

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
UNIVERSITE DE LIEGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

# **Développement d'un procédé biotechnologique de production de molécules à note verte à partir de feuilles de betteraves**

Cédric GIGOT

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade  
de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs : Thonart Philippe, Ongena Marc

2011



COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
UNIVERSITE DE LIEGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

# **Développement d'un procédé biotechnologique de production de molécules à note verte à partir de feuilles de betteraves**

Cédric GIGOT

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade  
de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs : Thonart Philippe, Ongena Marc

2011

Gigot Cédric (2011) Développement d'un procédé biotechnologique de production de molécules à notes vertes à partir de feuilles de betteraves. Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech, -p. :154, - tabl. : 26, - fig. : 69

Résumé: La grande richesse des feuilles de betterave en 13-HPL (entre 10 et 12 UE<sup>1</sup>/g de poids frais), une enzyme produisant le (3Z)-hexénol, le (2E)-hexénal et le n-hexanal, fait de ce substrat un candidat potentiel pour le développement d'un procédé biotechnologique de production d'arômes alimentaires. Maillon essentiel du système de défense des plantes, l'enzyme 13-HPL est inductible par des stimuli externes et son expression dépend de l'âge et de l'état physiologique de la plante. Au cours de ce travail, l'optimisation de l'expression de cette enzyme au sein du végétal a été étudiée préalablement au développement d'un procédé industriel visant à exploiter ce substrat. Ce procédé comprend successivement quatre opérations chimiques : une hydrolyse d'huile végétale riche en acides gras insaturés, une oxydation de ces acides, un clivage par les 13-HPLs et une purification des aldéhydes et des alcools synthétisés. Selon nos résultats, l'étape limitante de ce procédé est la synthèse d'aldéhydes qui présente, dans des conditions optimales de réaction, une capacité de production maximale de 0,502mM à l'échelle pilote (100L). L'inhibition suicide par le substrat et l'instabilité combinée de l'enzyme et de ces produits de réaction réduisent le taux de clivage des aldéhydes. La mise au point d'un système d'extraction des arômes volatils par flux gazeux et d'une alimentation fed-batch en substrat permet de réduire l'impact limitant de ces facteurs et d'accroître la capacité de production à 1,37mM. Afin de mieux comprendre les mécanismes réactionnels, l'enzyme 13-HPL de la betterave a été séquencée et clonée dans un vecteur procaryote permettant de disposer d'une source d'activité enzymatique indépendante des contraintes du milieu extérieur. L'utilisation de ces techniques a permis de développer un procédé bivalent (à la fois de source microbienne et végétale) de production d'arôme exploitable au sein de l'industrie alimentaire.

Gigot Cédric (2011) Development of a biotechnological production of green leaf volatiles using sugar beet leaves. Gembloux, Belgium University of Liege – Gembloux Agro-Bio Tech -p. :154, - tabl. : 26, - fig. : 69

Summary: Sugar beet leaves, as unvalued biomaterials, has a huge valorization potential within the development of an original synthesis of natural aromatic compounds. The essential wealth of this bioresource is the high 13-HPL activity (10-12 UE<sup>1</sup>/g) measured in the leaf lamina. This enzyme cleaves 13-HPOs (a fatty acid derivat) into C<sub>6</sub>-aldéhydes, such as (3Z)-hexenal, (2E)-hexenal and n-hexanal, three widespread flavor molecules. Physiologically this enzyme is involved in plant defense; its expression is regulated upon external aggressions and depends on the stress nature, the age and the condition of the plant. In this thesis, HPL enzymatic levels are optimized within the plant to develop an industrial production process designed to guarantee a complete exploitation of the leaves. This process is divided in four steps: linseed oil hydrolyzation, fatty acids oxidation, aldehydes synthesis and purification. The critical phase of this process is the HPOs conversion into aldehydes by HPL; this step presents low production capacity levels at pilot scale (100L): 0,502mM. This result is essentially caused by the suicidal inhibition behavior of the HPL and the dual instability of the enzyme as well as the final products. Adaptation of a gas extraction module and a fed-batch substrate inlet increase the production capacity to 1,37mM reaching decent industrial concentrations. Furthermore, sugar beet HPL was sequenced and expressed in a prokaryote vector to increase enzymatic levels and to provide an alternative source of HPL free of enzyme contaminant and not depending on external conditions. Both techniques, microbial and vegetal source of enzymes, allow developing a bivalent production of food approved aromas at pilot scale.

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.

---

<sup>1</sup> 1UE correspond à une  $\mu$ mole d'hydroperoxyde d'acide gras dégradé par seconde

# Remerciements

---

Avant d'entrer dans le vif du sujet, j'écris ces quelques lignes dédiées à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Tout d'abord, pour être original, je vais remercier le Pr. Philippe Thonart alias « le chef » de m'avoir confié les clés du service de bio-industrie pour que je puisse y réaliser ma thèse de doctorat, de m'avoir toujours soutenu et d'avoir apporté sa vision concrète et judicieuse tout au long de mes recherches. Je pourrais ajouter le fait d'avoir pu supporter ma ponctualité matinale à variance élevée, mais je suppose que mon arrivée en trombe et mon opérationnalité immédiate comblaient cette mauvaise habitude. Je pense également à remercier Marc Ongena, grand gourou de la recherche scientifique et copromoteur de ma thèse, distillateur notamment de conseils et d'idées. Signalons surtout que ses conseils m'ont permis de passer les différentes échéances et présentations FRIA \*finger in the noze!\*. Je tiens également à particulièrement remercier Marie-Laure Fauconnier, qui pourrait être élevée au rang de co-promotrice, pour les multiples conseils et aides qu'elle m'a apportés ; ainsi que pour les coups de fil réguliers pour s'informer de l'avancement du travail. Elle m'a transmis sa pugnacité et m'a considérablement rassuré en portant de l'intérêt à mon travail. Enfin, je souligne également que mon travail a été rendu possible grâce au soutien financier de la région Wallonne.

Je profite également pour remercier dès à présent les membres de mon jury et de mon comité de thèse : le Pr. Philippe Thonart (promoteur), le Pr. Michel Crine, le Pr. Carlos Sanz (rapporteur externe), le Pr. Jean-Paul Wathelet, le Pr. Michel Paquot, le Pr. Patrick Du Jardin, Marie Laure Fauconnier et Marc Ongena (co-promoteur).

J'adresse un message particulier aux « déjà – docteurs » qui m'ont montré la voie à suivre pour aboutir au bout de ce travail. Ce sont mes exemples qui m'ont inspiré pour ce travail, ils m'ont aidé à nager dans l'imbroglie administratif qu'entraîne le fait d'être un « vieil » étudiant. La Fac de Gembloux avec sa dimension familiale m'a permis de faire des rencontres enrichissantes avec ses gens que j'apprécie, je pense surtout à Gilbert et Brigitte qui m'ont convaincu de devenir doctorant. Je pense aussi à mes camarades de classe Annick, Benoit, Maud, Nadège, Kevin, Thomas que j'ai plaisir à revoir le plus souvent possible, je leur souhaite beaucoup de réussite dans leur thèse ou dans les travaux qu'ils ont entamés !

Je pense également à mes collègues de bureau de la biologie végétale, où j'avais un statut de réfugié politique assumé. Dans ce bureau, où les conseils très détaillés et la bonne humeur de Catherine ont considérablement raccourci mes journées, d'ailleurs cette jeune fille avait tellement peur que je parte qu'elle m'enfermait dans le bureau. Je tiens aussi à saluer miss Benini pour toutes les cochonnetés qu'ont pu faire et pour m'avoir autorisé à la racketter systématiquement sur le temps de midi, un moindre mal par rapport aux heures que j'ai presté à ... Gros Smack à la pintade, à son originalité et à sa bonne humeur communicative qui la rendent incontournable, et également au marcassin pour tous ses coups sournois, à ce sujet j'ai d'ailleurs encore des clichés compromettants. Je pense aussi à Pat, à sa version revisitée de « I'm too sexy », et à l'aide précieuse qu'il m'a apportée pour mes expériences, mais également à Momo Daly pour les discussions footballistiques et scientifiques ainsi qu'à Pierre toujours de bon conseil et garde-fou de tout ce petit monde. Je remercie aussi Gaëlle et Virginie. Une énorme pensée va également au personnel de bio-industries, surtout à mes potes Sam, Benoit et Coco, avec

qui j'apprécie travailler et digresser, à tous nos bricomontages, aux bières qu'on a mises dans nos panses, aux musiques qu'on a partagées, aux coups de grisou... gageons qu'on restera toujours en contact. Je pense aussi à Margue et à Marina, grandes gestionnaires du CWBI et qui m'ont facilité toutes les tâches administratives. Je suis ravi d'avoir pu intégrer si facilement ce paysage multiculturel, je suis navré de ne pas citer tout le monde, mais j'aurais trop peur d'oublier quelqu'un !

Aussi je pense particulièrement à mes séjours dans le service de chimie générale, à Danny et Vincent, plus drôles que Chevalier et Laspales, et scientifiquement très impliqués dans la recherche, sans doute ont-ils déjà chacun plusieurs doctorats à leur actif, à Monsieur Wathelet pour sa gentillesse et sa disponibilité. J'ai également pu réaliser quelques expériences scientifiques au Centre Wallon de Recherches Agronomiques de Gembloux, au sein duquel j'ai rencontré Alain Bultreys qui m'a conseillé et qui m'a soutenu pour réaliser les expériences d'ISR, ainsi que Yordan, mon « sauveur », alors que je perdais espoir au sujet de mes essais de séquençage, le protocole que Yordan m'a proposé a été redoutablement efficace et m'a permis d'obtenir ce gène si récalcitrant. À ce sujet, je remercie également JC Twizere et Aurélie avec qui j'ai pu réaliser mon clonage et la sélection des souches recombinantes utilisées au sein de ce travail.

Je pense aussi à tous mes potes, qui n'ont cessé de me vanner avec ce titre de docteur, d'ingénieur agricole ou de vieil étudiant. À leur « c'est quand que tu présentes », « on va venir te vanner », « et sinon après y a à boire ? », « Bon ça ! Et à bouffer ? »... Ils ont cru que je ne présenterais jamais, ou que je mitonnais et qu'en réalité j'étais au chômage, ...

Finalement je pense à mes parents, à leur soutien inébranlable tout au long de ce travail, pour la relecture du texte et pour avoir entendu mes multiples plaintes sur ce même sujet. Je suis tellement chanceux d'avoir été gâté par ma famille. Je remercie marraine Jaja qui, infiltrée au sein du CWBI, m'a beaucoup aidé et m'a donné la motivation de réaliser ce travail. Et si je peux dédier ce travail ce serait à mes grands parents, et plus particulièrement à parrain Louis, comme ses enfants avant moi nous sommes très fiers d'avoir réussi à l'Institut !

# Tables des Matières

---

1 : Etude bibliographique de la synthèse des molécules à notes vertes et description des bioressources .....	18
1.1. La betterave et l'industrie betteravière .....	18
1.1.1. Origine et culture de la betterave .....	18
1.1.2. La valorisation des sous-produits de la betterave.....	19
1.2. Les molécules à note verte.....	21
1.2.1. Nature des arômes .....	21
1.2.2. Les molécules à note verte.....	21
1.2.3. Utilisation des GLVs .....	22
1.3. La voie de synthèse des oxylipines.....	23
1.3.1. Les GLVs : une classe d'oxylipines volatiles.....	23
1.3.2. La lipoxygénase chez les plantes .....	24
1.3.3. Les enzymes de la famille CYP74.....	27
1.3.4. Enzymes impliquée dans les modifications de structure des GLVs.....	34
1.4. Le rôle physiologique des GLVs .....	35
1.4.1. Impacts de ces molécules sur leur environnement.....	35
1.4.2. Implication des GLVs dans le « signalling and plant defense » .....	36
1.5. La production industrielle de GLVs.....	39
1.5.1. Introduction.....	39
1.5.2. La synthèse chimique de GLVs .....	40
1.5.3. La production de GLVs naturels .....	40
2 : Objectif de la thèse de doctorat.....	44
2.1. Préliminaires et objectif initial .....	44
2.2. Extraction brute des GLVs .....	44
2.3. Etude des niveaux de précurseurs et d'enzymes en vue de l'adaptation d'un procédé biotechnologique. ....	44
2.4. Développement de solutions alternatives aux ressources limitées présentes dans les feuilles de betteraves. ....	45
2.5. L'élaboration d'un procédé industriel.....	45
2.6. L'optimisation du procédé .....	45
2.7. Le scale-up.....	46
3. Matériel et Méthodes .....	49
3.1. Caractérisation de la feuille de betterave .....	49

3.1.1. Collecte et broyage des feuilles de betterave .....	49
3.1.2. Lyophilisation des feuilles de betteraves .....	49
3.1.3. Analyse de la matière sèche dans les feuilles de betteraves .....	49
3.1.4. Dosage des protéines .....	49
3.1.5. Teneur des feuilles en GLVs.....	50
3.1.6. Teneur des feuilles de betteraves en matière grasse. ....	51
3.1.7. Fractionnement de la matière grasse.....	52
3.1.8. Évaluation des teneurs en oxylipines .....	52
3.1.9. Dosage de l'activité lipase .....	54
3.1.10. Dosage de l'activité lipoxygénase.....	54
3.1.11. Dosage de l'activité HPL .....	55
3.1.12. Dosage de l'activité allène oxyde synthase.....	56
3.1.13. Dosage de l'activité alcool déshydrogénase .....	56
3.2. Stimulation de la production d'HPL et ISR .....	57
3.2.1. Mise en culture des betteraves.....	57
3.2.2. Stress des plantules .....	57
3.2.3. Expériences d'ISR.....	57
3.3. Analyse biomoléculaire .....	58
3.3.1. Extraction de l'ARN total .....	58
3.3.2. Transformation de l'ARNm en ADNc.....	58
3.3.3. PCR d'identification .....	58
3.3.3. RACE-PCR.....	59
3.3.4. Clonage du gène <i>BvHPL</i> .....	59
3.3.5. Sélection des souches productrices de protéine 6-HIS .....	60
3.3.6. Production d'enzymes recombinantes.....	60
3.4. Production industrielle de GLVs .....	61
3.4.1. Hydrolyse enzymatique de l'huile de lin .....	61
3.4.2. Hydrolyse alcaline de l'huile de lin .....	62
3.4.3. Oxygénation des acides gras .....	62
3.4.4. Synthèse des aldéhydes .....	63
3.4.5. Downstream Processing.....	63
4 : La betterave en tant que source de GLVs .....	65
4.1. Le point sur la valorisation des substrats végétaux en tant que source de GLVs dans l'industrie. .....	65

4.2. Les substrats de GLVs dans la feuille de betterave .....	65
4.2.1. Composition générale de la feuille de betterave .....	65
4.2.2. Teneur en GLVs.....	66
4.2.3. Teneur en Molécule grasse .....	67
4.2.4. Teneur en oxylipines .....	70
4.3. Les enzymes impliquées dans la synthèse des GLVs .....	73
4.3.1. L'activité lipase .....	73
4.3.2. L'activité LOX .....	74
4.3.3. L'activité des enzymes de la famille CYP74s .....	74
4.3.4. L'activité ADH .....	80
4.4. Bilan général des teneurs en substrats et en enzymes .....	80
4.4.1. Teneur en précurseurs de GLVs .....	80
5 : Enrichissement de la feuille en activité HPL.....	83
5.1. Généralités .....	83
5.2. Augmentation des teneurs en acides gras libres .....	83
5.3. Modification du rapport enzymatique entre AOS et HPL .....	84
5.4. Induction de résistance systémique et implication sur le système enzymatique.....	86
5.5. Bilan général sur la stimulation de l'activité HPL .....	87
6 : Production de GLVs : améliorations technologiques .....	89
6.1. Schéma général .....	89
6.2. Synthèse du substrat de la LOX.....	89
6.2.1. Choix du substrat.....	89
6.2.2. Mise au point de la méthode d'hydrolyse.....	91
6.3. Synthèse des hydroperoxydes.....	92
6.3.1. Sélection de la source de lipoxygénase.....	92
6.3.2. Synthèse d'hydroperoxydes à l'aide de la 13-LOX de soja.....	93
6.4. Production de GLVs .....	94
6.4.1. Synthèse de C <sub>6</sub> -aldéhydes à l'aide de 13-HPL (v.1.0) .....	94
6.4.2. Mise au point de la méthode de récupération des produits .....	101
6.4.3. Purification des C <sub>6</sub> -aldéhydes par distillation.....	103
6.4.4. Description du système de production .....	104
7 : Production de GLVs : Utilisation d'HPL recombinante .....	108
7.1. Identification de la 13-HPL de la feuille de betterave.....	108
7.1.1. Screening des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des GLVs .....	108

7.2. Séquençage de BvHPL par RACE-PCR .....	109
7.3. Clonage de BvHPL.....	112
7.4. Production de 13-HPL recombinante .....	113
7.5. Production de C <sub>6</sub> -aldéhydes à l'aide de 13-HPL recombinante.....	114
7.5.1. Comparaison de trois 13-HPLs issues de végétaux différents.....	114
7.6.2. Comparaison des clones producteurs d'HPLs .....	115
7.7. Discussion .....	116
8. Discussion générale .....	118
8.1. Préambule .....	118
8.2. La feuille de betterave : source d'enzymes ou de substrats ? .....	118
8.2.1. Localisation et réactions initiales .....	118
8.2.2. Formation et disponibilité des oxylipines .....	118
8.2.3. Teneur initiale en GLVs et synthèse in vivo.....	120
8.3. L'élaboration d'un procédé industriel de GLVs .....	121
8.3.1. La betterave : plante de contraste entre richesse et pauvreté.....	121
8.3.2. Enrichissement de feuilles de betteraves .....	121
8.3.3. Le procédé industriel de A à Z.....	122
8.3.4. Synthèses à l'aide d'HPLs recombinantes .....	127
8.3.5. Exploitation des résultats .....	128
9. Perspectives.....	129
9.1. L'extension du procédé industriel envisageable à d'autres substrats végétaux ?.....	129
9.2. L'instabilité de l'HPL : Un obstacle incontournable ?.....	129
9.3. HPLs recombinantes : l'avenir de la production d'arômes GLVs naturels ?.....	129
9.4. Quelle dimension de scale-up pour la production de GLVs ? .....	130

# Liste des abréviations

<b>Dérivés d'acide gras linoléique (*D) ou linoléique (*T)</b>	
<b>KOD-KOT</b>	Keto-acide
<b>EAD-EAT</b>	Epoxy-hydroxy acide
<b>HOD-HOT</b>	Hydroxyde d'acide gras
<b>9-HPOD</b>	Acide (10Z,12E)-9-hydroperoxy-octadecadiénoïque
<b>9-HPOT</b>	Acide (10E,12Z,15Z)-9-hydroperoxy-octadecatriénoïque
<b>13-HPOD</b>	Acide (9Z,11E)-13-hydroperoxy-octadecadiénoïque
<b>13-HPOT</b>	Acide (9Z,11E,15Z)-9-hydroperoxy-octadecatriénoïque
<b>13-HPOE</b>	Acide (7Z,10Z,12E)-13-hydroperoxyhexadecatriénoïque
<b>C18:2</b>	Acide (9Z,12Z)-octadecadiénoïque
<b>C18:3</b>	Acide (9Z,12Z,15Z)-octadecatriénoïque
<b>OPDA</b>	Acide cis-12-oxo-phytodiénoïque
<b>HPOD-HPOT</b>	Hydroperoxyde d'acides gras
<b>Enzymes impliquées dans la voie de Lipoxygénase</b>	
<b>LOX-*</b>	Lipoxygénase
<b>*-HPL</b>	Hydroperoxyde Lyase
<b>DES</b>	Divynil Ether Synthase
<b>*-AOS</b>	Allène Oxyde Synthase
<b>AOC</b>	Allène Oxyde Cyclase
<b>GLV</b>	Green Leaf Volatile / Molécule à Note Verte
<b>ADH</b>	Alcool Déshydrogénase
<b>GLase</b>	Galactolipase
<b>PLase-*</b>	Phospholipase
<b>AAT</b>	Alcool Acyl Transférase
<b>PXG</b>	Péroxygénase
<b>RED</b>	Réductase
<b>EAS</b>	Epoxy-Alcool Synthase
<b>ISO</b>	Isomérase
<b>Technique d'analyse</b>	
<b>SPME</b>	La Micro Extraction en Phase Solide
<b>PDMS</b>	Polydiméthylsiloxane
<b>GCMS</b>	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>FID</b>	Ionisation de Flamme
<b>HPLC</b>	Chromatographie Liquide à Haute Performance
<b>SPE</b>	L'Extraction en Phase Solide
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RACE</b>	Protocole pour une amplification rapide des extrémités ADN
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulfate - électrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>TPM</b>	Tour par minutes
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince

<b>Famille de composés ou molécules chimiques</b>	
<b>NL</b>	Lipides Neutres
<b>TG</b>	Triglycérides
<b>SE</b>	Ester de stérol
<b>S</b>	Stérol
<b>MG</b>	Monoglycérides
<b>DG</b>	Diglycérides
<b>FA</b>	Acides gras libres
<b>LIPase</b>	Lipase
<b>ISR</b>	Résistance Systémique Induite
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediamine tétra-acétique
<b>ARN(m)</b>	Acide ribonucléique (messenger)
<b>ADN(c)</b>	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
<b>LB</b>	Lysogeny Broth
<b>TB</b>	Terrific Broth
<b>AGPI</b>	Acide Gras PolyInsaturé
<b>GL</b>	Galactolipide
<b>PL</b>	Phospholipide
<b>Divers</b>	
<b>PGPR</b>	bactéries de la rhizosphère bénéfiques à la croissance de la plante
<b>OMC</b>	Organisation Mondiale du Commerce

# Liste des figures

Figure 1 : Répartition de la production mondiale de betteraves selon la « Foods and Agriculture Organization » ( <a href="http://faostat.fao.org">http://faostat.fao.org</a> ) en 2008.....	18
Figure 2 : Organigramme de la valorisation des sous-produits de la betterave sucrière.....	20
Figure 3 : Illustration de la synthèse des oxylipines à partir des galactolipides (GL) et des phospholipides (PLA) de la membrane cellulaire.....	24
Figure 4 : Description des quatre hydroperoxydes pouvant être produits par l'oxydation stéréospécifique catalysée par les 9-LOX et 13-LOX sur l'acide linoléique et l'acide linoléique .....	25
Figure 5 : Mécanisme réactionnel détaillé de la réaction de la LOX végétale d'après Baysal (Baysal et Demirdoven 2007).....	26
Figure 6 : A la suite de l'hydrolyse des galactolipides et des phospholipides par une phospholipases, les hydroperoxydes produits par la LOX sont hydratés en allènes oxydes très instables par l'AOS et ensuite cyclisé par l'AOC en acide cis-12-oxo-phytodienoïque (OPDA).....	29
Figure 7 : Formation des divinyl-éthers par l'action de la DES selon un mécanisme à la fois homolytique et hétérolytique proposé par Grechkin.....	30
Figure 8 : Mécanisme du clivage hétérolytique des hydroperoxydes par l'hydroperoxyde lyase chez les plantes supérieures (Delcarte et al. 2000). .....	32
Figure 9 : Vue d'ensemble de la production des GLVs à partir des quatre isomères d'hydroperoxyde d'acide gras. ....	33
Figure 10 : Transformation d'un aldéhyde en alcool par l'intermédiaire d'ADH et de la réduction du cofacteur..	34
Figure 11 : Réaction chimique catalysée par l'AAT .....	35
Figure 12 : Illustration du mécanisme de défense contre les larves d'insectes d'après Matsui et al, 2006. La larve consomme le feuillage de la plante, ce qui provoque la synthèse de GLVs. Une partie de ces GLVs diffuse directement dans la plante et provoque une répulsion du ravageur. La volatilité des GLVs permet d'étendre ce système de défense à des plantes proches.....	36
Figure 13 : Mécanisme de défense mis en place au sein de la cellule de plante, cible d'une blessure ou d'une attaque de pathogènes d'après Blée (Blee 2002).....	38
Figure 14 : Vue schématique de la production industrielle de GLVs naturels .....	40
Figure 15 : Plan de développement de la recherche scientifique sur la synthèse des GLVs à partir de feuilles de betteraves. ....	47
Figure 16 : Distillation semi-pilote Normschliff Geratebeau Wertheim .....	64
Figure 17 : Chromatogramme GC-MS obtenu après l'extraction Lickens Nikerson d'un échantillon de 2 grammes de feuilles de betteraves (Étalon interne : Octanal ; Solvant d'extraction : éther).....	66
Figure 18 : Comparaison d'un spectrogramme SPME (à gauche) et de GC-FID (à droite) concernant l'analyse des molécules volatiles extraites du broyage à froid de feuilles de betteraves (1. Hexanal, 2. (2Z)-hexénal, 3. (3Z)-hexénal, 4. (2E)-hexénal).....	67
Figure 19 : Mesures gravimétriques (moyenne de trois essais, en % de Poids frais) de la matière grasse totale extraite à l'aide de trois méthodes d'extraction différentes). ....	68
Figure 20 : Chromatographie sur couche mince des phospholipides extraits de feuilles de betteraves .....	68
Figure 21 : Dosage gravimétrique des fractions grasses après séparation par SPE des extraits Folch.....	69
Figure 22: Chromatogramme type du profil en acide gras de feuilles de betteraves des fractions triglycérides, phospholipides et acides gras libres (Standard Interne : Acide décaheptanoïque C <sub>17:0</sub> ).....	69
Figure 23 : Profil en acides gras réalisé par GC-FID (Standard Interne : acide decaheptadecanoïque C <sub>17:0</sub> ) .....	70
Figure 24 : analyse HPLC des HPOs et des HOs non estérifiés présents dans le limbe <span style="color:blue">■</span> et les tiges <span style="color:red">■</span> de feuilles de betteraves (nmol/g de poids frais) (SI: 13-γ-HOT).....	71
Figure 25 : analyse HPLC des HPOs et des HOs estérifiés présents dans le limbe <span style="color:blue">■</span> et les tiges <span style="color:red">■</span> de feuilles de betteraves (nmol/g de poids frais) (SI: acide riconoléique).....	71

