.** (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 201-208.
- Lee D.S., Nioche P., Hamberg M. et Raman C.S.** (2008). Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature*, 455, 363-368.
- Li L., Chang Z., Pan Z., Fu Z.Q. et Wang X.** (2008). Modes of heme binding and substrate access for cytochrome P450 CYP74A revealed by crystal structures of allene oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 105, 13883-13888.
- Li Y. et Zhang Y.** (2009). REMO: A new protocol to refine full atomic protein models from C-alpha traces by optimizing hydrogen-bonding networks. *Proteins*, 76, 665-676.
- Liavonchanka A. et Feussner I.** (2006). Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, 163, 348-357.
- Lin-Cereghino G.P., Stark C.M., Kim D., Chang J., Shaheen N., Poerwanto H., Agari K., Moua P., Low L.K., Tran N., Huang A.D., Nattestad M., Oshiro K.T., Chang J.W., Chavan A., Tsai J.W. et Lin-Cereghino J.** (2013). The effect of alpha-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 519, 311-317.

- Lindahl E., Azuara C., Koehl P. et Delarue M.** (2006). NOMAD-Ref: visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. *Nucleic Acids Research*, 34, W52-56.
- Long Z., Kong X., Zhang C. et Hua Y.** (2010a). Stability of hydroperoxide lyase activity from *Amaranthus tricolor* (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves: influence of selected additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 729-734.
- Long Z., Kong X., Zhang C., Jiang B. et Hua Y.** (2010b). Purification and characterization of hydroperoxide lyase from amaranth tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 231, 865-871.
- Löoke M., Kristjuhan K. et Kristjuhan A.** (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for pcr-based applications. *BioTechniques*, 50, 325-328.
- Márczy J.S., Németh Á.S., Samu Z., Háger-Veress Á. et Szajáni B.** (2002). Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxide lyase enzymes. *Biotechnology Letters*, 24, 1673-1675.
- Martini D. et Iacazio G.** (1995). Les lipoxygénases et les voies métaboliques associées : Lipochimie : présence et prospective. Journées Chevreul 1995 : oléagineux et corps gras du futur. 5, 374-385.
- Matoba T., Hidaka H., Kitamura K., Kaizuma N. et Kito M.** (1985). Contribution of hydroperoxide lyase activity to n-hexanal formation in soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 856-858.
- Matsui K., Shibata Y., Kajiwara T. et Hatanaka A.** (1989). Separation of 13- and 9-hydroperoxide lyase activities in cotyledons of cucumber seedling. *Zeitschrift für Naturforschung*, 44 883 - 885
- Matsui K., Toyota H., Kajiwara T., Kakuno T. et Hatanaka A.** (1991). Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves. *Phytochemistry*, 30, 2109-2113.
- Matsui K., Kajiwara T. et Hatanaka A.** (1992). Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 175-178.
- Matsui K., Shibutani M., Hase T. et Kajiwara T.** (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Letters*, 394, 21-24.
- Matsui K., Kurishita S., Hisamitsu A. et Kajiwara T.** (2000a). A lipid-hydrolysing activity involved in hexenal formation. *Biochemical Society Transactions*, 28, 857-860.

- Matsui K., Miyahara C., Wilkinson J., Hiatt B., Knauf V. et Kajiwara T.** (2000b). Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 1189-1196.
- Matsui K., Ujita C., Fujimoto S., Wilkinson J., Hiatt B., Knauf V., Kajiwara T. et Feussner I.** (2000c). Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber. *FEBS Letters*, 481, 183-188.
- Matsui K.** (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 274-280.
- Matsui K., Minami A., Hornung E., Shibata H., Kishimoto K., Ahnert V., Kindl H., Kajiwara T. et Feussner I.** (2006). Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, 67, 649-657.
- Matsui K., Sugimoto K., Mano J.I., Ozawa R. et Takabayashi J.** (2012). Differential metabolisms of Green Leaf Volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements. *Public Library of Science ONE*, 7, e36433.
- Maucher H., Hause B., Feussner I., Ziegler J.R. et Wasternack C.** (2000). Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *The Plant Journal*, 21, 199-213.
- Miller B.T., Singh R.P., Klauda J.B., Hodoscek M., Brooks B.R. et Woodcock H.L.** (2008). CHARMMing: a new, flexible web portal for CHARMM. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48, 1920-1929.
- Minor W., Steczko J., Bolin J.T., Otwinowski Z. et Axelrod B.** (1993). Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemistry*, 32, 6320-6323.
- Mita G., Quarta A., Fasano P., De Paolis A., Di Sansebastiano G.P., Perrotta C., Iannaccone R., Belfield E., Hughes R., Tsesmetzis N., Casey R. et Santino A.** (2005). Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2321-2333.
- Mosblech A., Feussner I. et Heilmann I.** (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 511-517.
- Mu W., Xue Q., Jiang B. et Hua Y.** (2012). Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of *Solanum tuberosum* hydroperoxide lyase. *European Food Research and Technology*, 234, 723-731.

Muller B., Gautier A., Dean C. et Kuhn J.C. (1995). Process for the enzymatic preparation of aliphatic alcohols and aldehydes from linoleic acid, linoleic acid, or a natural precursor, Firmenich S.A.

Mwenda C.M. et Matsui K. (2014). The importance of lipoxygenase control in the production of green leaf volatiles by lipase-dependent and independent pathways. *Plant Biotechnology*, 31, 445-452.

Nakamura S. et Hatanaka A. (2002). Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both gram-negative and gram-positive bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7639-7644.

Nakashima A., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Sugimoto K., Takabayashi J. et Matsui K. (2011). Monogalactosyl diacylglycerol is a substrate for lipoxygenase: its implications for oxylipin formation directly from lipids. *Journal of Plant Interactions*, 6, 93-97.

Nakashima A., Von Reuss S.H., Tasaka H., Nomura M., Mochizuki S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Boland W., Takabayashi J. et Matsui K. (2013). Traumatins- and dinortraumatins-containing galactolipids in Arabidopsis: their formation in tissue-disrupted leaves as counterparts of green leaf volatiles. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 26078-26088.

Nemeth A.S., Marczy J.S., Samu Z., Hager-Veress A. et Szajani B. (2004). Biocatalytic production of 2(E)-hexenal from hydrolysed linseed oil. *Enzyme and microbial technology*, 34, 667-672

Noordermeer M.A., Veldink G.A. et Vliegthart J.F. (1999). Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase. *FEBS Letters*, 443, 201-204.

Noordermeer M.A., Van Dijken A.J., Smeekens S.C., Veldink G.A. et Vliegthart J.F. (2000). Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2473-2482.

Noordermeer M.A., Veldink G.A. et Vliegthart J.F. (2001a). Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome p450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem*, 2, 494-504.

Noordermeer M.A., Veldink G.A. et Vliegthart J.F. (2001b). Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation. *FEBS Letters*, 489, 229-232.

Noordermeer M.A., Van Der Goot W., Van Kooij A.J., Veldink J.W., Veldink G.A. et Vliegthart J.F. (2002). Development of a biocatalytic process for the production of c6-

aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4270-4274.

Novoa E.M. et Ribas De Pouplana L. (2012). Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends in genetics: TIG*, 28, 574-581.

Nugent T. et Jones D.T. (2013). Membrane protein orientation and refinement using a knowledge-based statistical potential. *BMC Bioinformatics*, 14, 276.

Olias J.M., Rios J.J., Valle M., Zamora R., Sanz L.C. et Axelrod B. (1990). Fatty acid hydroperoxide lyase in germinating soybean seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 624-630.

Padilla M.N., Hernandez M.L., Perez A.G., Sanz C. et Martinez-Rivas J.M. (2010). Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 5649-5657.

Palmieri-Thiers C., Canaan S.P., Brunini V., Lorenzi V., Tomi F.L., Desseyn J.-L., Garscha U., Oliw E.H., Berti L. et Maury J. (2009). A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 339-346.

Panagakou I., Touloupakis E. et Ghanotakis D.F. (2013). Structural characterization of hydroperoxide lyase in dodecyl maltoside by using circular dichroism. *Protein J*, 32, 1-6.

Perez A.G., Sanz C., Olias R. et Olias J.M. (1999). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 249-253.

Peterson J.A. et Graham S.E. (1998). A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure*, 6, 1079-1085.

Pikal-Cleland K.A., Rodríguez-Hornedo N., Amidon G.L. et Carpenter J.F. (2000). Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric beta-galactosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384, 398-406.

Plotkin J.B. et Kudla G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews. Genetics*, 12, 32-42.

Porta H. et Rocha-Sosa M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130, 15-21.

Psylinakis E., Davoras E.M., Ioannidis N., Trikeriotis M., Petrouleas V. et Ghanotakis D.F. (2001). Isolation and spectroscopic characterization of a recombinant bell pepper hydroperoxide lyase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1533, 119-127.

- Rabetafika H.N., Gigot C., Fauconnier M.-L., Ongena M., Destain J., Du Jardin P., Wathelet J.-P. et Thonart P.** (2008). Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnology Letters*, 30, 1115-1119.
- Robert X. et Gouet P.** (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42, W320-324.
- Romanos M.A., Scorer C.A. et Clare J.J.** (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8, 423-488.
- Roy A., Kucukural A. et Zhang Y.** (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 725-738.
- Royo J., Vancanneyt G., Pérez A.G., Sanz C., Störmann K., Rosahl S. et Sánchez-Serrano J.J.** (1996). Characterization of Three Potato Lipoxygenases with Distinct Enzymatic Activities and Different Organ-specific and Wound-regulated Expression Patterns. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 21012-21019.
- Ruckenstein E. et Shulgin I.L.** (2006). Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126, 97-103.
- Salas J.Ì.N.J. et Sanchez J.** (1999). Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Science*, 143, 19-26.
- Santiago-Gomez M.P., Kermasha S., Nicaud J.-M., Belin J.-M. et Husson F.** (2008). Secondary structure conformation of hydroperoxide lyase from green bell pepper, cloned in *Yarrowia lipolytica*, and its activity in selected media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52–53, 128-132.
- Santiago-Gomez M.P., Thanh H.T., De Coninck J.L., Cachon R.M., Kermasha S.L., Belin J.-M., Gervais P. et Husson F.** (2009). Modeling hexanal production in oxido-reducing conditions by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 44, 1013-1018.
- Santiago-Gomez M.P., Kermasha S., Nicaud J.-M., Belin J.-M. et Husson F.** (2010). Predicted secondary structure of hydroperoxide lyase from green bell pepper cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65, 63-67.
- Schrader J., Etschmann M.M.W., Sell D., Hilmer J.M. et Rabenhorst J.** (2004). Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters*, 26, 463-472.

- Schreier P. et Lorenz G.** (1982). Separation, partial purification and characterization of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato Fruits. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 37, 165-173.
- Schwab W.** (2000). Biosynthesis of Plant Flavors: Analysis and Biotechnological Approach. *Flavor Chemistry*, American Chemical Society. 756, 72-86.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R. et Lewinsohn E.** (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant Journal*, 54, 712-732.
- Scorer C.A., Buckholz R.G., Clare J.J. et Romanes M.A.** (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 136, 111-119.
- Sharp P.M. et Li W.H.** (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*, 15, 1281-1295.
- Shibata Y., Matsui K., Kajiwara T. et Hatanaka A.** (1995). Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207, 438-443.
- Siedow J.N.** (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 145-188.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D. et Higgins D.G.** (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539.
- Singh S.K., Kolhe P., Wang W. et Nema S.** (2009). Large-scale freezing of biologics. *BioProcess International*, 7, 32-44.
- Sinha J., Plantz B.A., Inan M. et Meagher M.M.** (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 102-112.
- Stelmach B.A., Müller A., Hennig P., Gebhardt S., Schubert-Zsilavec M. et Weiler E.W.** (2001). A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 12832-12838.
- Stothard P.** (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28, 1102-1104.

- Stumpe M., Kandzia R., Göbel C., Rosahl S. et Feussner I.** (2001). A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells¹. *FEBS Letters*, 507, 371-376.
- Stumpe M. et Feussner I.** (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5, 347-357.
- Suurmeijer C.N., Perez-Gilabert M., Van Unen D.J., Van Der Hijden H.T., Veldink G.A. et Vliegthart J.F.** (2000). Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase. *Phytochemistry*, 53, 177-185.
- Tijet N., Wäspi U., Gaskin D.J., Hunziker P., Muller B.L., Vulfson E.N., Slusarenko A., Brash A.R. et Whitehead I.M.** (2000). Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*). *Lipids*, 35, 709-720.
- Tijet N., Schneider C., Muller B.L. et Brash A.R.** (2001). Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386, 281-289.
- Toporkova Y.Y., Gogolev Y.V., Mukhtarova L.S. et Grechkin A.N.** (2008). Determinants governing the CYP74 catalysis: conversion of allene oxide synthase into hydroperoxide lyase by site-directed mutagenesis. *FEBS Letters*, 582, 3423-3428.
- Toporkova Y.Y., Ermilova V.S., Gorina S.S., Mukhtarova L.S., Osipova E.V., Gogolev Y.V. et Grechkin A.N.** (2013). Structure-function relationship in the CYP74 family: conversion of divinyl ether synthases into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *FEBS Letters*, 587, 2552-2558.
- Tressl R. et Drawert F.** (1973). Biogenesis of banana volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 560-565.
- Vagenende V., Yap M.G.S. et Trout B.L.** (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48, 11084-11096.
- Vick B.A. et Zimmerman D.C.** (1976). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiology*, 57, 780-788.
- Vick B.A. et Zimmerman D.C.** (1981). Lipoxygenase, hydroperoxide isomerase, and hydroperoxide cyclase in young cotton seedlings 1. *Plant Physiology*, 67, 92-97.
- Vick B.A. et Zimmerman D.C.** (1987). Pathways of Fatty Acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiology*, 85, 1073-1078.
- Vick B.A.** (1991). A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids*, 26, 315-320.

- Vliegthart J.F.G. et Veldink G.A.** (1991). Substrates and products of lipoxygenase catalysis. *Studies in Natural Products Chemistry*, 9, 559-589.
- Wan X.-H., Chen S.-X., Wang C.-Y., Zhang R.-R., Cheng S.-Q., Meng H.-W. et Shen X.-Q.** (2013). Isolation, expression, and characterization of a hydroperoxide lyase gene from cucumber. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 22082-22101.
- Wasternack C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100, 681-697.
- Wasternack C. et Hause B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111, 1021-1058.
- Wu D., Yu X.W., Wang T.C., Wang R. et Xu Y.** (2011). High yield *Rhizopus chinensis* prolipase production in *Pichia pastoris*: Impact of methanol concentration. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16, 305-311.
- Wu S., Skolnick J. et Zhang Y.** (2007). Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC Biology*, 5, 17.
- Xu D. et Zhang Y.** (2011). Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization. *Biophysical Journal*, 101, 2525-2534.
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J. et Zhang Y.** (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12, 7-8.
- Yang S., Kuang Y., Li H., Liu Y., Hui X., Li P., Jiang Z., Zhou Y., Wang Y., Xu A., Li S., Liu P. et Wu D.** (2013). Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. *Public Library of Science ONE*, 8, e75347.
- Yang Z., Liu X.-J., Chen C. et Halling P.J.** (2010). Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 821-828.
- Yoeun S., Sukhanov A. et Han O.** (2016). Separation of enzymatic functions and variation of spin state of rice allene oxide synthase-1 by mutation of Phe-92 and Pro-430. *Bioorganic Chemistry*, 68, 9-14.
- Zhang Y. et Skolnick J.** (2005). TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Research*, 33, 2302-2309.
- Zhang Y.** (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40.

Zhu B.-Q., Xu X.-Q., Wu Y.-W., Duan C.-Q. et Pan Q.-H. (2012). Isolation and characterization of two hydroperoxide lyase genes from grape berries : HPL isogenes in *Vitis vinifera* grapes. *Molecular biology reports*, 39, 7443-7455.

Zimmerman D.C. et Coudron C.A. (1979). Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-Oxo-trans-10-dodecenoic acid. *Plant Physiology*, 63, 536-541.