Figure 26 : analyse HPLC des HPOs et des HOs non estérifiés présents dans le limbe de feuilles de betteraves fraîches ■ ou stockées 8 mois à -20°C ■ (nmol/g de poids frais) (SI: 13-γ-HOT).....	72
Figure 27 : Analyse HPLC des HPOs et des HOs estérifiés présents dans le limbe de feuilles de betteraves fraîches ■ ou stockées 8 mois à -20°C ■ (nmol/g de poids frais) (SI:acide riconoleique).....	73
Figure 28 : Moyennes de trois mesures spectrométriques de l'activité de dégradation des hydroperoxydes (UE/g de poids frais) dans les feuilles de betteraves ■ et de tomates ■ selon l'isomère HPO servant de substrat. ....	74
Figure 29 : Moyennes de mesures chromatographiques de l'activité HPLs ■ de feuilles de betteraves (gauche) ou de feuilles de tomates (droite). L'activité AOS ■ est déduite d'après les mesures concernant l'activité CYP74 totale. Les 4 isomères d'HPOs substrats sont étudiés pour cette mesure d'activité. ....	75
Figure 30 : Activité HPL (substrat : 13-HPOT) de différentes de variétés de betteraves, les caractéristiques de ces variétés sont reprises à l'aide de symboles : * variétés résistantes à la rhizomanie, ° variétés de culture hâtive, ^ variétés fourragères destinées à l'alimentation animale et " variétés à haut rendement en sucre. Les mesures sont réalisées au 1 septembre sur des betteraves cultivées en serres depuis 3 mois. ....	76
Figure 31 : Mesure moyenne de l'activité HPL (UE/G de PF) de mars à décembre sur des plants de betteraves cultivés en champs ( variété : Anastasia KWS).....	77
Figure 32 : Mesure de la teneur o en acide linoléique (μmol/G de PF), Δ en 13-HPOT (nmol/G de PF) et en □ (3Z)-Hexenal (nmol/g de PF) au cours de la saison sur des plants de betteraves en champs (variété : Anastasia KWS).....	77
Figure 33 : Évolution de l'activité HPL au cours d'un stockage d'une période de 28 jours sur des feuilles de betteraves, les échantillons concernent des feuilles sur plantes vivantes non récoltées ◇, ou des feuilles conservées à 4°C □ ou à -20°C Δ (sable limoneux, variété : Anastasia KWS) .....	78
Figure 34: Évolution de l'activité HPL (UE/g de PF) sur les 13-HPOD □ et 13-HPOT ◇ selon le pH du milieu de réaction .....	79
Figure 35 : Évolution de l'activité HPL (UE/g de PF) sur le 13-HPOT selon la température de réaction. ....	79
Figure 36: Vitesse moyenne de la réaction enzymatique (μmol/min) selon la teneur en 13-HPOT (mM) durant les deux premières minutes de réaction. ....	79
Figure 37 : Bilan général de la voie de l'HPL au sein de la feuille de betterave.....	81
Figure 38: Niveaux moyens d'acide linoléique libre dans le limbe de feuilles de betteraves ciblées par des essais de stimulation .....	84
Figure 39 : Niveaux moyens d'activité HPL par rapport à une plante contrôle non stressée (à laquelle correspond un niveau d'activité de 100%) dans les feuilles de betteraves soumises à différents stress .....	85
Figure 40 : Niveaux moyens d'activité AOS par rapport à une plante contrôle non stressée (à laquelle correspond un niveau d'activité de 100%) dans les feuilles de betteraves soumises à différents stress .....	85
Figure 41 : Évolution du coefficient K <sub>f</sub> à la suite de différents essais de stimulations.....	86
Figure 42: Pourcentage de plants de betterave âgée de 4 semaines présentant une extension des zones d'infections par <i>Pseudomonas syringae aptata</i> .....	86
Figure 43 : Niveaux moyens d'activité AOS ou HPL par rapport à des plantes contrôles (à laquelle correspond un niveau d'activité de 100%) chez les feuilles de betteraves préalablement mises en contact avec <i>Pseudomonas putida BTP1</i> et soumises à une infection par le pathogène <i>Pseudomonas syringae aptata</i> .....	87
Figure 44 : Vue générale du procédé industriel de production de C6-GLVs à partir de feuilles de betteraves.....	90
Figure 45 : Profil en acide gras de l'huile de lin raffinée (Vandeputte, Mouscron, Belgique).....	91
Figure 46 : Rendement d'hydrolyse de l'huile de lin selon différentes méthodes. Les temps T1 ■ et T2 ■ correspondent à 30 minutes et 60 minutes pour les hydrolyses chimiques et à 16 heures et 24 heures pour l'hydrolyse enzymatique.....	91
Figure 47 : Activité moyenne en LOX de type I et LOX de type II extraite de graines de soja ■, de graines de niébé ■ et de germes de soja ■ selon le substrat : l'acide linoléique ou l'acide linolénique. L'activité est exprimée en UE (1UE = 1μmol de HPO produite par seconde).....	93
Figure 48 : Mesures spectrométriques d'activité LOX de type I sur des échantillons de graines de soja provenant de différents distributeurs .....	93

Figure 49: Système de production des GLVs v.1.0.....	94
Figure 50 : Concentration en C <sub>6</sub> -aldéhydes dans le milieu réactionnel selon le temps de réaction (la teneur en substrat est de 1mM en 13-HPOT et de 0,26mM de 13-HPOD; SI : Octanal).....	95
Figure 51: Courbe de synthèse de (2E)-hexénal combiné au (3Z)-hexénal selon la teneur en substrat utilisée. Les courbes représentent des activités en HPL différentes.....	97
Figure 52: Capacité de production ■ et rendement ● de la production de C <sub>6</sub> -en-aldéhydes avec ajouts fed-batch d'1mM par minute de HPOs (13-HPOT) au cours de la synthèse, l'activité HPL initiale du milieu est de 0.42 UE/ml.....	98
Figure 53 : Capacité de production ■ et rendement ● de la production de C <sub>6</sub> -en-aldéhydes avec ajouts fed-batch de 0.75mM par 30 secondes de HPOs (13-HPOT) comparés à la capacité de production ■ et au rendement ■ de la production de C <sub>6</sub> -en-aldéhydes avec ajouts fed-batch de 1mM par 30 secondes de HPOs (13-HPOT), l'activité HPL initiale du milieu est de 0,61 UE/ml.....	98
Figure 54: Evolution de la capacité de production d'essai de synthèse de GLVs en bioréacteur de 100L (substrat 13-HPOT). ▲ = 15mM en HPOs ; ◆ = 1mM en HPOs ; ● = 0,15mM en HPOs .....	99
Figure 55 : Système de production de GLVs v.1.1.....	101
Figure 56 : Pourcentage d'extraction des aldéhydes du milieu de production en trente minutes selon le débit d'air injecté.....	102
Figure 57 : Adaptation de l'extraction par flux d'air à la production de GLVs ((2E)-hexénal/(3Z)-hexénal) .....	103
Figure 58 : Système de production de GLVs v.1.2.....	105
Figure 59 : Description quantitative de la production des GLVs au du procédé industriel de synthèse .....	106
Figure 60 : Alignement de séquences protéiques de différentes enzymes HPLs et AOS de plantes. L'alignement est réalisé à l'aide de l'algorithme ClustalW.....	111
Figure 61: Arbre phylogénique de différentes HPLs retrouvées chez les plantes. Les alignements sont réalisés avec l'algorithme ClustalX et l'analyse est réalisée en utilisant la méthode « Neighbor-joining » développée par Phylip avec un coefficient de correction de Kimura pour les substitutions et un bootstrap de 1500 données ....	112
Figure 62 : Évolution moyenne de la densité optique ◆, de la température ▲ et de l'activité HPL ■ (U.E./ml) lors de la culture de Escherichia coli M15 exprimant BvHPL dans un fermenteur de 2 litres.....	113
Figure 63 : Rendements moyens en pourcentage (● = HPLs extraites de Beta vulgaris ; ● = HPLs extraites de Escherichia coli) et capacité de production moyenne en mM de GLVs (■ = HPLs extraites de Beta vulgaris ; ■ = HPLs extraites de Escherichia coli) dans un bio-réacteur de 2 litres avec 0.5UE/L d'enzymes de feuille de betterave (variété : Katarina) ou d'enzymes HPLs recombinantes.....	114
Figure 64 : Evolution de densité optique (■ bactéries exprimant CaHPL ; ■ bactéries exprimant BvHPL) et de l'activité enzymatique (● bactéries exprimant CaHPL ; ● bactéries exprimant BvHPL) de cultures en volume de deux litres d' Escherichia coli recombinantes exprimants des gènes HPLs différents. ....	115
Figure 65 : Production après 30 minutes de synthèse de C <sub>6</sub> -en-aldéhydes (■ à l'aide d'HPLs produites à partir de BvHPL ; ■ à l'aide d'HPLs produites à partir de CaHPL ) à partir d'extrait enzymatique composé d'HPL recombinante. La teneur en activité HPL est de 0,75 UE/ml.....	116
Figure 66 : Système de production de GLVs v.2.0.....	117
Figure 67 : Représentation des voies métaboliques de la synthèse des GLVs les plus empruntées au sein des feuilles de betteraves. La localisation des différentes réactions au sein de la cellule végétale est également illustrée.....	119
Figure 68: Stimulation des voies de défense de la plante à l'aide de trois stimuli différents.....	120
Figure 69: Synthèse des GLVs en bioréacteur optimisé.....	124

# Liste des Tableaux.

---

Tableau 1 : Prix moyen (Euro cent par kilogramme) de la production de sucre issu de canne à sucre, de betterave, et de sirop de maïs riche en fructose de 1995 à 2000. ....	19
Tableau 2 : Liste des GLVS principalement utilisés en aromatique alimentaire avec leur masse moléculaire et leur température d'ébullition .....	21
Tableau 3 : Liste des GLVS les plus utilisés en aromatique avec la description de leur fragrance et leur spectre d'application selon la Flavor-Base 2011 ( <a href="http://www.leffingwell.com/flavbase.htm">http://www.leffingwell.com/flavbase.htm</a> ). ....	22
Tableau 4 : Récapitulatif des GLVs produits à partir des isomères HPOs et des C <sub>18</sub> -AGPIs .....	32
Tableau 5 : Liste des organismes végétaux dans lesquels une activité HPL a été identifiée. Celle-ci est représentée en relation avec la spécificité et la famille enzymatique dont elles proviennent. ....	42
Tableau 6 : Valeurs moyennes des principales classes de composés retrouvés dans les feuilles de betteraves. ...	65
Tableau 7 : Teneurs en GLVs dans les feuilles de betterave estimées après extraction Lickens Nikerson et analyse GC FID (Standard interne : Octanal).....	67
Tableau 8 : Teneur en HPOs substrats spécifiques de l'HPL dans les feuilles et les tiges de betteraves (nmol/g de P.F), .....	72
Tableau 9 : Rapports isomériques pour différents HOs et HPOs extraits de feuilles .....	73
Tableau 10 : Bilan de la stimulation de l'activité HPL selon le stress appliqué .....	88
Tableau 11 : Quatre huiles végétales et leur potentiel de production de C <sub>6</sub> -GLVs.....	91
Tableau 12: Rendements moyens de l'hydrolyse enzymatique de l'huile de lin raffinée pendant 24 heures à 37°C. ....	92
Tableau 13 : Rendement des productions enzymatiques de 13-hydroperoxydes selon la teneur initiale en AGPIs. Les réactions sont réalisées en triplicate.....	94
Tableau 14 : Productivités et rendements de production en C <sub>6</sub> -en-aldéhydes ((2E)-hexénal/(3Z)-hexénal) après 2 minutes de synthèse à température et pH optimaux dans un réacteur de 2L et selon la teneur en enzymes et en substrat ( Standard Interne : Octanal) .....	96
Tableau 15 : Essais de production de GLVs ((2E)-hexénal/(3Z)-hexénal) dans un bio-réacteur de 100L ; étude de l'influence de la teneur en substrat (13-HPOT) .....	100
Tableau 16 : Ajouts dosés de 0.1667mM toutes les 30" lors d'une production de (2E)-hexénal/(3Z)-hexénal en 100L.....	100
Tableau 17 : Essai d'extraction de solutions de C <sub>6</sub> -aldéhydes. Extraction de 2L solution concentrée à 10mM dans une colonne d'extraction contenant 250g en résine Purolite. L'élution est réalisée à l'éthanol.....	101
Tableau 18 : Comparaison des méthodes d'extraction par flux d'air à 10vvm pendant 25 minutes sur des solutions d'Hexanal (5mM) et de Z-(3)-Hexenal (20mM) face à une extraction sur colonne de résine .....	103
Tableau 19: Composition du mélange test de distillation .....	104
Tableau 20 : Fractions récoltées lors de la distillation du mélange test.....	104
Tableau 21 : Pourcentage d'homologie entre BvHPL et les gènes connus d'HPL végétale .....	110
Tableau 22 : Pourcentage d'homologie et d'identité de BvHPL avec d'autres HPL ou AOS .....	110
Tableau 23 : Paramètres cinétiques Km et Vmax de trois HPLs recombinants produites respectivement à partir de <i>Olea europea</i> , <i>Beta vulgaris</i> et <i>Capsicum annum</i> et exprimée dans <i>E. coli</i> M15 via le plasmide pQe-31. Ces paramètres ont été calculés selon la loi de Lineweaver-burk sur des mesures spectrométriques d'activités enzymatiques extraites de cultures en fiole. ....	115
Tableau 24 : Optimisation des paramètres de la synthèse des GLVs .....	125
Tableau 25 : Récapitulatif des étapes de synthèses des GLVs développé dans ce travail et dans la littérature ..	125
Tableau 26 : Evaluations des cours des étapes de productions selon la teneur en GLVs produites par jour dans une entreprise travaillant 24heures sur 24. ....	128
Tableau 27 : Surfaces cultivées de différentes espèces végétales pouvant intégrer le processus industriel décrit dans ce travail. ....	129

# **PARTIE**

# **BIBLIOGRAPHIQUE**

---

---

# 1 : Étude bibliographique de la synthèse des molécules à notes vertes et description des bioressources

---

## 1.1. La betterave et l'industrie betteravière

### 1.1.1. Origine et culture de la betterave

La betterave est une plante supérieure de la famille des *chenopodiaceae*. De son nom scientifique : *Beta vulgaris* L., la betterave constitue une des plus grandes cultures industrielles de l'Europe et de l'Amérique du Nord (Figure 1). Les semences de betteraves sont le fruit d'une vaste sélection génétique afin d'obtenir des plants monogermes présentant des rendements en sucre les plus élevés possible. Ces graines sont plantées à la mi-mars après les gelées pour être récoltées de septembre à décembre. La betterave sucrière est une plante cultivée pour sa racine charnue, elle est principalement utilisée pour la production de sucre, mais également comme plante fourragère ou légumineuse.

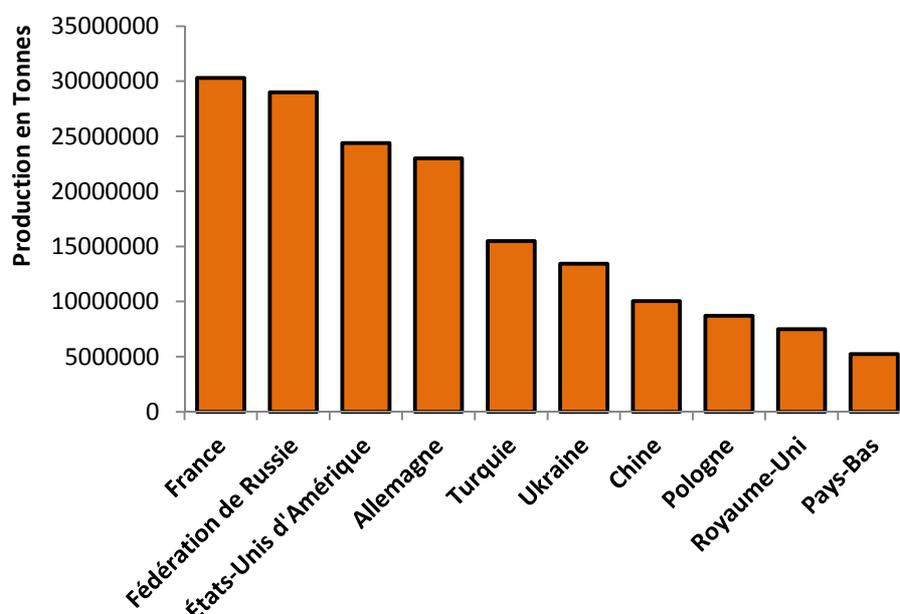


Figure 1 : Répartition de la production mondiale de betteraves selon la « Foods and Agriculture Organization » (<http://faostat.fao.org>) en 2008

La betterave n'est pas la seule source de sucre (ou plus précisément de saccharose), en effet la canne à sucre est sa concurrente directe depuis plus de 200 ans. Dans le monde entier, 75 % du sucre produit (environ 140 millions de tonnes<sup>2</sup>) est extrait de la canne à sucre alors que le dernier quart provient de la betterave. L'extraction du sucre de la canne est moins coûteuse, ce qui permet à celle-ci de couvrir un marché plus vaste (Tableau 1). Historiquement l'Union Européenne a longtemps été le premier producteur de sucre sur le marché mondial, mais depuis quelques années des pays comme le Brésil et la Thaïlande en produisent davantage. Pour stabiliser le marché du sucre de betterave sur son continent et préserver son économie, l'UE a finalement adopté le système de quotas betteraviers garantissant un prix fixe pour une certaine quantité de sucre. Par l'intermédiaire d'un dispositif d'intervention, l'UE subsidie les producteurs pour leur assurer des revenus stables et éviter l'inondation du marché européen avec le sucre de canne. Cependant, à la suite de la plainte déposée

---

<sup>2</sup> Selon la FAO d'après les chiffres de 2009

par le Brésil auprès de l'Organisation Mondiale du Commerce en 2002 (plainte relative à des subventions non réglementaires de l'UE) ainsi que suite à l'ouverture plus large du marché européen à l'importation, le prix du sucre blanc (issu de la betterave) va devoir baisser pour satisfaire les exigences des marchés. De cette manière, les quotas de productions seront réduits à 115% de la consommation européenne de sucre après 2010. L'économie sucrière en Belgique, exclusivement betteravière, est donc malmenée par ces deux problématiques. Par conséquent, de nouvelles voies de valorisation doivent être découvertes afin de pouvoir accroître la valeur ajoutée de la culture de betteraves et ainsi lui permettre de lutter plus efficacement face à la concurrence des producteurs mondiaux. Pour de plus amples renseignements sur la réforme OCM sucre, vous pouvez consulter les textes officiels disponibles sur le portail européen de la Politique Agricole Commune ([http://ec.europa.eu/agriculture/markets/sugar/index\\_fr.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/markets/sugar/index_fr.htm)).

Année	1995-1996	1997-1998	1999-2000
<b>Sucre de canne</b>			
Low cost producteur <sup>a</sup>	17,84	17,32	16,98
Grand exportateur <sup>b</sup>	22,13	21,82	20,53
<b>Sucre de betterave</b>			
Low cost producteur <sup>c</sup>	35,16	32,19	34,41
Grand exportateur <sup>d</sup>	40,79	35,76	37,57
<b>Sirop de maïs à haute teneur en Fructose</b>			
Grand producteur	25,47	19,52	17,85

Tableau 1 : Prix moyen (Euro cent par kilogramme) de la production de sucre issu de canne à sucre, de betterave, et de sirop de maïs riche en fructose de 1995 à 2000. <sup>a</sup>Australie, Brésil, Guatemala, Zambie et Zimbabwe ; <sup>b</sup>Australie, Brésil, Guatemala, Colombie, Afrique du sud, Cuba et Thaïlande ; <sup>c</sup>Belgique, Canada, Chili, France, Turquie, Royaumes-unis et États unis ; <sup>d</sup>Belgique, Allemagne, France et Turquie ; <sup>e</sup>Belgique, Pays-bas, Allemagne, Italie, Chili, France, Turquie, Royaumes-unis et États unis

### 1.1.2. La valorisation des sous-produits de la betterave

Pour les producteurs, la culture de la betterave est une des plus répandues et des plus rentables en Belgique, elle concerne 10.000.000 tonnes de produits végétaux. Les sous-produits étudiés en vue d'une valorisation sont donc largement disponibles. La culture de la betterave génère en moyenne à l'hectare 71,3T de racines contenant 11,5T de sucre et 46.5T de feuilles<sup>3</sup>. La meilleure stratégie afin d'augmenter la valeur d'une plante de culture est de valoriser l'intégralité du végétal et ainsi supprimer les pertes dues à la gestion des différents sous-produits (Figure 2). Les feuilles, les pulpes et la mélasse de sucrerie composent les 3 sous-produits principaux de la culture de betteraves sucrières.

- La **mélasse** est l'égout de sucrerie qui subsiste après la cristallisation de 3ème jet. Elle se retrouve sous la forme d'un sirop brun et visqueux riche en saccharose (+/- 50%) non cristallisable. Actuellement la mélasse est un substrat de choix pour la production de biocarburant et plus précisément de bioéthanol. Le sucre est transformé en alcool par la levure (*S. cerevisiae*). L'alcool est récupéré par distillation et le liquide restant constitue les vinasses qui seront utilisées comme fertilisants. Par sa richesse en source de carbone, la mélasse est également utilisée comme substrat de culture pour différents microorganismes, ou pour la production d'acide citrique par fermentation.
- Les **pulpes de betteraves** composent le second sous-produit de l'industrie betteravière, ce sont les cossettes épuisées issues de la racine de la betterave, cossettes dont le sucre a

<sup>3</sup> Chiffre de l'IRBAB (<http://www.irbab-kbivb.be>) pour la saison 2010

été extrait par diffusion. Ces pulpes peuvent être fraîches ou sèches selon leur taux de déshydratation et servent principalement dans l'alimentation du bétail. C'est un aliment riche en sucre digestible et généralement très apprécié par la plupart des animaux. Actuellement, des chercheurs tentent également d'associer la pulpe sèche avec des polymères pour obtenir des matériaux de construction solides et très légers (Finkenstadt et al. 2007). Des perspectives d'utilisation de la pulpe de betterave existent également dans l'industrie du papier. Les microfibrilles végétales de la pulpe font l'objet d'étude afin de substituer les cristaux de sel (coûteux et polluant) renforçant l'opacité du papier.

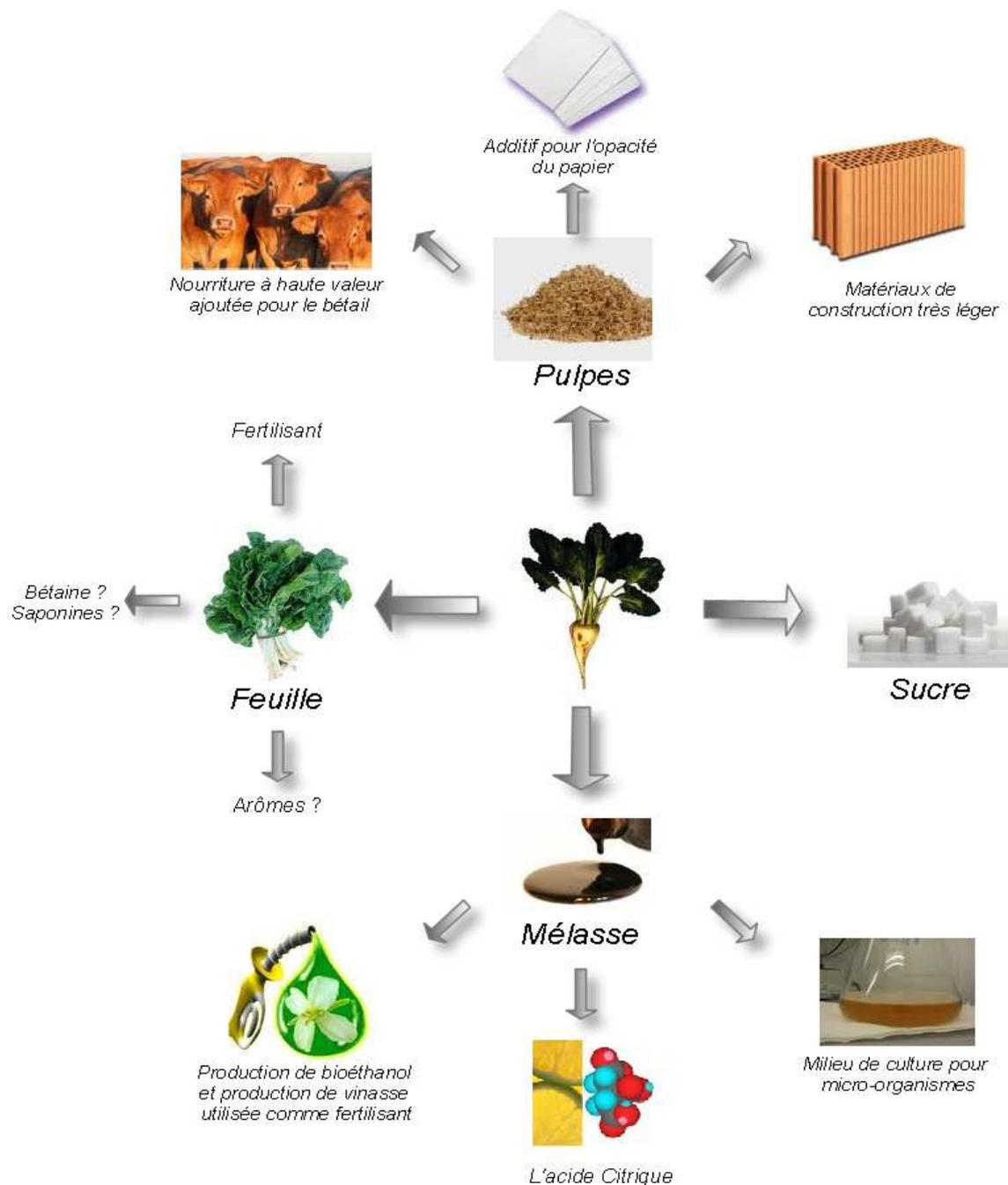


Figure 2 : Organigramme de la valorisation des sous-produits de la betterave sucrière

- Enfin, les **feuilles de betteraves** sont actuellement abandonnées sur les terres de cultures pour servir de fertilisant ou de plus en plus rarement distribuées en tant que compléments alimentaires pour le bétail. Néanmoins, la recherche de produits à haute

valeur ajoutée au sein de la feuille, tels que les protéines Rubisco (Servaites et al. 1987), la bêtaïne, les saponines, les pectines ou les arômes peut être une source de bénéfices importants. Sachant que les feuilles constituent environ 40% du poids de la plante, ce manque de valorisation constitue la plus grande perte pour l'industrie betteravière. Chaque année, 3.500.000 tonnes de feuilles sont disponibles en Belgique pendant la récolte s'étalant de septembre à décembre, ces feuilles peuvent être aisément récoltées après le passage de l'effeuilleuse par l'intermédiaire d'un tapis roulant.

## 1.2. Les molécules à note verte

### 1.2.1. Nature des arômes

Les arômes sont une combinaison de goûts et d'odeurs interagissant avec les détecteurs sensoriels du corps humain. Les arômes volatils, dont font partie les molécules à note verte, sont transportés par l'air inhalé et interagissent avec les cellules épithéliales de la muqueuse nasale induisant une sensation de plaisir appréciable par l'individu. L'utilisation de plante en tant que saveur, améliorant ainsi la qualité de la nourriture, des boissons et des parfums, est répandue depuis les prémices de l'humanité. Mais ce n'est qu'au 19<sup>ème</sup> siècle que la production industrielle d'arômes a débuté. Pour atteindre aujourd'hui un marché mondial estimé à 18 milliards de dollars. Actuellement suite aux coûts élevés et au manque de sources naturelles d'extraits aromatiques, la plupart des arômes sont qualifiés « d'identiques au naturel » et dérivent de produits pétroliers. Néanmoins, récemment le consommateur a développé une aversion vis-à-vis de ces produits issus de la pétrochimie et il est de plus en plus attiré vers les produits naturels dérivant de la biotechnologie. Les voies de biosynthèse de ces arômes sont le plus souvent établies selon les voies de synthèse d'un organisme dans lequel la molécule d'intérêt est présente en large quantité. L'établissement de procédés biotechnologiques de production passe par une caractérisation complète des substrats et des enzymes impliqués dans la synthèse in vivo. Parfois la connaissance est approfondie jusqu'à l'obtention des séquences génomiques des enzymes.

### 1.2.2. Les molécules à note verte

Les molécules à note verte sont des molécules volatiles émises par les plantes dans des conditions de stress (Hatanaka 1993). Dans le langage scientifique, elles sont communément appelées « green leaf volatiles » ou GLVs. Cet ensemble de molécules est composé d'aldéhydes et d'alcools, dont deux groupes distincts peuvent être isolés : les composés à six carbones et les composés à neuf carbones. Toutes ces molécules disposent de propriétés aromatiques intéressantes et composent l'essence de plusieurs huiles essentielles et parfums. Au niveau moléculaire, les alcools possèdent généralement une fragrance moins prononcée, mais une stabilité accrue en comparaison aux aldéhydes (Berger 1995) ; comme en attestent notamment les températures d'ébullition des principaux GLVs valorisés en aromatique (Tableau 2).

Green Leaf Volatiles	Masse moléculaire	Température d'ébullition
Hexanal	100	119-124°C
Hexénal	98	119-124°C
Hexanol	102	158°C
Hexéno1	100	158°C
Nonénal	140	55-60°C
Nonedié1nal	138	97-98°C
Nonéno1	142	215°C
Nonedié1no1	140	207°C

Tableau 2 : Liste des GLVS principalement utilisés en aromatique alimentaire avec leur masse moléculaire et leur température d'ébullition

### 1.2.3. Utilisation des GLVs

Dans les préparations aromatiques, les GLVs confèrent un « aspect naturel » et « authentique » aux préparations auxquelles ils sont ajoutés (Berger 1995). Chacun des composés possède un parfum caractéristique et une utilisation spécifique (Tableau 33). Les domaines d'application sont principalement les parfums et fragrances, les aliments type chewing-gums ou boissons gazeuses, et également les plats préparés. Dans ce dernier domaine, les GLVs sont fréquemment ajoutés après la stérilisation des plats pour rendre aux aliments les saveurs qu'ils ont perdues pendant le traitement à la chaleur. Dans le monde industriel, le marché mondial des GLVs est estimé à 30 millions US dollars dont 18 millions US dollars sont réservés aux GLVs correspondant à la classe d'arômes naturels (Schwab et al. 2008).

Nom	Odor Description	Application
<b>E-2-hexenol</b>	Sharp, green, leafy, fruity, unripe banana odor.	Used in apple, berry, orange and pear flavors and as an alcohol enhancer.
<b>E-3-hexenol</b>	Intensely green, somewhat bitter, earthy, fatty odor	Good for green, leafy vegetable flavors like various lettuces.
<b>Z-2-hexenol</b>	An odor similar to cis-3-hexenol, with a brandy nuance.	This material has a fresher greenness than trans-2-hexenol and can also be used to enhance brandy flavors.
<b>Z-3-hexenol</b>	Powerful, fresh, green grass odor.	Has many applications including strawberry, tomato, pineapple, orange, pear, berries, cherry, grape and apple flavors.
<b>E-2-hexenal</b>	A green, citrusy, orange, pungent odor.	Many uses including green fruit, kiwi, peach, green apple, berry, strawberry, fresh blueberry, cherry, tea, orange, citrus and raspberry.
<b>Hexanal</b>	An intense green, fruity, aldehydic odor,	An extremely versatile material. In dilution it is used in many fruit and vegetable flavors as well as butter and rum
<b>Z-3-nonenol</b>	A fresh, waxy, green melon odor.	Used for fresh, tropical, melon notes
<b>E-2-nonenol</b>	Waxy, green odor.	Used in melon and cucumber flavors. Also can be used for 'fried' fatty effect.

Tableau 3 : Liste des GLVS les plus utilisés en aromatique avec la description de leur fragrance et leur spectre d'application selon la Flavor-Base 2011 (<http://www.leffingwell.com/flavbase.htm>).

En tant qu'additif alimentaire, l'aspect naturel de l'arôme au sens législatif a également une importance capitale. Selon les directives européennes la définition d'une **substance aromatisante naturelle**, c'est «une substance aromatisante obtenue au moyen de procédés physiques qui peuvent résulter en des modifications inévitables, mais non intentionnelles de la structure chimique des constituants de l'aromatisant (par ex. la distillation ou l'extraction de solvant), ou de procédés enzymatiques ou microbiologiques, à partir de matériaux d'origine végétale ou animale. Ces matériaux peuvent être à l'état brut, ou transformés pour la consommation humaine suivant les procédés de préparation alimentaire (par ex. le séchage, la torréfaction et la fermentation). Ceci signifie que les substances ont été identifiées/détectées dans un matériel naturel animal ou d'origine végétale. » (Codex Alimentarius CAC/GL 66-2008; [www.codexalimentarius.net/](http://www.codexalimentarius.net/)). Certains composés aromatiques sont maintenant couramment produits par voie biotechnologique à partir de microorganismes, génétiquement modifiés ou non. Selon la nouvelle réglementation européenne du paquet « agents d'amélioration », la naturalité de l'arôme peut être mise en avant, à condition que la partie aromatisante de l'arôme soit exclusivement composée de substances ou de préparations aromatisantes naturelles (présentes dans un substrat végétal ou animal). Ces normes sont assez

restrictives, dès lors la production de GLVs naturels entraîne des difficultés importantes et les rendements sont nettement moins élevés que pour la synthèse chimique de molécules. Cependant le prix de vente de la molécule aromatique naturelle est 25 fois plus important ; 40\$/litre pour un produit de synthèse et jusqu'à 1000\$/L pour un produit naturel pur à 98%<sup>4</sup>.

### **1.3. La voie de synthèse des oxylipines**

#### **1.3.1. Les GLVs : une classe d'oxylipines volatiles**

Les GLVs sont des molécules synthétisées par la plupart des végétaux supérieurs le plus souvent en réaction à des stimuli d'agressions. Ces molécules volatiles sont le produit de voies métaboliques complexes comprenant les actions successives de plusieurs enzymes. Les GLVs font partie de la classe des *oxylipines*, qui constituent une vaste famille de composés dérivant d'acides gras contenus dans les phospholipides et/ou galactolipides des membranes cellulaires (Blee 1998), et de la classe des *phytoalexines* qui englobent les molécules accumulées par l'organisme végétal suite à une exposition à des micro-organismes. La biosynthèse des GLVs débute par l'intervention d'une lipoxygénase (LOX) sur un acide gras polyinsaturé (AGPI). Les précurseurs les plus courants des GLVs sont l'acide linoléique (C18:2), l'acide linoléique (C18:2), ou encore l'acide hexadécatriénoïque (C16:3) (Wasternack et Kombrink 2009). Des hydroperoxydes d'acides gras (HPOs) sont formés par cette LOX via une oxydation des carbones adjacents aux doubles liaisons des AGPIs précédemment cités. Ces HPOs, des composés instables et réactifs, sont au carrefour de plusieurs branches métaboliques qui vont conduire à former des dérivés finaux plus stables et dotés d'activités biologiques diverses (Figure 3). La régulation de ces diverses voies enzymatiques en compétition pour un même substrat constitue un point de contrôle important pour le végétal. En effet, les signatures ou profils d'oxylipines varient considérablement selon la plante et le stress subi ayant activé la synthèse de ces composés (Feussner et Wasternack 2002). Ces nouvelles molécules seront adaptées pour lutter de manière directe ou indirecte contre la source du stimulus. La voie de la LOX agit comme un pseudo système immunitaire, selon le stimulus perçu par la plante.

La LOX est le point initiateur de la réponse ciblée de la plante face à l'agression (Figure 3), les différentes enzymes agissant par la suite vont préciser cette réponse. Parmi ces enzymes, l'allène oxyde synthase (AOS), l'hydroperoxyde lyase (HPL) et la divinyl éther synthase (DES) font partie de la même famille de protéines : les CYP74s un sous-ensemble de la famille des cytochromes P450 (Hughes et al. 2009). Ces enzymes bien que proches au niveau du *foldings* et de la séquence protéique des P450 classiques (présentes dans le règne animal) génèrent des molécules très différentes. D'autres enzymes telles que des réductases (RED), des peroxygénases (POX) ou d'autres lipoxygénases (LOX<sup>2</sup>) synthétisent également des oxylipines, mais leurs implications sont minimes et ne sont pas développées dans ce travail. Les GLVs font partie de ces composés et sont le fruit de l'activité HPL. Leur synthèse est donc co-dépendante de plusieurs systèmes enzymatiques de régulation, et le taux de molécules produites va dépendre largement de la disponibilité du substrat pour l'HPL qui est en compétition avec les différentes voies métaboliques (Hughes et al. 2009). Après la synthèse des GLVs par l'HPL, des modifications moléculaires peuvent être réalisées sur ces molécules volatiles par l'intermédiaire de nouvelles enzymes : l'isomérase (ISO), l'alcool déshydrogénase (ADH) et l'alcool acyle transférase (AAT). Ces enzymes vont élargir le spectre de variétés de GLVs synthétisés accroissant également les possibilités autant au niveau des intérêts biologiques que des intérêts aromatiques (Matsui 2006) (voir en annexe 1 afin de consulter la liste des GLVs et leur formule semi-développée).

---

<sup>4</sup> Ces prix ont été obtenus après consultation de différentes sociétés productrices de GLVs aromatiques. Ce sont les moyennes des prix de vente disponibles chez IFF (New-York, United States), Givaudan (Teaneck, United States), Firmenich (Geneva, Switzerland) et Robertet France (Grasse, France)

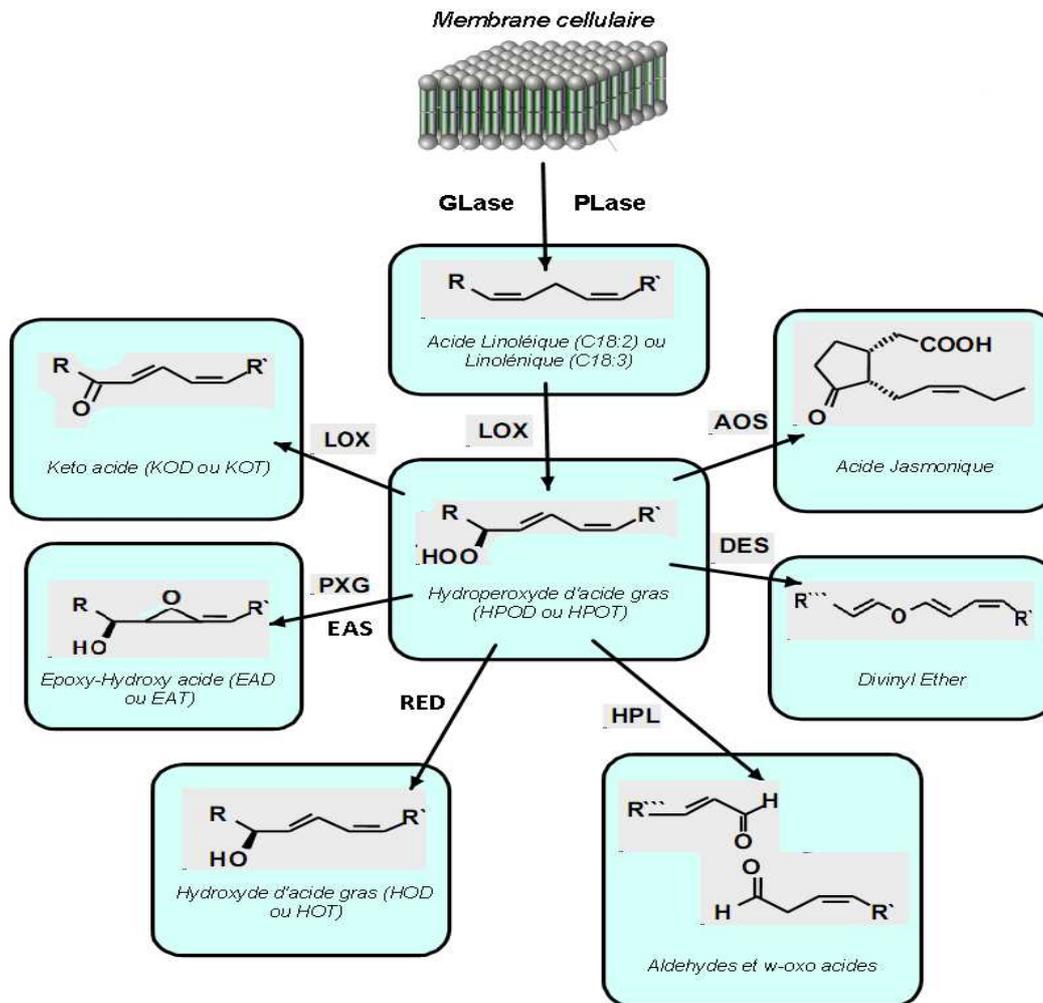


Figure 3 : Illustration de la synthèse des oxylipines à partir des galactolipides (GL) et des phospholipides (PLA) de la membrane cellulaire. Les systèmes enzymatiques mis en jeu comprennent : l'allène oxyde synthase (AOS) conduisant à la formation des jasmonates ; l'hydroperoxyde lyase (HPL) clivant les hydroperoxydes en aldéhydes et en oxo-acides ; la réductase (RED) catalysant la production d'hydroxy-acides gras ; la peroxygénase (POX) et l'époxy alcool synthase (EAS) produisant des acides gras époxydés et époxy-hydroxylés ; la divinyl éther synthase (DES) fournissant des divinyl éthers ; une seconde lipoxygénase (LOX<sup>2</sup>) formant des cétoacides.

## 1.3.2. La lipoxygénase chez les plantes

### 1.3.2.1. Origine et classification

Les lipoxygénases (LOXs) forment une famille de dioxygénases comprenant un atome de fer sur leur site actif (E.C 1.13.11.12). L'enzyme fut pour les premières fois identifiée dans le fruit de la pastèque (Vick et Zimmerman 1976), la graine de soja (Axerold et al. 1981), le fruit de la tomate (Riley et al. 1996), les racines de pomme de terre (Royo et al. 1996) et ensuite dans plus d'une centaine d'autres végétaux. Ces enzymes catalysent la dioxygénation régio- et stéréo-spécifique des AGPIs libres (Porta et Rocha-Sosa 2002), mais plusieurs études montrent que l'enzyme est également capable d'oxygéner des acides gras estérifiés, tel que les galactolipides ou les phospholipides (Brash 1999), les triacylglycerols (Feussner et al. 1995) ou les esters de stérols (Belkner et al. 1991). Ces enzymes sont très répandues dans le monde végétal et généralement classées selon la position spécifique de l'oxygénation qu'elles catalysent. Deux classes de LOXs existent selon le rang de la liaison de l'acide gras qui sera oxydée : les 9-LOX et les 13-LOX (Figure 4). La LOX produit à partir de l'**acide linoléique** (acide (9Z,12Z)-octadécadiénoïque) le **9-HPOD** (l'acide (10Z,12E)-9-hydroperoxy-octadécadiénoïque) et le **13-HPOD** (l'acide (9Z,11E)-13-hydroperoxy-octadécadiénoïque), à partir de l'**acide linoléique**

(acide (9Z,12Z,15Z)-octadécatriénoïque) le **9-HPOT** (l'acide (10E,12Z,15Z)-9-hydroperoxy-octadécatriénoïque) et le **13-HPOT** (l'acide (9Z,11E,15Z)-9-hydroperoxy-octadécatriénoïque) (Grechkin 1998) et enfin à partir de l'acide (7Z,10Z,13Z)-hexadécatriénoïque, l'acide (7Z,10Z,12E)-13-hydroperoxyhexadécatriénoïque (**13-HPOE**, non illustré sur la figure 4 et plus rare que les précédents). La LOX entraîne donc la formation de molécules similaires à certaines obtenues par auto-oxydation de la matière grasse. De plus, les proportions relatives à ces molécules peuvent varier dans le cas d'une réaction enzymatique selon la spécificité et les conditions de réaction de l'enzyme. Par exemple, lors d'une oxydation à 4°C, l'activité 13-LOX est largement favorisée par rapport à l'activité 9-LOX, le substrat consommé, à savoir les acides linoléiques ou linoléniques, sera majoritairement converti en 13-HPOs. Chez la plupart des végétaux, plusieurs isoformes différentes de la LOX sont détectées, elles se distinguent par leur pH optimal de fonctionnement ou leur spécificité envers les produits et les substrats (Axerold et al. 1981). Les isoenzymes sont classifiées en type I, qui concernent les LOXs spécifiques des AGPIs libres et présentant un pH optimum alcalin de 8,5 ou +, la plus célèbre étant la LOX-1 du soja, et les LOXs de type II, entraînant la co-oxydation de caroténoïdes à pH neutre, tels que la LOX-2, la LOX-3 ou la LOX-4 du soja qui sont fréquemment utilisées en tant qu'agent blanchissant dans les pains (Prigge et al. 1997; Baysal et Demirdoven 2007). D'autres LOX végétales présentent des intérêts scientifiques importants, notamment la LOX de la pomme de terre qui a la particularité de pouvoir oxyder les acides gras à 20 carbones entraînant la formation de 15-HPO (Royo et al. 1996). Les isoformes de la LOX de pomme de terre ont également la particularité de présenter des affinités de substrat variées, la LOX-1 oxydant l'acide linoléique tandis que les LOX-2 et -3 réagissent préférentiellement avec l'acide linoléique. Également dans les feuilles de tomate, différentes isoformes de 9-LOX présentent des stabilités thermiques très différentes des LOX précédemment découvertes (Chen et al. 2004).

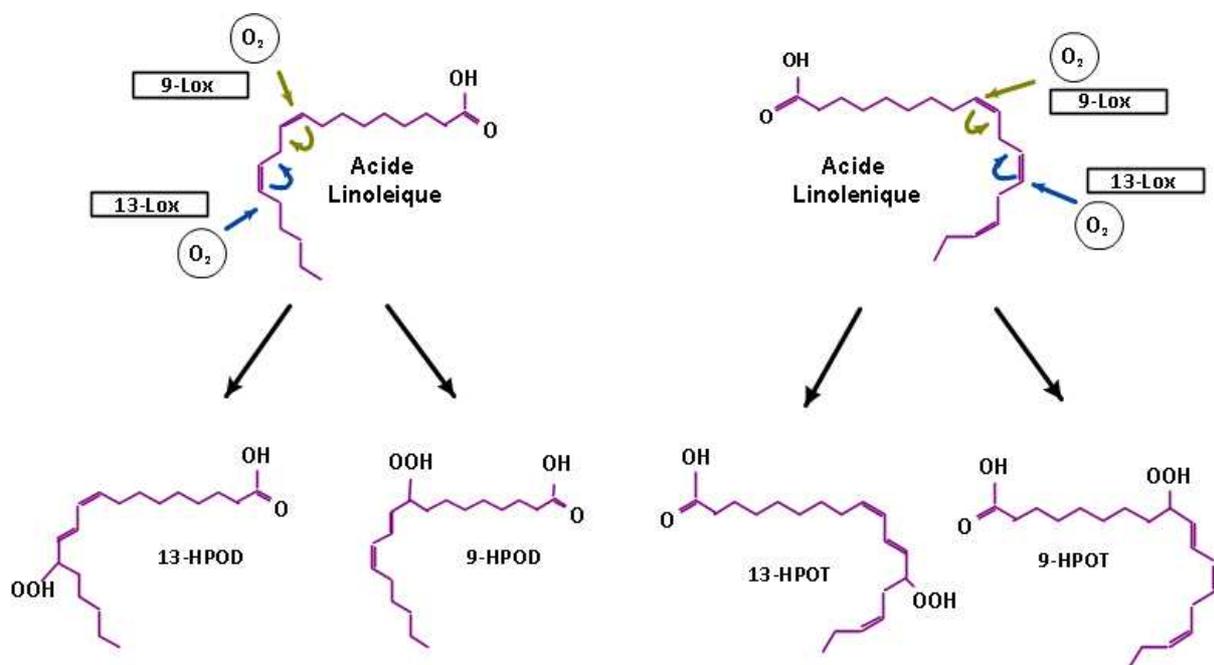


Figure 4 : Description des quatre hydroperoxydes pouvant être produits par l'oxydation stéréospécifique catalysée par les 9-LOX et 13-LOX sur l'acide linoléique et l'acide linoléinique

### 1.3.2.2. Mécanisme réactionnel

D'un point de vue réactionnel, les LOXs peuvent travailler à des pH compris entre 5 et 10,5 et la spécificité de l'oxydation va varier en fonction du pH du milieu. Cette enzyme nécessite systématiquement de l'oxygène, en tant que co-substrat pour compléter sa réaction. La stabilité

thermique de la LOX est très élevée : l'enzyme garde de l'activité à 0°C comme à 70 °C. C'est une enzyme de petite taille (environ 100kd) qui possède un atome de fer au sein de son site actif (Coffa et al. 2005). Cet atome de fer se trouve au degré d'oxydation  $Fe^{2+}$  lors que l'enzyme native est à l'état latent et au niveau  $Fe^{3+}$  lorsque l'enzyme forme un catalyste oxydatif activé. Activée, l'enzyme est capable de décrocher stéréospécifiquement un atome d'hydrogène du groupe méthyle d'un AGPI en reformant un atome  $Fe^{2+}$ . Le complexe radicalaire enzyme-alkyle est ensuite oxydé par l'oxygène pour former un complexe enzyme-peroxyde. Enfin, la protonation et la dissociation de ce complexe enzyme-peroxyde permettent de former un HPO (Andreou et Feussner 2009). La sélectivité de la LOX dépend de la structure de son site réactionnel, il est caractérisé par trois résidus histidine et une asparagine placée de manière à venir coincer l'acide gras dans une poche réactionnelle (Stumpe et Feussner 2006), l'atome de Fer est reliée, au centre de cette cavité, à deux des résidus histidines. La conformation de cette enzyme permet à celle-ci d'avoir une regiospécificité caractéristique. Par sa conformation, la LOX synthétise toujours un des deux isomères optiques R et S majoritairement (rapport isomérique 95/5) par rapport à l'autre. Cette particularité permet de distinguer lors d'analyses chirales, les HPOs produits par autooxydation du substrat (mélange racémique) des HPOs synthétisés par la LOX (Coffa et al. 2005). Le mécanisme complet de la réaction est présenté à la Figure 5.

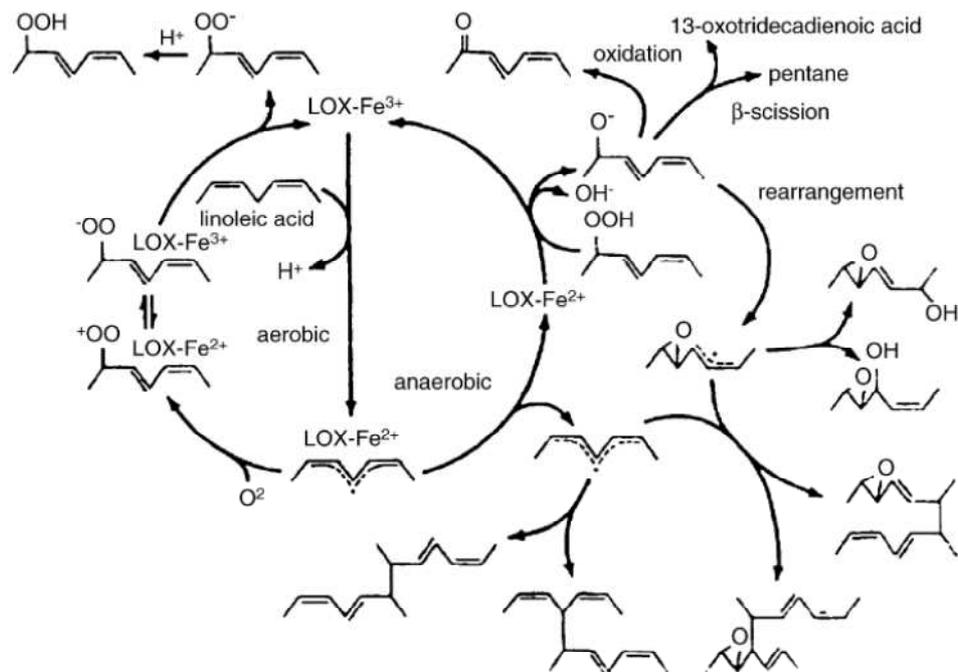


Figure 5 : Mécanisme réactionnel détaillé de la réaction de la LOX végétale d'après Baysal (Baysal et Demirdoven 2007). La première étape est l'activation de l'enzyme native par la transformation de  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ . La seconde étape est l'enlèvement d'un hydrogène d'un substrat complexé avec l'enzyme afin de former un radical libre. Enfin, la molécule d'oxygène est introduite stéréospécifiquement au sein de la molécule d'acide gras pour former un hydroperoxyde.

### 1.3.2.3. Localisation et rôle

La localisation proprement dite de l'enzyme au sein du végétal dépend de la nature de l'organisme et de l'isoforme étudiée. La plupart des LOXs sont solubles dans le cytosol, les vacuoles ou les corps lipidiques. Cependant dans certains cas la LOX peut être intégrée au niveau des membranes plasmiques (Nellen et al. 1995), des membranes des microsomes (Feussner et al. 1995) ou dans l'enveloppe des chloroplastes (Blee et Joyard 1996). Au sein d'un même végétal, chacune des isoformes peut avoir une localisation spécifique reliée à sa fonction afin d'orchestrer la synthèse d'HPOs et l'enchaînement des cascades enzymatiques impliquées par la suite. D'ailleurs, la LOX est un

maillon essentiel pour le développement des stratégies de défense chez la plante. L'importance de l'enzyme a été mise en évidence par différents scientifiques qui en supprimant l'expression du gène de la LOX transforment des individus résistants à certains pathogènes en individus sensibles (Rance et al. 1998). Cette sensibilité est principalement due à l'absence de synthèse de GLVs et d'acide jasmonique qui découle de l'activité LOX. La LOX est également impliquée dans la germination de la plante, après rupture des membranes lipidiques, l'enzyme entame la catalyse des acides gras de réserves. De même, les phénomènes de sénescence sont stimulés par les réactions d'oxydation de la LOX (Liavonchanka et Feussner 2006).

#### **1.3.2.4. Application industrielle**

Les LOXs ont beaucoup d'implications dans le domaine industriel et celles-ci dépendent de l'isoforme étudiée. A un point tel que le vaste intérêt porté à cette enzyme a entraîné le développement de protocole de modification par génie génétique du profil des LOX contenues dans certains végétaux. Par exemple, certains chercheurs sont parvenus à développer des variétés de soja exprimant seules une ou deux isoformes de la LOX en vue d'une application industrielle ciblée (Hughes et al. 2001). D'un point de vue général, le domaine d'application industrielle de l'enzyme n'est pas limité à la production d'arômes ou au blanchissement des pains, (Cumbee et al. 1997) mais également aux ralentissements de développements de saveurs ou de couleurs parasites au sein d'un produit alimentaire (dû à l'oxydation catalysée par la LOX) (Laine et al. 2006). Dans ce cas, l'inactivation des LOXs par un traitement spécifique peut allonger la durée de vie d'un produit alimentaire (Gosset et al. 2008).

#### **1.3.3. Les enzymes de la famille CYP74**

Les enzymes AOS, DES et HPL sont des membres de la famille d'enzymes CYP74s, un sous-ensemble de la famille cytochrome P450, et ce, bien que les enzymes CYP74s aient une origine différente des P450 classiques qui sont présentes chez les mammifères et les microbes. Ces enzymes, exclusivement végétales, ont un site catalytique très productif avec un turn-over très élevé favorisant une réaction très rapide (Hughes et al. 2006). De plus, le mécanisme réactionnel ne nécessite aucun co-substrat, tel que l'oxygène ou la NAD(P)H réductase habituellement nécessaire à l'activité des P450s (Song et al. 1993). Cette famille d'enzymes concerne exclusivement des protéines liées aux membranes cellulaires, celles-ci jouant un rôle primordial sur le *fold*ing et la stabilité de l'enzyme. La membrane confère la conformation adéquate pour la fixation du substrat et l'accession au site actif de l'enzyme. La localisation de l'enzyme au niveau des membranes de certains organites peut suggérer les cascades enzymatiques poursuivies par les métabolites de ces enzymes au sein de la plante. Par exemple, la présence de l'AOS dans la membrane interne du chloroplaste et de l'HPL dans la membrane externe suggère une régulation interne à la plante pour les jasmonates et externe pour les GLVs (Froehlich et al. 2001).

Les CYP74s sont exclusivement impliquées dans la synthèse d'oxylipines. Cette famille de protéines regroupe trois activités enzymatiques : (i) l'AOS conduisant à la formation d'allènes oxydes instables qui se transformeront en kétol et en cyclopenténone, (ii) l'HPL formant un hémiacétal qui sera clivé en aldéhyde et en oxoacide et (iii) la DES qui forme des divinyls éthers. Ces enzymes sont fort semblables au niveau structure, d'ailleurs dans certains cas la modification d'un seul acide aminé peut métamorphoser l'activité enzymatique, par exemple la métamorphose d'une enzyme AOS en enzyme HPL par la mutation d'un résidu leucine au niveau de la séquence ARN (Toporkova et al. 2008). Parmi ces enzymes, essentiellement l'HPL présente des intérêts industriels pour la production des GLVs. Découvertes au début des années 90, la classification de la famille CYP74 a été adaptée successivement au fil des années. Actuellement, quatre sous-familles regroupent les enzymes et la classification est principalement basée selon la séquence ARN et la spécificité envers le substrat.

Cette classification est relativement archaïque et pourrait faire l'objet d'une adaptation importante dans les prochaines années.