Annexes

```

1  ATGACGGGTTGCGCCCTCCGTGACTCCATTGTGCGCCTCCATCGCCATCGCCACCTTCCCCGTCGTCTCTGCCCCCTCCGCGCCATTCCCTGGAGGCTACGGGT
   M T G S P S V T P L S P P S P S P P S S L P L R A I P G G Y G
101 GGCCGGTGGTGGGTCCAATCATCGACAGATTGAATTATTTTGGTTTCAGGGTCCTCCGACTTTCTTCAAGAGAGAAATGGAAAAGTATAAGAGTACAGT
   W P V V G P I I D R L N Y F W F Q G P T F F K K R M E K Y K S T V
201 TTTCAGAACAAATGTGCGCTCCAACATTCCCTTGGTTTTTAGGGCTTAATCCTAATGTAATTGCTGTTCTTGATGTCAAGTCAATTTCTCATCTCTTTGAT
   F R T N V P P T F P W F L G V N P N V I A V L D V K S F S H L F D
301 ATGGAATTTGTTGAAAAGGCAAAACGTGCTCGTCGGAGATTTTCATGCCAGTGTAAATATACAGGGGATTTTCGTGTTTGTGCATATCTCGATACTTCAG
   M E I V E K A N V L V G D F M P S V K Y T G D F R V C A Y L D T S
401 AGGCTAAACATACTCAAAATTAAGAAGCTTTTCACTCGATATCTTGAAACGAGCTCGACCATTGGGTACCGTCACTCATAAGTTCAGTACTAGACTCCATGTG
   E A K H T Q I K N F S L D I L K R S S T I W V P S L I S S L D S M W
501 GGACAAAATTGACGCTGACGTTGCCAACTCCGGCTCAGCCAGTTCTTCTCCCTCCCATGCGAGCAATTCCTTTTAGGTTCTTACTCGCTGCATTTGTCGGA
   D K I D A D V A N S G S A S S F L P M Q Q F L F R F L T R C I V G
601 GCAGACCCCTCGACTTCGCGCTGAGATCGCCAGCTCTGCCCATTATTTGCTCGACAAGTGGCTCGGTATTTCAGATCCTGCCGACTGTCACATCGGCATTTC
   A D P S T S P E I A S S G H I M L D K W L G I Q I L P T V N I G I
701 TACAACCCCTCGAAGAAGCTCTTCCCTCCATCTTTCTCATACCCCTTTCTGGCTTGTAAAGGAGACTACAACAAGCTGGTGCAGTTTGTGGAAAAAAGAGG
   L Q P L E E L F L H S F S Y P F W L V K G D Y N K L V Q F V E K E G
801 CAAAGAAGTTATACAAAGAGCTCAACTGAATTCATCTGACTGAACAAGAAGCAATTCACATCTTCTTTTCATCTTAGGATTCATGCATTTGGTGGG
   K E V I Q R A Q T E F N L T E Q E A I H N L L F I L G F N A F G G
901 TTTACGATATCTTTCTGGCGCTCTTGAGTGCAGATCGGGGATCAGAAAAGTACTGGGCTACACGAAAACCTCCGGGATGAAGTAAGCAAAAATCTGGTT
   F T I F F L A L L S A I G D Q K S T G L H E K L R D E V R Q K S G
1001 CCAATTCAAATACTCTCAGTTTCGAAAGTGTAAAGGATATGGAATTAGTACAATCATTTGCTACGAAACTCTTCGATGAAACCCCGAGTCCATCGCA
   S N S N T L S F E S V K D M E L V Q S F V Y E T L R L N P P V P S Q
1101 ATTGCCCCGAGCTAGAAAAGGATTTCAAGCTGACCTCGCATGATGCTGTTTACGAAATCAAGAAAAGGAGAGCTTCTCTGTTGGGATCAGCCATTGGTGAIG
   F A R A R K D F K L T S H D A V Y E I K K G E L L C G Y Q P L V M
1201 AAAGATGCCAAAGTCTTCGAGAGAGTCCCTGAGACATTTTATACGACAGATTTACAAGAGAGAAAGGCGGGACAGAGTTGCTGAATTAATCTATACTGGT
   K D A K V F E E S P E T F L Y D R F T R E K G G T E L L N Y L Y W
1301 CAAACGGGCCCAAACTGGATCGGCCACGGCAGCCAACAAGCAGTGTGCAGCTAAAGAGATTGTGCCCTTAAGTGCAGCGTTATTGTGGCTTATTTGTT
   S N G P Q T G S A T A A N K Q C A A K E I V P L T A A L F V A Y L F
1401 TCAGAGATATGATGACATTACAAATTTCTTCTGGTTCAATCACTGCAGTTGAGAAGTCCAAAGTGA
   Q R Y D D I T I S S G S I T A V E K S K *

```

Figure A : Séquence nucléotidique et peptidique de l'HPL d'olive de la variété Leccino.
 Le début et la fin du cadre de lecture correspondant à l'HPL d'olive sauvage (HPLwt) sont représentés respectivement par les codons ATG et TGA. La séquence correspondant au peptide de transit chloroplastique, à l'extrémité N-terminale de l'enzyme est soulignée en rouge. L'HPL dépourvue de ce peptide est appelée HPLdel.

```

1   ATGACAGGTTCCCATCCGTTACCCATTGAGTCTCCTTCCCATCACACCTTCCCATCTTCCCTTGCCTCTTAGAGCTATTCCAGGTGGATACGGTT
   M T G S P S V T P L S P P S P S P S P S S L P L R A I P G G Y G
101  GGCCAGTTGTCGGACCTATCATCGATAGATTGAACTACTTCTGTTCCAAAGGTCCACCTACATTTTTCAAGAAAAGAAATGGAAAAGTACAAGTCTACTGT
   W P V V G P I I D R L N Y F W F Q G P P T F F K K R M E K Y K S T V
201  CTTTAGAACAAACGTTCCACCTACCTTCCCATGGTTTTTGGGAGTTAACCCCTAATGTTATGCTGTCTTGGATGTTAAGTCTTTTTCTCATCTTTTCGAC
   F R T N V P P T F P W F L G V N P N V I A V L D V K S F S H L F D
301  ATGGAAATCGTTGAGAAAGCCACGTTTTGGTCCGGAGATTTTCATGCCCTTCTGTCAAGTACACTGGAGATTTTAGAGTTTGTGCTTATTTGGACACTTCAG
   M E I V E K A N V L V G D F M P S V K Y T G D F R V C A Y L D T S
401  AGGCCAAGCACACAAATTAATAATTTCTCCTTTGGACATCCTTAAAGATCAAGTACAATTTGGGTCCCAAGTTTGATCTCTTCCCTTGATTCTATGTG
   E A K H T Q I K N F S L D I L K R S S T I W V P S L I S S L D S M W
501  GGACAAGATTGATGAGAGCGTTGCTAACTCTGGTCCGCTTCGCTCTTTTGCCTATGCAACAGTTCTTGTTCAGATTTCTTACAAGATGCATCGTTGGA
   D K I D A D V A N S G S A S S F L P M Q Q F L F R F L T R C I V G
601  GCAGATCCATCAACAGTCCCTGAAATGCTTCTTCCGGTCATATCATGTTGGACAAATGGCTTGGTATTCAAATCTTGCCAAGTGTAAATATTGGTATCT
   A D P S T S P E I A S S G H I M L D K W L G I Q I L P T V N I G I
701  TGCAGCCTCTTGAGAGTTGTTTCTTCACTCTTCTCCTACCCATTTTGGTTGGTTAAGGGAGATTACAACAACTTGCCAATTCGTTGAAAAGGAGGG
   L Q P L E E L F L H S F S Y P F W L V K G D Y N K L V Q F V E K E G
801  AAAAGAAGTTATTCAAAGAGCCAGACAGAATTCATTTGACCGAACAGGAGGCAATCCATAACTTGCTTTTTATCTTGGGTTTCAATGCTTTTGGTGGG
   K E V I Q R A Q T E F N L T E Q E A I H N L L F I L G F N A F G G
901  TTCACTATTTCTTTTTGGCCTTGCTTTCCGCAATCGGAGATCAAAAGTCAACAGGATTGCACGAAAACTTAGAGACGAGGTCAGACAGAAATCAGGTA
   F T I F F L A L L S A I G D Q K S T G L H E K L R D E V R Q K S G
1001 GTAACCTAATACCTTGTCTTCGAATCAGTTAAGGATATGGAGCTTGTCCAATCTTTCGTTTACGAAACTTTGAGACTTAATCCACCTGTTCCCTCCCA
   S N S N T L S F E S V K D M E L V Q S F V Y E T L R L N P P V P S Q
1101 GTTCGCTAGAGCCGAAAGGATTTTAAATGACTTCACATGACGCGAGTTTACGAAATTAAGAAAGGAGAGTTGCTTTGTGGATATCAACCATTGGTCATG
   F A R A R K D F K L T S H D A V Y E I K K G E L L C G Y Q P L V M
1201 AAGGATGCCAAAGTTTTTGAAGAGTCTCCTGAACTTCTTGTACGACAGATTCACTAGAGAAAAGGGTGAAGTACTGCTTAACTACTTGTATTGGA
   K D A K V F E E S P E T F L Y D R F T R E K G G T E L L N Y L Y W
1301 GTAATGGTCCCAAAACCGGATCCGCTACTGCTGCCAACAGCAGTGCAGCTAAAGAGATTGTCCCTTTGACTGCCGCACTTTTCGTTGCTTATTTGTT
   S N G P Q T G S A T A A N K Q C A A K E I V P L T A A L F V A Y L F
1401 TCAAAGATACGATGACATTACAATCAGTTCAGTTCCATTACAGCAGTTGAGAAGTCCAAATAA
   Q R Y D D I T I S S G S I T A V E K S K *

```

Figure B : Séquence nucléotidique et peptidique de l'HPL d'olive de la variété Leccino, après optimisation pour l'expression chez la levure *Pichia pastoris*.

Lors de l'optimisation, les codons de l'HPL wt ont été remplacés par des codons préférentiellement lus par *Pichia pastoris*. La séquence peptidique, quant à elle, est inchangée. L'enzyme est notée HPLopt.

```

1   ATGAATTCGTCCCTCTATCAACTCCGGCGCCGGTTACTCTGCCCGTCCGTTTCGATTCCGGGCAGCTACGGATTGCCGTTAGTAGGGCCAATCGCGGATC
   M N S A P L S T P A P V T L P V R S I P G S Y G L P L V G P I A D
101  GATTAGACTACTTCTGGTTCCAAAAACCGGAAAACCTTCTCACCAAGAGAAATGAAAAAGCACAAAGAGCACGGTTTTTCAGAACGAACGTGCCCGCGTGT
   R L D Y F W F Q K P E N F F T K R M E K H K S T V F R T N V P P C F
201  TCCGTTTTTCGGTAGTGTGAATCCAAATGTGGTGGCGGTTTTAGATGTGAAATCGTTTTTCGCATCTGTTTGATATGGAGATTGTAGAGAAAGCTAATGTG
   P F F G S V N P N V V A V L D V K S F S H L F D M E I V E K A N V
301  CTGTGTGGGATTTTCATGCCAGTGTGTTTATACTGGAGATATGCGTGTGTTGCTTATCTCGATACTTCTGAACCTAAACACGCCAGATTAAAGAA
   L V G D F M P S V V Y T G D M R V C A Y L D T S E P K H A Q I K N
401  TTTCACAGGATATTTCAAAAAGAGGCTCAAAAACATGGGTGCCTACACTACTTAAAGAGCTTGATACAATGTTTACAACCTTTTGAAGCAGATCTTTCAAA
   F S Q D I L K R G S K T W V P T L L K E L D T M F T T F E A D L S K
501  ATCCAATACAGCTTCTCTTCTTCCGACTCCAAAAATTCCTCTTAACTTCTTCTCCCTCACTATCCTCGGGCGTGATCCATCTGTCTCCCGAGAAATC
   S N T A S L L P A L Q K F L F N F F S L T I L G A D P S V S P E I
601  GCCAATTCGGCTACATCTTTCTTGATTCATGGTAGCTATTCAAATAGCCCCTACTGTGAGCATTGGTGTCTTCAACCTCTTGAAGAAATTTTAGTCC
   A N S G Y I F L D S W L A I Q L A P T V S I G V L Q P L E E I L V
701  ATTCTTTTGCATACCCCTTTTTTCTTGTCAAGGTAATTTATGAAAACTCGTTCAATTCGTCAAAAATGAAGCCAAAGGAAATTTAAGCAGGGCACAAAC
   H S F A Y P F F L V K G N Y E K L V Q F V K N E A K E V L S R A Q T
801  AGGGTTTCAACTCACAGAACAAAGCCATTCATAACCTTTTGTTCATTCTTGGGTTCAATGCTTTTGGTGGCTTCTCTATTTTCTTGCCAACTCTTTTG
   G F Q L T E Q E A I H N L L F I L G F N A F G G F S I F L P T L L
901  GGAAATCTTGGAGATGAGAAAAACGGGATATGCAAGAGAAACTGAGAAAAAGAGTGAAGACAAAGTCCGCGTAAATCCAGAAAACTTGAGTTTGA
   G N L G D E K N A D M Q E K L R K E V R D K V G V N P E N L S F E
1001 GTGTTAAAGAAATGGAATTTGTCAGTCTTTTGTATGAAACACTTAGGCTTAGTCCACCAGTACCAAGTCAATATGCAAGAGCAAGAAAGATTTTAA
   S V K E M E L V Q S F V Y E T L R L S P P V P S Q Y A R A R K D F K
1101 ACTGAGTTCACATGATTCAGTTTACGAAATCAAGAAAGGGAGCTTCTTTGTGGTTATCAGCCTTTAGTTATGAAAGATCCAAAGGTGTTTGTGAACT
   L S S H D S V Y E I K K G E L L C G Y Q P L V M K D P K V F D E P
1201 GAAAAGTTTGTGTTGGAGAGATTTACAAAGGAAAAAGGAAAGAAATGCTGAATTTATTTGTTTGGTCTAATGGTCCACAAACTGGGAGACCTACTGAAT
   E K F V L E R F T K E K G K E L L N Y L F W S N G P Q T G R P T E
1301 CAAACAAGCAATGTGCTGCTAAAGATATGGTTACTCTAACTGCTTCTTTGATTGTGGCTTACATTTTCCAAAAGTACGATTCTGTGAGTTTCTCATCTGG
   S N K Q C A A K D M V T L T A S L I V A Y I F Q K Y D S V S F S S G
1401 TTCACTCACATCTGTGAAAAAGGCTAGTTGA
   S L T S V K K A S *

```

Figure C : Séquence nucléotidique et peptidique de l'HPL de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (HPLLe).

Numéro d'accension GenBank de la séquence nucléotidique : AAK27265.1.

Tableau A : Liste des oligonucléotides utilisés comme amorces.

Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'
pQE-for	CGGATAACAATTTTCACACAG
pQE-rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC
<i>Xho</i> I Kex26xHisD ₄ KAHPLwtfor	CCGCTCGAGAAAAGACATCATCATCATCAT GATGATGATGATAAAGCCACGGGTTTCGCCCTCCGTG
<i>Xho</i> I Kex26xHisD ₄ KAHPLdelfor	CCGCTCGAGAAAAGACATCATCATCATCAT GATGATGATGATAAAGCCTCTCTGCCCTCCGCGCCA
<i>Xba</i> I stopHPLrev	GCTCTAGATCACTTGGACTTCTCAACTGCAGTGAT
<i>Xba</i> I HPLrev	GCTCTAGACTTGGACTTCTCAACTGCAGTGAT
<i>Xho</i> I Kex26xHisHPLdelfor	CCGCTCGAGAAAAGACATCATCATCATCATATTCTCTGCCCT CCGCGCCA
<i>Xho</i> I Kex26xHisHPLoptfor	CCGCTCGAGAAGAGACACCAC
<i>Xba</i> I stopHPLoptrev	GCTCTAGATTATTTGGACTTCTCAAC
<i>Xho</i> I Kex2HPLwtfor	CCGCTCGAGAAAAGAATGACGGGTTTCGCCCTCCGTG
<i>Xho</i> I Kex2HPLdelfor	CCGCTCGAGAAAAGATCTCTGCCCTCCGCGCCA
<i>Xho</i> I Kex2HPLoptfor	CCGCTCGAGAAGAGAATGACAGGTTCCCATCCGTT
HPLT302Kfor	GCATTTGGTGGGTTT <u>TAAG</u> ATATTCTTTCTGGCG
HPLT302Krev	CGCCAGAAAGAAATATCTTAAACCCACCAAATGC
HPLQ187Dfor	TCTTTCCTCCCCATGGACCAATTCCTTTTTAGG
HPLQ187Drev	CCTAAAAAGGAATTGGTCCATGGGGAGGAAAGA
HPLD218Tfor	GGCCATATTATGCTC <u>ACCA</u> AGTGGCTCGGTATT
HPLD218Trev	AATACCGAGCCACTTGGT <u>GAG</u> CATAATATGGCC

Les codons soulignés sont porteurs de la mutation.

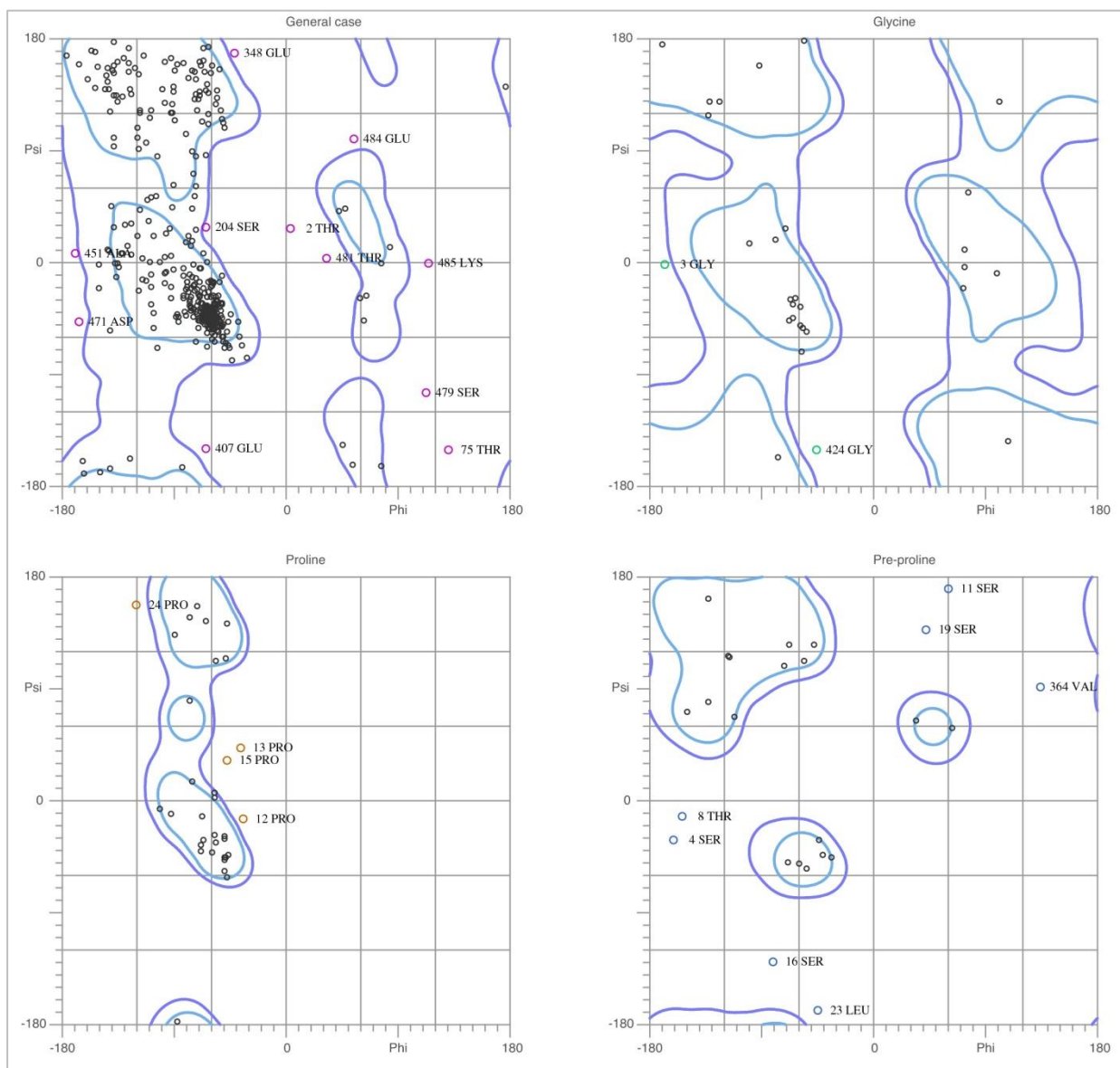


Figure D : Diagramme de Ramachandran réalisé avec MolProbity, pour le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive
 Pour le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive construit avec I-TASSER, le diagramme de Ramachandran établi avec MolProbity montre 403 résidus (83,1%) placés dans des zones énergétiquement très favorables, 58 résidus (12%) placés dans des zones autorisées et 24 résidus (4,9%) dans des régions non favorables.

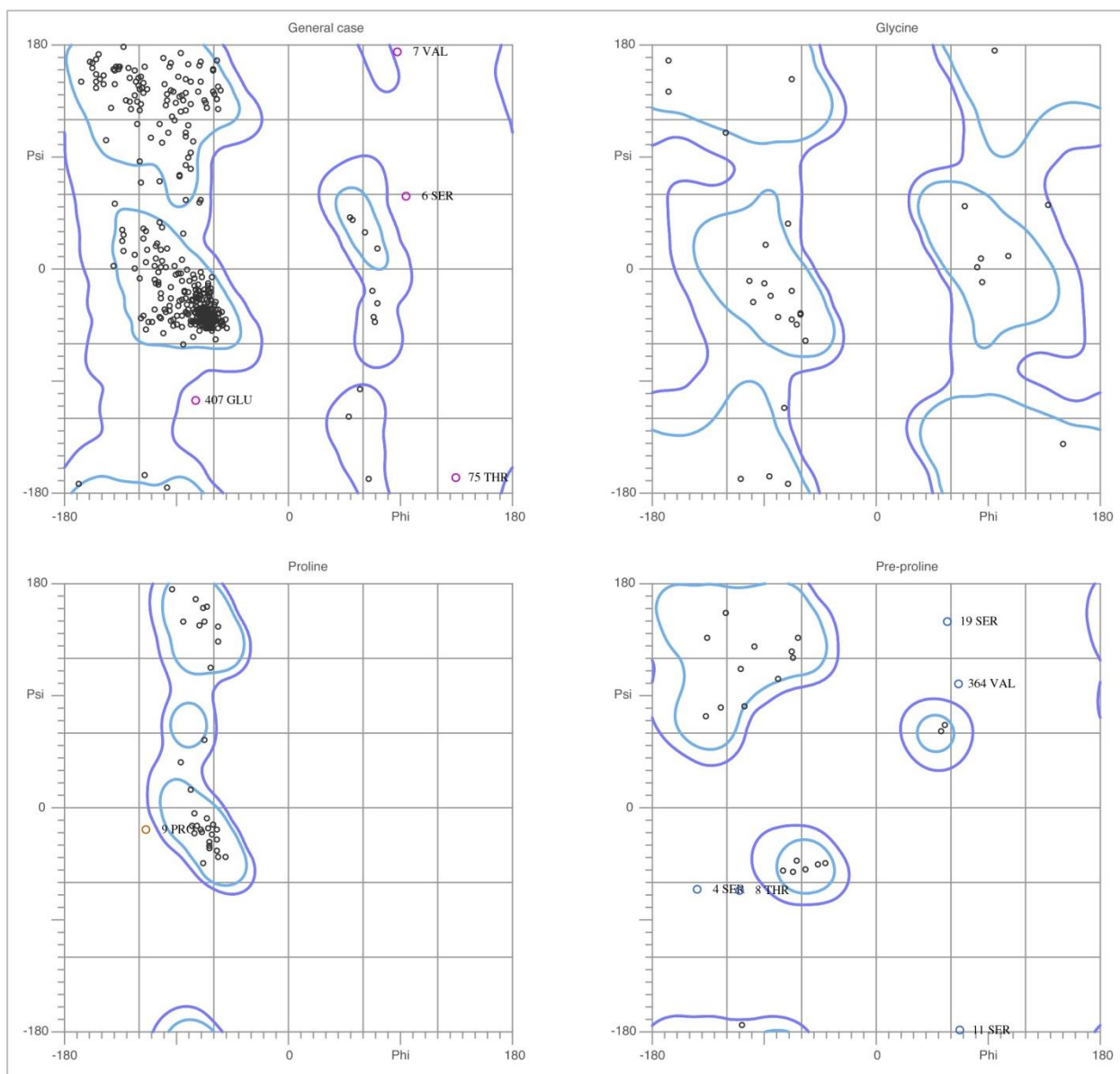


Figure E : Diagramme de Ramachandran réalisé avec MolProbity, pour le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive minimisé

Pour le modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive construit avec I-TASSER puis minimisé avec YASARA minimization, le diagramme de Ramachandran établi avec MolProbity montre 451 résidus (93%) placés dans des zones énergétiquement très favorables, 24 résidus (4,9%) placés dans des zones autorisées et 10 résidus (2,1%) dans des régions non favorables.

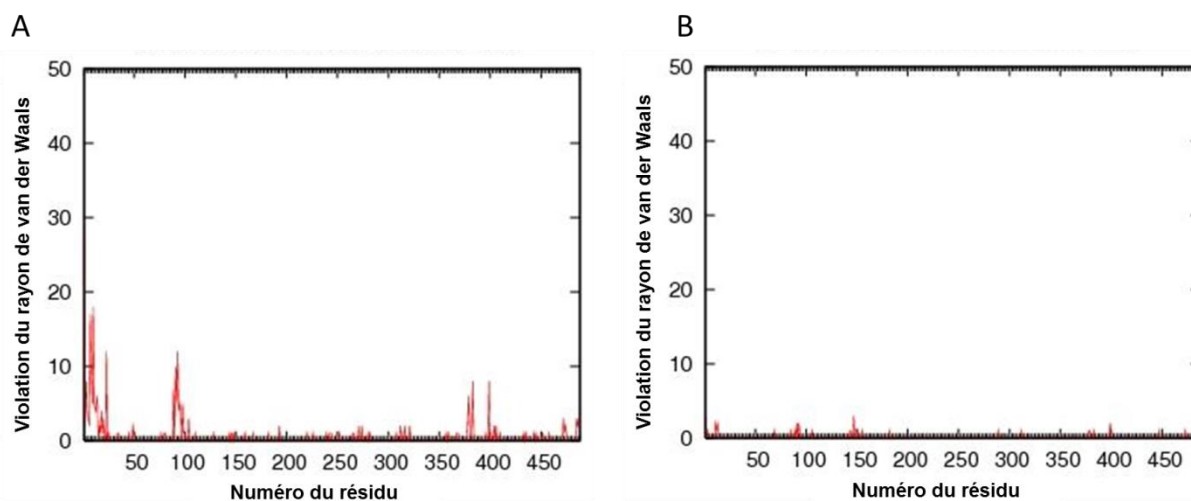


Figure F : Violation du rayon de van der Waals des atomes du modèle tridimensionnel de la 13-HPL d'olive (A) et de sa structure minimisée (B)

La minimisation de l'énergie, à l'aide du serveur YASARA minimization, de la structure tridimensionnelle de la 13-HPL d'olive modélisée avec I-TASSER, a permis la diminution des affrontements stériques entre les atomes de la structure.

Communications

Communications par affiche

Vincenti S., Mariani M., Maury J., Brunini V., Berti L., Identification d'acides aminés impliqués dans la régiospécificité de substrat de l'hydroperoxyde lyase. Journée des Doctorants, Corte, 16 juin 2016.

Vincenti S., Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Giannettini J., Maury J., Berti L. Olive oil lipid profiles strongly depend on the olive variety : the case of Corsican oils. Congrès Les lipides du futur : les lipases au cœur des développements scientifiques et industriels, Romainville, 23 novembre 2015.

Vincenti S., Maury J., Brunini V., Berti L., Expression de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive chez la levure *Pichia pastoris*. Journée des Doctorants, Corte, 25 juin 2015.

Vincenti S., Maury J., Brunini V., Berti L., Expression de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive chez la levure *Pichia pastoris*. Journée des Doctorants, Corte, 26 juin 2014.

Jacopini S., Mariani M., Vincenti S., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Muselli A., Desjobert JM., Costa J., Paquet P., Tomi F., Maury J., Berti L. Utilisation de la 13-Hydroperoxyde Lyase recombinante d'olive dans des procédés biocatalytiques de production de composés à note verte. Journée des doctorants, Corte, 25 juin 2015.

Jacopini S., Mariani M., Vincenti S., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Muselli A., Desjobert JM., Costa J., Paquet P., Tomi F., Maury J., Berti L. Utilisation de la 13-Hydroperoxyde Lyase recombinante d'olive dans des procédés biocatalytiques de production de composés à note verte. Tribune des chercheurs, Bastia, 19 juin 2015.

Jacopini S., Mariani M., Vincenti S., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Muselli A., Desjobert JM., Costa J., Maury J., Berti L. Use of olive recombinant 13-Hydroperoxide Lyase in the biocatalytic process of production of green note compounds. Congrès Enzymes Innovations Industries, Romainville, 27 octobre 2014.

Jacopini S., Vincenti S., Brunini-Bronzini V., Gambotti C., Maury J., Berti L. Purification et caractérisation de l'hydroperoxyde lyase recombinante d'olive pour la production de composés aromatiques. Journée des doctorants, Corte, 20 juin 2013.

Communications orales

Vincenti S., Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Muselli A., Desjobert JM., Costa J., Paquet P., Tomi F., Maury J., Berti L. Production biotechnologique de molécules aux propriétés aromatisantes : les molécules à note verte. Tribune des chercheurs, Bastia, 19 juin 2015.

Publication dans une revue nationale

Vincenti S., Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Gambotti C., Muselli A., Desjobert JM., Costa J., Paquet P., Tomi F., Maury J., Berti L. Production biotechnologique de molécules aux propriétés aromatisantes : les molécules à note verte. Bulletin de la Société des Sciences Historiques et Naturelles de la Corse.

Publications dans une scientifique internationale

Jacopini S., Mariani M., Brunini-Bronzini De Caraffa V., Gambotti C., Vincenti S., Desjobert J.-M., Muselli A., Costa J., Berti L. et Maury J. (2016). Olive Recombinant Hydroperoxide Lyase, an Efficient Biocatalyst for Synthesis of Green Leaf Volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179, 671-683.

Jacopini S.[§], Vincenti S.[§], Mariani M., Brunini-Bronzini De Caraffa V., Gambotti C., Desjobert J.-M., Muselli A., Costa J., Tomi F., Berti L. et Maury J. Activation and stabilization of the recombinant olive 13-hydroperoxide lyase using selected additives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (accepté, 2016).

Publication 1

Olive Recombinant Hydroperoxide Lyase, an Efficient Biocatalyst for Synthesis of Green Leaf Volatiles

**Sabrina Jacopini, Magali Mariani,
Virginie Brunini-Bronzini de Caraffa,
Claude Gambotti, Sophie Vincenti, Jean-
Marie Desjobert, et al.**

**Applied Biochemistry and
Biotechnology**

Part A: Enzyme Engineering and
Biotechnology

ISSN 0273-2289

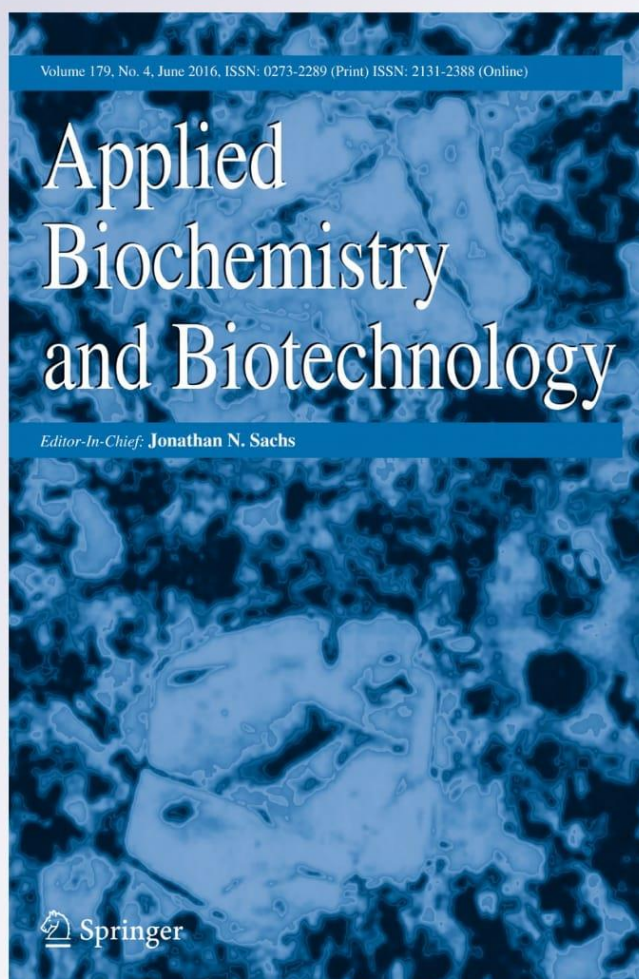
Volume 179

Number 4

Appl Biochem Biotechnol (2016)

179:671-683

DOI 10.1007/s12010-016-2023-x



 Springer

Olive Recombinant Hydroperoxide Lyase, an Efficient Biocatalyst for Synthesis of Green Leaf Volatiles

Sabrina Jacopini¹ · Magali Mariani¹ ·
Virginie Brunini-Bronzini de Caraffa¹ · Claude Gambotti¹ ·
Sophie Vincenti¹ · Jean-Marie Desjobert² · Alain Muselli² ·
Jean Costa² · Liliane Berti¹ · Jacques Maury¹

Received: 10 October 2015 / Accepted: 18 February 2016 /

Published online: 10 March 2016

© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Volatile C6-aldehydes are the main contributors to the characteristic odor of plants known as “green note” and are widely used by the flavor industry. Biotechnological processes were developed to fulfill the high demand in C6-aldehydes in natural flavorants and odorants. Recombinant hydroperoxide lyases (HPLs) constitute an interesting alternative to overcome drawbacks arising from the use of HPL from plant extracts. Thus, olive recombinant 13-HPL was assayed as biocatalysts to produce C6-aldehydes. Firstly, a cDNA encoding for olive HPL of Leccino variety was isolated and cloned in pQE-30 expression vector. In order to improve the enzyme solubility, its chloroplast transit peptide was deleted. Both enzymes (HPL *wild type* and HPL *deleted*) were expressed into *Escherichia coli* strain M15, purified, characterized, and then used for bioconversion of 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. Aldehydes produced were extracted, then identified and quantified using gas chromatography and mass spectrometry. Recombinant HPL *wild type* (HPL_{wt}) allowed producing 5.61 mM of hexanal and 4.39 mM of 3Z-hexenal, corresponding to high conversion yields of 93.5 and 73 %, respectively. Using HPL *deleted* (HPL_{del}) instead of HPL_{wt} failed to obtain greater quantities of hexanal or 3Z-hexenal. No undesirable products were formed, and no isomerization of 3Z-hexenal in 2E-hexenal occurred. The olive recombinant HPL_{wt} appears to be a promising efficient biocatalyst for the production of C6-aldehydes.

Keywords Hydroperoxide lyase · C6-aldehydes · Green note · Bioconversion · Hexanal · 3Z-Hexenal

✉ Jacques Maury
maury@univ-corse.fr

¹ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Végétales, CNRS UMR6134 SPE, Université de Corse, Campus Grimaldi, BP52, 20250 Corte, France

² Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, CNRS UMR6134 SPE, Université de Corse, Campus Grimaldi, BP52, 20250 Corte, France

Abbreviations

HPOD	hydroperoxyoctadecadienoic acid
HPOT	hydroperoxyoctadecatrienoic acid
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LOX	lipoxygenase
HPL	hydroperoxide lyase
GLVs	green leaf volatiles

Introduction

Green leaf volatiles (GLVs) are molecules composed especially of C6-aldehydes such as hexanal, 3Z-hexenal, and 2E-hexenal. They are synthesized by higher plants in response to biotic and abiotic stresses and act as defence mechanisms against insect or fungal pathogen attacks [1–5]. GLVs are naturally produced through a metabolic pathway of the C18-polyunsaturated fatty acids named the lipoxygenase pathway. First, the lipoxygenase (LOX) catalyzes the oxygenation of linoleic and linolenic acids to form corresponding fatty acid hydroperoxides which are then cleaved by hydroperoxide lyase (HPL) to generate short-chain aldehydes and oxoacids [6]. According to their specificity, HPLs can act on the 9- or 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids (hydroperoxyoctadecadienoic acid (HPOD) and hydroperoxyoctadecatrienoic acid (HPOT)) and catalyze the cleavage of these hydroperoxides into C6- or C9-aldehydes and the C12- or C9- oxoacids, respectively [1]. HPLs are described to be heminic enzymes, classified in the cytochrome P450 family and more particularly in the two subfamilies CYP74B (13-HPL) and CYP74C (9-HPL and 9/13-HPL) [7]. Genes encoding HPL have been cloned and characterized in several kinds of plants, such as alfalfa, tomato, green bell pepper, olive, and cucumber [8–12]. Most HPLs are membrane bound: some of them in plants such as *Arabidopsis* and olive contain a chloroplast transit peptide in their N-terminal ends, whereas other HPLs in plants such as melon do not have a chloroplast transit peptide and are suggested to be localized in the microsomes [11, 13–15]. Although the structural details of plant HPLs remain poorly understood, recent studies have highlighted the structural aspects of HPLs in plants [10, 16]. The circular dichroism analysis of green bell pepper HPL solubilized in dodecyl maltoside demonstrated that the protein secondary structure in dodecyl maltoside consists of 13 % α -helix, 32 % β -sheet, 21 % turn, and 31 % random coil [16].

GLVs are the main contributors to the characteristic odor of plants known under the name of “green note” [1, 5]. They are widely used by various industries to improve food quality by restoring the fresh and fruity green odor or to add a touch of freshness to fragrances [17]. As consumers’ demand for natural flavorants and odorants has increased in recent years, due to health and safety concerns, many biotechnological processes based on the LOX pathway were developed. If soybean flour was generally used as LOX source, numerous plant extracts (green bell pepper, mint leaves, green leaves from sugar beet) were tested as HPL sources [18–20]. However, HPL activity is very unstable in plant extracts, is variable from plant to another plant, and, in addition, crude extracts contain other enzymes generating undesirable products. To overcome these drawbacks, the search for new sources of efficient HPL and strategies is critical. The use of recombinant HPLs carefully selected constitute an interesting alternative because their production is independent of environmental conditions, harvesting period, and plant heterogeneity; their purification is generally easier and therefore, their use in the form of purified enzymes could allow the selective production of volatile compounds. The

advancement of knowledge has led to development of new biocatalytic processes based on the use of recombinant HPLs for the production of these natural volatile compounds [5]: recently, efficient biocatalytic processes using recombinant sugar beet HPL [21], yeast *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing soybean LOX2 and watermelon HPL [22], and leaf extract of *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated with a viral vector system allowing overexpression of a soybean 13-LOX and a watermelon 13-HPL [23] were reported.