- **Les CYP74A** : En 1991, des scientifiques ont cloné la première enzyme CYP74 : l'AOS isolée à partir de graines de lin (Song et Brash 1991). Cette enzyme est spécifique des 13-HPOs comme l'est l'entièreté de la famille CYP74A. Différents organismes contiennent des AOS de cette famille : *Zea mays* (Utsunomiya et al. 2000), *Arabidopsis thaliana* (Laudert et al. 1996), ...
- **Les CYP74B** : L'HPL du poivron clonée par Matsui (Matsui et al. 1996) a été la première enzyme classée dans ce groupe, qui concerne les HPL spécifiques des 13-HPOs. Actuellement la plupart des HPLs appartiennent à cette sous-famille telles que l'HPL de la pastèque (Vick et Zimmerman 1976), l'HPL du soja (Gardner et al. 1991) ou l'HPL de la luzerne (Noordermeer et al. 2000).
- **Les CYP74C** : Récemment, les scientifiques ont découvert des AOS (Itoh et al. 2002) et des HPLs (Tijet et al. 2001) avec une double spécificité envers les 9- et 13-HPOs. Depuis lors, beaucoup d'enzymes sont classifiées dans cette sous-famille selon la découverte de nouvelles propriétés et de spécificité de substrat, tel que l'HPL de concombre (Matsui et al. 2000), l'AOS de l'orge (Maucher et al. 2000) ou l'AOS de la pomme de terre (Stumpe et al. 2006). Cependant, le professeur K. Matsui met en doute cette classification en identifiant chez le concombre deux iso-enzymes distinctes conférant cette double activité (Matsui et al. 2000). Cette découverte n'est peut-être pas un cas isolé et chacune des enzymes de cette classe est susceptible d'être en réalité un couple d'isoenzymes avec une spécificité différente.
- **Les CYP74D** : La dernière sous-famille des CYP74s est exclusivement associée avec l'activité DES, cette famille d'enzymes est la plus récemment découverte (Itoh et Howe 2001).

### **1.3.3.1. L'allène oxyde synthase et l'allène oxyde cyclase**

#### 1.3.3.1.1. Mécanisme réactionnel

Cette partie de la voie enzymatique de la LOX aboutit à la synthèse de l'acide jasmonique et de son méthyl ester via les interventions successives de deux enzymes : l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC). Les mécanismes réactionnels de cette synthèse sont très complexes, ils ont été élucidés en plusieurs étapes par Vick (Vick et Zimmerman 1983), Hamberg (Hamberg 1988) et Wasternack (Wasternack et Kombrink 2009). La réaction de transformation reste rapide malgré sa complexité. La synthèse peut être divisée en deux phases. La première phase se déroule au sein des chloroplastes dans lesquels siègent les AOS et AOC qui font partie intégrante de la membrane de l'organite. L'action combinée des deux enzymes entraîne la formation de l'acide cis-12-oxo-phytyldienoïque (OPDA), molécule signal largement étudiée dans les végétaux (Taki et al. 2005). L'OPDA est sécrété à l'extérieur du chloroplaste et va subir la bêta-oxydation au sein des peroxysomes pour former les molécules de la famille jasmonates (Li et al. 2005). Les quatre différents HPOs produits par la LOX peuvent entrer dans cette voie enzymatique, mais seuls les 9-HPOT, 13-HPOT et le 13-HPOE dérivant de l'acide C<sub>16:3</sub> peuvent être transformés en acide jasmonique ou en jasmonate. La transformation des 9-HPODs et 13-HPODs s'arrête au stade des alpha- et bêta-kétols suite à la spécificité introduite par l'action de l'AOC.

#### 1.3.3.1.2. Localisation

L'AOS est présente dans tous les organes de la plante, le fruit excepté, elle est précisément localisée dans la membrane interne du chloroplaste excepté chez la guayule où elle a été découverte dans le cytoplasme (Pan et al. 1995). L'AOC, qui ne fait pas partie de la famille CYP74 est également située dans la membrane du chloroplaste et a été découverte chez la tomate (Hause et al. 2000) et *Arabidopsis thaliana* (Stenzel et al. 2003). La cyclisation des allènes oxydes instables produits par

l'AOS survient naturellement, l'AOC catalyse cette réaction et par sa conformation particule oriente stéréospécifiquement la formation de la molécule cyclique (Hofmann et al. 2006).

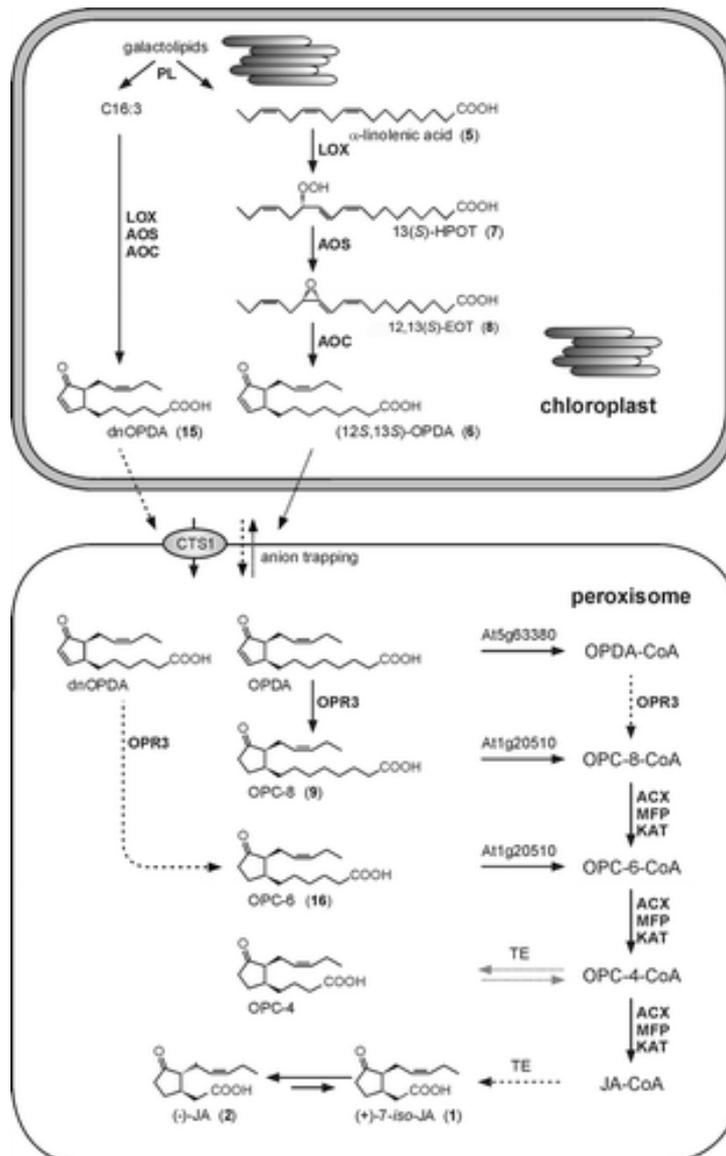


Figure 6 : A la suite de l'hydrolyse des galactolipides et des phospholipides par une phospholipase, les hydroperoxydes produits par la LOX sont hydratés en allènes oxydes très instables par l'AOS et ensuite cyclisés par l'AOC en acide cis-12-oxo-phytodiénoïque (OPDA). Ces nouvelles molécules sont secrétées au sein du peroxysome par l'intermédiaire du transporteur CTS1. L'OPDA est ensuite réduite par l'enzyme OPDA réductase (OPR3) avant d'être estérifiée par d'autres enzymes (At5g63380, At1g20510 par exemple) pour former un ester de Coenzyme A. La molécule obtenue est ensuite raccourcie par l'intervention successive de l'acyle CoAoxydase (ACX), de la protéine multifonctionnelle (MFP) et de l'AcylCoAthiolase (KAT). Le produit final de cette transformation est le jasmonate de CoA qui, clivé par une thioestérase, forme le jasmonate et son méthyle ester (Wasternack et Kombrink 2009).

### 1.3.3.1.3. Fonction biologique

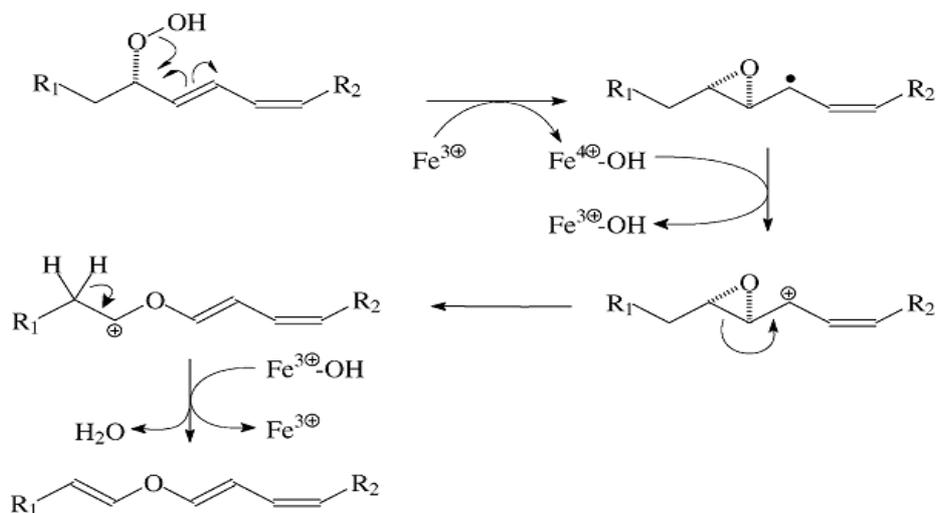
L'importance physiologique de ces enzymes est principalement liée aux produits de réaction : l'OPDA et l'acide jasmonique. Ce sont deux phytohormones très étudiées, elles sont liées aux réactions de stress ainsi qu'au développement de la plante. Ces produits confèrent une résistance accrue aux pathogènes et aux insectes ravageurs (Taki et al. 2005; Chehab et al. 2008). Le jasmonate est impliqué notamment dans les phénomènes de sénescence (Ueda et Kato 1980), d'inhibition de

croissance, de formation de tubercule (Blechert et al. 1995) ou d'expression de gènes de réponse (Miersch et al. 1999) voire de mécanismes de défense indirects impliquant des insectes et/ou d'auteurs ravageurs (Smith et al. 2009). Ces molécules sont également connues pour un effet accumulateur stimulant leur propre synthèse et la synthèse d'autres phyto-oxylipines (Wasternack et Kombrink 2009). Cette grande variété de fonctions biologiques est notamment due à la présence de deux centres chiraux au niveau de la molécule de jasmonates permettant d'obtenir quatre isomères différentes.

### 1.3.3.2. La divinyl éther synthase

#### 1.3.3.2.1. Structure et mécanisme réactionnel

La seconde enzyme de la famille des cytochromes P450s, la divinyl éther synthase (DES), métabolise la transformation des HPOs en divinyl éther. L'enzyme a été initialement découverte chez la pomme de terre en 1976 (Galliard et Phillips 1976), depuis elle a été localisée dans divers végétaux tels que le tabac (Fammartino et al. 2007), ou certaines renonculacées (Hamberg 2002). Les gènes de la DES ont été clonés avec succès chez la tomate (Itoh et Howe 2001), la pomme de terre (Stumpe et al. 2001) ou le tabac (Fammartino et al. 2007). La DES est une enzyme transcriptionnellement activée par une élévation ou une attaque de pathogènes, sa spécificité est fortement orientée vers les isomères 9-HPOs (Stumpe et al. 2001), l'activité moyenne concernant les 13-HPOs correspondant à 5% de l'activité pour les 9-HPOs, isomères desquels dérivent les acides colnéléique et colnéléinique. Cette enzyme possède un poids proche des 50 kdaltons et une séquence acide aminée proche de la famille des AOS (42% d'homologie) et des HPLs (30% d'homologie). Comme ces deux enzymes, la DES présente un turnover très élevé ( $500-100\text{ s}^{-1}$ ) et un  $K_m$  faible entre 40 et  $70\mu\text{M}$  (Itoh et Howe 2001). Son comportement est très proche de l'AOS et de l'HPL et sa stabilité est réduite.



A:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$  or  $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ ;  $R_2 = -(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ;

B:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ ;  $R_2 = -(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$  or  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$

Figure 7 : Formation des divinyl-éthers par l'action de la DES selon un mécanisme à la fois homolytique et hétérolytique proposé par Grechkin. Tout d'abord, intervient une protonation-déshydratation de l'hydroperoxyde d'acides gras formant un carbocation époxylallilique. Ce carbocation subit successivement une déprotonation et un clivage de la liaison C-C assistée par l'enzyme pour former un divinyl éther se différenciant selon les résidus fixés (Grechkin 2002).

#### 1.3.3.2. Importance biologique des métabolites

Les divinyls éthers sont des molécules complexes qui peuvent jouer un rôle de phyto-alexines ou d'inhibiteur de LOX (Blee 1998; Grechkin 2002; Stumpe et al. 2008) . Ils peuvent s'accumuler dans les tissus et réduire le taux d'infection lors des agressions par des pathogènes (Weber et al. 1999). Comme les enzymes précédentes décrites, la DES est stéréospécifique pour ses produits, mais également au niveau de ses substrats. Une dizaine de divinyl-éthers différents ont été jusqu'à présent identifiés se différenciant par les résidus liés à la chaîne principale, les plus célèbres étant l'acide colnéléique et l'acide colnéléinique. Cette enzyme est généralement peu active biologiquement en comparaison aux autres CYP74, ceci étant dû à sa plus faible concentration.

#### 1.3.3.3. L'hydroperoxyde lyase

##### 1.3.3.3.1. Occurrence

L'HPL est l'enzyme responsable de la synthèse des GLVs. Chez les plantes supérieures, l'HPL transforme les HPOs par un clivage hétérolitique de la liaison C-C entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et la double liaison adjacente, produisant un aldéhyde et un oxoacide (Fauconnier et al. 1997). Cette enzyme a été identifiée dans plusieurs végétaux et plusieurs organes différents : la pastèque (Vick et Zimmerman 1976), le concombre (Galliard et Phillips 1976), les feuilles de thé (Hatanaka et al. 1992), le tournesol (Itoh et Vick 1999), les feuilles d'arabidopsis (Bate et al. 1998) ou le poivron (Shibata et al. 1995). L'enzyme est fixée aux membranes plasmiques comme toutes les CYP74s, et plus précisément à la membrane du chloroplaste pour les 13-HPL et aux membranes du tonoplaste ou des corps lipidiques pour les 9-HPLs (Mita et al. 2005; De Domenico et al. 2007). Par conséquent, l'HPL nécessite une extraction avec des détergents pour être isolée de l'organisme végétal.

##### 1.3.3.3.2. Extraction et structure

Plusieurs auteurs ont étudié la purification de l'HPL (Shibata et al. 1995; Blee et Joyard 1996; Fauconnier 1997), l'enzyme pure possède toujours une masse moléculaire totale située entre 170 et 250 kDaltons et est composée de trois ou quatre sous-unités identiques de 55 kDaltons. L'HPL est constituée d'un noyau hème et d'atomes de fer à haute réactivité (Noordermeer et al. 2000). Une fois extraite des membranes cellulaires, l'HPL est caractérisée par son manque de stabilité, il est reporté que l'enzyme supporte difficilement la congélation ainsi que les hautes températures (Rodrigo et al. 2007). L'activité HPL chute de manière importante au cours du temps et ne peut être conservée une fois extraite, cette caractéristique sera à prendre en considération lors d'une utilisation industrielle de cette enzyme (Husson et Belin 2002). Le manque de stabilité provient de l'extraction de la membrane par des détergents, ce changement d'environnement entraîne l'apparition de forces et d'interactions complexes déstabilisant l'enzyme. L'effet positif des détergents sur l'activité enzymatique in vitro, par exemple l'utilisation de triton X-100 (Suurmeijer et al. 2000), provoque dans le même cas la déstabilisation de l'enzyme. Cependant, la stabilité du biocatalyste peut être améliorée à l'aide de différents composés, notamment les sels, les sucres ou les polyols. Ces effets de stabilisation sont attribués à l'habilité de ces composés à contrecarrer les forces de déstabilisation menant à l'inactivation de l'enzyme. Des auteurs ont déjà utilisé d'autres composés chimiques stabilisateurs tels que le dithiothréitol (Hornostaj et Robinson 2000), le glycérol (Salas et al. 2005) ou différents détergents (Matsui et al. 2000; Matsui et al. 2000). Aussi d'autres auteurs (Hall et al. 2008) ont montré que le KCl protège l'enzyme durant une lyophilisation ou un stockage à long terme, et également que la glycine était un des meilleurs additifs visant à préserver l'activité enzymatique. Récemment, de nouveaux et efficaces protocoles ont également été développés pour extraire de hautes concentrations en HPL, ces enzymes sont ensuite stabilisées par un procédé protégé par un brevet (Hughes et al. 2009). Dans ce brevet, il apparaît que la présence de détergents durant la conservation ou le séchage de l'enzyme est au détriment de la stabilité des protéines, dénaturant le noyau hème. Des techniques de lyophilisation en l'absence de détergent permettent une

conservation des enzymes stabilisées pendant 15 semaines, ces enzymes nécessitant simplement une mise en solution avant leur utilisation.

### 1.3.3.3.3. Mécanisme réactionnel

D'un point de vue réactionnel, l'HPL présente un pH optimum de réaction entre 6 et 9 selon sa spécificité en substrat et une température optimale moyenne de 30 °C. Le mécanisme réactionnel de l'HPL est à présent bien connu, il a été décrit par Hatanaka (Hatanaka 1993) et Gardner (Gardner et Plattner 1984). Le *folding* de l'enzyme entraîne la formation d'un couloir hydrophobe dans lequel vient s'introduire l'HPO. Récemment, il a également été démontré que la synthèse de l'oxoacide est précédée par la formation d'un hémiacétal et d'un énol (Grechkin et al. 2003). Celui-ci est ensuite transformé en ion époxy/carbone intermédiaire avant d'être clivé en oxoacide et en aldéhyde.

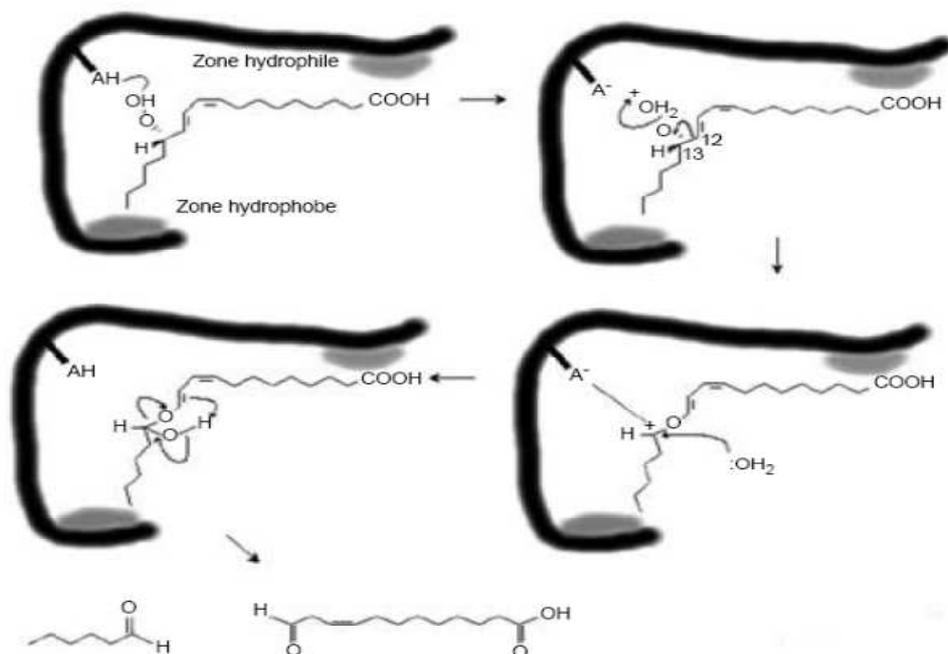


Figure 8 : Mécanisme du clivage hétérolytique des hydroperoxydes par l'hydroperoxyde lyase chez les plantes supérieures (Delcarte et al. 2000).

L'HPL est capable de métaboliser chacun des isomères HPOs issus de la réaction d'oxydation par la LOX, les aldéhydes dérivant de cette réaction seront chimiquement différents les uns des autres. La liste de ces aldéhydes est disponible dans le tableau 4 (ci-dessous) et à la figure 9.

AGPIs	HPOs	GLVs
Acide Linoléique	9-HPOD	(3Z)-nonenal
	13-HPOD	Hexanal
Acide Linoléique	9-HPOT	(3Z,6Z)nonedienal
	13-HPOT	(3Z)-hexenal

Tableau 4 : Récapitulatif des GLVs produits à partir des isomères HPOs et des C<sub>18</sub>-AGPIs

Des acides (non représentés) sont également produits en même temps que les aldéhydes : tels que l'acide w-nonanoïque et l'acide w-oxododecanoïque précurseurs de la traumatine et de l'acide traumatique. Ces deux composés sont des phytohormones ou plus précisément des molécules signales de blessures stimulant la division cellulaire lors de la reconstruction des tissus après une agression par un pathogène (Zimmerman et Coudron 1979).

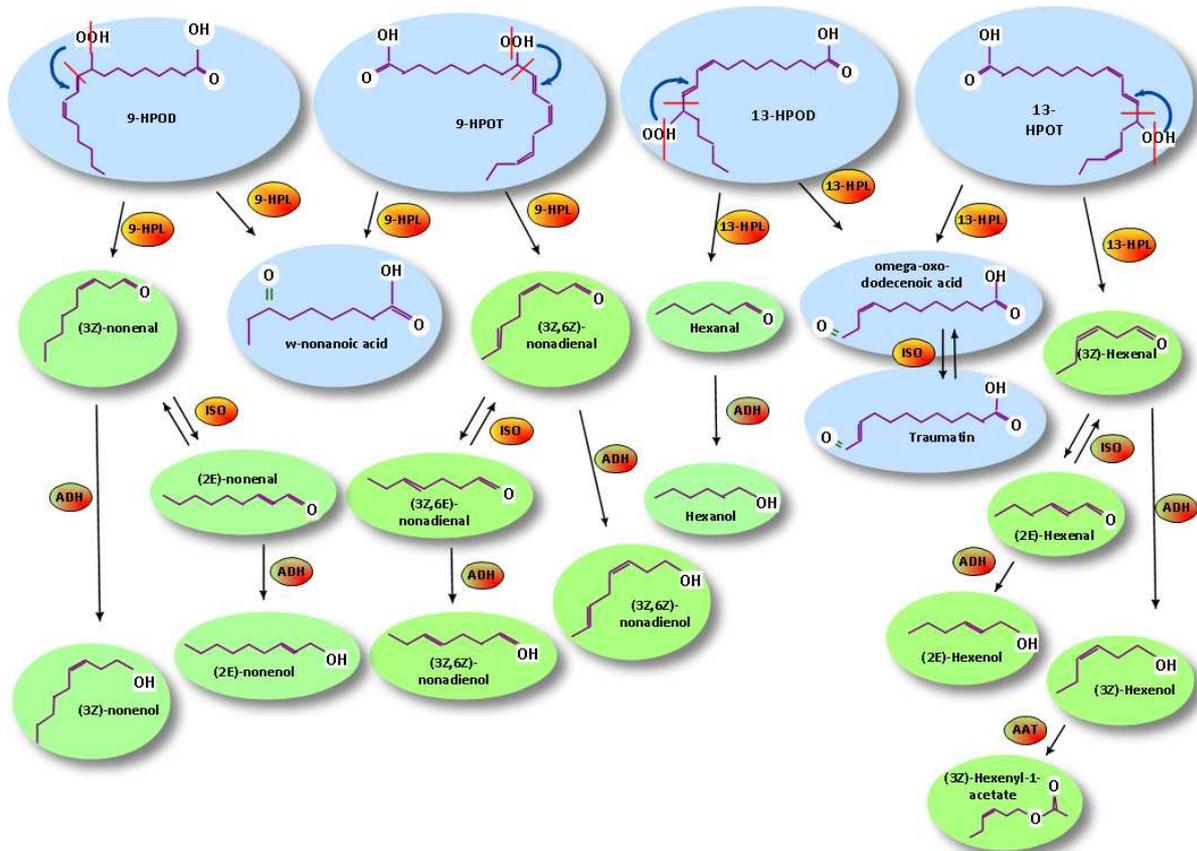


Figure 9 : Vue d'ensemble de la production des GLVs à partir des quatre isomères d'hydroperoxydes d'acide gras. Dans un premier temps l'HPL provoque le clivage en aldéhydes et en oxoacides. Ensuite l'ISO transforme les aldéhydes sous la forme isomère Z en isomères E. L'ADH réduit les aldéhydes en alcools et finalement l'AAT transforme le (3Z)-hexénol en hexényl acétate. La couleur bleue illustre les composés acides et la couleur verte les GLVs à proprement dits.

#### 1.3.3.3.4. Inhibition et instabilité

La caractéristique principale de l'HPL est son comportement vis-à-vis de son substrat. L'enzyme présente une inhibition de type suicide : elle est inhibée par son propre substrat. Des recherches ont montré que le site actif de l'enzyme peut être notamment déstabilisé par la présence d'ion  $Hg^{++}$ , indiquant la présence d'un groupement SH essentiel à l'activité (Matsui et al. 1992). Dans le même temps de la réaction métabolique, un mécanisme parasite indissociable a lieu, inactivant irréversiblement l'enzyme. Ce type de phénomène est courant chez les enzymes de la famille P450. Au cours de la catalyse, les P450 génèrent des intermédiaires réactionnels altérant de manière irréversible l'activité enzymatique. Matsui déduit l'hypothèse que les HPOs sont reconnus spécifiquement par l'enzyme et sont en partie transformés en espèces radicalaires venant détruire le groupement SH du site réactionnel (Matsui et al. 1992). Une autre hypothèse est la fixation d'HPOs ou d'intermédiaire indissociable de l'enzyme bloquant définitivement le site actif.

#### 1.3.3.3.5. Importance biologique

D'un point de vue physiologique, l'HPL est une enzyme indispensable pour le développement d'un système immunitaire efficace chez la plante, son activité est d'ailleurs plus élevée dans les tissus jeunes et plus particulièrement chez les cellules en division (Sekiya et al. 1983; Matsui et al. 1997). Différents auteurs ont d'ailleurs montré que des mutants déficients en HPLs présentaient des carences en développement ainsi qu'une sensibilité accrue aux pathogènes (Rayko et al. 2004; Chem 2006; Shiojiri et al. 2006). Cette importance biologique est exclusivement liée aux GLVs dont le rôle est exposé dans la partie suivante : 1.4. Le rôle physiologique des GLVs.

### 1.3.4. Enzymes impliquées dans les modifications de structure des GLVs

#### 1.3.4.1. L'isomérase

Les GLVs synthétisés par l'HPL ont une structure moléculaire particulière, et sont exclusivement de conformation de structure Z. La transformation vers la forme isomérique E peut avoir lieu naturellement ou être favorisée par une activité isomérase. Les isomérases sont des enzymes qui catalysent les réarrangements isomériques au sein d'une molécule. Dans le monde végétal, la présence de cette enzyme a été confirmée en 1999 par Noordermeer chez la luzerne (Noordermeer et al. 1999). Les réactions d'isomérisation sont moins rapides que la synthèse d'aldéhydes, ceux-ci sont donc progressivement transformés. Les hautes températures favorisent cette réaction et réduisent le taux d'isomères Z présents. Cette transformation étend la variété des GLVs produits et stabilise ces molécules sous leur forme isomérique E.

#### 1.3.4.2. Alcool déshydrogénase

Cet enzyme catalyse la transformation d'aldéhydes en alcools. Elle est relativement rare chez les plantes, mais elle a pu être détectée dans les feuilles de thé (Brändén et al. 1975), chez le concombre (Hatanaka et al. 1975) et dans les graines de soja (Matoba et al. 1989). Les activités enzymatiques demeurent faibles et relativement instables. Par contre, cette enzyme a été largement étudiée chez les microorganismes et notamment chez la levure de boulangerie, *Saccharomyces cerevisiae*, où elle a été l'objet de plusieurs travaux. L'enzyme présente une structure identique aux ADHs végétales, elle possède une masse moléculaire moyenne de 150kD et est composée de 4 sous-unités de 36kD. L'ADH réagit spécifiquement avec les aldéhydes disponibles et forme des alcools, au cours de cette réaction une molécule de NADH est réduite. L'ADH est dite NAD-dépendante, ce qui constitue une limite à son application, car elle nécessite continuellement la régénération de son cofacteur.