In this study, we isolated a cDNA encoding for a 13-HPL, named HPL *wild type* (HPL*wt*), from black olive fruits (*Olea europaea* L., Leccino variety), in order to use the olive recombinant 13-HPL in a biocatalytic process producing C6-aldehydes. Olive fruits were chosen because the involvement of enzymes of LOX pathway in the biosynthesis of flavor compounds of virgin olive oil was well established [24], the C6-aldehyde compounds are the main components (about 80 %) of this flavor [25–27] suggesting the presence of efficient enzymes of the LOX pathway in these fruits. HPL*wt* displays an N-terminal transit peptide suggesting its targeting and insertion to the chloroplast envelope [13, 28]. This transit peptide could allow insertion of the recombinant enzyme in the membrane or in inclusion bodies during expression in *Escherichia coli*, thereby reducing the amount of enzyme recovered in the soluble protein fraction. Also, we decided to suppress the sequence encoding the transit peptide using a PCR-based method. The new enzyme was designated as HPL *deleted* (HPL*del*) (deleted transit peptide). Both enzymes (HPL*wt* and HPL*del*) were expressed into *E. coli* (M15), purified in one step by affinity chromatography, and their catalytic efficiencies were determined and compared. Then, HPL*wt* and HPL*del* were tested in biocatalytic processes, and we have optimized the biotransformation conditions of 13-HPOD and 13-HPOT into hexanal and 3Z-hexenal, respectively, to achieve the highest yields.

Materials and Methods

Chemical Compounds

Chemical compounds (antibiotics, δ -aminolevulinic acid, sodium phosphate mono and dibasic, benzamidine, linoleic and linolenic acids, hexanal (98 %), 3Z-hexenal (50 % in triacetin), MgSO₄, Triton X-100, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)), bovin serum albumin (BSA), soybean LOX, DNase I, and lysozyme were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (Saint-Quentin-Fallavier, France). All chemicals were commercial products of analytical grade or molecular biological grade.

Plant Material

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

RNA Extraction and Reverse Transcription PCR Analysis

Total RNA was extracted from the olive pulp as described by Hernández et al. [29]. Reverse transcription was performed using up to 5 μg of total RNA extracted from mature olives (20 WAF, black stage), oligo(dT)₁₈ primer, and the PowerScript reverse transcriptase (Clontech)

according to the manufacturer's instructions. The first strand cDNA was used as template in PCR experiments with degenerated primers (HPL 13-2: 5'-ggnttyaaygcntwyggngg, HPL 13-3: 5'-gyttnngcngcraaytgyttrtt) designed from conserved amino acid sequences of known plant 13-HPLs and oligo(dT)₁₈V and specific primer of olive 13-HPL (HPL b: 5'gttgctgaattatctatact) designed during the present study. The PCR conditions were as follows: 94 °C 5 min, 56 °C 1 min, 72 °C 40 s (1 cycle); 94 °C 30 s, 53 °C 1 min, 72 °C 40 s (15 cycles); 94 °C 30 s, 50 °C 1 min, 72 °C 40 s (30 cycles); 72 °C 7 min (1 cycle) with the HPL 13-2 and HPL 13-3 primers and 94 °C 5 min, 52 °C 2 min, 72 °C 3 min (1 cycle); 94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 1 min (15 cycles), 94 °C 30 s, 46 °C 30 s, 72 °C 1 min (15 cycles); 94 °C 30 s, 42 °C 30 s, 72 °C 1 min (15 cycles); 72 °C 7 min (1 cycle), with the oligo(dT)₁₈V and HPL b primers.

5' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Procedures

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

The RACE procedure was repeated twice with the specific primers HPLg: 5'-accaccaaagtcattgaatcc, HPLh: 5' attgctctgttcagtcag and HPLi: 5'-tgagctcttgtataactctttgcc, then, with HPLj: 5'ttgccaacgtcagcgtca, HPLk: 5'-atttgtcccacatggag, and HPLl: 5'-agtgaacttatgagtgacgtaccaca, under the same PCR conditions.

Cloning of Amplification Products

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

DNA Sequencing

Sequencing was performed by GATC Biotech AG (Germany).

Cloning of Olive HPL cDNA for Expression in *E. coli*

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

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

Expression and Purification of Recombinant HPL

Four hundred milliliters of culture TB medium (24 g L⁻¹ yeast extract; 12 g L⁻¹ tryptone, 0.4 % v/v glycerol; 0.17 M KH₂PO₄; 0.72 M K₂HPO₄) was incubated with 24 mL of the overnight culture of the M15 *E. coli* transformed with pQE30-HPL_{wt} or pQE30-HPL_{del} and incubated at 37 °C until the cell density had increased to A₆₀₀ 0.6 to 0.8. The culture was incubated 48 h at 15 °C after addition of IPTG (0.5 mM) and δ-aminolevulinic acid (2.5 mM) then centrifuged 30 min at 7000×g at 4 °C. The pellet was resuspended in 20 mL of lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing 0.25 mg mL⁻¹ lysozyme, 500 mM NaCl, and 0.1 % Triton X-100) and frozen at -80 °C. After thawing, the lysis was continued by addition of 0.01 mg mL⁻¹ DNase I, 50 mM MgSO₄, and 1 mM benzamidine then, the solution was incubated 30 min at 4 °C. After centrifugation at 12,000×g for 30 min at 4 °C, the supernatant (soluble protein fraction) was collected.

Purification of recombinant HPL was performed by affinity chromatography on Äkta purifier (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography). The soluble protein fraction (19 mL) was loaded onto Cobalt TALON Superflow Metal Affinity (Clontech) column (1 mL bed volume) pre-equilibrated with buffer A (50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing 300 mM NaCl). Most of the *E. coli* proteins elute in the flow through, and once the A₂₈₀ of the effluent returned to baseline, one wash (corresponding to about 10 column volumes) was performed with 40 mM imidazole in buffer A, to elute the unspecifically bounded proteins. Then, the His-tagged olive HPL was eluted with 100 and 200 mM imidazole in buffer A. Fractions showing HPL activity and containing pure protein on SDS-PAGE were pooled and dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer pH 7. The protein sample was used immediately in the different processes.

Enzymatic Assay

Substrates of HPL (13-hydroperoxides of linoleic or linolenic acids) were prepared as described by Vick [30] with adaptations. The reaction mixture (30 mL final volume) containing 70 mM sodium borate buffer pH 9 with 6.35 mM linoleic or linolenic acids, 11 mM NaOH, and 30 units of commercial soybean LOX (Sigma-Aldrich) was stirred during 30 min at 4 °C under oxygen bubbling. The reaction was stopped by acidification (pH 3) with 1 M HCl. Hydroperoxides were extracted with 3 × 30 mL of diethyl ether and washed with 2 × 30 mL of water. The synthesis of hydroperoxides was checked by TLC in solvent heptan/diethyl ether/acetic acid (55/45/1) and

revealed by copper acetate/phosphoric acid (50/50). The identification of products was performed by ^{13}C -NMR [31]. The concentration of hydroperoxide solutions was determined by measuring absorbance at 234 nm using the extinction coefficient of $\varepsilon = 25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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

Kinetic parameters were determined from Michaelis-Menten plot over a range of substrate concentrations between 7 and 114 μM HPOD and 16 and 134 μM HPOT for HPL_{wt} and 7 and 121 μM HPOD and 8 and 175 μM HPOT for HPL_{del}.

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

Protein Analysis

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

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

C6-Aldehydes Production

The C6 volatile compounds were produced from 13-HPOD and 13-HPOT obtained by the action of soybean lipoxygenase on the linoleic or linolenic acids as previously described. The action of HPL_{wt} and HPL_{del} on 13-HPOD and 13-HPOT were evaluated, using different amounts of enzyme (0.25, 0.5, and 1 U mL^{-1}) and substrate (2, 4, and 6 mM). The standard reaction was performed in 5 mL of 50 mM phosphate buffer pH 7.5 incubated at 25 °C, containing the selected amount of substrate (HPOD or HPOT). The reaction started by addition of the enzyme. The mixture was distributed in closed tubings (1 mL total volume), and reactions were stopped at different times (1, 5, 10, 15, and 20 min) by acidification (pH 2) with 5 M HCl. Aldehydes produced were extracted by $3 \times 200 \mu\text{L}$ of dichloromethane.

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

Volatile green notes were quantified by GC-FID and identified by GC-MS. GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus (Walton, MA, USA) equipped with

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

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

Results and Discussion

Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Enzymes

Full-length HPL cDNA was isolated by a combined strategy using RT-PCR and RACE-PCR on total RNA extracted from black olives of the Leccino variety harvested at 20 weeks after flowering (WAF). The olive 13-HPL cDNA sequence contains an open reading frame of 1461 bp encoding a presumptive translation product of 487 amino acid residues, which corresponds to a calculated molecular mass of 50 kDa and a pI of 6.9. Fasta analysis of the deduced amino acid sequence revealed 99.8 % identity with the olive HPL sequence (*OepHPL*) of the Picual variety [11], suggesting that the two deduced amino acid sequences of the olive HPLs in the Leccino and Picual varieties are encoded by the same gene. Olive HPL of the Leccino variety lacks the four amino acid residues (MMAK) in N-terminal position and has a glutamic acid residue at position 411, which is replaced by an alanine residue (at position 415) in olive HPL of the Picual variety [11].

The enzyme (HPL*wt*) contains a N-terminal transit peptide characteristic of CYP74B enzymes [15], suggesting its targeting and insertion to the chloroplast envelope [13, 28]. This transit peptide could allow insertion of the recombinant enzyme in the membrane during expression in *E. coli*, thereby reducing the amount of enzyme recovered in the soluble protein fraction. Also, we deleted the sequence encoding the transit peptide (the enzyme was designated as HPL*del*) in order to recover larger amount of enzyme in the soluble protein fraction.

Both enzymes, HPL*wt* and HPL*del*, were expressed in *E. coli* (M15). Expression was induced by 0.5 mM IPTG, in presence of 2.5 mM δ-aminolevulinic acid as heme precursor, and was performed at 15 °C during 48 h. Recombinant enzymes were purified by affinity

chromatography using Cobalt chelated column (Clontech). Purified HPL_{wt} and HPL_{del} appeared as a unique band at 50 kDa in both Coomassie Brilliant Blue stained SDS-PAGE and immunoblot, in good agreement with the predicted molecular mass of one subunit of HPL (Fig. 1). It appears that the deletion of N-terminal peptide does not avoid an important accumulation of enzyme in lysis pellet. Indeed, the soluble protein fraction obtained from the cell lysis and the purified fraction of HPL_{del} appear to contain a lower amount of enzyme than the soluble protein and purified fraction of the HPL_{wt} (Fig. 1). From 0.4 L of culture medium, we have purified 0.502 ± 0.002 mg of HPL_{wt} with specific activities of 71.15 ± 0.18 U mg⁻¹ proteins on 13-HPOT and 16.98 ± 2.38 U mg⁻¹ proteins on 13-HPOD. From the same volume of culture medium, we have purified 0.28 ± 0.02 mg of HPL_{del} with specific activities of 56.89 ± 4.50 U mg⁻¹ proteins on 13-HPOT and 7.91 ± 2.00 U mg⁻¹ proteins on 13-HPOD. The deletion of the N-terminal transit peptide has not increased the amount of purified enzyme, and in addition, the enzyme obtained has lower specific activities (decrease of about 20 and 53 % for 13-HPOT and 13-HPOD, respectively) than the wild-type enzyme.

Optimum pH and optimum temperature were determined using 13-HPOD and 13-HPOT as substrates. Both enzymes displayed an optimum pH at 7.5 and an optimum temperature at 25 °C. Enzymatic activity was stable in a range of pH 6.5 to 8 (about 80 % of the specific activity was preserved). Salas and Sanchez [35] have previously reported a broad pH spectrum of HPL activity in olive, showing the highest activity at pH 6.0. Ben Akacha et al. [36] showed that olive HPL is active in a range of pH between 6 and 8 with an optimal pH at 6.5 and an optimal production of C6 compounds performed at 20 °C, whereas Padilla et al. [11] reported the maximal activity of *OepHPL* at pH range between 8 and 9 and at 45 °C.

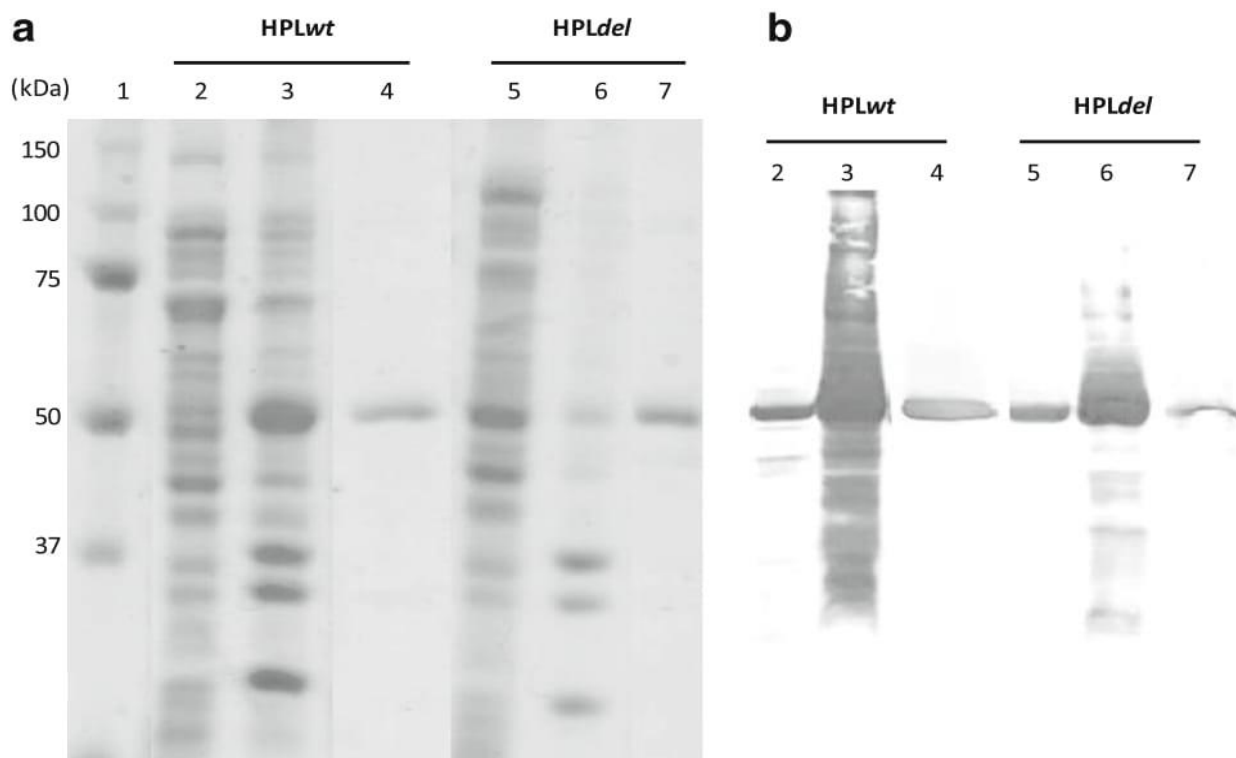


Fig. 1 SDS-PAGE (12 % acrylamide) analysis of olive recombinant HPL_{wt} and HPL_{del}. The proteins were separated by electrophoresis then **a** stained by EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich) or **b** blotted and probed with the specific monoclonal peroxidase conjugated anti-His antibody. *Lane 1*: molecular mass standard. The lanes 2 to 4 and 5 to 7 relate to HPL_{wt} and HPL_{del}, respectively. *Lanes 2* and *5*: soluble extract; *lanes 3* and *6*: lysis pellet; *lanes 4* and *7*: purified pooled fractions containing HPL_{wt} or HPL_{del}

Kinetic parameters were investigated using 13-HPOD and 13-HPOT as substrates (Table 1). No activity was observed toward 9-HPOD or 9-HPOT. Both enzymes showed a lower K_m for 13-HPOD (43.10 and 43.22 μM for HPL $_{wt}$ and HPL $_{del}$, respectively) than for 13-HPOT (152.75 and 173.85 μM for HPL $_{wt}$ and HPL $_{del}$, respectively) suggesting a preference for 13-HPOD rather than 13-HPOT. However, HPL $_{wt}$ and HPL $_{del}$ showed a 21.4-fold and 22.5-fold increase of the turnover (564.95 vs 26.38 s^{-1} and 402.62 vs 17.89 s^{-1}) for 13-HPOT, respectively. These results lead to a catalytic efficiency (kcat/ K_m) of both HPLs significantly higher for 13-HPOT than for 13-HPOD (sixfold and 5.5-fold increase for HPL $_{wt}$ and HPL $_{del}$, respectively), in good agreement with results reported by Padilla et al. [11]. Moreover, HPL $_{wt}$ seems to act more effectively on 13-HPOT and 13-HPOD than on HPL $_{del}$ (3.71 vs 2.36 $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ for 13-HPOT and 0.62 vs 0.43 $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ for 13-HPOD).

C6-Aldehyde Production Assays with Recombinant Olive Hydroperoxide Lyases

The enzymes HPL $_{wt}$ and HPL $_{del}$ were assayed as catalyst for the production of hexanal or 3Z-hexenal from 13-HPOD or 13-HPOT, respectively. The effect of substrate and enzyme concentrations on the cleavage reaction was firstly investigated by using HPL $_{wt}$ and 13-HPOD (Table 2). Data showed that increasing concentrations of hexanal were achieved using increasing HPOD concentrations. The molar conversion rates remained stable or increased when increasing substrate concentrations were used with constant value of enzyme concentration. Moreover, data showed that hexanal concentrations were influenced by HPL $_{wt}$ concentrations. Indeed, the highest concentration of hexanal was achieved with 1 U mL^{-1} HPL $_{wt}$ and 6 mM of 13-HPOD, while the 0.25 U mL^{-1} enzyme concentration seems insufficient to transform 4 or 6 mM of 13-HPOD (about 60 % only of yield achieved in 20 min of reaction). The optimal conditions have produced 5.61 ± 0.48 mM of hexanal, corresponding to a molar conversion rate of 93.5 %. When HPL $_{wt}$ was substituted by HPL $_{del}$, the hexanal concentrations were always smaller (Table 2). However, 3.93 ± 0.15 mM of hexanal were produced with 1 U mL^{-1} HPL $_{del}$ and 6 mM of 13-HPOD, corresponding to a molar conversion rate of 65.5 %. These results may be regarded as good results since the yields reported in the literature range from 25 to 86 % [19, 20, 37] when plant extracts are used as a source of HPL, or 65 % when alfalfa recombinant HPL is used as catalyst [38].

The production of 3Z-hexenal from 13-HPOT by the action of HPL $_{wt}$ or HPL $_{del}$ was investigated in a same way that production of hexanal from 13-HPOD (Table 3). In all experiments performed, 3Z-hexenal was the sole compound detected; 2E-hexenal was never detected, suggesting that, in the conditions used, no isomerization of 3Z-hexenal in 2E-hexenal occurred. The optimal conditions for 3Z-hexenal production were obtained with 0.5 U mL^{-1} HPL $_{wt}$ and 6 mM of 13-HPOT and have allowed to reach an amount of 2.26 ± 0.02 mM of 3Z-

Table 1 Kinetic parameters of purified recombinant olive HPL $_{wt}$ and HPL $_{del}$

HPL	Substrates	K_m (μM)	V_m ($\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$)	kcat (s^{-1})	kcat/ K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
HPL $_{wt}$	13-HPOD	43.10 ± 4.46	0.48 ± 0.06	26.38 ± 3.01	0.62
	13-HPOT	152.75 ± 10.36	10.35 ± 0.68	564.95 ± 36.89	3.71
HPL $_{del}$	13-HPOD	43.22 ± 7.87	0.34 ± 0.01	17.89 ± 0.53	0.43
	13-HPOT	173.85 ± 27.70	7.65 ± 0.07	402.62 ± 3.66	2.36

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

Table 2 Production of hexanal from 13-HPOD using HPL_{wt} or HPL_{del}

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

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

hexenal corresponding to a molar conversion rate of 38 %. Using HPL_{del} instead of HPL_{wt} failed to obtain greater quantities of 3Z-hexenal (Table 3). The data showed that the amounts of 3Z-hexenal were always lower than the amounts of hexanal (Tables 2 and 3), leading to molar conversion rates lower, whereas HPL_{wt} acts more effectively on the 13-HPOT than on the 13-HPOD. A possible explanation of this phenomenon can be given by the inhibitory effect

Table 3 Production of 3Z-hexenal from 13-HPOT using HPL_{wt} or HPL_{del}

Recombinant HPL (U mL ⁻¹)	13-HPOT (mM)	3Z-Hexenal (mM)	Molar conversion rate (%)	Optimum reaction time (min)
HPL _{wt}				
0.25	4	0.87 ± 0.04	22	5
	6	0.90 ± 0.15	15	10
0.5	2	0.77 ± 0.002	38.5	20
	4	1.45 ± 0.18	36	10
	6	2.26 ± 0.02	38	5
1	4	0.75 ± 0.02	19	5
	6	2.18 ± 0.14	36	15
HPL _{del}				
0.25	4	0.49 ± 0.03	12	20
0.5	4	1.12 ± 0.02	28	20
	6	1.19 ± 0.23	19.8	10

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

exerted by the 13-HPOT present at high concentration [39]. Another explanation may be provided by the high volatility of 3Z-hexenal to 25 °C. To test this hypothesis, we performed again the experiment with 0.5 U mL⁻¹ HPL_{wt} and 6 mM of 13-HPOT at 10 °C to minimize evaporation and thus the loss of 3Z-hexenal. Under these conditions, 4.39 ± 0.38 mM of 3Z-hexenal were produced, corresponding to a molar conversion rate of 73 %. Yields of 38 and 73 % can be considered as good values since studies conducted to produce the C6-aldehydes (3Z-hexenal and 2E-hexenal, both in combination) from 13-HPOT, and using HPL plant extracts as catalyst, have reported yields ranging from 37 to 50 % [18, 19, 36], and studies using a recombinant HPL reported yields of 43 % [38] and about 65 % [21]. Conversion of 13-HPOT in C6-aldehydes, using HPL plant extracts, often leads to a mixture of 3Z-hexenal and 2E-hexenal [18, 21, 36]. Indeed, 3Z-hexenal produced by HPL-catalyzed cleavage of 13-HPOT can be, in part, isomerized to 2E-hexenal by the action of 3Z:2E-enal isomerases present in plant extracts and by heating [18, 36]. Here, we reported a process using an olive recombinant HPL at a low reaction temperature (10 °C) which allowed to produce exclusively 3Z-hexenal with a good yield value (73 %). Obtaining of pure and sufficiently stable 3Z-hexenal is interesting and allows to consider its use as an intermediate in a longer reaction sequence, as in the production of 3Z-hexenol.

Conclusion

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

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

References

1. Hatanaka, A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, *34*, 1201–1218.
2. Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2006). ETR1-, JAR1- and PAD2-dependent signaling pathways are involved in C6-aldehyde-induced defense responses of Arabidopsis. *Plant Science*, *171*, 415–423.
3. Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T., & Feussner, I. (2006). Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, *67*, 649–657.
4. Ibdah, M., Lavid, N., Lewinson, E., Amit, A., & Dror, N. (2010). Green routes to green notes. *Chemical Engineering Transactions*, *20*, 241–246.
5. Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, *13*, 727–739.
6. Matsui, K., Shibata, Y., Tateba, H., Hatanaka, A., & Kajiwara, T. (1997). Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *61*, 199–201.
7. Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T., & Kajiwara, T. (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Letters*, *394*, 21–24.

8. Noordermeer, M. A., Van Dijken, A. J., Smeekens, S. C., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. (2000). Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics. *European Journal of Biochemistry*, *267*, 2473–2482.
9. Atwal, A. S., Bisakowski, B., Richard, S., Robert, N., & Lee, B. (2005). Cloning and secretion of tomato hydroperoxide lyase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, *40*, 95–102.
10. Santiago-Gomez, M. P., Kermasha, S., Nicaud, J.-M., Belin, J.-M., & Husson, F. (2010). Predicted secondary structure of hydroperoxide lyase from green bell pepper cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *65*, 63–67.
11. Padilla, M. N., Hernandez, M. L., Pérez, A. G., Sanz, C., & Martinez-Rivas, J. M. (2010). Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 5649–5657.
12. Wan, X. H., Chen, S. X., Wang, C. Y., Zhang, R. R., Cheng, S. Q., Meng, H. W., & Shen, X. Q. (2013). Isolation, expression, and characterization of a hydroperoxide lyase gene from cucumber. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 22082–22101.
13. Bate, N. J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J. M. C., Thompson, J. E., & Rothstein, S. J. (1998). Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiology*, *117*, 1393–1400.
14. Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. (2001). Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome p450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem*, *2*, 494–504.
15. Stumpe, M., & Feussner, I. (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, *5*, 347–357.
16. Panagakou, I., Touloupakis, E., & Ghanotakis, D. F. (2013). Structural characterization of hydroperoxide lyase in dodecyl maltoside by using circular dichroism. *The Protein Journal*, *32*, 1–6.
17. Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, *54*, 712–732.
18. Németh, Á. S., Márczy, J. S., Samu, Z., Hágér-Veress, Á., & Szajáni, B. (2004). Biocatalytic production of 2 (E)-hexenal from hydrolysed linseed oil. *Enzyme and Microbial Technology*, *34*, 667–672.
19. Gargouri, M., Drouet, P., & Legoy, M.-D. (2004). Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves: volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids. *Journal of Biotechnology*, *111*, 59–65.
20. Rabetafika, H. N., Gigot, C. d., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Destain, J., Du Jardin, P., Wathelet, J.-P., & Thonart, P. (2008). Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnology Letters*, *30*, 1115–1119.
21. Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.-L., Muhovski, Y., Wathelet, J.-P., du Jardin, P., & Thonart, P. (2012). Optimization and scaling up of a biotechnological synthesis of natural green leaf volatiles using *Beta vulgaris* hydroperoxide lyase. *Process Biochemistry*, *47*, 2547–2551.
22. Buchhaupt, M., Guder, J. C., Etschmann, M. M. W., & Schrader, J. (2012). Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*, 159–168.
23. Huang, F. C., Studart-Witkowski, C., & Schwab, W. (2010). Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana benthamiana* using a viral vector system. *Plant Biotechnology Journal*, *8*, 783–795.
24. Olias, J. M., Perez, A. G., Rios, J. J., & Sanz, L. C. (1993). Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*, 2368–2373.
25. Morales, M. T., Aparicio, R., & Rios, J. J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, *668*, 455–462.
26. Angerosa, F., Basti, C., & Vito, R. (1999). Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 836–839.
27. Luaces, P., Pérez, A. G., & Sanz, C. (2003). Role of olive seed in the biogenesis of virgin olive oil aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 4741–4745.
28. Froehlich, J. E., Itoh, A., & Howe, G. A. (2001). Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology*, *125*, 306–317.
29. Hernandez, M. L., Mancha, M., & Martinez-Rivas, J. M. (2005). Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive. *Phytochemistry*, *66*, 1417–1426.
30. Vick, B. A. (1991). A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids*, *26*, 315–320.
31. Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J., & Berti, L. (2006). Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*, 450–454.
32. Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, *6*, 1948–1954.

33. Gill, S. C., & Von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, *182*, 319–326.
34. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
35. Salas, J. J., & Sanchez, J. (1999). Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Science*, *143*, 19–26.
36. Ben Akacha, N., & Gargouri, M. (2009). Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide-lyase from olive leaves and alcohol-dehydrogenase from yeast in liquid/gas reactor. *Process Biochemistry*, *44*, 1122–1127.
37. Márczy, J. S., Németh, A. S., Samu, Z., Háger-Veress, Á., & Szajáni, B. (2002). Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxid lyase enzymes. *Biotechnology Letters*, *24*, 1673–1675.
38. Noordermeer, M. A., van der Goot, W., van Kooij, A. J., Veldsink, J. W., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. G. (2002). Development of a biocatalytic process for the production of C6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4270–4274.
39. Matsui, K., Kajiwara, T., & Hatanaka, A. (1992). Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*, 175–178.

Publication 2

Activation and Stabilization of Olive Recombinant 13-Hydroperoxide Lyase Using Selected Additives

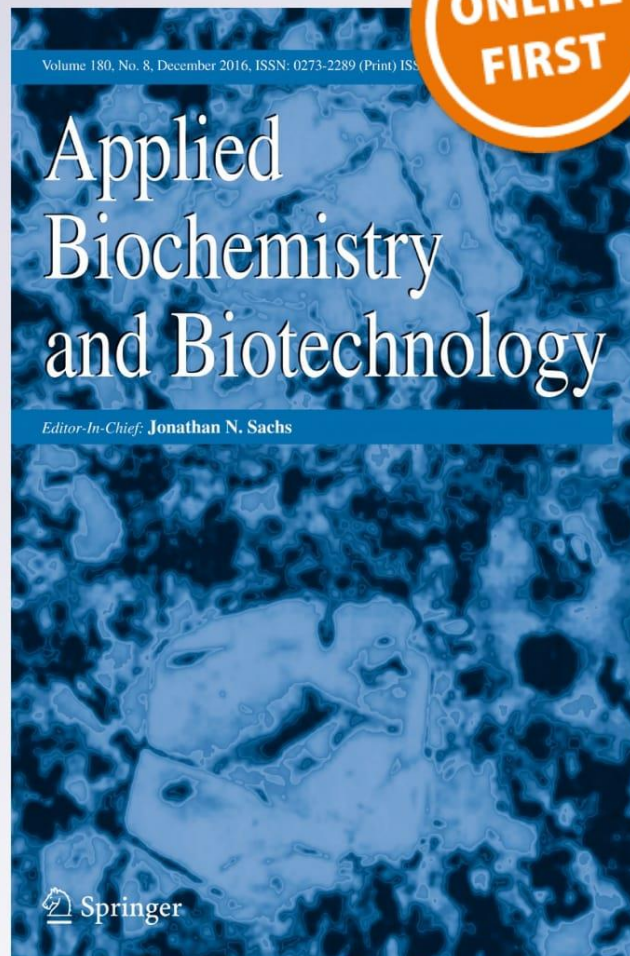
Sabrina Jacopini, Sophie Vincenti, Magali Mariani, Virginie Brunini-Bronzini de Caraffa, Claude Gambotti, Jean-Marie Desjobert, et al.

Applied Biochemistry and Biotechnology

Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology

ISSN 0273-2289

Appl Biochem Biotechnol
DOI 10.1007/s12010-016-2377-0



Activation and Stabilization of Olive Recombinant 13-Hydroperoxide Lyase Using Selected Additives

Sabrina Jacopini¹ · Sophie Vincenti¹ · Magali Mariani¹ ·
Virginie Brunini-Bronzini de Caraffa¹ ·
Claude Gambotti¹ · Jean-Marie Desjobert² ·
Alain Muselli² · Jean Costa² · Félix Tomi³ ·
Liliane Berti¹ · Jacques Maury¹

Received: 2 August 2016 / Accepted: 14 December 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The stabilization of olive recombinant hydroperoxide lyases (rHPLs) was investigated using selected chemical additives. Two rHPLs were studied: HPL full-length and HPL with its chloroplast transit peptide deleted (matured HPL). Both olive rHPLs are relatively stable at 4 °C, and enzyme activity can be preserved (about 100% of the rHPL activities are maintained) during 5 weeks of storage at −20 or at −80 °C in the presence of glycerol (10%, v/v). Among the additives used in this study, glycine (2.5% w/v), NaCl (0.5 M), and Na₂SO₄ (0.25 M) provided the highest activation of HPL full-length activity, while the best matured HPL activity was obtained with Na₂SO₄ (0.25 M) and NaCl (1 M). Although the inactivation rate constants (*k*) showed that these additives inactivate both rHPLs, their use is still relevant as they strongly increase HPL activity. Results of C6-aldehyde production assays also showed that glycine, NaCl, and Na₂SO₄ are appropriate additives and that NaCl appears to be the best additive, at least for hexanal production.

Keywords Hydroperoxide lyase · Additives · Stabilization · Green note · Hexanal · 3Z-hexenal

Sabrina Jacopini and Sophie Vincenti contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12010-016-2377-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jacques Maury
maury@univ-corse.fr

¹ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Végétales, Université de Corse, CNRS UMR6134 SPE, Campus Grimaldi, BP52, 20250 Corte, France

² Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, CNRS UMR6134 SPE, Campus Grimaldi, BP52, 20250 Corte, France

³ Equipe Chimie et Biomasse, Université de Corse, CNRS UMR6134 SPE, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

Abbreviations

HPOD	Hydroperoxyoctadecadienoic acid
HPOT	Hydroperoxyoctadecatrienoic acid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LOX	Lipoxygenase
HPL	Hydroperoxide lyase
GLVs	Green leaf volatiles

Introduction

Hydroperoxide lyase (HPL) is an enzyme found in higher plants that is involved in a lipid oxidation pathway, called the lipoxygenase pathway, which is activated in response to wounds or pathogen attacks [1–4]. First, lipoxygenase (LOX) (EC 1.13.11.12) catalyzes regiospecific dioxygenation at the carbon 9 (9-LOX) or 13 (13-LOX) of C-18 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), mainly linoleic and α -linolenic acids, to form the corresponding fatty acid hydroperoxides [5]. Subsequently, HPL can act on these 9-hydroperoxides or 13-hydroperoxides of linoleic or linolenic acids (9-HPOD or 13-HPOD and 9-HPOT or 13-HPOT, respectively) to form C9-aldehydes or C6-aldehydes and C9-oxoacids or C12-oxoacids, respectively [6]. HPLs are described as heme enzymes and classified in the cytochrome P450 family, more particularly in two subfamilies according to their substrate specificity: CYP74B (13-HPLs) and CYP74C (9-HPLs and 9-HPLs/13-HPLs) [7–12].

Volatile C6-aldehydes and C9-aldehydes produced by HPLs and their corresponding alcohols are known as green leaf volatiles (GLVs) and are responsible for the fresh green odor of many fruits and vegetables [13, 14]. GLVs such as hexanal, 3Z-hexenal, and 2E-hexenal are associated to the “green note” odor that is of major importance in the fragrance and flavor industries [15]. They are also widely used in the food and beverage industry to restore the fresh green character lost during processing or to enhance food storage due to their antimicrobial activities [16]. Given the high demand for natural flavors, biocatalytic processes based on the LOX pathway were developed for large-scale production. Plant extracts are used as a source of LOX and HPL to convert vegetable oils chosen for their fatty acid profile into natural GLVs. If soybean flour is successfully used as LOX source, many plant extracts with HPL activities were tested: mint leaves [17], green bell pepper [18], or tomato leaves [19], or guava fruit [20, 21]. However, large amounts of raw materials are required, and HPLs are described as enzymes with low stability [22, 23], with activity that varies from plant to plant. In addition, crude extracts contain other enzymes that use fatty hydroperoxides, leading to undesired products and loss of substrate. The use of recombinant HPL in these biocatalytic processes could be an interesting choice to increase the availability of HPL and overcome these problems and environmental conditions (plant culture and harvesting period). This would allow selective and more efficient production of natural flavoring molecules.

For use in a bioconversion process that produces green note aldehydes, we recently isolated a complementary DNA (cDNA) encoding for HPL, named HPL full-length, from black olive fruit (*Olea europaea* L., Leccino variety), and then, we deleted the N-terminal transit peptide to produce the matured HPL. Both enzymes were expressed in *Escherichia coli* (M15), purified by affinity chromatography, and characterized biochemically. Their use in the bioconversion process showed that they are promising efficient biocatalysts [24]. However, the use of HPLs for bioconversion reactions is limited by their poor stability. The addition of selected chemical additives, including

salts, sugars/polyols, and polymers, is considered as an efficient mean for stabilizing enzymes as well as for enhancing their activities [25, 26]. The beneficial effect of several additives was attributed to their ability to counteract the forces that lead to enzyme denaturation and loss of activity, by modifying the enzyme's microenvironment and/or the molecular interactions between proteins and additives [25]. Various chemical compounds have been used to stabilize or enhance HPL activity, including glycerol [22, 23], salts such as NaCl and KCl [26–28], glycine [27, 28], dextran [28], Triton X-100 [22, 29], dithiothreitol [30], and β -mercaptoethanol [22].

In this study, we investigated the stabilization of olive recombinant HPLs (full-length and matured) with selected chemical additives. First, the stability of both HPLs during long-term storage (over 5 weeks) was evaluated at different temperatures (4, -20 , and -80 °C). The ability of glycerol as a cryoprotectant to preserve enzymatic activity was assayed. The influence of selected chemical compounds (KCl, NaCl, Na_2SO_4 , glycine, and glycerol) on recombinant HPLs (full-length and matured) activity was also investigated. Kinetic parameters for both enzymes as well as catalytic efficiency were determined and compared in the presence and absence of these additives. Finally, we evaluated the influence of these chemicals in the reaction mixture during the production of hexanal and 3Z-hexenal.

Material and Methods

Chemical Compounds

All chemical compounds used as additives (KCl, NaCl, Na_2SO_4 , glycine, and glycerol) as well as antibiotics, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), imidazole, benzamidine, DNase I, MgSO_4 , lysozyme, Triton X-100, δ -aminolevulinic acid, sodium phosphate monobasic and dibasic, bovine serum albumin (BSA), linoleic and linolenic acids, and soybean lipoxygenase, were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (Saint-Quentin Fallavier, France).

Generation of Recombinant HPL Full-Length and Matured HPL

Construction of the pQE-30 expression plasmids containing cDNAs encoding for the full-length olive 13-HPL (HPL full-length) or the olive 13-HPL with its chloroplast transit peptide deleted (matured HPL) is described in our previous work [24]. The recombinant plasmids (pQE-30-HPL full-length and pQE-30-matured HPL) were used to transform M15 *E. coli* cells.