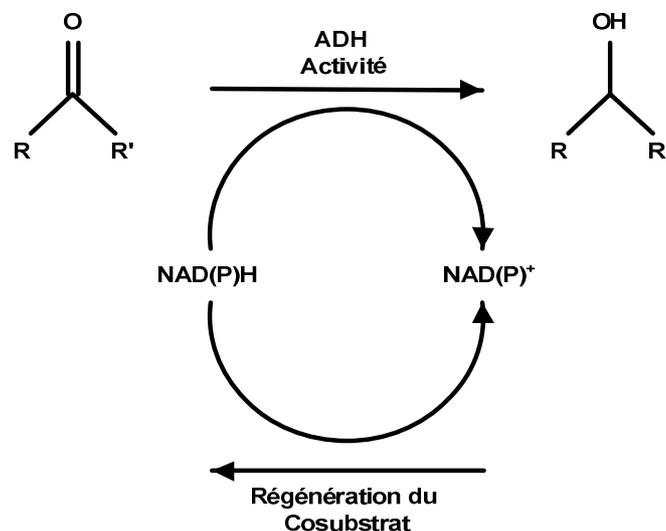


Figure 10 : Transformation d'un aldéhyde en alcool par l'intermédiaire d'ADH et de la réduction du cofacteur

Chez la plante, l'expression de l'ADH est régulée par les stress environnementaux. La production de mutant n'exprimant pas l'enzyme montre d'ailleurs une sensibilité accrue au froid et aux chocs osmotiques. Le second rôle de l'ADH est la modification de la balance aromatique entre les aldéhydes et les alcools. Ce phénomène a notamment été étudié chez la tomate, où l'expression de l'ADH entraîne une modification au niveau de l'arôme des fruits (Speirs et al. 1998).

### 1.3.4.3. Alcool acyle transférase

Cette dernière enzyme est capable de produire des esters en établissant une liaison entre un acyle coenzyme A et un alcool. Les esters aliphatiques participent de manière importante à la saveur et à la fragrance des fruits et des végétaux. Chez les plantes dans le cadre de la formation des GLVs, l'AAT métabolise la synthèse de (3Z)-hexényl acétate à partir du (3Z)-hexénol. Cette molécule fait partie des GLVs retrouvés en plus grande quantité chez les plantes (Frost et al. 2007), c'est une molécule signal responsable du phénomène de priming des organismes végétaux et entraînant l'accumulation d'autres oxylipines telles que les jasmonates (Frost et al. 2008). Il a notamment été montré que l'accumulation de (3Z)-hexényl acétate est très fortement liée aux blessures mécaniques, cette réaction est rapide puisque l'activité AAT s'accroît de plus de 400% les trois premières heures après l'application du stress mécanique (Kost et Heil 2006). Le (3Z)-hexényl acétate, malgré sa large disponibilité, n'est cependant pas un arôme vendu dans le secteur industriel, car son pouvoir aromatisant est faible et sa fragrance peu appréciée.



Figure 11 : Réaction chimique catalysée par l'AAT

## 1.4. Le rôle physiologique des GLVs

### 1.4.1. Impacts de ces molécules sur leur environnement

Indépendamment des voies métaboliques empruntées et des métabolites qu'ils cogénèrent, les GLVs, synthétisés par la plante, remplissent deux fonctions physiologiques différentes : la signalisation et la défense. Pulvérisés dans l'atmosphère ou dispersés dans la rhizosphère, ils sont reconnus par les microorganismes, les insectes, mais également les autres organismes végétaux proches, provoquant des réactions métaboliques ou comportementales spécifiques.

#### 1.4.1.1. Sur les microorganismes

Les GLVs ont un pouvoir bactéricide, notamment le (3E)-hexénal, et ce, à la fois sur les bactéries Gram positif et Gram négatif (Nakamura et Hatanaka 2002). Des scientifiques ont observé que certaines plantes sont capables de synthétiser des quantités élevées de GLVs, tels qu'ils deviennent des composés létaux pour les pathogènes bactériens avec lesquels ils peuvent rentrer en contact (Croft et al. 1993). Cette propriété est mise à contribution lors du stockage de produits périssables : des GLVs sont pulvérisées sur des fruits afin d'en améliorer la conservation (Lanciotti et al. 2004). Plusieurs GLVs ont également montré une activité fongicide importante (à haute concentration) vis-à-vis de champignons pathogènes (Kubo et al. 2003). Néanmoins, de faibles teneurs en GLVs peuvent avoir des propriétés inverses et peuvent stimuler la croissance de certains champignons. Le plus souvent ces champignons bénéficiaires protègent des infections et vivent en symbiose dans la rhizosphère de la plante (Fallik et al. 1998). Globalement, cette double activité permet une régulation de la population fongique et bactérienne vivant dans un environnement proche de la plante et de sa racine.

#### 1.4.1.2. Sur les insectes

La relation entre les insectes et les GLVs est plus complexe que le rapport avec les microorganismes. Les insectes sont équipés de senseurs olfactifs très développés leur permettant de distinguer aisément les GLVs dans l'atmosphère. En réaction à cela, les insectes vont pouvoir localiser les

plantes productrices de GLVs et s'en approcher ou s'en éloigner selon leurs affinités. Des études ont montré que la suppression de la synthèse des GLVs chez la pomme de terre augmentait considérablement les infections par les pucerons (Vancanneyt et al. 2001). Les GLVs peuvent également intervenir dans un mécanisme de défense indirect de la plante. Par exemple, des pucerons ou des chenilles se nourrissent de la plante, celle-ci en réponse à cette agression libère des GLVs dans l'atmosphère. Ces composés sont détectés par les prédateurs des herbivores, qui vont chasser les ravageurs de la plante (Arimura et al. 2005).

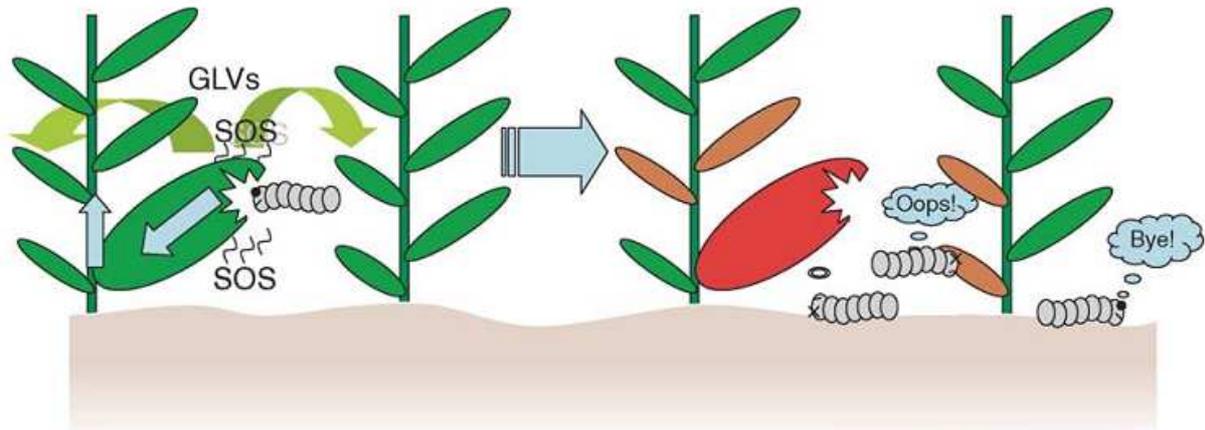


Figure 12 : Illustration du mécanisme de défense contre les larves d'insectes d'après Matsui et al, 2006. La larve consomme le feuillage de la plante, ce qui provoque la synthèse de GLVs. Une partie de ces GLVs diffuse directement dans la plante et provoque une répulsion du ravageur. La volatilité des GLVs permet d'étendre ce système de défense à des plantes proches.

### 1.4.1.3. Sur les plantes

Les GLVs sont des molécules volatiles de défense très rapidement émises lors d'un stress, elles peuvent être dispersées dans l'atmosphère ou diffusées dans les tissus végétaux. Cette caractéristique fait de ces composés de très bons signaux de défense pour les plantes. De plus, des concentrations faibles sont suffisantes afin d'induire une réponse chez la plante, car elle possède des récepteurs spécifiques activés par le phénomène d'adsorption des GLVs sur la cuticule de leurs feuilles (Matsui, et al 2006). Ces GLVs sont des molécules allélopathiques de communication à une distance proche, après leur détection les plantes métabolisent ensuite rapidement ces composés sous forme d'ester, supprimant leur caractère toxique et réactif (Arimura et al. 2009). Les plantes peuvent réagir de différentes manières face à une exposition à des GLVs. Plusieurs essais ont notamment montré que les voies enzymatiques de la LOX, de l'AOS ou de l'HPL peuvent être activées par ce biais (Arimura et al. 2001; Gomi et al. 2003). Cette activation présente un caractère systémique et l'émission de composés volatils de défense (jasmonate, GLVs...) est également stimulée dans les tissus sains (Farag et Pare 2002). Parmi les GLVs, l'(2E)-hexénal a un rôle plus particulier, sa nature électrophile fait de lui un composé toxique inhibant la croissance et le développement des racines (Arimura et al. 2001; Kishimoto et al. 2005; Kishimoto et al. 2006). Ce composé va notamment entraîner une inhibition de la croissance des plantules proches de l'émission de GLVs, protégeant certaines plantes face à l'envahissement d'adventices (Arimura et al. 2010).

## 1.4.2. Implication des GLVs dans le « signalling and plant defense »

### 1.4.2.1. Vue globale du système de défense des plantes

Les plantes restent confinées dans les régions où elles grandissent et s'adaptent pour résister aux conditions climatiques auxquelles elles sont confrontées. Ces organismes développent une résistance naturelle face aux attaques microbiennes auxquelles elles sont constamment exposées. Ne possédant pas de systèmes immunitaires en tant que tels, les plantes résistent par l'intermédiaire de défense

constitutive et de réponses induites qui affaiblissent l'organisme pathogène. Les défenses constitutives, telles que la cuticule, les parois ou la membrane cellulaire sont des barrières protégeant la plante des composés toxiques ou des enzymes capables de contaminer l'organisme végétal. Les réponses induites sont des réponses de la plante face aux stimuli perçus, cette perception est propagée intracellulairement de manière à activer la transcription de gènes pouvant lutter contre l'agression.

Lors d'une réponse face à des stimuli, la voie de transduction du signal a une importance capitale, chez la plupart des plantes trois voies développées autour d'un composé clé sont souvent observées : la voie de l'acide salicylique, la voie des jasmonates et la voie de l'éthylène. Ces trois voies métaboliques s'interpénètrent pour offrir des réactions rapides et ciblées face aux attaques de bactéries, de champignons ou d'insectes. Ces voies de signalisations sont empruntées lors de la SAR « résistance systémique acquise » ou de l'ISR « résistance systémique induite ». Dans le cas de la SAR, la mise en contact de la plante avec l'organisme pathogène déclenche le système de défense tandis que dans le cas de l'ISR, les systèmes de défense de la plante sont initiés par des microorganismes racinaires non pathogènes. Dans les deux cas, l'activation des phénomènes de défense permet à la plante de mieux résister à des attaques ultérieures.

#### ***1.4.2.2. L'activation de la synthèse des GLVs***

Dans le cadre de ce travail, nous définissons l'activation de la voie de synthèse comme la première agression que subit la plante, agression qui peut être due à un microorganisme, à une blessure mécanique ou chimique ou à un insecte ravageur. Cette activation, dans le cadre d'une blessure mécanique ou d'une morsure d'un insecte, est également associée à une rupture de la paroi cellulaire chez le végétal. Cela concerne également la détection d'un pathogène spécifique par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires qui vont détecter la présence d'un éliciteur. Dès la détection de ce stress, la plante a la capacité de pouvoir répondre rapidement via le système décrit ci-après.

Deux voies métaboliques principales sont décrites chacune pouvant déboucher sur la synthèse de GLVs, la première est entièrement cytosolique (et concernent principalement les 9-HPOs) tandis que la seconde se déroule en partie dans un chloroplaste (relatif au 13-HPOs). La voie cytosolique est la plus simple, elle débute par la libération d'acides gras libres, notamment via des phospholipases, mais également par d'autres lipases, augmentant considérablement le taux d'acides gras libres dans le cytosol de la cellule (Conconi et al. 1996). L'augmentation de la teneur en AGPIs active les LOX-9 cytosoliques (Stumpe et Feussner 2006). Les acides gras sont donc métabolisés par ces enzymes pour produire des 9-HPOs. Ces molécules intermédiaires font partie de la classe des oxylipines et sont déjà capables de stimuler l'expression de gènes de défense et propager des cascades réactionnelles (Blée 1998). En outre, ces HPOs sont dégradés par des enzymes cytosoliques afin de produire des métabolites des voies de défenses à savoir les HOs, les kétol, les divinyl éthers, les C<sub>9</sub>-aldéhydes et les époxy-hydroxy-acides formant un ensemble de phyto-oxylipines.

La seconde voie décrite fait intervenir des lipases qui activées en réponse aux stimuli vont principalement dégrader les galactolipides proches des chloroplastes, les phospholipides de membranes ou certains lipides de réserve (Ishiguro et al. 2001; Hyun et al. 2008). Les AGPIs libres, C<sub>18:2</sub> ou C<sub>18:3</sub>, servent de substrats à la LOX qui produira des 13-HPOD/Ts (cette enzyme ne semble pas être activée à proprement dite, mais sert simplement à fournir un pool accessible d'HPOs pour les CYP74 enzymes), certaines de ces molécules peuvent ensuite être métabolisées en différents composés intervenant dans les systèmes de défense. Plusieurs voies utilisant les CYP74 enzymes sont possibles, mais les deux principales sont selon Froelich (Froehlich et al. 2001) : la métabolisation en C<sub>6</sub>-aldéhydes par la 13-HPL ou la métabolisation en 12-OPDA par l'AOS et l'AOC (membrane interne du chloroplaste). Ces systèmes de production de phyto-oxylipines sont très rapides. La localisation proche de la détection des stimuli et des activités enzymatiques intervenantes est optimisée. La plante augmente ainsi l'activité de ses enzymes productrices de phyto-oxylipines par la voie des

CYP74 enzymes entre deux et quatre heures après la stimulation. Il faut ensuite entre 8 et 24h pour redescendre à un niveau d'activité normal. Ce retour à la normale rapide est essentiel, car la plupart des oxylipines sont des composés cytotoxiques qui peuvent entraîner la mort cellulaire (Grechkin 2002). Les composés volatils ainsi émis diffuseront dans l'atmosphère ou pourront interagir au niveau du noyau des cellules pour stimuler l'expression de certains gènes de défense.

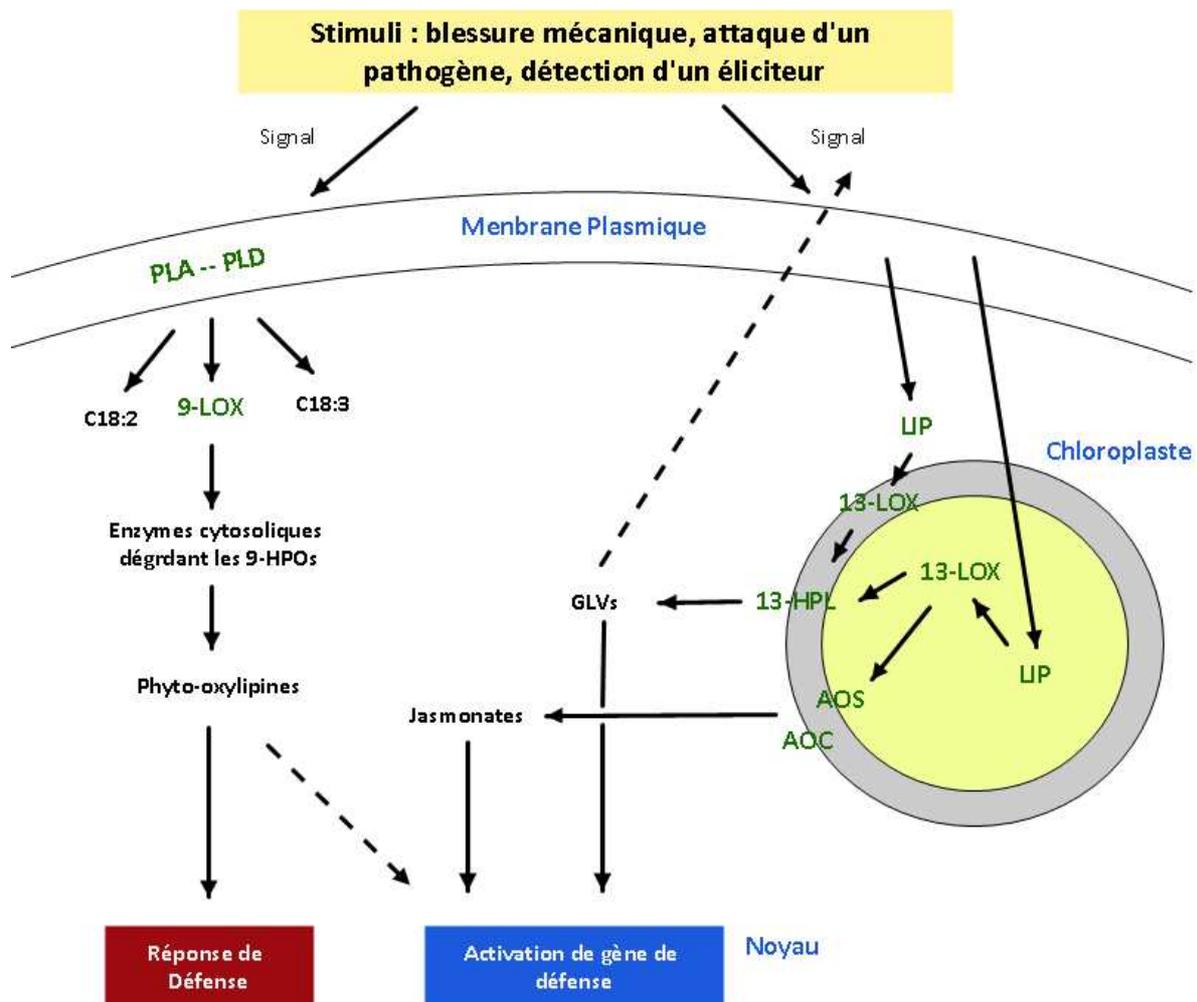


Figure 13 : Mécanisme de défense mis en place au sein de la cellule de plante, cible d'une blessure ou d'une attaque de pathogènes d'après Blée (Blee 2002)

### 1.4.2.3. Propagation de la réaction de défense.

La propagation de la réaction de défense peut s'effectuer de deux manières distinctes, tout d'abord en utilisant les molécules volatiles émises par les cellules cibles (jasmonate, aldéhydes, éthylène et acide salicylique), mais aussi par l'intermédiaire des gènes de défense produisant des métabolites tels que la systémine. Cette seconde voie ne sera pas décrite dans ce travail, la systémine étant un polypeptide qui va stimuler la mise en place d'un système de défense vis-à-vis des pathogènes. Concernant la première voie de propagation, les familles de molécules volatiles émises dans le milieu extérieur vont interagir au niveau des cellules intactes plus ou moins proches de l'élément déclencheur initial. Les cellules ciblées réagiront différemment selon l'espèce de la plante et la nature du métabolite signalé :

- **Les jasmonates :** ces composés, volatils lorsqu'ils sont estérifiés, sont les principaux relais du mécanisme de défense, leur activité au niveau des cellules est multiple. Les

jasmonates augmentent l'activité de plusieurs enzymes (Avdiushko et al. 1995): notamment de la LOX en augmentant la production et l'accumulation d'oxylipines ainsi que de la lipase en augmentant le taux d'acides gras libres aux abords de la cellule blessée (Conconi et al. 1996), le jasmonate est également capable de stimuler sa propre synthèse afin d'intensifier la réponse de défense de la plante (Blee et Joyard 1996). La stimulation de la synthèse d'aldéhydes par le biais des jasmonates peut être observée chez certaines espèces telles que *Arabidopsis* (Bate et al. 1998), la tomate (Degenhardt et al. 2010), le concombre ou le tabac, (Avdiushko et al. 1995) mais est absente chez d'autres plantes : *Artemisia* (Afitlhile et al. 2005). Enfin, les jasmonates sont capables de stimuler l'activation des gènes de défenses dans le noyau de la cellule. L'ensemble de ces stimulations augmente considérablement la résistance de la plante face aux pathogènes, notamment face à *Botrytis cinerea* (Thomma et al. 2000; Darras et al. 2005).

- **Les aldéhydes :** Comme les jasmonates, les aldéhydes sont capables de stimuler l'expression des gènes de défense, ils sont également capables d'accentuer la synthèse de terpènes, composés également capables d'activer des gènes de défense (Arimura et al. 2001). Ces observations ont été corroborées par Farag (Farag et Pare 2002), celui-ci a également montré que les C<sub>6</sub>aldéhydes stimulaient la production de phyto-oxylipines. La synthèse de jasmonates semble intensifiée par ces composés volatils (Creelman et Mullet 1997). Cependant, Gomi (Gomi et al. 2003) a montré que l'hexanal avait plutôt un effet contraire inhibant l'activité LOX et HPL. Par contre, le (3Z)-hexénal et le (2E)-hexénal favorisent la résistance du végétal face à des pathogènes, tel que *Botrytis cinerea* par un mécanisme semblable aux jasmonates, notamment en augmentant la lignification des cellules de la plante (Kishimoto et al. 2006).
- **L'éthylène :** C'est la phytohormone volatile la plus commune chez les plantes, elle est très impliquée dans les relations de signalisation plante-plante. Des études ont montré que cette molécule travaille en synergie autant avec les jasmonates (Ruther 2000) qu'avec les GLVs (Schmelz et al. 2003). L'éthylène est également capable d'induire une augmentation de l'activité des enzymes productrices d'oxylipines.
- **L'acide salicylique :** Phytohormone très étudiée, l'acide salicylique est impliqué dans la floraison, la transpiration, la croissance, mais également le système de défense des plantes, et plus précisément dans le cas de la SAR. L'acide salicylique stimule l'expression de gène de défense et l'activité d'enzyme productrice d'oxylipines telles que la LOX ou l'AOS (Clarke et al. 2000).

Par l'intermédiaire des molécules volatiles, les réactions de défense vont donc se propager au sein de la plante blessée, mais aussi chez les plantes proches géographiquement. Ces voies de signalétiques travaillent en synergie pour induire des mécanismes de défense cohérents. Les recherches ont également mené à identifier des composés communs à plusieurs voies de signalisation instaurant un « cross-talking » entre celles-ci (Blee 2002). Ce système de défense n'est pas spécifique à une espèce ou à une famille végétale donnée, mais est valable pour plusieurs espèces végétales. Ces molécules rendent donc possible la communication entre deux plantes d'une espèce différente même si la réaction de la plante face aux mêmes éliciteurs volatils peut être distincte selon l'espèce.

## **1.5. La production industrielle de GLVs**

### **1.5.1. Introduction**

Comme expliqués dans le premier chapitre, les GLVs représentent un secteur important de la production industrielle d'arômes, de par leur polyvalence et leur omniprésence. Environ 50% du

marché est réservé aux arômes artificiels ce qui représente 500 tonnes de produits, l'autre partie est destinée aux marchés des arômes naturels, environ 20 tonnes. Chaque secteur possède sa préférence pour le choix de type d'arômes, mais dans tous les cas, les arômes naturels sont utilisés avec plus de parcimonie, car leur prix est nettement plus élevé.

### 1.5.2. La synthèse chimique de GLVs

Le marché des GLVs comprend en majeure partie la synthèse d'arômes artificiels, dont principalement les aldéhydes et alcools en C6. La méthode de production est peu coûteuse et permet d'obtenir des rendements importants pour un produit final pur à 95%. La synthèse commence par la production des alcools en C6 à partir d'une combinaison de molécules d'éthylène et d'une oxydation. Des oxydations dirigées supplémentaires sont ensuite réalisées afin d'obtenir les aldéhydes. Après distillation, des mélanges purs à plus de 95% d'aldéhydes ou d'alcools peuvent être commercialisés à environ 25-50\$ le litre, selon la molécule synthétisée. Ce marché des molécules artificielles couvre 50% du chiffre d'affaires de la production mondiale des GLVs et environ 90% de la quantité totale de GLVs produits (Schwab et al. 2008).

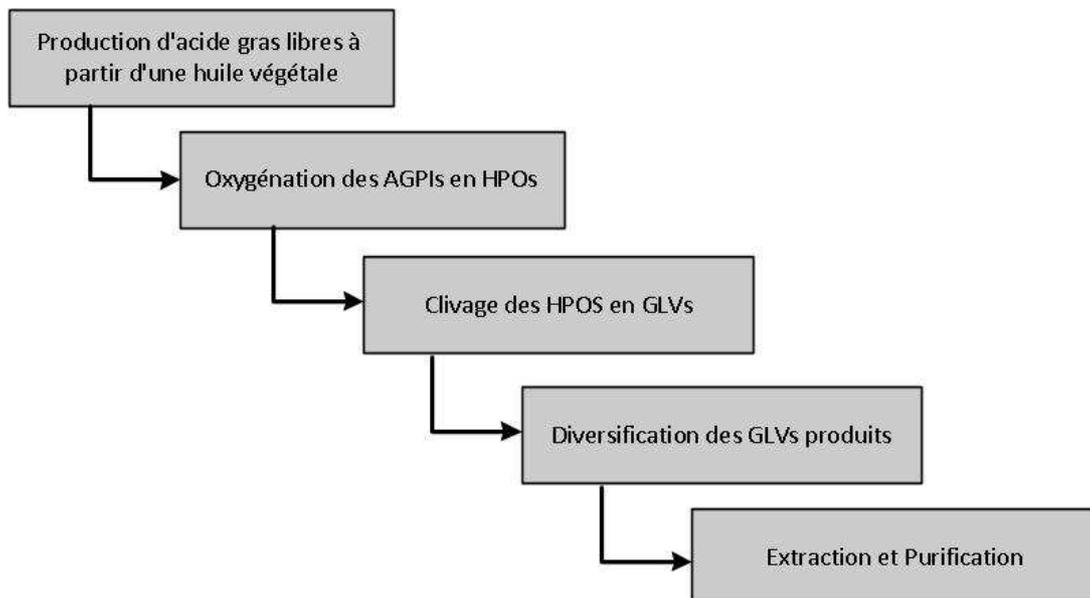


Figure 14 : Vue schématique de la production industrielle de GLVs naturels

### 1.5.3. La production de GLVs naturels

Les GLVs naturels sont des composés à haute valeur ajoutée (750 à 1000\$/L) et leur production est plus complexe et coûteuse que celle des arômes artificiels. Pour produire un arôme naturel, le substrat initial doit être d'origine végétale ou animale. Les huiles végétales riches en acides gras insaturés à 18 carbones sont les meilleurs substrats initiaux pour la production de GLVs, car elles sont peu coûteuses, aisément stockables et disponibles en large quantité. Les différentes réactions enzymatiques seront menées successivement sur ce substrat afin d'obtenir les GLVs. D'une manière générale, la synthèse biotechnologique reproduit la voie de métabolisation in vivo des GLVs. La production d'acide gras est suivie par une oxygénation enzymatique dirigée. Ensuite, les HPOs produits sont clivés par l'HPL et servent de base à la production de toute la diversité de GLVs. Le procédé se conclut par l'extraction et la purification des molécules aromatiques pour obtenir un produit fini pur à 95%.

### **1.5.3.1. La production d'acides gras**

La première étape de la synthèse des arômes est la production d'acides gras libres à partir de matière grasse complexe. Il est tout d'abord nécessaire de bénéficier d'une source de matière grasse riche en composés d'intérêts. Dans la plupart des cas, les huiles végétales raffinées sont sélectionnées pour leur haute teneur en AGPIs. Deux huiles retiendront particulièrement notre attention, l'huile de tournesol, riche en acide linoléique, substrat de choix pour la synthèse d'hexanal et le nonenal (Márczy et al. 2002), et l'huile de lin, riche en acide linoléique, pour la production d'hexenal et de nonedienal (Nemeth et al. 2004).