Expression of recombinant proteins was performed as described previously [24]. Briefly, cells were grown to an OD_{600} of 0.6–0.8 before induction, and protein expression was induced by 0.5 mM IPTG in the presence of 2.5 mM δ -aminolevulinic acid during 48 h at 15 °C. After centrifugation at $7000\times g$ for 30 min at 4 °C, the pellet was resuspended in 20 mL of lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing 0.25 mg mL^{-1} lysozyme, 500 mM NaCl, and 0.1% Triton X-100) and frozen at -80 °C. After thawing, the lysis was continued by addition of 0.01 mg mL^{-1} DNaseI, 50 mM MgSO_4 , and 1 mM benzamidine. After incubation for 30 min at 4 °C, centrifugation at $12,000\times g$ for 30 min at 4 °C was performed, and the supernatant (soluble protein fraction) was collected. Purification of recombinant HPL was performed by affinity chromatography on an Äkta purifier (GE Healthcare Life Sciences). The soluble protein fraction (19 mL) was loaded onto cobalt resin (Talon® Super Flow Metal Affinity Resin, Clontech) with a bed volume of 1 mL. Resin was equilibrated with buffer A (50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing 300 mM NaCl). His-tagged olive recombinant HPL was eluted with buffer B

(200 mM imidazole in buffer A). Fractions showing HPL activity and containing pure protein on SDS-PAGE were pooled, dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer pH 7, and used in the various experiments in this study.

Preparation of 13-Hydroperoxides and HPL Enzymatic Assay

The 13-hydroperoxides of linoleic or linolenic acids were prepared as described by Vick [31] with the modifications as described previously [24]. Identification of products was performed by ^{13}C -NMR [32], and the concentration of hydroperoxide solutions was determined by measuring absorbance at 234 nm using the extinction coefficient of $\epsilon = 25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

HPL activity was determined at 25 °C by continuously monitoring the decrease of absorbance at 234 nm corresponding to the cleavage of the conjugated diene system of hydroperoxide by the enzyme. The standard 1 mL reaction mixture consisted of 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 and 10 μL of purified enzyme. The reaction was started by adding 43 μM hydroperoxide. One unit of HPL activity was defined as the amount of enzyme that converts 1 μmol of substrate per minute at 25 °C.

Long-Term Storage

HPL stability was studied over 5 weeks. Several aliquots of purified HPL full-length and matured HPL were stored at different temperatures (4, -20, -80 °C). Aliquots of purified HPL full-length and matured HPL containing various concentrations of glycerol (10, 20, 30, 40% v/v) were also prepared and stored at -20 and -80 °C. The enzyme activity of selected aliquots was measured every week.

Effect of Various Additives on HPL Activity

The influence of various additives including KCl, NaCl, Na_2SO_4 , glycine, and glycerol on HPL activity was investigated by varying their concentrations in the reaction mixture from 0 to 2 M for KCl, NaCl, and Na_2SO_4 and from 0 to 20% (w/v) for glycine and glycerol in phosphate buffer 50 mM pH 7.5. The effect of selected additives and their concentrations on HPL full-length and matured HPL activity was compared by one-way variance analysis. A Newman-Keuls test was used to establish differences between means (of three independent determinations of specific activity) at the 0.1% significance level ($p < 0.001$) for all variables studied. Calculations were performed using Statgraphics software (version Centurion XV.II, SIGMA plus, Neuilly sur Seine, France).

Effect of Selected Additives on Enzyme Kinetics

The kinetic parameters of HPL full-length and matured HPL were determined with 1 μg of pure protein in the presence or absence of a selected additive in the reaction buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5). For HPL full-length, the enzyme kinetics was measured over a range of substrate concentrations between 7 and 114 μM HPOD and 16 and 134 μM HPOT in phosphate buffer and 11 and 91 μM HPOD and 8 and 215 μM HPOT when supplemented with glycine (2.5% w/v) or NaCl (0.5 M). For matured HPL, the substrate concentrations were between 7 and 121 μM HPOD and 8 and 175 μM HPOT in phosphate buffer and 7 and 125 μM HPOD and 17 and 230 μM HPOT with Na_2SO_4 (0.25 M) or with NaCl (1 M). Kinetic parameters were calculated using the Michaelis-Menten model and Lineweaver-Burk plots.

HPL Inactivation in the Presence of Selected Additives

HPL inactivation was investigated by measuring HPL activity after incubation of the enzyme with selected additives (2.5% (w/v) glycine or 0.5 M NaCl for HPL full-length and 0.25 M Na₂SO₄ or 1 M NaCl for matured HPL) for different time periods (0, 5, 10, or 15 min). The inactivation rates were estimated by calculating the first-order inactivation constant (k) on semi-logarithm plots. The time required to decrease half of the initial HPL activity ($t_{1/2}$) was calculated using the following equation: $t_{1/2} = \ln(2) / k$.

Heme degradation during inactivation of HPL full-length and matured HPL was estimated by measuring their absorption spectrum after incubation for different time periods (0, 5, 10, or 15 min) in phosphate buffer pH 7.5, supplemented with 2.5% (w/v) glycine or 0.5 M NaCl for HPL full-length and 0.25 M Na₂SO₄ or 1 M NaCl for matured HPL.

Effect of Selected Additives on C6-Aldehyde Production

C6-aldehydes (particularly hexanal and 3Z-hexenal) were produced by the action of HPL full-length and matured HPL on 13-HPOD and 13-HPOT synthesized by soybean LOX as previously described [24]. The standard reaction was performed at 25 °C in 5 mL of 50 mM phosphate buffer pH 7.5 containing the selected amount of substrate (4 or 6 mM HPOD or HPOT). In order to evaluate the effect of additives on the production of volatile green notes, the phosphate reaction buffer was supplemented with 2.5% (w/v) glycine 0.5 M NaCl for “HPL full-length”-catalyzed reactions and 0.25 M Na₂SO₄ or 1 M NaCl for “matured HPL”-catalyzed reactions. The reaction was started by adding 0.5 U mL⁻¹ of enzyme. The mixture was distributed in closed tubes (1 mL total volume), and the reactions were stopped at different times (1, 5, 10, 15, 20 min) by acidification (pH 2) with 5 M HCl. The aldehydes that were produced were extracted with 3 × 200 μL dichloromethane. They were identified and quantified with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and GC-flame ionization detector (GC-FID), using the analytical equipment described previously [24]. Quantification was performed using external standard calibration. Calibration curves were built from solutions of hexanal, 2E-hexenal, and 3Z-hexenal prepared in dichloromethane at nine concentrations: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 mM. Experiments were carried out in triplicate. Peak integrations were performed with TurboChrom software (PerkinElmer, Walton, MA, USA). The results were expressed as mM. The quantification method was validated by higher correlation coefficients ($R^2 = 0.994$ for hexanal, $R^2 = 0.988$ for 2E-hexenal, and $R^2 = 0.985$ for 3Z-hexenal) for the calibration curves obtained with concentrations ranging from 0.5 to 8 mM. In addition, relative standard deviation under 5% confirms the reproducibility of the method.

Results and Discussion

Long-Term Storage

In order to preserve HPL activity during long-term storage, the purified recombinant enzymes, HPL full-length (71.15 ± 0.18 U mg⁻¹ protein on 13-HPOT) and matured HPL (56.89 ± 4.50 U mg⁻¹ protein on 13-HPOT), were stored under different conditions for 5 weeks. Different storage temperatures (4, -20, -80 °C) as well as the influence of

glycerol as cryoprotectant at various concentrations (0, 10, 20, 30, 40%, v/v) were assayed. The enzyme activity was measured every week (Fig. 1).

In the absence of glycerol, both HPLs were relatively stable for 5 weeks at 4 °C (Fig. 1a, b), since about 80 and 60% of HPL full-length and matured HPL specific activity remained, respectively. The HPL full-length can be stored for about 3 weeks at 4 °C without major loss of

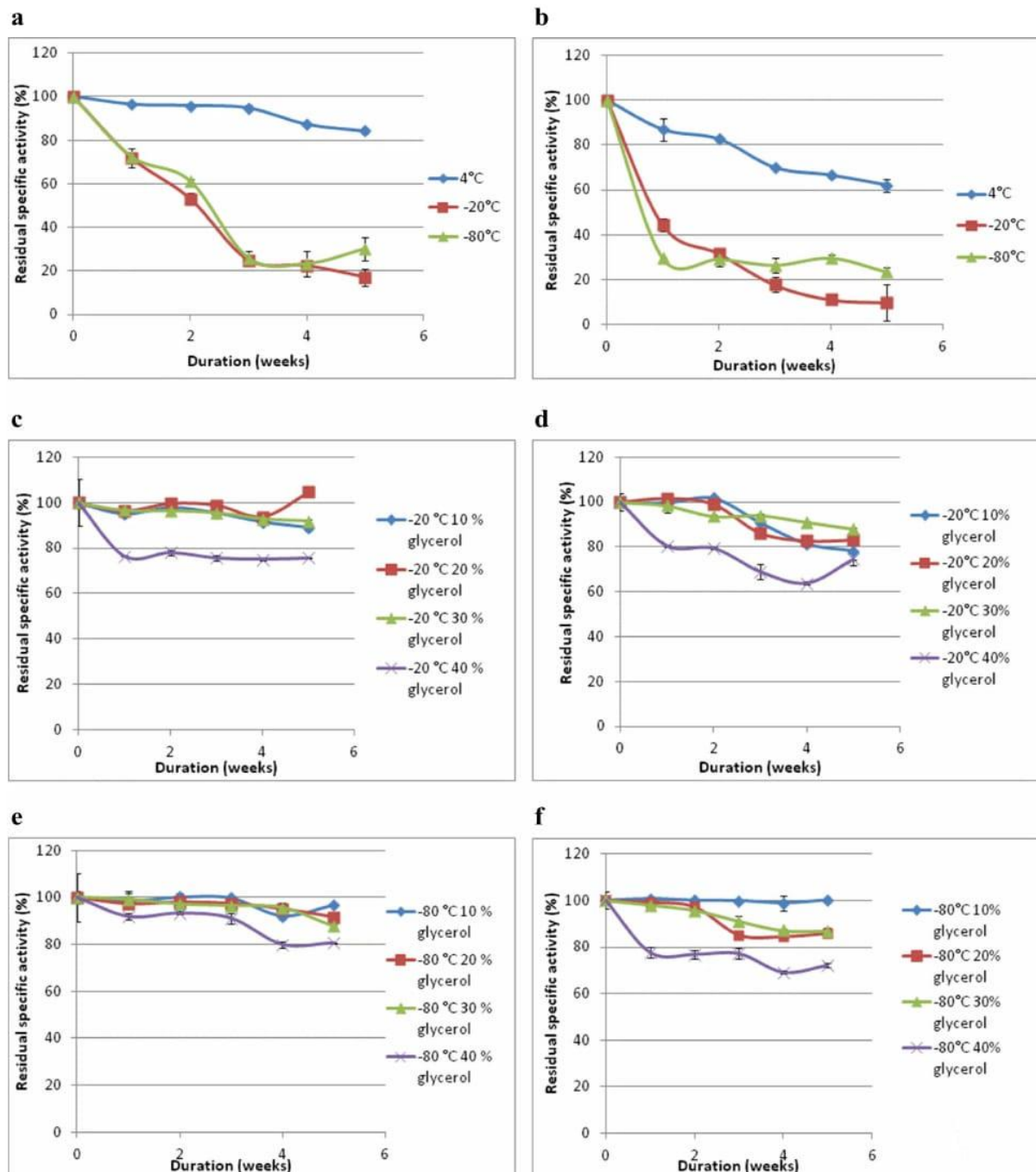


Fig. 1 Long-term stability of HPL full - length (a, c, e) and matured HPL (b, d, f). The enzymes were stored at different temperatures (4, -20, and -80 °C) without glycerol (a, b). The cryoprotective effect of glycerol at various concentrations (10, 20, 30, and 40% v/v) was studied during storage at -20 °C (c, d) and -80 °C (e, f). HPL activity was determined spectrophotometrically at 234 nm using 13-HPOT as a substrate. Residual specific activity was defined as the percentage of HPL specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) after storage (1–5 weeks) compared to that without storage (week 0). Relative percentage standard deviation was defined as the standard deviation of HPL triplicate samplings, divided by their respective means, multiplied by 100

activity (95% remaining activity), whereas more than 10% of matured HPL activity was lost in 1 week. Thus, the stability of HPL full-length appears better than that of matured HPL during storage at 4 °C and similar to that of recombinant HPL from alfalfa, which can be stored at 4 °C for 1 month without any significant loss of activity [33].

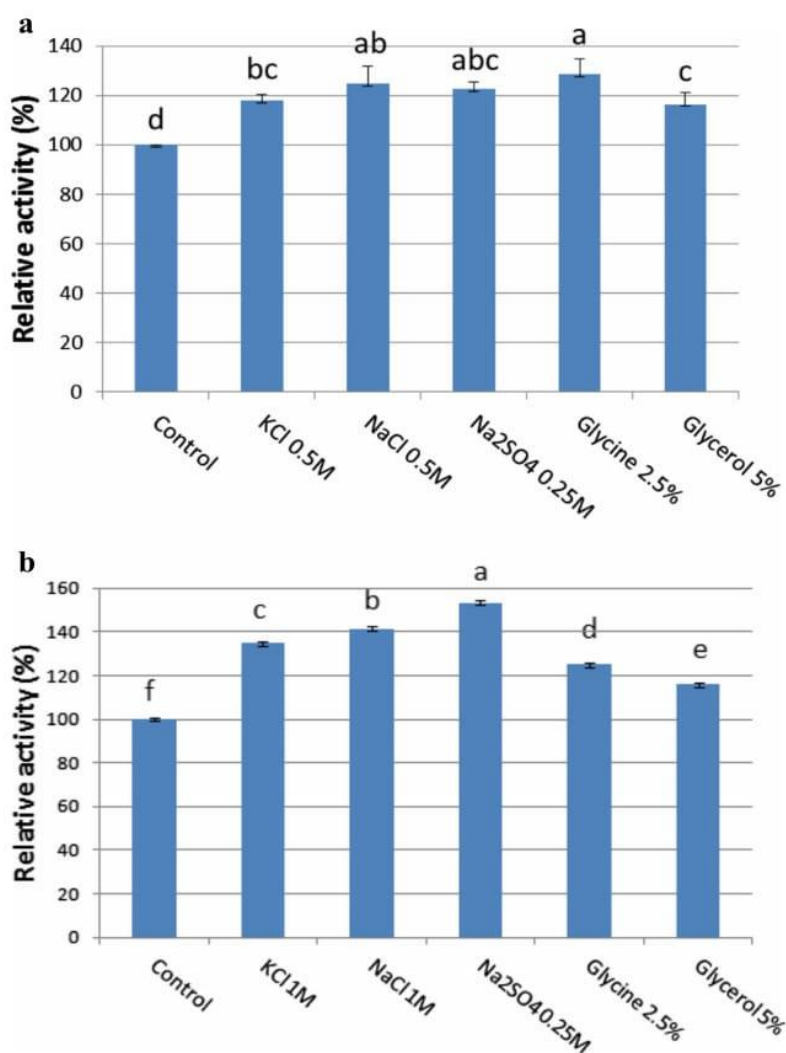
On the other hand, freezing without a cryoprotectant inactivated both enzymes rapidly. The enzyme activity was greatly reduced within 3 weeks for HPL full-length and within 1 week for matured HPL since only about 20% of the enzyme activity remained when they were stored at –20 or –80 °C (Fig. 1a, b). This loss of activity may be due to (i) stresses caused by freezing-thawing [33–35]; (ii) osmotic stresses during conversion of water into ice crystals which causes a progressive concentration (cryoconcentration) of unfrozen solutes as proteins, an increase of ionic strength which reduces protein solubility and destabilizes their structure by disrupting the salt bridges, and pH changes [35, 36]; and (iii) adsorption of proteins on the surface of ice crystals, causing surface denaturation through weakening of hydrophobic bonds and intermolecular hydrogen bonds [34, 37].

Addition of the stabilizer glycerol inhibits these changes in the protein environment and helps to preserve the protein's native structure. It maintains HPL in a liquid state during storage at temperatures below –20 °C, which helps to prevent damage to proteins during freezing and thawing [22, 23]. Moreover, glycerol is known to shift the native protein conformation to more compact states [38]. During storage at –20 and –80 °C, the activity of both HPLs was preserved in the presence of glycerol (Fig. 1c–f). Approximately 90 to 100% of HPL full-length activity was maintained over 5 weeks when the enzyme was stored at –20 or –80 °C in the presence of 10, 20, or 30% glycerol (Fig. 1c, e), and around 80 to 100% of matured HPL activity was preserved in the same conditions (Fig. 1d, f). Beneficial effects of glycerol on HPL storage have been already reported by Long et al. [23] for HPL from *A. tricolor* leaves. Its activity decreases by 62% when it was stored at –20 °C without glycerol during 30 days, whereas 58% of residual activity was retained in the presence of 40% glycerol. Our results suggest however that a lower concentration of glycerol (10 or 20%) is more beneficial for preserving HPL activity. As proposed by Vagenende et al. [38], glycerol, by acting as stabilizer on the hydrophobic surface regions of enzyme that are more sensitive to freezing, could limit protein aggregation by inhibiting protein unfolding. The ability to conserve the recombinant HPLs without loss of activity during 3 weeks at 4 °C or for a longer period (5 weeks) at –20 or –80 °C by adding 10% glycerol is an advantage for their potential use in an industrial bioprocess.

Effect of Selected Additives and their Concentrations on HPL Activity

Various additives, including glycine, glycerol, KCl, NaCl, and Na₂SO₄, were evaluated for their ability to preserve HPL activity during the enzymatic reaction (Supplemental data, Figs. S1–S3). The effect of various additives at their most effective concentration was compared (Fig. 2). Glycine (2.5% w/v), NaCl (0.5 M), and Na₂SO₄ (0.25 M) caused the largest significant increase in HPL full-length activity, with a maximum increase obtained with glycine (increase of 28.7% compared to the control without additive) (Fig. 2a). Akacha et al. [28] have previously reported that the addition of glycine (10% w/v) increased HPL specific activity in enzymatic extracts of mint leaves and suggested that glycine increases hydrophobic interactions. The experimental results also indicated that the most effective additive for matured HPL was Na₂SO₄ (0.25 M), which significantly increased the specific activity (increase of 53.2%) compared to the control without additives (Fig. 2b). Koeduka et al. [26] and Mu et al. [39] also showed that the activity of recombinant HPL from barley and potato,

Fig. 2 Effect of selected additives on HPL full-length (a) and matured HPL (b) specific activity. The enzymatic activity of HPL full-length was determined in 50 mM phosphate buffer pH 7.5 supplemented with NaCl, KCl, Na₂SO₄, glycine, or glycerol at the concentration that caused the highest increase in HPL activity. Relative specific activity was defined as the percentage of HPL specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) in the presence of the additive compared to that of the control (without additive). Relative percentage standard deviation was defined as the standard deviation of HPL triplicate samplings, divided by their respective means, multiplied by 100. Bars with different letters at the top are significantly different ($p < 0.001$)



respectively, was greatly enhanced in the presence of high concentrations of monovalent cations (such as the sodium and potassium contained in NaCl, KCl, and Na₂SO₄) and proposed salt effects on enzyme conformation including arrangements surrounding the heme.

Effect of Selected Chemical Compounds on Kinetic Parameters

Kinetic parameters were determined from Michaelis-Menten plots in the absence or presence of a selected chemical that caused the two highest increases in activity (Fig. 2): 2.5% (w/v) glycine or 0.5 M NaCl for HPL full-length and 0.25 M Na₂SO₄ and 1 M NaCl for matured HPL. The presence of additives increased the *k_{cat}* values of both enzymes towards 13-HPOD, whereas the *K_m* values were not affected (Table 1). For HPL full-length, the turnover was increased 1.6-fold and 5.1-fold in the presence of glycine (2.5% w/v) and NaCl (0.5 M), respectively, while for matured HPL, the turnover was increased 2.6-fold and 4.1-fold in the presence of Na₂SO₄ (0.25 M) and NaCl (1 M), respectively. Additives also increased the *k_{cat}* values of matured HPL towards 13-HPOT and had very little effect on HPL full-length (Table 1). For matured HPL, the turnover was increased 2.1-fold and 1.7-fold in the presence of Na₂SO₄ (0.25 M) and NaCl (1 M), respectively, whereas the HPL full-length *k_{cat}* values were quite similar in the presence or in the absence of additives. Furthermore, additives did not seem to affect the *K_m* values of both enzymes towards 13-HPOT, excepted NaCl at 1 M,

Table 1 Kinetic parameters of HPL full - length (a) and matured HPL (b) in the presence or absence of selected additive

Substrates		Km (μM)	Vm (nmol s^{-1})	kcat (s^{-1})	kcat/Km ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
a					
13-HPOD	Control ^a	43.1 \pm 4.5	0.5 \pm 0.0	26.4 \pm 3.0	0.6
	Control ^a + 2.5% (w/v) glycine	64.4 \pm 1.7	0.8 \pm 0.0	42.0 \pm 1.2	0.7
	Control ^a + 0.5 M NaCl	58.6 \pm 7.0	2.5 \pm 0.0	133.9 \pm 1.2	2.3
13-HPOT	Control ^a	152.8 \pm 10.4	10.4 \pm 0.7	565.0 \pm 36.9	3.7
	Control ^a + 2.5% (w/v) glycine	137.3 \pm 5.5	10.8 \pm 0.2	587.4 \pm 12.0	4.3
	Control ^a + 0.5 M NaCl	258.3 \pm 43.0	10.6 \pm 0.8	579.0 \pm 41.0	2.2
b					
13-HPOD	Control ^a	43.2 \pm 7.9	0.3 \pm 0.0	17.9 \pm 0.5	0.4
	Control ^a + 0.25 M Na ₂ SO ₄	61.3 \pm 8.3	0.9 \pm 0.0	46.9 \pm 1.4	0.8
	Control ^a + 1 M NaCl	65.3 \pm 10.9	1.4 \pm 0.0	73.2 \pm 2.1	1.1
13-HPOT	Control ^a	173.9 \pm 27.7	7.7 \pm 0.1	402.6 \pm 3.7	2.4
	Control ^a + 0.25 M Na ₂ SO ₄	243.2 \pm 41.0	16.0 \pm 0.6	843.3 \pm 31.3	3.5
	Control ^a + 1 M NaCl	449.1 \pm 45.6	13.4 \pm 0.6	701.6 \pm 31.9	1.6

Values are means of triplicates \pm standard deviation

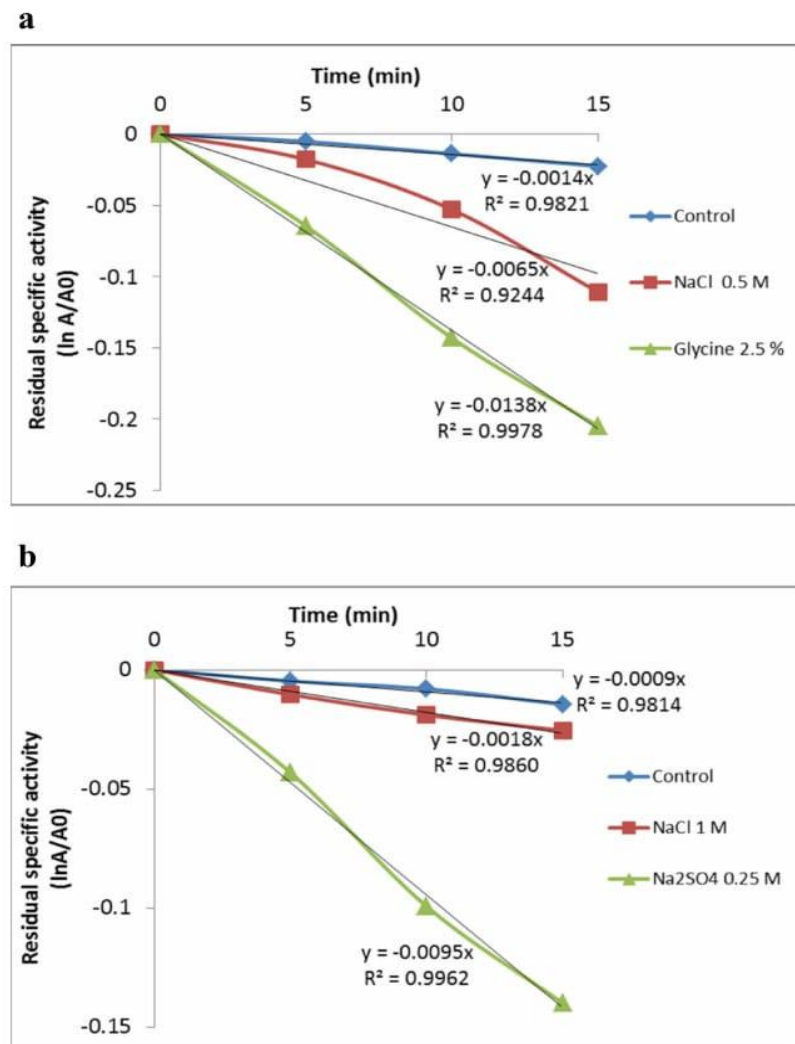
^a Values of control were determined with 50 mM phosphate buffer pH 7.5

which induces a small increase in the Km value of matured HPL. The data suggest that these additives exert their effect on the enzymes themselves, rather than on partition of the substrates in the enzyme's microenvironment, with the exception of 1 M NaCl, which appears to decrease the affinity of matured HPL towards 13-HPOT; this result may be due to an effect on the binding of 13-HPOT in the active site of matured HPL and/or on partition of 13-HPOT in the microenvironment of the matured HPL [26, 28].

HPL Inactivation in the Presence of Selected Additives

The effect of chemical compounds that induced the highest increase in HPL activity (i.e., glycine, NaCl, Na₂SO₄) on HPL full-length and matured HPL inactivation was investigated by determining the inactivation kinetics of both enzymes in the presence and absence of the selected additives (Fig. 3). Results showed that the chemical compounds tested inactivated both enzymes (Fig. 3a, b). Glycine (2.5% w/v) and Na₂SO₄ (0.25 M) led to a greater loss of specific activity of HPL full-length and matured HPL, respectively. The semi-logarithmic plots of the inactivation kinetics were straight lines, with correlation coefficient (R^2) values in the range of 0.92–0.99. These results indicate that HPL inactivation in the presence and absence of additives followed first-order kinetic behavior. The first-order inactivation constant (k) and the half-life ($t_{1/2}$) of both HPLs were calculated (Tables 2 and 3). The presence of 2.5% (w/v) glycine in HPL full-length extract resulted in a 10-fold increase of k value compared to the control and a decrease in the $t_{1/2}$ value of the HPL full-length from 8.9 to 0.8 h (50 min) (Table 2). In the presence of 0.25 M Na₂SO₄, the k value of matured HPL was 10-fold higher than the control and the $t_{1/2}$ value of the matured HPL was 1.2 h (Table 3). The addition of NaCl in HPL extracts (0.5 M in HPL full-length extract and 1 M in matured HPL extract) resulted in slower inactivation of the enzymes compared to the inactivation observed in the presence of glycine or Na₂SO₄ (Tables 2 and 3). Inactivation of HPL full-length and matured HPL in the presence of additives was not caused by the degradation of prosthetic heme, since the absorption spectra of HPL full-length and matured HPL in the absence and presence of

Fig. 3 Inactivation kinetics of HPL full - length in the presence of 2.5% (w/v) glycine or 0.5 M NaCl (a) and matured HPL in the presence of 0.25 M Na₂SO₄ or 1 M NaCl (b). **a** Inactivation kinetics of HPL full - length was evaluated at 25 °C in 50 mM phosphate buffer at pH 7.5 in the absence (blue diamonds) or presence of 0.5 M NaCl (red squares) or 2.5% (w/v) glycine (green triangles). **b** Inactivation kinetics of matured HPL was evaluated at 25 °C in 50 mM phosphate buffer at pH 7.5 (blue diamonds) or the presence of 1 M NaCl (red squares) or 0.25 M Na₂SO₄ (green triangles). A₀ and A are the HPL specific activity (μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) at time zero and at time *t* (5, 10, or 15 min), respectively



selected additives were similar (supplemental data, Fig. S4). This HPL inactivation can be explained by a spatial arrangement, modulated by the additives which affect either the heme's surroundings or the entire protein [26, 40]. Nevertheless, the addition of selected chemicals is still relevant due to the short duration of HPL action in biocatalytic processes (2 to 20 min) [24, 41] and because they induce a strong increase in HPL activity. For example, NaCl (0.5 M) induces a 25% increase in HPL full-length activity at time zero and a loss of less than 10% after 15 min.

Table 2 Inactivation of HPL full - length in the presence of 2.5% (w/v) glycine or 0.5 M NaCl

HPL full - length	Control ^a	Control ^a + 2.5% (w/v) glycine	Control ^a + 0.5 M NaCl
<i>k</i> ^b	0.0013 (±0.0002)	0.0136 (±0.0007)	0.0054 (±0.0019)
<i>t</i> _{1/2} ^c (h)	8.8816	0.8486	2.1384

Values are means of triplicates ± standard deviation

^a Values of control were determined with 50 mM phosphate buffer pH 7.5

^b The inactivation constant (*k*) was calculated using the following equation: $\ln(A/A_0) = -k \times t$ (min), where A₀ and A are the HPL specific activities (μmol min⁻¹ mg⁻¹ protein), respectively, at initial time and time *t* (5, 10, or 15 min)

^c The half-life time (*t*_{1/2}) is defined as the time after which only 50% of the HPL activity remain and was calculated as follows: $t_{1/2} = \ln(2) / k$

Table 3 Inactivation of matured HPL in the presence of 0.25 M Na₂SO₄ or 1 M NaCl

matured HPL	Control ^a	Control ^a + 0.25 M Na ₂ SO ₄	Control ^a + 1 M NaCl
k^b	0.0009 (±0.0001)	0.0093 (±0.0006)	0.0019 (±0.0002)
$t_{1/2}^c$ (h)	12.8301	1.2421	6.1130

Values are means of triplicates ± standard deviation

^a Values of control were determined with 50 mM phosphate buffer pH 7.5

^b The inactivation constant (k) was calculated using the following equation: $\ln(A/A_0) = -k \times t$ (min), where A_0 and A are the HPL specific activities ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein), respectively, at initial time and time t (5, 10, or 15 min)

^c The half-life time ($t_{1/2}$) is defined as the time after which only 50% of the HPL activity remain and was calculated as follows: $t_{1/2} = \ln(2) / k$

Effect of Selected Additives on C6-Aldehyde Production

The influence of selected additives present in HPL extracts on C6-aldehyde production was then investigated. Hexanal production using HPL full-length and matured HPL in the presence of additives was assayed first (Table 4). Based on previously reported results [24], we chose to perform the reactions with 0.5 U mL⁻¹ of HPL full-length and 6 mM of 13-HPOD or 0.5 U mL⁻¹ of matured HPL and 4 mM of 13-HPOD, both in the absence and presence of additives. Data showed that increasing concentrations of hexanal were achieved in the presence of NaCl. In fact, 5.67 ± 0.38 mM of hexanal was produced by HPL full-length in the presence of 0.5 M NaCl, corresponding to a molar conversion rate of 94.5 ± 6.4%, and 3.56 ± 0.1 mM of hexanal was produced by matured HPL in the presence of 1 M NaCl, corresponding to a molar conversion rate of 88.9 ± 2.4%. No significant differences were observed in experiments performed in the presence of glycine (2.5% w/v) or Na₂SO₄ (0.25 mM) compared to control. Optimal conditions were obtained with HPL full-length in the presence of 0.5 M NaCl, and they allowed production of an equivalent quantity of hexanal and an equivalent molar conversion rate to those obtained in the previously described conditions (6 mM 13-HPOD and 1 U mL⁻¹ of HPL full-length) [24], while decreasing by 2.5-fold the amount

Table 4 Production of hexanal from 13-HPOD using HPL full - length or matured HPL in the presence of additives

	Recombinant HPL (U mL ⁻¹)	13-HPOD (mM)	Hexanal (mM)	Molar conversion rate (%)	Optimum reaction time (min)
HPL full - length					
Control	0.5	6	5.02 ± 0.05	83.7 ± 0.8	15
+ Glycine (2.5%)	0.5	6	5.20 ± 0.57	86.7 ± 9.5	20
+ NaCl (0.5 M)	0.5	6	5.67 ± 0.38	94.5 ± 6.4	10
Matured HPL					
Control	0.5	4	2.74 ± 0.10	68.6 ± 2.6	10
+ Na ₂ SO ₄ (0.25 M)	0.5	4	3.06 ± 0.26	76.6 ± 6.6	15
+ NaCl (1 M)	0.5	4	3.56 ± 0.1	88.9 ± 2.4	10

Values represent the mean of two independent replicates ± standard deviation. Reactions were performed with various concentrations of 13-HPOD in 1 mL of reaction mixture (phosphate buffer 50 mM, pH 7.5, in the presence or absence of additives and incubated at 25 °C) during an optimum reaction time. After extraction, hexanal were identified and quantified by GC-MS and GC-FID

Table 5 Production of 3Z-hexenal from 13-HPOT using HPL full - length or matured HPL in the presence of additives

	Recombinant HPL (U mL ⁻¹)	13-HPOT (mM)	3Z-hexenal (mM)	Molar conversion rate (%)	Optimum reaction time (min)
	HPL full - length				
Control	0.5	6	4.39 ± 0.38	73.2 ± 6.4	15
+ Glycine (2.5%)	0.5	6	2.13 ± 0.20	35.5 ± 3.3	5
+ NaCl (0.5 M)	0.5	6	3.19 ± 0.25	53.2 ± 4.1	15
	Matured HPL				
Control	0.5	4	1.80 ± 0.05	45.1 ± 1.3	15
+ Na ₂ SO ₄ (0.25 M)	0.5	4	2.68 ± 0.16	67.0 ± 4.0	15
+ NaCl (1 M)	0.5	4	2.35 ± 0.16	58.7 ± 3.9	20

Values represent the mean of two independent replicates ± standard deviation. Reactions were performed with various concentrations of 13-HPOT in 1 mL of reaction mixture (phosphate buffer 50 mM, pH 7.5, in the presence or absence of additives and incubated at 10 °C) during an optimum reaction time. After extraction, 3Z-hexenal were identified and quantified by GC-MS and GC-FID

of HPL full-length used. Addition of selected additives in the reaction mixture turns out to be advantageous in terms of the results obtained, which may be considered as good since the yields reported in the literature range from 25 to 86% [17, 42–44].

The production of 3Z-hexenal from 13-HPOT by the action of HPL full-length or matured HPL in the presence of additives was investigated in a same way as production of hexenal from 13-HPOD (Table 5). Addition of 2.5% (w/v) glycine or 0.5 M NaCl in the HPL full-length reaction mixture led to the production of 2.13 ± 0.20 and 3.19 ± 0.25 mM of 3Z-hexenal, respectively, corresponding to a molar conversion rate of 35.5 ± 3.3 and 53.2 ± 4.1%. The 3Z-hexenal concentration was smaller than control without additives (4.39 ± 0.38 mM, molar conversion rate of 73.3 ± 6.4%). However, in the presence of glycine, 2E-hexenal was detected (0.69 ± 0.02 mM). Glycine in the reaction mixture appears to promote the isomerization of 3Z-hexenal to 2E-hexenal. The amount of hexenals (3Z-hexenals and 2E-hexenals) produced in the presence of glycine was 2.82 ± 0.22 mM, corresponding to a molar conversion rate of 47.01 ± 3.65%. The biotransformation of 4 mM of 13-HPOT by 0.5 U mL⁻¹ of matured HPL in the presence of 0.25 M Na₂SO₄ or 1 M NaCl led to the production of 2.68 ± 0.16 and 2.35 ± 0.16 mM of 3Z-hexenal, respectively, corresponding to molar conversion rates of 67.0 ± 4.0 and 58.7 ± 3.9%. In these experiments, greater amounts of 3Z-hexenal were produced compared to control, while decreasing the amount of enzyme used by 1.5-fold.

Conclusion

Olive recombinant HPLs were activated and stabilized by the addition of chemical additives. Results indicated that glycine or NaCl and Na₂SO₄ or NaCl are appropriate chemical additives for HPL full-length activity and matured HPL activity, respectively. Based on the *k* values and the results of C6-aldehyde production assays, NaCl appears to be the most appropriate chemical additive for hexenal production with HPL full length and matured HPL and for 3Z-hexenal production with matured HPL. Overall findings of this study could be of interest for the potential use of olive recombinant HPLs in biocatalytic production processes of selected green leaf volatiles.

Acknowledgements This work has been supported by the “Collectivité Territoriale de Corse” and the Commission of European Communities, EuroTrans-Bio 2009-94, “Biocatalyzed synthesis of fragrances.” The authors thank Dr. Athel Cornish-Bowden and Dr. María Luz Cárdenas for valuable discussion about kinetic parameters of enzymes and Dr. Patrick Paquet for valuable discussion about the paper.