Les acides gras issus des huiles végétales sont présents sous forme de triglycérides, ils doivent être hydrolysés par une lipase afin de rendre possibles les étapes suivantes de la production de GLVs. Les lipases sont des enzymes particulières ne nécessitant pas de cofacteurs. Cependant, ces enzymes gardent une dépendance interfaciale, à ce sujet l'utilisation d'un solvant hydrophobe tel que l'hexane peut augmenter considérablement le rendement de cette première étape (Fu et al. 1995). Néanmoins, l'utilisation de solvant pose problème pour une synthèse d'un arôme alimentaire, au contraire de la production d'un arôme de parfumerie. La solution alternative est la réalisation d'une émulsion stable de l'huile dans une solution aqueuse par des procédés de mélange à haute vitesse et avec l'aide de molécules émulsifiantes. La synthèse d'acide gras peut également être réalisée par hydrolyse chimique des huiles. Ce type d'hydrolyse, si elle est réalisée avec de l'eau ou de l'éthanol, ne pose aucun problème avec les normes agroalimentaires. Mais les conditions drastiques d'hydrolyse demandent une réalisation de cette étape séparément du reste de la synthèse, sous peine de déstabiliser l'ensemble des enzymes intervenant plus tard dans la voie de synthèse.

### **1.5.3.2. La production d'hydroperoxydes d'acide gras**

La production d'HPOs est la seconde étape vers la synthèse des GLVs. Cette étape a déjà été développée et optimisée lors de différentes recherches scientifiques, notamment pour la production d'arômes. Pour parvenir à produire les HPOs, trois éléments sont essentiels :

- Des acides gras libres et plus précisément l'acide linoléique ou linoléique, voire un mélange des deux.
- Une source de LOX, l'oxydation devant être dirigée afin d'obtenir des 9- ou des 13-HPOs sera nécessairement enzymatique. La source devra être choisie en fonction de la stéréochimie du substrat et des produits. Gardner (Gardner et Plattner 1984) a décrit une liste des activités spécifique de LOX végétale selon l'HPO produit.
- Une source d'oxygène : l'oxygène est le cofacteur nécessaire à la réaction chimique il peut être injecté pur ou sous forme d'air comprimé.

Fauconnier (Fauconnier 1997) a décrit un système performant de production de 13-HPOs à partir d'huile de lin et de LOX de soja. Dans ses recherches, l'importance de la stéréospécificité de la LOX est mise en évidence, certaines isoformes de la LOX peuvent former des isomères d'HPOs différentes. Dès lors les conditions de réaction doivent favoriser au maximum le travail de l'isoenzyme LOX sélectionnée. Par exemple, pour la formation des 13-HPOs, Fauconnier a choisi de travailler à basse température et à pH basique, favorisant ainsi l'isoenzyme de type I formant les 13-HPOs. Des traitements spécifiques par la chaleur peuvent également réduire l'activité des autres isoformes de la LOX pour maximiser la production de l'HPO désiré (Nemeth et al. 2004). Fauconnier insiste également sur le mélange lors de la réaction. Les acides gras sont peu solubles dans l'eau, des gouttelettes de molécules se forment donc dans le milieu de réaction, une agitation forte va briser ses gouttelettes et augmenter la surface de contact entre les acides gras et les enzymes. Dans ce système classique, milieu tamponné et acides gras, le taux de production maximum reste limité à 50g d'HPOs par litre et par heure. Si les normes le permettent, dans le cas d'une production d'arômes de parfumerie par exemple, le système bienzymatique décrit par Drouet et Gargouri (Drouet et al. 1994; Gargouri et al. 2004) peut s'avérer très intéressant. Il propose de travailler en système biphasique pour la

production des arômes, la phase hydrophobe agissant comme réserve de matière grasse, et la phase hydrophile contenant les acides gras produits par la lipase. La LOX dégrade ensuite ces AGPIs en HPOs, qui restent toujours stockés dans la phase hydrophile. Cette technique permet de coupler la production d'acides gras libres et d'HPOs mais elle demande une extraction des HPOs de la phase hydrophobe avant la poursuite des autres réactions.

### 1.5.3.3. La production d'aldéhydes et d'alcools

Cette dernière étape de la production des GLVs est la plus complexe du fait de l'instabilité de l'HPL mais également de son inhibition vis-à-vis de son substrat. Le choix de la source enzymatique a beaucoup d'importance, le tableau ci-dessous reprend diverses HPLs végétales ainsi que leur spécificité envers le substrat.

Source	Famille	Spécificité	Référence
Melon (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Vick et Zimmerman 1976)
Thé (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Hatanaka et al. 1979)
Poire (Fruit)	CYP74C	9-HPOT = 9-HPOD	(Kim et Grosch 1981)
Pomme (Fruit)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Schreier et Lorenz 1982)
Épinard (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Vick et Zimmerman 1987)
Soja (Graines)	CYP74C	13-HPOT/D > 9-HPOD/T	(Gardner et al. 1991)
Soja (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Gardner et al. 1991)
Poivrons (Fruits)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Matsui et al. 1996)
Tournesol (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Itoh et Vick 1999)
Haricot mung (Graines)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Rehbock et al. 1998)
Concombre (Fruits)	CYP74C	13-HPOT/D = 9-HPOD/T	(Matsui et al. 2000)
Luzerne (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT = 13-HPOD	(Noordermeer et al. 2000)
Tomate (Fruits)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Suurmeijer et al. 2000)
Poire (Graines)	CYP74C	13-HPOT/D = 9-HPOD/T	(Hornostaj et Robinson 2000)
Pastèque (Fruits)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Holtz et al. 2001)
Melon Musc (Fruits)	CYP74C	9-HPOD > 9-HPOT	(Brash et al. 2001)
Menthe (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Gargouri et al. 2004)
Orge (Graines)	CYP74C	9-HPOT = 9-HPOD	(Kuroda et al. 2005)
Riz (Graines)	CYP74C	13-HPOT/D = 9-HPOD/T	(Kuroda et al. 2005)
Amende (Graines)	CYP74C	9-HPOT = 9-HPOD	(Mita et al. 2005)
Betterave (Feuilles)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Rabetafika et al. 2008)
Medicago (Feuilles)	CYP74C	13-HPOT/D = 9-HPOD/T	(Hughes et al. 2006)
Olive (Fruits)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Padilla et al. 2010)
Guava (Fruits)	CYP74B	13-HPOT > 13-HPOD	(Valecillos et Fermin 2010)

Tableau 5 : Liste des organismes végétaux dans lesquels une activité HPL a été identifiée. Celle-ci est représentée en relation avec la spécificité et la famille enzymatique dont elles proviennent.

Comme l'étape précédente, la production d'aldéhydes est réalisée dans un bioréacteur afin d'ajuster le pH et la température du milieu de synthèse. HPL du fait de son manque de stabilité devra être continuellement ajoutée au milieu, soit par l'intermédiaire de végétaux (table 5), soit par l'intermédiaire d'une source alternative. Différents auteurs ont mis en place des systèmes de production de GLVs, mais jusqu'à présent ces systèmes sont coûteux et peu rentables (Buescher et Buescher 2001; Márczy et al. 2002; Noordermeer et al. 2002; Fukushige et Hildebrand 2005). Récemment, Nemeth a optimisé la production de GLVs à partir d'HPL de poivrons atteignant des teneurs proches de 10mM, ce qui est rentable en vue d'une extraction et d'une purification (Nemeth et al. 2004).

Après la production des aldéhydes, ceux-ci peuvent être transformés en alcool par l'intermédiaire de l'ADH (Fauconnier et al. 1999). Les paramètres de la synthèse vont ainsi permettre de définir la nature des produits obtenus dans le bioréacteur. En effet selon les temps de réaction entre l'HPL et l'ADH, les isomères 3Z ou 2E pourront être sélectionnés. Plusieurs auteurs (Gargouri et al. 2004; Nemeth et al. 2004) ont montré que l'isomérisation des aldéhydes 3Z en 2E n'est pas instantanée, mais demande plusieurs minutes ou quelques heures. En choisissant le moment d'ajout de l'ADH, on peut ainsi stabiliser l'un ou l'autre produit sous forme d'alcool. Cette transformation bienzymatique des HPOs en alcools a été modélisée afin de pouvoir prévoir les résultats expérimentaux selon les conditions de réaction (Akacha et al. 2005). Les GLVs peuvent également être transformés sous forme d'esters, ces nouvelles molécules possèdent un pouvoir aromatique réduit, mais une stabilité chimique très élevée (Tan et Siebert 2004). La synthèse d'ester tel que l'(3Z)-hexényl acétate peut être réalisée par l'intermédiaire de l'alcool acyle transférase (Liaquat 2011).

#### **1.5.3.4. L'extraction et la purification des molécules d'intérêts**

La production des GLVs mène à un mélange de molécules aromatiques faiblement solubles dans un milieu aqueux chargé en AGPIs, HPOs et débris cellulaires issus de végétaux ou de microorganismes. Différentes approches peuvent être mises en œuvre afin de procéder à l'extraction des GLVs. Dans la littérature, les auteurs réalisent généralement une filtration suivie d'une distillation afin de récupérer et de purifier les molécules aromatiques. Cette technique est cependant coûteuse, entraîne des modifications sur certaines molécules sensibles à la chaleur, comme l'isomérisation du (3Z)-hexénal en (2E)-hexénal (Noordermeer et al. 1999).

#### **1.5.3.5. L'utilisation de protéines recombinantes lors de la synthèse des GLVs**

En conséquence de son instabilité, de sa faible teneur dans les organismes végétaux ainsi que de sa difficulté à être purifiée, l'HPL est le facteur limitant de la synthèse industrielle de GLVs. Dès lors, beaucoup d'efforts ont été consentis afin de cloner ce gène pour produire cette enzyme en plus larges quantités. En effet, depuis l'identification et le séquençage du gène HPL issu de *Capsicum annuum* (Matsui et al. 1996), plus de 30 gènes d'HPL dans 15 espèces différentes ont été identifiés. Après ces séquençages, l'enzyme a été clonée avec succès à partir de luzerne (Noordermeer et al. 2000), de la noix (Mita et al. 2001), du poivron (Bourel et al. 2004), du melon (Tijet et al. 2001), et de la tomate (Howe et al. 2000; Matsui et al. 2000; Atwal et al. 2005). Ces différents clonages ont été réalisés dans des vecteurs procaryotes (*Escherichia coli*) et eucaryotes (*Pichia pastoris* et *Yarrowia lipolytica*). La différence fondamentale entre les deux systèmes d'expression est la possibilité de production d'enzymes extracellulaires dans le cas d'eucaryote. Cependant les taux d'enzymes obtenus sont largement supérieurs dans le cas des clonages avec *Escherichia coli*.

---

## 2 : Objectif de la thèse de doctorat

---

### **2.1. Préliminaires et objectif initial**

Le marché mondial des arômes industriels naturels et artificiels équivaut approximativement à 4 milliards de dollars dont environ 2/3 sont écoulés en Europe occidentale et aux États-Unis (Schwab et al. 2008). La croissance annuelle liée aux secteurs agroalimentaires est de 5 à 6 % avec une tendance majeure vers les produits labellés naturels. Cette augmentation, stimulée par la bonne image des matières premières naturelles, est réalisable grâce aux perspectives offertes par les résultats de recherches scientifiques. La plupart des procédés existants de production d'arômes naturels sont construits sur base d'une particularité spécifique d'un substrat végétal ou animal. A la suite d'analyses préliminaires réalisées sur différents sous-produits foliaires, il a été démontré que la feuille de betterave dispose de richesses en enzymes métabolisant des arômes naturels très recherchés : les GLVs. Ces feuilles, sous-produits inexploités de l'agriculture, sont abandonnées sur les champs de culture après l'arrachage des plantes pour être plus tard incorporées au sol en tant qu'amendement. Cette richesse suggère un haut potentiel de valorisation de ce substrat aisément disponible en très grandes quantités et dont la récolte ne pose aucun problème technique. Afin d'établir les potentialités technologiques de l'exploitation des feuilles, une caractérisation complète, au-delà de simples dosages de composés aromatiques, est mise en œuvre. Cette étude va décrypter les relations entre les matières premières, les intermédiaires réactionnels et les produits finaux. Selon les résultats de ces expériences, un procédé de synthèse des GLVs sera développé. L'objectif final est de disposer, au terme de l'élaboration d'un procédé, d'arômes naturels purs (> 95%) pouvant occuper une niche commerciale dans le secteur agroalimentaire. Un procédé biotechnologique rentable à l'échelle pilote sera développé lors de nos travaux afin d'estimer la faisabilité industrielle d'une telle production.

### **2.2. Extraction brute des GLVs**

Au-delà de sa richesse enzymatique, la feuille de betteraves peut disposer de concentrations en GLVs très élevées dans ses tissus. Ces composés, communs à l'intégralité des plantes supérieures ne sont habituellement pas accumulés dans les tissus, et ce, quel que soit la teneur en enzymes les métabolisant. D'ailleurs, ces composés biologiquement actifs sont plutôt sécrétés dans l'atmosphère pour être dispersés dans un environnement proche de la plante. Néanmoins, l'épaisse cuticule et la large masse foliaire des betteraves peuvent contenir des quantités non négligeables de GLVs adsorbés. Concomitamment d'une collecte d'informations physiologiques sur la voie de synthèse, le dosage de GLVs dans les tissus peut mettre en évidence la faisabilité d'une extraction brute de ces arômes volatils. D'un point de vue économique, l'analyse cible particulièrement le (2E)-hexénal et le (3Z)-hexénol qui sont les GLVs présentant le plus de débouchés sur le marché aromatique.

### **2.3. Étude des niveaux de précurseurs et d'enzymes en vue de l'adaptation d'un procédé biotechnologique.**

À défaut de disposer de taux en GLVs suffisants importants pour adapter un système d'extraction brute, l'élaboration d'un procédé biotechnologique de production est envisagée. Ce système exploite les richesses enzymatiques de la feuille afin de reproduire les réactions de la cascade enzymatique et de les transférer dans un milieu liquide agité. Cette étude nécessite l'analyse de l'ensemble des potentialités en termes de précurseurs et d'enzymes présents dans la feuille de betterave. Initialement, les GLVs dérivent de la matière grasse de réserve et plus précisément de molécules contenant des AGPIs à 18 carbones. L'intervention successive de plusieurs enzymes transforme ces molécules en aldéhydes et en acides à courte chaîne. Afin d'évaluer le potentiel de synthèse des GLVs, la fraction grasse est extraite et partitionnée de manière à pouvoir estimer le taux d'AGPIs à 18

carbones disponibles. Le niveau d'HPOs insaturés, précurseurs directs des GLVs, est également étudié. Également, la recherche d'enzymes impliquées dans la voie de la lipoxygénase constitue l'étape indispensable de cette étude de potentialité. Les premières enzymes étudiées sont directement impliquées dans la cascade réactionnelle menant à la synthèse de GLVs : les lipases, lipoxygénases, hydroperoxyde lyases, isomérases et alcool déshydrogénases. Ensuite, d'autres enzymes menant à des voies parallèles impliquées dans la dégradation des HPOs sont également étudiées. Ces enzymes rivalisent avec HPL pour le même substrat et réduisent le taux de GLVs productibles. L'ensemble de ces analyses évalue la capacité des feuilles betteraves à produire des GLVs en vue de l'élaboration d'un procédé industriel enzymatique.

#### ***2.4. Développement de solutions alternatives aux ressources limitées présentes dans les feuilles de betteraves.***

Les ressources dont dispose la betterave sont peu élevées au niveau de plusieurs réactions enzymatiques réduisant les taux de transformations finaux. La cascade enzymatique de transformation de la matière grasse en GLVs peut être assimilée à une chaîne dont la résistance dépend de la solidité du maillon le plus fragile. En vue de l'adaptation d'un procédé biotechnologique, des solutions alternatives doivent être développées afin de tirer un profit maximal de la richesse du substrat végétal initial. La production biotechnologique d'arômes naturels est soumise à la législation européenne sur les substances aromatisantes naturelles, les sources alternatives devront nécessairement être d'origine végétale ou animale. Dans la mesure où la voie de la LOX/HPL menant aux GLVs est exclusivement végétale, les recherches de sources alternatives de substrats ou d'enzymes sont menées sur différents végétaux. Au cours de ces analyses, les substrats économiques, disponibles et peu valorisés seront choisis de manière à réduire les coûts de production.

#### ***2.5. L'élaboration d'un procédé industriel***

La conception d'un procédé de production à partir des richesses de la feuille de betterave et éventuellement de ressources supplémentaires constitue l'objectif principal de ce travail. Ce procédé sera intégré au sein d'une biotransformation complète de la matière première pour former des arômes naturels. La matière grasse sélectionnée est transformée en GLVs par des réactions enzymatiques successives. Au cours de cette bio-transformation, la productivité est optimisée (parfois au détriment du rendement) du fait que les coûts en matières premières sont nettement inférieurs aux prix de revient des produits finaux. Le procédé biotechnologique est également adapté aux exigences fixées dans le codex alimentarius. Les opérations d'affinage telles que l'extraction et la purification sont développées dans cette partie du travail. Enfin, les déchets générés par la production sont recyclés dans la mesure du possible, afin d'éviter les surcoûts liés à leur gestion et afin de récupérer une partie de l'argent investi dans l'achat des matières premières.

#### ***2.6. L'optimisation du procédé***

Chaque étape réactionnelle intégrée dans la biotransformation est optimisée en vue d'une capacité de production finale élevée par l'intermédiaire d'innovations biotechnologiques. L'étude détaillée des réactions est d'ailleurs capitale afin de décrypter les facteurs réactionnels influençant le taux de molécules produites. Ces améliorations concernent la modification de paramètres réactionnels, mais également l'enrichissement de la matière première en enzymes au travers des stimulations spécifiques de la voie de la LOX. En tant que maillon essentiel du système de défense des plantes, la voie enzymatique peut être stimulée par des agressions mécaniques, chimiques ou biologiques. Chacune d'entre elles ayant un impact spécifique sur l'expression des enzymes et la disponibilité des précurseurs. Ces expériences permettent également de collecter des informations physiologiques sur

la plante selon les différents stimuli appliqués. L'optimisation du procédé exploite des techniques biomoléculaires avancées de manière à isoler les gènes relatifs aux enzymes impliquées dans la production de GLVs. Afin d'élucider les mécanismes réactionnels complexes et de disposer d'enzymes sans contraintes externes, certains gènes seront clonés et exprimés dans des souches spécifiques pour l'expression de protéines hétérochtones.

## **2.7. Le *scale-up***

Les biotransformations de produits végétaux destinés à l'industrie alimentaire sont réalisées à grande échelle. Après la conception du procédé à l'échelle laboratoire (jusque deux litres), celui-ci sera extrapolé dans des bio-réacteurs agités de 100L. Les optimisations réalisées à faible échelle seront transposées de manière à conserver une capacité de production maximale. L'augmentation du volume demande une gestion de l'opération de mélange approfondie afin d'éviter les phénomènes de gradients de concentration. Le *scale-up* va permettre également de juger de la rentabilité de la production et de pouvoir ainsi tirer des conclusions sur les perspectives de développement industriel du procédé.

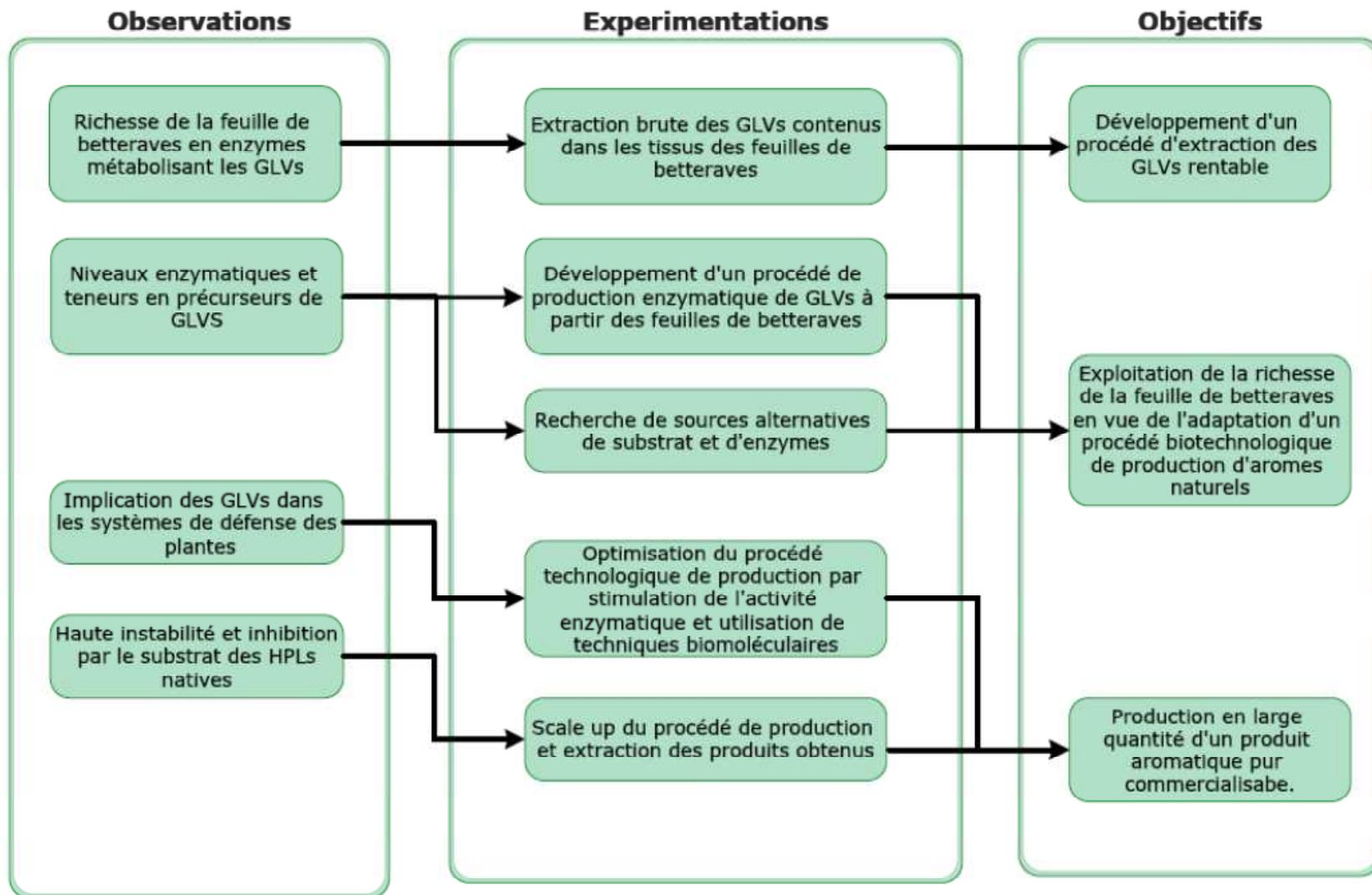


Figure 15 : Plan de développement de la recherche scientifique sur la synthèse des GLVs à partir de feuilles de betteraves.

# **PARTIE**

# **EXPÉRIMENTALE**

---

---

## 3. Matériel et Méthodes

---

### 3.1. Caractérisation de la feuille de betterave

#### 3.1.1. Collecte et broyage des feuilles de betterave

Les feuilles de betteraves constituent un substrat hétérogène, elles doivent subir plusieurs opérations avant d'être utilisées comme un analyte. Les feuilles servant aux expériences qui sont décrites dans ce travail ont été récoltées en champs ou en serre. La collecte a fait l'objet de choix particuliers :

- Les feuilles ont été récoltées sur champs (sol : sablo – limoneux) présentant la même variété : Cultivar Marcel (Pype©) pour les expériences de caractérisation et cultivar Anastasia (KWS) pour les productions, sauf si un autre cultivar est spécifié.
- La récolte est effectuée sur des plantes présentant un phénotype sain situées à des localisations où l'ensoleillement est maximal.
- Des feuilles âgées et jeunes ont été récoltées afin d'avoir un échantillon représentatif de la totalité de la plante.

Après la récolte, les feuilles sont conservées à -20°C, le délai entre la collecte et la conservation ne doit pas excéder une heure sachant que les métabolites et les enzymes étudiés sont sensibles aux hautes températures. Lors de la réalisation d'une expérience, au minimum 100 grammes de feuilles sont lavés à l'eau de ville pour supprimer tout élément externe au végétal (terre, poussières, ...). Les feuilles sont ensuite séchées pendant une heure sur du papier absorbant. Seul le limbe de la feuille est conservé pour la suite des expériences. Le broyage des feuilles est réalisé manuellement avec un pilon et un mortier sous azote liquide. Pour obtenir un échantillon plus fin, le broyage peut être poursuivi avec un broyeur universel A10 (IKA, Staufen, Allemagne) régulé par un circulateur réfrigéré SC100-A28 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-unis) avec une température de consigne de -10°C. La température est contrôlée tout au long du processus afin d'éviter toute dégradation de la matière première. Une fois broyées, les échantillons sont ensuite conservés à -20°C ou à -80°C selon les expériences à réaliser.

#### 3.1.2. Lyophilisation des feuilles de betteraves

La feuille de betterave contient une quantité élevée d'eau, la lyophilisation est un procédé permettant d'augmenter la durée de conservation des feuilles broyées. De plus, elle permet de concentrer les matières non volatiles en supprimant l'eau présente dans l'analyte, facilitant ainsi certaines analyses. Cette lyophilisation est menée sur des échantillons de 500g dans un lyophilisateur pendant 72H à -50°C. Les poudres récupérées sont ensuite stockées au dessiccateur.

#### 3.1.3. Analyse de la matière sèche dans les feuilles de betteraves

Les feuilles broyées, mélangées avec du sable dans une cuvette adéquate sont mises à l'étuve à 105°C pendant 24h. Ensuite après deux heures au dessiccateur, les cuvettes sont pesées et la matière sèche est calculée.

$$\% \text{ de Matière sèche} = (P_{\text{sec}} - P_{\text{vide}}) / (P_{\text{frais}} - P_{\text{vide}}) \times 100$$

#### 3.1.4. Dosage des protéines

Les dosages protéiques ont été réalisés par un appareil Kjeldhal automatique composé d'un Kjelttec 1030 et d'un Digesteur 1015 (Foss, Hillerød, Danemark). Le principe est basé sur une minéralisation de l'échantillon par de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré avec catalyseur. L'échantillon rejette des vapeurs

ammoniacales qui sont absorbées dans une solution d'H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. L'ammoniaque est ensuite titrée en retour avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02N. La teneur en azote dans l'échantillon pourra être estimée par la formule suivante :

$$\%N = (\text{ml H}_2\text{SO}_4 \cdot 28) / \text{Poids de l'échantillon}$$

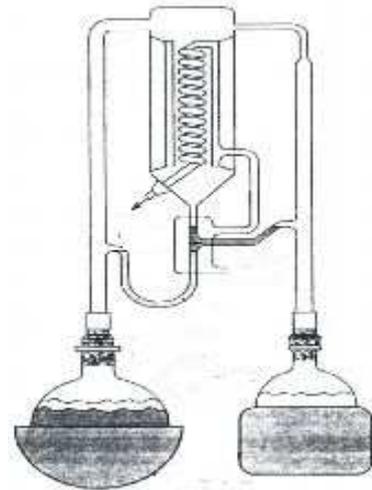
La teneur en protéines est ensuite calculée par la relation moyenne suivante :

$$\% \text{ Protéines} = \%N \cdot 6,25$$

### 3.1.5. Teneur des feuilles en GLVs

#### 3.1.5.1. Extraction selon Likens-Nickerson

L'extraction selon Likens-Nickerson est réalisée avec l'éther en tant que solvant extracteur, ce type d'extraction a été choisi, car il permet de conserver l'intégrité des molécules sensibles aux hautes températures. Dans cette configuration, un ballon contenant le solvant et un ballon contenant l'échantillon sont chauffés séparément afin d'être amenés à ébullition. L'extraction a lieu dans une section intermédiaire du dispositif où les vapeurs des deux ballons sont condensées par un réfrigérant à -20°C. Le surplus de solvant, moins dense que l'eau, est redirigé par reflux vers le ballon qui contiendra l'extrait en fin de processus. Dans notre expérience, 5g de feuilles broyées sont mélangés avec 25 ml d'eau, cela constitue l'échantillon qui sera chauffé à 160°C. Le ballon de solvant contient 5ml d'éther chauffé à 50°C. L'extraction est menée pendant 90 minutes et l'extrait est conservé à 4°C.



#### 3.1.5.2. Solid Phase Micro Extraction

L'adsorption et le dosage des éléments volatils, après broyage, peuvent être également réalisés par SPME. Les feuilles sont broyées dans un milieu confiné et mis en contact avec la fibre PDMS. La fibre PDMS/DVB adsorbe les molécules volatiles émises par 5g de feuilles de betteraves maintenus à 40°C via un bain thermostatisé. Le contenu de la fibre est ensuite directement analysé par GCMS.

#### 3.1.5.3. Analyse chromatographique des GLVs

##### 3.1.5.3.1. Configuration des injecteurs

Lors de l'analyse SPME, l'injecteur *split/splitless* avec une chambre d'injection adaptée à la SPME est utilisé. Sa température initiale de 150°C est maintenue 3 minutes, elle est ensuite augmentée de 30° par minute jusqu'à 230°C. Concernant un extrait classique (éther ou hexane), l'injecteur *on-column* est utilisé avec une température initiale de 50°C augmentée jusqu'à 230°C. Le volume d'injection est de 1µl.

##### 3.1.5.3.2. Configuration du four

L'analyse chromatographique est menée sur un appareil Hewlett Packard 6890C équipé d'une colonne CPWAX52CB (48mx0.25mm épaisseur de particule 0.15µm, Chrompack, The Netherlands). La température du four initialement programmée à 50°C est augmentée jusqu'à 240°C. La colonne est alimentée par un flux d'hélium à 0.8ml/min.

### 3.1.5.3.3. Configuration des détecteurs

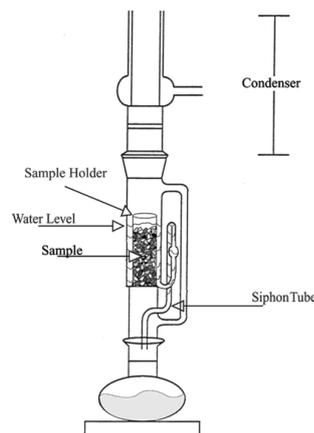
Dans le cas d'une analyse quantitative classique, le détecteur FID est utilisé à une température de 250°C. Le spectromètre de masse peut également être utilisé avec les conditions suivantes : masse analysée (m/z) entre 60 et 450, température de la source 250°C et tension d'ionisation 70eV.

## 3.1.6. Teneur des feuilles de betteraves en matière grasse.

La teneur en matière grasse des feuilles est très faible et ces composés sont rapidement dégradables à haute température, la méthode d'extraction doit donc être adaptée. Selon ces limitations, trois méthodes ont été utilisées et étudiées.

### 3.1.6.1. La méthode d'extraction Soxhlet

La méthode Soxhlet est une extraction à chaud de la matière grasse, avec en général un très bon rendement, mais pouvant dégrader les molécules sensibles, telles que les phospholipides et les galactolipides. L'extraction Soxhlet est réalisée avec 50 ml d'hexane pour deux grammes de feuilles broyées. Le chauffage du solvant est progressif jusqu'à 80°C et l'extraction est maintenue pendant six heures. L'échantillon est ensuite concentré au rotavapor, avant de pouvoir être à nouveau dissous dans un solvant organique.



### 3.1.6.2. La méthode d'extraction Folch

Cette méthode d'extraction à froid est largement répandue pour le matériel végétal (Folch et al. 1957). Deux grammes de feuilles de betteraves sont extraits par 50 ml d'un mélange solvant Chloroforme - Méthanol (2/1) pendant 45 minutes. L'extrait est ensuite filtré et décanté dans une ampoule. Pour faciliter le passage des molécules grasses vers la phase organique une solution salée à 0.9% est ajoutée à la phase aqueuse. La phase organique est récupérée ainsi que l'interphase, souvent riche en molécules grasses. L'extrait est concentré au rotavapor.

### 3.1.6.3. La méthode d'extraction Blight And Dyer

Cette méthode est adaptée à des analytes contenant moins de 1 % de matière grasse par rapport au poids frais (Blight et Dyer 1959). 5 grammes de feuille sont extraits par 150ml de mélange solvant méthanol – chloroforme (2/1). Le mélange est passé au waring blendor pendant 2', en étant successivement augmenté de 50ml de chloroforme et de 50ml d'eau distillée entre chaque mélange. Enfin, le mélange est filtré et décanté. La phase organique est récupérée et peut être concentrée au rotavapor.

### 3.1.6.4. Détermination du profil en acide gras

La matière grasse extraite est mise en solution dans du chloroforme (environ 10mg/ml). Après ajout de 0,2ml d'hexane et de 0,5ml de solution d'estérification (Hexane, BF<sub>3</sub>-Méthanol, Méthanol) à 1ml de solution à analyser, la solution est placée au bain-marie à 70°C pendant 90'. Ensuite, les échantillons sont refroidis à l'eau, on y ajoute 0,2ml d' H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10%, 0,5 ml de NaCl saturé et 8ml d'hexane. La phase hexanique est ensuite récupérée après centrifugation et analysée en GC.

### 3.1.6.5 Analyse des acides estérifiés par GCMS

L'analyse est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 6890C équipé d'un injecteur split/splitless configuré comme suit : le volume injecté est de 0,5 µl, la colonne est une CPWAX52CB (48mx0.25mm épaisseur de particule 0.15µm, Chrompack, The Netherlands) ; la

température du four est initialement maintenue à 50°C pendant 1min, ensuite augmentée de 8°C par minute jusqu'à 255°C, température finale à laquelle le four est maintenu pendant 10' ; le gaz vecteur est l'hélium à 1ml/min ; enfin le détecteur FID est configuré à 255°C tandis que le spectromètre de masse est configuré de la manière suivante : masse analysée (m/z) entre 60 et 450, température de la source de 255°C et tension d'ionisation 70eV.

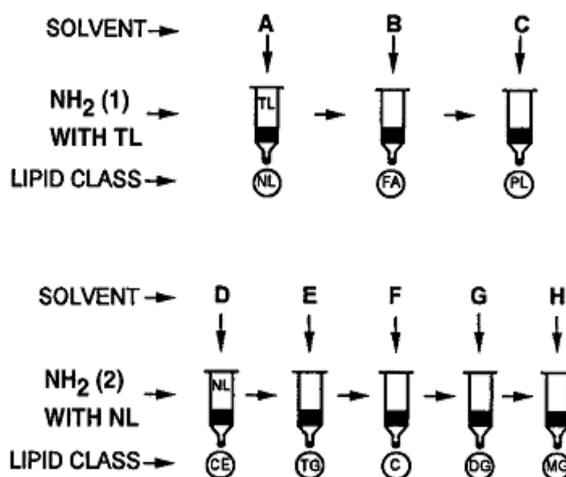
### 3.1.7. Fractionnement de la matière grasse

#### 3.1.7.1. Chromatographie sur couche mince à haute résolution

Des plaques de chromatographie sur couche mince de 10cm X 10cm sont lavées au chloroforme méthanol (2/1). Les spots correspondants aux extraits Soxhlet Folch et Blight&Dyer sont déposés conjointement avec les témoins suivants : phospholipides (sphingomyéline, phosphatidyl choline, phosphatidyl éthanolamine, acide phosphatidique, phosphatidyl inositol), triglycérides (trioléine), esters d'acide gras et monoglycérides. Le mélange solvant est de composition suivante : chloroforme / méthanol / eau / acide acétique (50/30/4/8). La migration dure environ 90 minutes et les spots sont révélés à l'iode.

#### 3.1.7.2. Fractionnement par SPE

Les extraits de matière grasse peuvent être fractionnés sur des colonnes de silice aminopropylée (NH<sub>2</sub> Mega Bond ELUT Varian, Palo Alto, Canada) selon la méthode de Vaghela (Vaghela et Kilara 1995). 1,5 ml d'extrait brut de matière grasse est déposé en tête de colonne et successivement élué avec les solvants A : chloroforme – isopropanol (2/1), B : éther + 2% acide acétique et C : méthanol pour obtenir les classes suivantes : NL lipides neutres, FA acides gras libres et PL phospholipides. Les lipides neutres peuvent être séparés en sous-classes avec les solvants D : hexane, E : 1% (vol/vol) diethyl éther, et 10% (vol/vol) dichlorométhane dans l'hexane, F : 5%



(vol/vol) acétate d'éthyl dans l'hexane, G : 15% (vol/vol) acétate d'éthyl dans l'hexane et H : 2:1 (vol/vol) chloroforme/méthanol qui extraient les classes CE, esters de stérol; TG, triacylglycerols; C, stérol; DG, diacylglycerols; MG, monoacylglycerols. Ces fractions sont ensuite transférées dans un ballon afin d'être concentrées au rotavapor et pesées.

### 3.1.8. Évaluation des teneurs en oxylipines

#### 3.1.8.1. Extraction des oxylipines libres

Les teneurs en oxylipines ont été évaluées par HPLC, après leur extraction (Laine et al. 2006). Deux types d'oxylipines sont analysés, les oxylipines libres, et les oxylipines estérifiées à la matière grasse. Deux grammes de poudre de feuilles de betteraves (avec le standard interne : 13 γ –HOTE) sont extraits sur glace avec 20ml de solution HIP (isohexane/ alcool isopropylique (3/2) + 0,0025% de butyl hydroxytoluène). L'échantillon est homogénéisé à l'Ultra-turrax à 12000 RPM afin de former un mélange uniforme. Ensuite, l'échantillon est placé au mélangeur rotatif pendant 10 minutes avant de réaliser une centrifugation à 3000g et 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et on ajoute du sulfate de potassium 6,7 % jusqu'à un volume total de 32,5 ml. A nouveau l'échantillon est

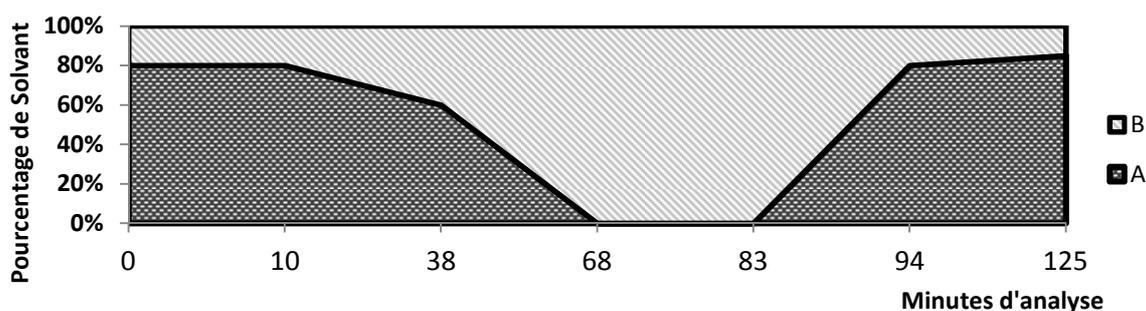
placé au mélangeur rotatif pendant 10 minutes avant de réaliser une centrifugation à 3000g, 4°C pendant 10 minutes. La phase supérieure, riche en hexane, est récupérée dans un tube de 15ml. Le solvant est récupéré et le culot est remis en solution l'échantillon dans un eppendorf contenant 1200 µl d'hexane/isopropanol (100:5) et l'échantillon est concentré par évaporation sous nuage d'azote. Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C et préparés pour l'analyse HPLC en reverse phase. L'échantillon est dissous dans 70 µl de solution méthanol / H<sub>2</sub>O / HOAc (75/25/0,1), vortexé fortement et centrifugé 5 min à 13.000 tour.min<sup>-1</sup>. 100µl de surnageant sont récupérés, avec une pipette Pasteur et transférés dans un vial HPLC.

### 3.1.8.2. Extraction des oxylipines estérifiées

L'extraction des oxylipines estérifiées se passe de la même manière que pour les oxylipines libres, si ce n'est que l'étalon interne utilisé est le tricinoléate et une étape de transméthylation est introduite avant l'analyse HPLC. 330µl de solution de toluène/méthanol (2/1) et 170µl de solution de sodium méthoxyde 0.5M sont ajoutés à l'échantillon débarrassé de solvant. La solution est mélangée pendant 20 minutes et ensuite additionnée de 500µl de solution de NaCl saturée et de 20µl d'acide hydrochlorique 32 % (v/v). Les méthylesters résultants de la réaction sont extraits avec 1ml d'hexane et séchés sous flux d'azote. Les échantillons sont redissolus dans l'acétonitrile et stockés à -20°C sous azote.

### 3.1.8.3. Analyse RP-HPLC

Les oxylipines sont tout d'abord séparées en famille par HPLC sur une colonne apolaire. L'analyse est réalisée sur un HPLC HP séries 1100 équipé d'une colonne EC250/2 Nucleosil 120-5 C18 (250mm x 2.1mm, 5µm de taille de particule, Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les solvants sont les suivants : Solvant A : méthanol / eau / acide acétique (75/15/0.1), solvant B : méthanol / eau / acide acétique (100/0/0.1). L'intensité du flux des solvants A et B varie selon le graphe ci-dessous. Le volume injecté est de 80µl et les pics correspondant aux dérivés de l'acide linoléique et de l'acide linoléinique sont récupérés. Le débit de phase mobile est de 0.18ml/min jusqu'à 30', il est augmenté linéairement à 0.35ml/min jusque 65' et maintenu 10' pour ensuite redescendre à 0.18ml/min après 125 minutes d'analyse.



### 3.1.8.4. Analyse SP-HPLC

Les échantillons collectés de chacune des familles d'oxylipines dérivées des acides gras récoltées sont mis en solution dans l'hexane avant d'être injectés sur une colonne polaire. L'analyse est réalisée sur un HPLC HP série 1100 équipé d'une colonne Zorbax Rx-SIL (150mm x 2.1mm, 5µm, Agilent, Santa Clara, États-Unis), la phase mobile est la suivante : n-hexane/2-propanol/acide acétique (100 :1 : 0.1) injectée à 0,2 ml/min. Le volume injecté est de 25µl et le détecteur à diode array est programmé entre 240 et 270nm. Les fractions correspondant aux oxylipines d'intérêts sont à nouveau collectées pour l'analyse chirale.

### **3.1.8.5. Analyse Chirale-HPLC**

Cette analyse va permettre de distinguer les énantiomères R et S des différentes oxylipines, l'établissement des rapports racémiques de chaque composé permet d'identifier si son origine est enzymatique ou non. L'analyse est conduite sur un HPLC Agilent série 1100 équipée d'une colonne chirale OD-H (150 mm x 2,1 mm, 5 µm, Daicel, Tokyo, Japon), le solvant est le même que précédemment n-hexane/2-propanol/acide acétique (100 :1 : 0.1) à un débit de 0.1ml/min. Le volume injecté est de 10µl.

### **3.1.9. Dosage de l'activité lipase**

L'activité lipase est mesurée par la dégradation des triglycérides, soit de manière qualitative en observant l'hydrolyse de la tributyrine, soit de manière quantitative par un titrage des acides gras.

#### **3.1.9.1. Mise en évidence de l'hydrolyse de la tributyrine**

Des boîtes de Pétri contenant un milieu à base de 15g/l d'Agar et de 9g/l de tributyrine sont préparées. L'extraction enzymatique est réalisée de la même manière que dans le dosage avec l'huile d'olive. Des morceaux de papier filtre sont ensuite imbibés d'extrait enzymatique et déposés à la surface des boîtes de Pétri. L'incubation dure 24h à 30°C. Après ce temps, des halots transparents apparaissent autour des bandelettes de papier suite à l'hydrolyse de la tributyrine. Cette méthode est exclusivement qualitative.

#### **3.1.9.2. Titrage des acides gras**

25 grammes de feuilles de betteraves sont extraits au tampon phosphate pH 6.7 avec 3mmol d'EDTA, 0.5% de triton X-100 et 5mmol de cystéine pendant 60' et à 4°C. Le mélange est ensuite centrifugé à 10000g pendant 15' et à 4°C, le surnageant est conservé. Une émulsion d'huile olive et d'eau est réalisée à l'Ultra-turrax : huile d'olive 100ml, NaOH 0,1N 30ml et 270 ml de PVA 0,2%. 3 ml d'émulsion sont ensuite digérés par 2 ml d'extrait enzymatique pendant 15minutes à 37°C et sous agitation. Après incubation, 5ml de Solution STOP (50% éthanol (98%), 50% acétone) sont ajoutés afin d'arrêter la réaction enzymatique. La solution est finalement titrée par une solution de NaOH 0,05N contenant de la phénolphthaléine.

### **3.1.10. Dosage de l'activité lipoxygénase**

La LOX est une enzyme relativement stable et présentant des tolérances aux hautes et basses températures, la méthode la plus facile de dosage est une méthode spectrométrique mesurant la production d'hydroperoxydes d'acides gras au cours du temps. Un dosage chromatographique de ces produits peut également être réalisé par HPLC.

#### **3.1.10.1. Préparation du substrat**

Le substrat est préparé sous forme d'une émulsion. 140mg d'acide linoléique (Sigma-Aldrich, 85, 601-0) ou d'acide linoléique (Sigma, L2376-500) sont mélangés à 50ml d'eau à 4°C désoxygénée à l'azote et contenant 18mg de Tween 20 et 0,3 ml de NaOH 0,2N. Le substrat est partitionné en aliquotes de 1ml conservées à -20°C.

#### **3.1.10.2. Extraction de la LOX**

1g de feuilles de betterave est dilué dans 20 ml de tampon phosphate de sodium froid (0,1 M, pH 7,5) contenant du métabisulfite de Na (2mM). L'extraction est poursuivie sur glace pendant 30 minutes. Après une centrifugation à 30000g pendant 15min, le surnageant est conservé en tant qu'extrait enzymatique.

### 3.1.10.3. Mesure de l'activité LOX

En spectrométrie, la mesure est réalisée dans une cuvette en quartz de 3ml contenant 50µl de substrat de 50 à 150µl d'extrait et du tampon phosphate à pH (jusqu'à un volume de 3ml) adapté selon l'isoforme de la LOX analysée (pH6.7 ou pH9). L'analyse peut être également réalisée par HPLC (voir 6.1.8.3. Analyse RP-HPLC) après extraction des hydroperoxydes produits lors de la réaction enzymatique.

### 3.1.11. Dosage de l'activité HPL

L'HPL étant très instable, le dosage de son activité est réalisé sur des échantillons fraîchement récoltés. Une méthode de dosage chromatographique à deux longueurs d'onde mesurant à la fois la disparition du substrat et la production du métabolite de l'enzyme est utilisée en parallèle d'une méthode de dosage chromatographique du produit de la réaction enzymatique.

#### 3.1.11.1. Préparation du substrat

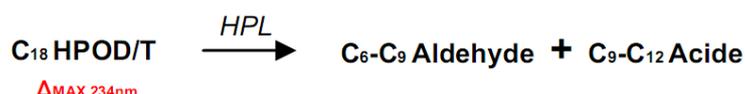
300mg d'acide linoléique ou linolénique sont additionnés de 18mg de Tween 40, de 50 ml d'eau désoxygénée et de 2ml de NaOH 1N. Dans un fermenteur agité de 1L, on ajoute aux 50ml de substrat 800ml de tampon borate pH 9.5 et 50ml de solution LOX-1 de soja (Concentration finale : 1500 – 2500 unités/ml). La température est maintenue à 4°C, l'agitation est maximale ainsi que l'aération (air comprimé ou oxygène). Après 30 minutes de réaction, le pH du milieu est descendu à 3 avec de l'HCl 6N. Les HPOs produits sont ensuite purifiés par SPE (colonne : Bondesil-C18, 10µm et série éluotrope : 25ml acétonitrile, 25ml acétonitrile/ méthanol (1/1), 25ml méthanol, 35ml eau, milieu de réaction, élution avec 15ml de CH<sub>2</sub>O, rinçage : 25ml eau et 25ml hexane). Les HPOs sont dosés par HPLC et stockés à -20°C.

#### 3.1.11.2. Extraction de HPL

5g de feuilles de betteraves sont broyées dans un mixeur avec 10 ml de tampon phosphate pH 6.7 contenant 3mM d'EDTA, 5mM de cystéine et 0,1% de Triton X-100. L'extraction se poursuit pendant une heure à 4°C sous agitation constante. Des aliquotes de 1ml de milieu d'extraction sont réparties dans des tubes Eppendorf®. Les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 5' à 4°C, le surnageant est conservé et constitue l'extrait enzymatique.

#### 3.1.11.3. Mesure des activités Hydroperoxydase et HPL

L'activité Hydroperoxydase est la mesure de la disparition des HPOs d'acides gras à 234nm, et correspond à l'activité totale des enzymes CYP74. Cette mesure est basée sur la réaction suivante et est réalisée dans une cuvette en quartz de 3ml dans laquelle sont successivement ajoutés : le tampon phosphate pH 6.7, les HPOs (environ 0.15mM), et l'extrait enzymatique. Les résultats sont exprimés en U.E. (Unité Enzymatique), une U.E. correspond à la dégradation de 1µmol d'HPO par seconde.



$$[\text{A CYP74}]_{(\text{UE})} = \frac{\Delta A_{234\text{nm}} \cdot F_d}{\epsilon_{\text{HPOD/T}} \cdot l \cdot C_s \cdot P}$$

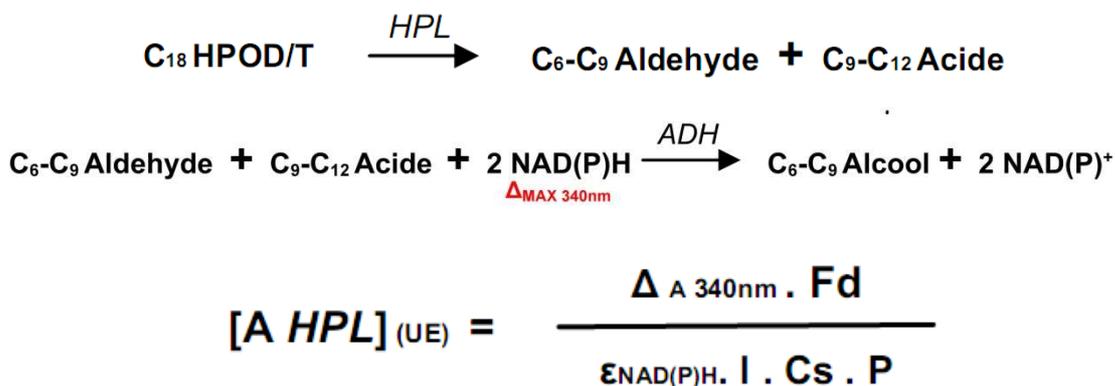
$E_{\text{HPOD/T}}$  est l'absorptivité molaire des HPOs = 25000 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>

l est la longueur de la cellule = 1 cm

C<sub>s</sub> est le coefficient stœchiométrique de la réaction = 1

P est le poids de l'échantillon  
 Fd est le facteur de dilution

La mesure de la production des aldéhydes est réalisée à 340nm. Cette mesure est basée sur la réaction suivante et est réalisée dans une cuvette en quartz de 3ml dans laquelle sont successivement ajoutés : le tampon phosphate pH 6.7, les HPOs, du NADH 0,01M, de l'activité ADH (3000U/ml) et l'extrait enzymatique. Les résultats sont exprimés en U.E., une U.E. correspond à la synthèse de 1µmol d'aldéhydes par seconde.



$\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$  est l'absorptivité molaire de NAD(P)H = 6250 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>  
 l est la longueur de la cellule = 1 cm  
 Cs est le coefficient stœchiométrique de la réaction = 2  
 P est le poids de l'échantillon

La même réaction entre les HPOs et l'HPL peut également être menée dans des flacons scellés. Après une minute de réaction, le milieu est extrait avec de l'hexane contenant (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en excès et de l'octanal (étalon interne) avant d'être injecté en GC-FID (voir 6.1.5.3. Conditions chromatographiques).

### 3.1.12. Dosage de l'activité allène oxyde synthase

Suite à l'absence de divinyl éther dans les analyses HPLC d'oxylipines, l'AOS et l'HPL sont considérées comme les deux seules enzymes capables de dégrader les HPOs en substances induisant une variation d'absorption à 234nm. La formule suivante peut donc être appliquée pour l'activité enzymatique :

$$[\text{A AOS}]_{(\text{UE})} = [\text{A CYP74}]_{(\text{UE})} - [\text{A HPL}]_{(\text{UE})}$$

### 3.1.13. Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

Deux grammes de feuilles de betterave sont dilués dans 20 ml de tampon phosphate de sodium froid (0,1 M, pH 7,5) contenant du métabisulfite de Na (2mM). L'extraction est poursuivie sur glace pendant 30 minutes. Après la centrifugation à 30000g pendant 15min, le surnageant est conservé en tant qu'extrait enzymatique. Pour la mesure, on ajoute dans une cuvette en quartz du tampon pyrophosphate 0.1N pH 9.2, de l'éthanol 2N, de NADH 0.025N, acétaldéhyde et l'extrait enzymatique. L'évolution de l'absorbance est ensuite mesurée à 340nm. L'activité est calculée par la formule suivante. Les résultats sont exprimés en U.E. qui correspond à la synthèse de 1µmol d'alcool par seconde.

$$[A \text{ ADH}]_{(UE)} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}} \cdot Fd}{\epsilon_{\text{NAD(P)H}} \cdot l \cdot Cs \cdot P}$$

$E_{\text{NAD(P)H}}$  est l'absorptivité molaire de NAD(P)H = 6250 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>

l est la longueur de la cellule = 1 cm

Cs est le coefficient stœchiométrique de la réaction = 1

P est le poids de l'échantillon

## 3.2. Stimulation de la production d'HPL et ISR

### 3.2.1. Mise en culture des betteraves

Les semences de betteraves sucrières (*Beta vulgaris* (L) cv *Marcel*) ont été fournies par la société Pype et sont utilisées en tant que variété de référence. Les semences subissent une désinfection préliminaire par une solution HgCl<sub>2</sub> 0.1% pendant 7 minutes. Après trois lavages à l'eau distillée stérile, la graine extirpée de son enrobage est séchée sur du papier filtre. Les semences sont ensuite déposées sur boîtes de Pétri contenant un milieu Murashige et Skoog, et mise à germer à 25°C avec une photopériode de 12h/12h pendant 3 jours. Les jeunes plantules sont ensuite repiquées dans un sol de tourbe contenant 10% de craie, 10% de sable et 5% de silice. Les températures de culture sont de 25°C durant le jour et de 20°C durant la nuit, la photopériode est de 16h/8h et l'humidité relative de la salle est de 70%.

### 3.2.2. Stress des plantules

Les plantules âgées de 4 à 6 semaines sont isolées les unes des autres afin d'éviter d'avoir des phénomènes de signalisation par des molécules volatiles entre les individus. Les plantes sont stressées par trois méthodes différentes :

- Le stress mécanique : Les feuilles sont coupées avec des scalpels stériles sur trois centimètres le long de la nervure principale (Conconi et al. 1996).
- Le stress chimique : Dans une enceinte fermée les plantes sont mises en contact avec des cotons imbibés de 5 ml de solution 1% (v/v) méthyljasmonate dans l'éthanol (Thomma et al. 2000).
- Le stress biologique : les plantes sont infectées par *Pseudomonas syringae* sv. *Aptata* dans une chambre à 100% d'humidité relative. 50µl de culture bactérienne à 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup> sont injectés au travers des stomates des feuilles par l'intermédiaire d'une seringue mise sous pression en contact avec le végétal.

### 3.2.3. Expériences d'ISR

*Pseudomonas putida* BTP1, souche isolée à partir de racine d'orge constitue le PGPR impliqué dans les expériences d'ISR. Cette souche est conservée et mise en culture sur des milieux spécifiques aux *Pseudomonas*. Les bactéries cultivées sur boîtes de Pétri sont récoltées à l'aide d'un râtelier et conservées sous forme d'une solution à 10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup>. Lors de la culture de betterave, le sol tourbeux est mélangé à 20ml de suspension de bactéries pour former un mélange à 10<sup>7</sup> CFU g<sup>-1</sup>. Tous les 14 jours, le sol est à nouveau inoculé à l'aide de ses bactéries.

### 3.3. Analyse biomoléculaire

#### 3.3.1. Extraction de l'ARN total

L'extraction de l'ARN total des feuilles de betteraves a été réalisée à l'aide de la solution TriReagent® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, United States). 100 mg de feuilles fraîchement broyées sont homogénéisés avec 1ml de solution TriReagent®. Les échantillons sont ensuite maintenus 5 minutes à température ambiante avant d'ajouter 0,1ml de 1-bromo-3-chloropropane. Après 10' d'incubation, le mélange est centrifugé à 12000g pendant 15' et à 4°C. Trois phases différentes sont séparées par cette centrifugation (de haut en bas) : une phase aqueuse contenant l'ARN, l'interphase contenant l'ADN et une phase organique rouge contenant les protéines. La phase aqueuse est transférée dans un tube et 0,5 ml d'éthanol y sont ajoutés. Après 10' d'incubation, le mélange est à nouveau centrifugé (12000g, 10', 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol à 75% et purifié par centrifugation (7500g, 8', 4°C). Le dépôt d'ARN est ensuite séché et remis en solution dans de l'eau distillée stérile. La quantification de l'ARN est réalisée au spectromètre Nanodrop® et les échantillons doivent présenter un rapport  $A_{260}/A_{280}$  supérieur à 1,7 correspondant à une pureté de l'ARN suffisante.