References

- Bate, N. J., & Rothstein, S. J. (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal*, *16*, 561–569.
- Blee, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, *7*, 315–322.
- Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*, 274–280.
- Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, *13*, 727–739.
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, *53*, 275–297.
- Stumpe, M., & Feussner, I. (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, *5*, 347–357.
- Matsui, K., Shibutani, M., Hase, T., & Kajiwara, T. (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Letters*, *394*, 21–24.
- Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. (2001). Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome p450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem*, *2*, 494–504.
- Tijet, N., Schneider, C., Muller, B. L., & Brash, A. R. (2001). Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *386*, 281–289.
- Mita, G., Quarta, A., Fasano, P., De Paolis, A., Di Sansebastiano, G. P., Perrotta, C., Iannacone, R., Belfield, E., Hughes, R., Tsesmetzis, N., Casey, R., & Santino, A. (2005). Molecular cloning and characterization of an almond 9-hydroperoxide lyase, a new CYP74 targeted to lipid bodies. *Journal of Experimental Botany*, *56*, 2321–2333.
- Hughes, R. K., De Domenico, S., & Santino, A. (2009). Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *Chembiochem*, *10*, 1122–1133.
- Padilla, M. N., Hernandez, M. L., Perez, A. G., Sanz, C., & Martinez-Rivas, J. M. (2010). Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *58*, 5649–5657.
- Hatanaka, A., Kajiwara, T., & Sekiya, J. Fatty acid hydroperoxide lyase in plant tissues, in *Biogeneration of Aromas*. 1986, American Chemical Society. p. 167–175.
- Hatanaka, A. (1993). The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, *34*, 1201–1218.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant Journal*, *54*, 712–732.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., & Gardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology*, *15*, 201–208.
- Gargouri, M., Drouet, P., & Legoy, M. D. (2004). Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves. Volatile C6-aldehyde production from hydroperoxy-fatty acids. *Journal of Biotechnology*, *111*, 59–65.
- Nemeth, A. S., Marczy, J. S., Samu, Z., Hager-Veress, A., & Szajani, B. (2004). Biocatalytic production of 2(E)-hexenal from hydrolysed linseed oil. *Enzyme and Microbial Technology*, *34*, 667–672.
- Schade, F., Thompson, J., & Legge, R. (2003). Use of a plant-derived enzyme template for the production of the green-note volatile hexenal. *Biotechnol and Bioengineering*, *84*, 265–273.
- Muller, B., Gautier, A., Dean, C., & Kuhn, J. C. (1995) Process for the enzymatic preparation of aliphatic alcohols and aldehydes from linoleic acid, linoleic acid, or a natural precursor. Firmenich S.A.
- Whitehead, I. M., Slusarenko, A. J., Waspi, U., Gaskin, D. J. H., Brash, A. R., & Tijet, N. (2004). *Guava (Psidium guajava) 13-hydroperoxide lyase and uses thereof*. Firmenich SA: Vanderbilt University, The University of Zurich.
- Suurmeijer, C. N., Perez-Gilabert, M., van Unen, D. J., van der Hijden, H. T., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. (2000). Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase. *Phytochemistry*, *53*, 177–185.

23. Long, Z., Kong, X., Zhang, C., & Hua, Y. (2010). Stability of hydroperoxide lyase activity from *Amaranthus tricolor* (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves: influence of selected additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*, 729–734.
24. Jacopini, S., Mariani, M., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Gambotti, C., Vincenti, S., Desjobert, J.-M., Muselli, A., Costa, J., Berti, L., & Maury, J. (2016). Olive recombinant hydroperoxide lyase, an efficient biocatalyst for synthesis of green leaf volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *179*, 671–683.
25. Gianfreda, L., & Scarfi, M. R. (1991). Enzyme stabilization: state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *100*, 97–128.
26. Koeduka, T., Stumpe, M., Matsui, K., Kajiwara, T., & Feussner, I. (2003). Kinetics of barley FA hydroperoxide lyase are modulated by salts and detergents. *Lipids*, *38*, 1167–1172.
27. Hall, C. E., Karboune, S., Florence, H., & Kermasha, S. (2008). Stabilization of an enzymatic extract from *Penicillium camemberti* containing lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities. *Process Biochemistry*, *43*, 258–264.
28. Akacha, N. B., Karboune, S., Gargouri, M., & Kermasha, S. (2010). Activation and stabilization of the hydroperoxide lyase enzymatic extract from mint leaves (*Mentha spicata*) using selected chemical additives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*, 901–911.
29. Noordermeer, M. A., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. (2001). Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation. *FEBS Letters*, *489*, 229–232.
30. Fukushige, H., & Hildebrand, D. F. (2005). Watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase greatly increases C6 aldehyde formation in transgenic leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 2046–2051.
31. Vick, B. A. (1991). A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids*, *26*, 315–320.
32. Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J., & Berti, L. (2006). Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*, 450–454.
33. Hanafusa, N. (1972) Denaturation of enzyme protein by freezing-thawing and freeze-drying of myosin and some other muscle proteins. Institute of low temperature science Hokkaido University. 1–20.
34. Cao, E., Chen, Y., Cui, Z., & Foster, P. R. (2003). Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, *82*, 684–690.
35. Singh, S. K., Kolhe, P., Wang, W., & Nema, S. (2009). Large-scale freezing of biologics. *Bioprocess International*, *7*, 32–44.
36. Kolhe, P., Amend, E., & Singh, S. K. (2010). Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. *Biotechnology Progress*, *26*, 727–733.
37. Chang, B. S., Kendrick, B. S., & Carpenter, J. F. (1996). Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *85*, 1325–1330.
38. Vagenende, V., Yap, M. G. S., & Trout, B. L. (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, *48*, 11084–11096.
39. Mu, W., Xue, Q., Jiang, B., & Hua, Y. (2012). Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of *Solanum tuberosum* hydroperoxide lyase. *European Food Research and Technology*, *234*, 723–731.
40. Matsui, K., Miyahara, C., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V., & Kajiwara, T. (2000). Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *64*, 1189–1196.
41. Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.-L., Wathelet, J.-P., Du Jardin, P., & Thonart, P. (2010). The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnology Agronomy and Society and Environment*, *14*, 451–460.
42. Márczy, J. S., Németh, Á. S., Samu, Z., Háger-Veress, Á., & Szajáni, B. (2002). Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxide lyase enzymes. *Biotechnology Letters*, *24*, 1673–1675.
43. Noordermeer, M. A., Van Der Goot, W., Van Kooij, A. J., Veldsink, J. W., Veldink, G. A., & Vliegthart, J. F. (2002). Development of a biocatalytic process for the production of c6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4270–4274.
44. Rabetafika, H. N., Gigot, C., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Destain, J., Du Jardin, P., Wathelet, J.-P., & Thonart, P. (2008). Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes. *Biotechnology Letters*, *30*, 1115–1119.

Supplemental data

Activation and stabilization of olive recombinant 13-hydroperoxide lyase using selected additives

Sabrina Jacopini, Sophie Vincenti, Magali Mariani, Virginie Brunini-Bronzini de Caraffa, Claude Gambotti, Jean-Marie Desjobert, Alain Muselli, Jean Costa, Félix Tomi, Liliane Berti¹, Jacques Maury

Figures S1-S3

Figure S1. Effect of salt concentration on the specific activity of HPL full-length (A, C, E) and matured HPL (B, D, F)

Figure S2. Effect of glycine and glycerol concentration on the specific activity of HPL full-length (A and C) and matured HPL (B and D)

Figure S3. Effect of selected additives and their concentrations on HPL activity

Figure S4. Absorption spectrum of HPL full-length (A, C, E) and matured HPL (B, D, F) in the absence (A and B) and presence of selected additives (C-F)

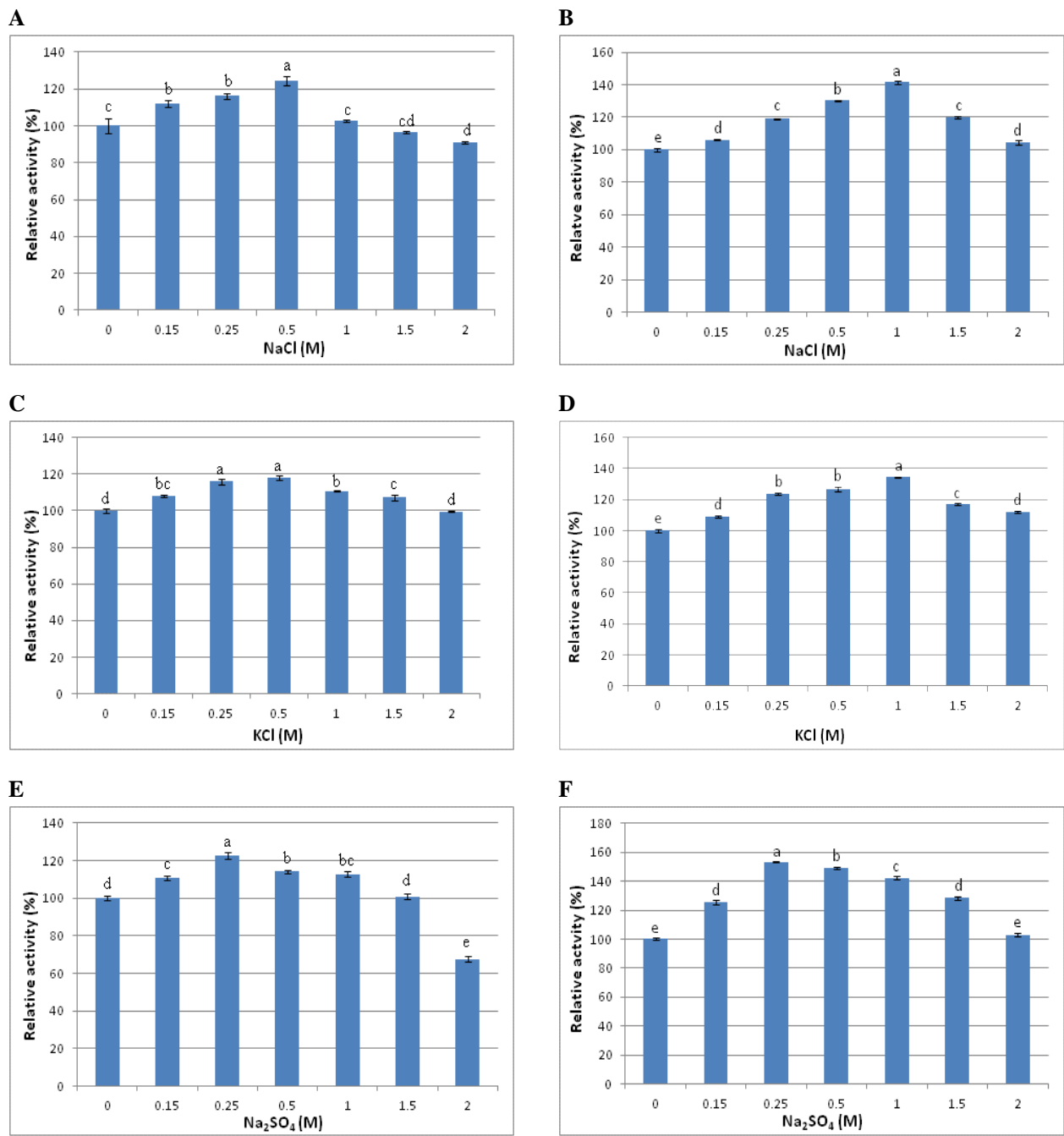


Figure S1. Effect of salt concentration on the specific activity of HPL full-length (A, C, E) and matured HPL (B, D, F)

The enzymatic activity was determined in the presence of NaCl (A and B), KCl (C and D) or Na₂SO₄ (E and F) at concentrations ranging from 0 to 2 M. Relative specific activity was defined as the percentage of HPL specific activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) in the presence of the salt compared to that of the control condition (without salt). Relative percentage standard deviation was defined as the standard deviation of HPL triplicate samplings, divided by their respective means, multiplied by 100. Bars with different letters at the top are significantly different ($p<0.001$).

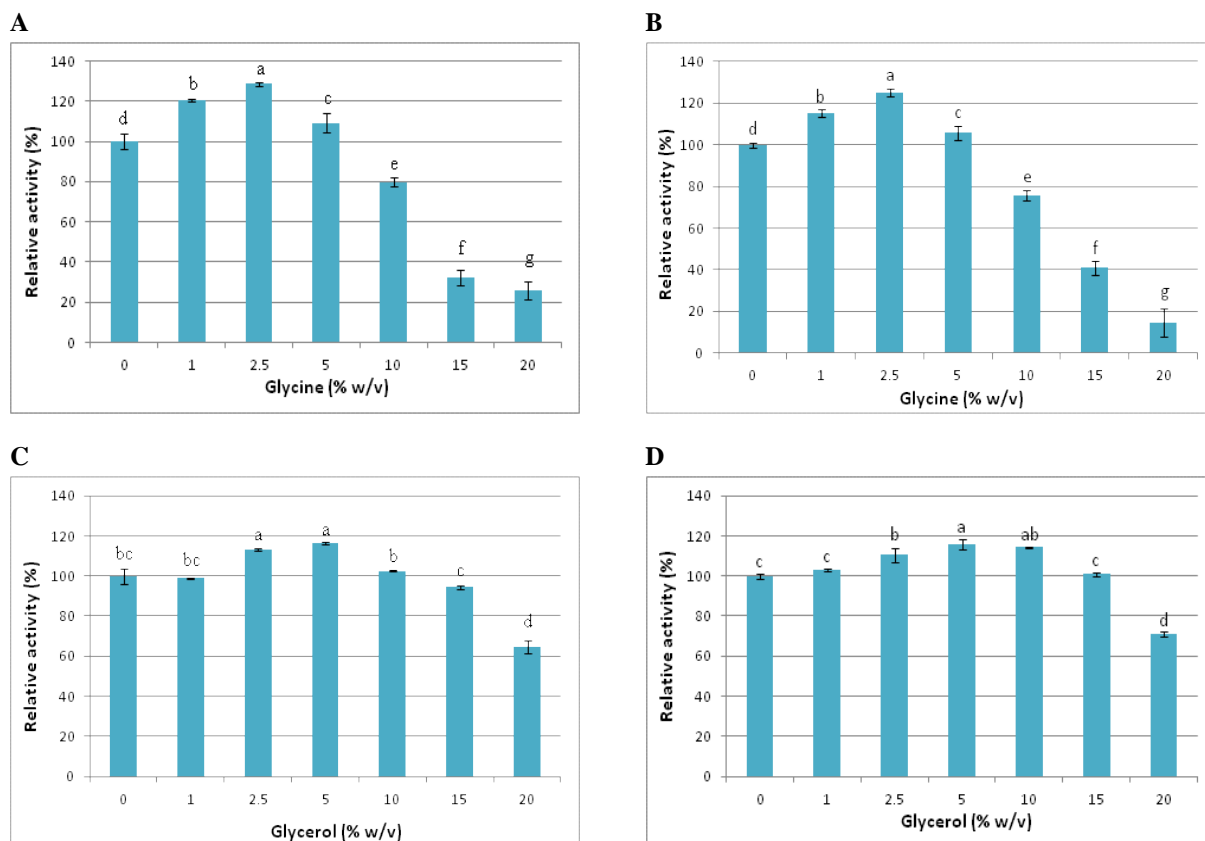


Figure S2. Effect of glycine and glycerol concentration on the specific activity of HPL full-length (A and C) and matured HPL (B and D)

The enzymatic activity was determined in the presence of glycine (A and B), or glycerol (C and D) at concentrations ranging from 0 to 20 % (w/v). Relative specific activity was defined as the percentage of the HPL specific activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) in the presence of the additive compared to that of the control condition (without additive). Relative percentage standard deviation was defined as the standard deviation of HPL triplicate samplings, divided by their respective means, multiplied by 100. Bars with different letters at the top are significantly different ($p < 0.001$).

Effect of selected additives and their concentrations on HPL activity

The effect of different salts (KCl, NaCl, Na₂SO₄) at concentrations ranging from 0 to 2 M on the activity of both recombinant HPLs was evaluated (Figure S1). Increasing the salt concentration led to an increase of HPL full-length enzymatic activity to a maximum of 24.5% with 0.5 M NaCl, 18% with 0.5 M KCl and 22.6% with 0.25 M Na₂SO₄ (Figure S1A, S1C and S1E). In the same way, addition of salts in the reaction mixture increased matured HPL activity to a maximum of 41.5% with 1 M NaCl, 33% with 1 M KCl and 53.2% with 0.25 M Na₂SO₄ (Figure S1B, S1D and S1F). The use of higher salt concentrations resulted in a decrease in the activity of both HPLs. Thus, the results showed that salts had a significant impact on HPL activity but this effect appeared to be dependent on salt concentration. The effect of salt concentration on enzyme activity may be due to the well-known salt effect on the solubility of proteins in aqueous solutions [1-5]: a small amount of salt increases aqueous protein solubility (“salting-in” effect), whereas a large amount of salt decreases aqueous protein solubility (“salting-out” effect). At low concentrations, salt ions shield the surface charges, and bring with them their solvation layer, thereby weakening the attractive forces between individual protein molecules (such forces can lead to aggregation and precipitation) and increasing the enzyme’s solubility. When the salt concentration is increased, competition between the salt ions and protein molecules to bind water leads to a decrease in the number of water molecules available to interact with the charged part of the protein. Many ions attract water molecules to form their own solvation layer and strip off the water shell surrounding the enzyme molecules, which is essential for the enzyme’s activity and solubility. The protein–protein interactions are then stronger than the solvent–solute interactions, thus proteins can aggregate by forming hydrophobic interactions with each other. The threshold value of the transition between these two opposing effects varies depending on the nature of the salt, enzyme, and pH of the buffer used. As shown with salts, the effect of glycine and glycerol on HPL specific activity was also dependent on their concentration (ranging from 0 to 20% w/v) (Figure S2). When glycine was added, a significant increase of the enzymatic activity of both enzymes was observed at concentrations of 1, 2.5 and 5% (w/v), with a maximum activity at 2.5% glycine which increased the activity by 28.7% for HPL full-length and 25.1% for matured HPL (Figure S2A and S2B). However, the activity was greatly reduced at concentrations of 10% and especially 15% and 20% (w/v). For glycerol, maximal activity was

noted at a concentration of 5% (w/v) which resulted in an increase in activity of 16.4% for HPL full-length and 15.9% for matured HPL (Figure S2C and S2D).

Figures S3. Effect of selected additives and their concentrations on HPL activity

References

1. Arakawa, T. & Timasheff, S. N. (1982). Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, 21, 6545-6552.
2. Collins, K. D. (2004). Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, 34, 300-311.
3. Ruckenstein, E. & Shulgin, I. L. (2006). Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126, 97-103.
4. Yang, Z., Liu, X.-J., Chen, C., & Halling, P. J. (2010). Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 821-828.
5. Duong-Ly, K. C. & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*, 541, 85-94.