#### 3.3.2. Transformation de l'ARNm en ADNc

La transformation de l'ARNm en cDNA a été réalisée à l'aide du kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Burlington, Canada). Ce kit travaille avec la transcriptase inverse M-MuLV qui ne présente aucune activité RNase. Les échantillons d'ARN extrait sont transformés en cDNA à l'aide d'un primer OligodT qui permet de sélectionner uniquement la synthèse des ARNm.

#### 3.3.3. PCR d'identification

Les gènes de la phospholipase B (*BvPLB*), de la phospholipase D (*BvPLD*), de la LOX (*BvLOX*), de l'HPL (*BvHPL*), de l'AOS (*BvAOS*) et de l'ADH (*BvADH*) sont recherchés au sein de la feuille de betteraves. Pour les gènes *BvPLB*, *BvPLD*, *BvLOX* et *BvADH*, des séquences partielles ont pu être retrouvées sur la banque de données NCBI à la suite de BLAST entre les banques EST de *Beta vulgaris* et les 4 gènes étudiés. Quatre couples d'amorces ont donc pu être synthétisés afin d'identifier la présence de ces gènes dans les ARNm de feuilles de betteraves.

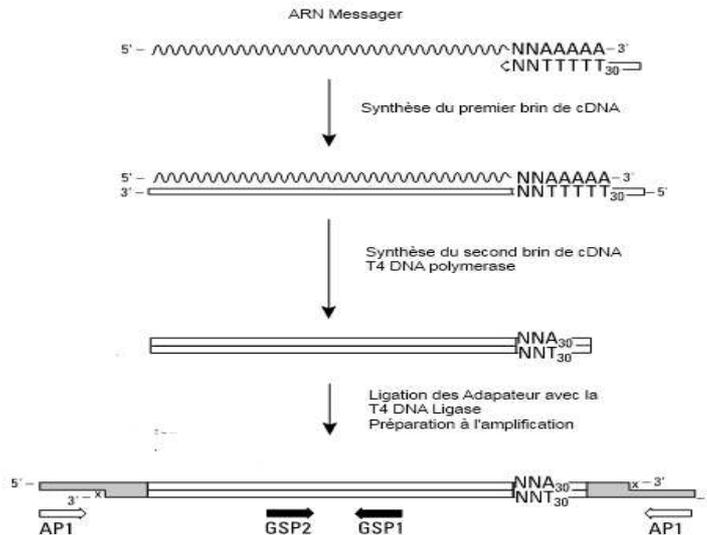
- *BvADH* : 5'-TCATCTTCGTGCATCCATGC-3' et 5'-GAAGCGTCGAATGTACTIONGGA-3'
- *BvPLB* : 5'-CTCAACTGGCTAAACCCTCTTG-3' et 5'-GGTGTNCTTCTGTTCTCTGAA-3'
- *BvPLD* : 5'-GTGATTTGCCTGGTCACCTC-3' et 5'-CAAGAGATTCTCTCACGCCA-3'
- *BvLOX* : 5'-GTGTCCTTTCAGCTTGCTAGTG-3' et 5'-GCTGGTGTGGTGTGGTAG-3'

Pour les gènes *BvAOS* et *BvHPL*, des amorces dégénérées ont été construites à partir de séquences conservées des deux enzymes.

- Pour *BvAOS* : *De1BvAOS* 5'-AAYRTGCCRCCDGGNMTTCA-3', *De2BvAOS* 5'-TCNTAYCTGGACCCMTCHGA-3', *De3BvAOS* 5'-CTTCAAYWSCTWCGGGHGG-3', *De4BvAOS* 5'-CCDCCCGWAGSWRTTGAAG-3', *De5BvAOS* 5'-AYCCGAAYARSATYTCNCC-3' et *De6BvAOS* 5'-GTYTCMSGBGCRTTVGACCA-3'.
- Pour *BvHPL* : *De1BvHPL* 5'-CTCTBCCCGTACGTWYRATTCC-3', *De2BvHPL* 5'-GATATGCGTGTGGTGTATCTYG-3' ; *De3BvHPL-3* 5'-CATAACCTTTTGTTCATTCTTGG-3' ; *De4BvHPL* 5'-CRAGATAACACAAACACGCATATC-3' ; *De5BvHPL* 5'-CCAAGAATGAATGAACAAAAGGTTATG-3' ; *De6BvHPL* : 5'-TAATTCAGCAATTCTTTCCTTYTCG-3'

### 3.3.3. RACE-PCR

Le séquençage de *BvHPL* a été réalisé par la technique de RACE-PCR. Cette technique est utilisée en biologie moléculaire afin d'obtenir une séquence complète d'un cDNA transcrit. La première étape de cette technique est l'obtention de cDNA double brin à partir d'ARNm. Deux courtes séquences nucléotidiques sont ensuite greffées à l'extrémité 5' et 3' du gène, pour ainsi permettre l'amplification de l'entièreté du gène étudié. La technique utilisée est basée sur le Kit Marathon (Clontech).



Les doubles brins cDNA sont obtenus à l'aide du SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, United States). Les fragments suivants sont ensuite ligués à l'extrémité de la séquence obtenue à l'aide de la T4 DNA Ligase (Roche, Basel, Suisse).

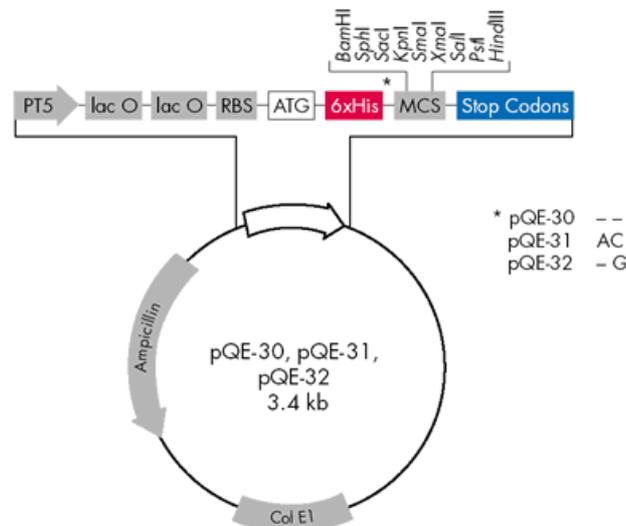


Les PCR peuvent ensuite être menées afin de bénéficier du gène complet. La PCR 3' est réalisée avec les amorces : GSP2 5'-CCAAGTTCACGGGGATAGGAGAGTTGGTG-3' et AP1 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' : et purifiée avec la nested PCR3' (nGSP1 5'-GTGTAATTTAGCCTATCCCCTATCGG-3' et AP2 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3') ensuite la PCR5' (GSP2 5'-CCAAGTTCACGGGGATAGGAGAGTTGGTG-3' et AP1 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') complétée par la nested PCR5 (nGSP2 : 5'-AAGGTTAAAACCCCTGTACCACTTC-3' et AP2 : 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'). Les fragments ont ensuite été purifiés sur gel d'agarose, extrait à l'aide du kit Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche, Basel, Suisse) et envoyés à la plateforme Giga (Liège, Belgium) pour être séquencés selon la méthode didéoxo chain termination.

### 3.3.4. Clonage du gène *BvHPL*

Au sein de l'unité de bio-industrie, nous disposons d'une souche *E. coli* M15 recombinante exprimant le gène *LeHPL* (Matsui et al. 2000). Ce système d'expression est très efficace et va être adapté aux gènes *BvHPL* (*Beta vulgaris*) et *OepHPL* (*Olea europea* (Padilla et al. 2010)). Par PCR des sites d'enzyme de restriction Kpn1 et HindIII ont été greffés aux extrémités du gène *BvHPL* en utilisant les deux amorces suivantes C1 5'-GTCGGTACCTGCCGCTCCGCACACTCCCGGGTGGCT-3' et C2 5'-CAGTCAAGCTTTCACTTAGCTTTCTCAACTCCCGTGATTGC-3'. L'amorce C2 contient le codon-STOP original de *BvHPL*. Le produit PCR obtenu est ensuite digéré avec les enzymes Kpn1 et HindIII, il est également déphosphorylé par une déphosphatase alcaline (Fermentas, Burlington, Canada). Après purification, le produit PCR est ligué dans un vecteur traité par les mêmes enzymes de restriction. Ce

vecteur est le pQe-31 (Qiagen, Venlo, Netherlands). Le résultat de cette ligation est disponible dans la partie annexe (*Annexe 4*)



Le vecteur est ensuite introduit dans la souche M15, contenant déjà un vecteur pREP4 gérant l'expression de la séquence introduite dans le plasmide pQe-31. La même technique est appliquée au gène *OepHPL* avec des enzymes de restrictions différentes. Ce sont les sites de restrictions pour BamH1 et HindIII qui sont introduits à l'aide des amorces suivantes : D1 5'-GTCGGATCCTCTGCCCTCCGCGCCATTCT-3' et D2 5'-CAGTCAAGCTTTCACCTTGGACTTCTCAACTGCAGTGATTG-3'. La digestion est ensuite réalisée avec ces deux enzymes.

### 3.3.5. Sélection des souches productrices de protéine 6-HIS

La sélection des souches productrices de protéines 6-HIS est réalisée par screening des protéines produites par des cultures d'*E. coli* en petit volume. Des colonies isolées sont mises en culture dans 1.5ml de milieu LB contenant des antibiotiques (ampicilline 100mg/L et kanamycine 25mg/L) durant 16h. 500 µl de milieu est ensuite inoculé avec ces précultures et incubé à 37°C pendant 30' (D.O. = 0.6-0.7). L'IPTG (concentration finale 1mM) est ensuite ajouté et la culture est prolongée de 5 heures. Les cellules sont récoltées après une centrifugation à 15000g. Elles sont ensuite suspendues dans un tampon de lyse (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M urée, pH8), incubées jusqu'à l'obtention d'une solution translucide et centrifugées à 15000g. Les colonnes de purification Ni-NTA sont équilibrées avec 600µl de tampon de lyse avant d'y déposer le lysat. Les centrifugations sont effectuées à 700g, les colonnes sont nettoyées à deux reprises avec 600µl de tampon de lavage (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M urée, pH6.3). Les protéines sont éluées par variation du pH dans 2x200µl de tampon d'éluion (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M urée, pH4.5). 2,5µl de tampon 5X SDS-PAGE est ensuite ajouté à 10µl des fractions purifiées avant d'être chauffées à 95°C pendant 5'. Les aliquotes sont ensuite analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE).

### 3.3.6. Production d'enzymes recombinantes

#### 3.3.6.1. Culture de la souche M15

La souche *E. coli* M15 est produite en fermenteurs de 2L ou de 20L dans des conditions identiques. La culture se déroule en deux phases, la première est une production classique qui va amener la bactérie à atteindre sa phase de croissance exponentielle :

- milieu de culture : Terrific Broth (Sigma-Aldrich, Saint Louis, United States) spécifique pour la culture de E.coli 37.8g/L, Glycerol 8g/L
- antibiotiques : kanamycine 50mg/L et ampicilline 200mg/L
- agitation : 500 RPM
- température de culture : 37°C
- aération : 1vvm
- durée : 3-6h (selon l'évolution de la pO<sub>2</sub>)
- pH : 7

À la suite de cette phase de culture, l'induction est mise en œuvre. La bactérie ne se multiplie plus, mais synthétise la protéine recombinante. Lors de l'induction, la culture est amenée à une température de 18°C et l'inducteur IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) est ajouté pour une concentration finale de 0.1M. La culture est maintenue entre 24 et 72 heures.

### **3.3.6.2. Extraction des HPL recombinante**

Le milieu de culture est tout d'abord centrifugé (10000g, 20', 18°C) et le surnageant est éliminé. Les cellules sont remises en suspension dans un tampon PO<sub>4</sub> pH7.7. Le tampon de lyse est ensuite ajouté de manière à concentrer 20 fois en cellules la culture initiale. La composition du tampon de lyse est la suivante : TrisHCl 50mM pH8, lysozyme de blanc d'œuf 5mg/l (Sigma-Aldrich, Saint Louis, United States), PMSF 0.1% (v/v), MgCl<sub>2</sub> 0.1M, DNase I 0,2% , NaCl 0.1M et Triton X-100 0.2% (p/v). La lyse est effectuée dans un récipient fermé à 4°C sous agitation vigoureuse pendant 30'. Le lysat est ensuite centrifugé (25000g, 4°C, 15'). Le surnageant constitue l'extrait enzymatique.

## **3.4. Production industrielle de GLVs**

### **3.4.1. Hydrolyse enzymatique de l'huile de lin**

#### **3.4.1.1. Production en bio-réacteur**

La première étape de la synthèse des GLVs est l'hydrolyse de la matière grasse, en l'occurrence l'huile de lin. Celle-ci est préalablement analysée afin de connaître l'indice d'iode (*voir protocole 7.4.1.2.*). La lipase choisie pour l'hydrolyse est extraite de *Thermomyces lanuginosus* et immobilisée sur microbilles (Novozymes, Bagsværd, Denmark). La réaction d'hydrolyse est réalisée dans un bio-réacteur *Bio-Laffitte* d'une contenance de 20L. Une quantité A d'huile de lin est ajoutée à 3xA ml de tampon PO<sub>4</sub> (100mM, pH 7). L'ajout d'émulsifiant tel que la gomme arabique est facultatif, il favorise la formation d'une émulsion stable, mais réduit le rendement de récupération des acides gras hydrolysés. Le mélange est passé à l'Utraturrax 13500 RPM pendant 10'. La lipase est injectée dans le fermenteur à une teneur de 100U/ml. Les conditions de réaction sont les suivantes :

- pH 7 ajusté par l'ajout de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ou de KOH
- agitation maximale : 350 RPM
- température entre 30°C et 37°C (37°C pour un travail optimal de l'enzyme)
- durée de réaction entre 16 et 24 heures

Le niveau d'acides gras libres est mesuré au cours de la réaction enzymatique (*voir protocole 7.4.1.3.*). Une fois la réaction complète, le réacteur est refroidi à 18°C. L'émulsion est filtrée afin de récupérer la lipase et ensuite centrifugée (20000 g ; 20 minutes). La fraction grasse est récupérée, les acides gras peuvent être purifiés sur colonnes amino-propylée si nécessaire (*voir protocole 7.1.7.2.*).

#### **3.4.1.2. Détermination de l'indice d'acide**

Des solutions de KOH 0,1N et de HCl 0,1N sont préparées et vérifiées. Un échantillon de 0,1g à 5g de matière grasse est déposé dans un bécher, on y ajoute 100ml de mélange solvant (éther/éthanol

50/50). 10ml de solution KOH 0,1N sont ensuite ajoutés au mélange. Après ajout de phénolphthaléine, la solution est titrée par l'HCl 0,1N. Le blanco est réalisé sans huile.

$$IA = \frac{(VB - VE) \times [HCl] \times M_{KOH}}{m}$$

- IA : indice d'acide
- VB : volume de titrage du blanco
- VE : volume de titrage de l'échantillon
- [HCl]S : concentration en HCl
- M<sub>KOH</sub> : masse molaire du KOH
- m : poids de l'échantillon

### **3.4.1.3. Détermination de degré d'hydrolyse par chromatographie**

Les échantillons d'huile de lin et d'hydrolysats sont dilués dans l'hexane (1mg/ml), le standard interne : la tripalmitine est ajoutée. Les solutions sont directement injectées en GC-FID. Les analyses sont réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse Carlo-Erba 5160 équipé d'une colonne CP-TAB CB (25m x 0,25mm x 0,1µm Varian, Palo Alto, Canada). Le gaz vecteur est H<sub>2</sub> à 50kpa et le volume injecté est de 1µl. L'injecteur *on column* est programmé parallèlement à la colonne, température initiale de 280°C maintenue 2' et ensuite augmentation de 3°C/min jusque 320°C qui sera maintenu à 30'. Le détecteur FID est à 320°C.

## **3.4.2. Hydrolyse alcaline de l'huile de lin**

### **3.4.2.1. Hydrolyse avec solvant**

Cent grammes d'huile de lin sont chauffés à 70°C dans un ballon muni d'un système de reflux avec un ajout de 100ml d'éthanol et 40 ml de NaOH 10N, un léger reflux est maintenu durant le chauffage. Le contenu est refroidi et acidifié avec de l'HCl concentré avant que la solution s'épaississe. La solution est ensuite décantée dans une ampoule et la phase aqueuse est éliminée. La phase organique est ensuite lavée 3 fois avec de l'eau chaude pour ensuite être récupérée.

### **3.4.2.2. Hydrolyse sans solvant**

100g d'huile de lin est chauffée à 100°C dans un ballon avec 50ml de NaOH 10N, une fois l'hydrolyse terminée, 300ml d'eau sont ajoutés au mélange. La solution est acidifiée avant de prendre en masse, décantée et ensuite lavée 3 fois à l'eau chaude.

## **3.4.3. Oxygénation des acides gras**

### **3.4.3.1. Broyage et traitement des graines de soja**

Les graines et les germes de soja sont utilisés en tant que source d'activité 13-LOX. Ils ont été fournis par la société Alpro Soya (Gent, Belgium). Les grains subissent un traitement Flash-température à 75°C pendant 5 minutes avant d'être refroidis et broyés au moulin IKA.

### **3.4.3.2. Production des hydroperoxydes**

Le tampon borate (200mM, pH 9.2) est préparé et refroidi à 4°C. De 10 à 250g/l d'acides gras libres préalablement produits par hydrolyse sont ajoutés au tampon. Le mélange est passé à l'Utraturax 13500RPM pendant 10'. Les graines de soja broyées (dont la détermination de l'activité LOX a été réalisée : voir protocole 6.1.10.) sont mélangées dans l'eau distillée et la solution est refroidie à 4°C. L'ensemble des réactifs est versé dans un bioréacteur *Bio-Lafitte* d'une contenance de 20L. Les conditions de réactions sont les suivantes :

- pH 9.2 ajusté par l'ajout de  $H_3PO_4$  ou de KOH : un pH supérieur à 9 favorise la production sélective de 13-HPOs
- agitation maximale : 350 RPM
- température 4°C : de la même manière que le pH faible, les faibles températures orientent les réactions vers la synthèse de 13-HPOs
- durée de réaction entre 30' et 60'
- aération entre 2 et 4 vvm (Air comprimé) : l'apport en oxygène doit être maximal, le débit est adapté selon les performances des turbines d'agitation.
- Briseur de mousse à vitesse maximum, la synthèse d'HPOs entraîne une production importante de mousse, le briseur permet d'éviter des débordements de milieu.

Après la fin de la réaction, le liquide du bio-réacteur est collecté et conservé à 4°C sous atmosphère d'azote. Le taux d'hydroperoxydes peut être analysé par HPLC (*voir protocole 6.1.8.3.*).

### **3.4.4. Synthèse des aldéhydes**

#### ***3.4.4.1. Broyage et préparation des feuilles de betteraves***

Les feuilles de betteraves récoltées sont stockées à 4°C avant leur utilisation. Le pétiole de la feuille est coupé et le limbe, qui contient la majeure partie de l'activité HPL, est lavé à l'eau distillée. Les betteraves sont ensuite broyées dans un mélangeur broyeur UMSK200E (Stephan, Lognes, France).

#### ***3.4.4.2. Mise en œuvre de la réaction enzymatique***

L'activité HPL du broyat de feuilles de betteraves est mesurée (*voir protocole 6.1.11.*). Les feuilles sont mélangées à un tampon  $PO_4$  (100mM, pH 6.5), la solution d'hydroperoxydes est ensuite ajoutée afin d'atteindre des teneurs entre 1 et 25mM en 13-HPOT. L'ensemble des réactifs est versé dans un bioréacteur *Bio-Lafitte* d'une contenance de 2 à 20L. Les conditions de réactions sont les suivantes :

- pH 6,5 ajusté par l'ajout de  $H_3PO_4$  ou de KOH
- agitation maximale : 350 RPM
- température 25°C
- durée de réaction entre 5' et 60'

Les GLVs peuvent être analysés en cours de réaction (*voir protocole 6.1.5.3.*) et la réaction est arrêtée par ajout de  $H_3PO_4$  jusqu'à atteindre un pH inférieur à 4 inhibant l'action de l'HPL et précipitant les HPOs.

#### ***3.4.4.3. Production à l'aide d'HPL recombinante***

La production de GLVs à l'aide des bactéries recombinantes suit les mêmes règles que la production avec les feuilles de betteraves, mais cette fois l'extrait enzymatique est ajouté en lieu et place des végétaux broyés.

### **3.4.5. Downstream Processing**

#### ***3.4.5.1. Extraction des C<sub>6</sub>-aldéhydes***

L'extraction des C<sub>6</sub>-aldéhydes du milieu de production est réalisée à l'aide de résine apolaire. Le jus brut de production est centrifugé à 10000g afin d'obtenir un jus clair. Ce jus clair est passé sur une colonne contenant de la résine MN-202 (Purolite, Llantrisant, Wales, UK). La teneur maximale en C<sub>6</sub>-aldéhydes admissible par gramme de résine est de 10mg. Les GLVs sont ensuite élués à l'aide d'éthanol ou d'isopropanol et stockés en vue de la distillation. Les GLVs peuvent également être récoltés par entraînement sous flux gazeux. Un flux d'air comprimé entraîne ces molécules à faible tension de vapeur, celles-ci sont ensuite condensées au niveau d'un piège à froid à l'acétone (jusqu'à -70°C). Ces deux méthodes d'extractions peuvent être combinées pour maximiser le rendement de récupération.

### 3.4.5.2. Distillation

La distillation des GLVs a été réalisée dans un appareil semi-pilote de marque Normschliff Geratebeau Wertheim. L'installation est constituée d'une pompe à vide Vacuubrand MD4C (Wertheim Germany), d'un système de gestion Desk-star advance N6W relié à un panneau de commande électrique, d'un piège à froid à l'acétone, d'un ballon à distiller de 6 Litres, d'une colonne de distillation remplie d'anneaux Wire-mesh (3500 meshes/cm<sup>2</sup>), d'un reflux avec réfrigérant, d'une valve électro-aimantée, d'un collecteur de fraction avec réfrigérant, de sondes températures et d'une sonde pression avec électrovanne Keller PAA23/8465.1-1.2. Le système de fonctionnement de l'appareil est basé sur les mesures de température permettant de récolter les fractions voulues de composés. Le vide 50mbars est réalisé dans l'entièreté du système via deux sites distincts d'aspiration : en amont du collecteur et en amont du reflux. Le ballon est chauffé à température voulue dans le chauffe-ballon contenant de l'huile de silicone. L'électrovanne et la sonde de pression permettent de maintenir une pression faible stable dans le système. Le chauffage du ballon est poursuivi jusqu'à la température de consigne. Le système travaille en mode reflux tant que la température de collecte n'a pas été atteinte au sommet de la colonne de distillation. L'électroaimant est inactif et la valve est fermée. Lorsque la température de collecte est atteinte, la valve est ouverte par l'intermédiaire de l'aimant et les vapeurs peuvent se condenser au niveau du réfrigérant du collecteur. Le système de reflux est pendant ce temps inactif. Le piège à froid est composé d'acétone à -70°C, il est connecté au vide relié à la fois au sommet du système de reflux et à l'extrémité du collecteur. Les composés volatils non condensés au contact des réfrigérants sont donc récoltés dans ce piège à froid.

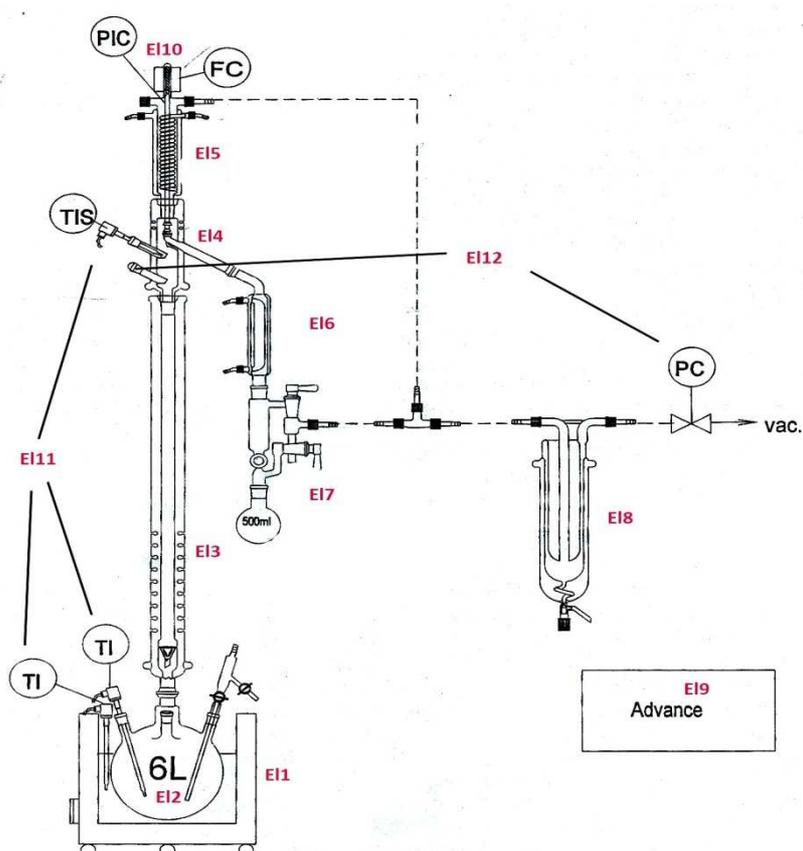


Figure 16 : Distillation semi-pilote Normschliff Geratebeau Wertheim. Éléments constitutifs : Chauffe ballon (E1); ballon (E12); colonne de distillation (E3); valve de distillation (E4) ; système de reflux (E5) ; réfrigérant (E6) ; collecteur (E7); piège à froid (E8) ; système de contrôle électronique (E9) ; électro-aimant (E10) ; sondes de température (E11) ; sonde pression et électrovanne (E12).

---

## 4 : La betterave en tant que source de GLVs

---

### 4.1. Le point sur la valorisation des substrats végétaux en tant que source de GLVs dans l'industrie.

Comme en attestent différents brevets établis au cours des dernières années, la production de GLVs (Green leaf volatiles) à partir de substrats végétaux a été envisagée à maintes reprises par le secteur industriel. En 1989, Goers (Goers et al. 1989) décrit un procédé de production de (3Z)-hexénal, de (3Z)-hexénol et de (2E)-hexénal à partir de feuilles de fraisiers. Dans ce procédé, les feuilles broyées sont ajoutées à un milieu aqueux contenant de la matière grasse dérivée d'une huile végétale, la synthèse est menée pendant 24h avant d'en extraire une essence de feuilles contenant les GLVs. Kanisawa a également décrit un procédé semblable de production de GLVs ((2E)-hexénal) à partir de graines de soja et d'huile végétale (Kanisawa et Itoh 1988). En 1989, des auteurs ont développé un système de production de (3Z)-hexénol à partir de feuilles de végétaux (Brunerie 1989). Ce brevet décrit les différentes étapes et optimisations possibles d'une production pouvant s'adapter à des types de feuilles très variés. Enfin, Holtz a développé un ensemble de procédés permettant de travailler en batch et en continu sur la production de GLVs, en ajoutant progressivement du substrat et des enzymes (Holtz et al. 2001). Par la suite, des réactions d'oxydation des AGPIs (Acides gras polyinsaturés) et de transformation des aldéhydes en alcools via l'ADH (Alcool déshydrogénase) peuvent également être adjointes à cette synthèse, afin de réduire les étapes de production. Ces différents brevets sont déposés à partir d'observation scientifique relative à la matière première. La synthèse de GLVs au sein des feuilles de betteraves est abordée de la même manière. La feuille va faire l'objet d'une caractérisation exhaustive de la voie de l'HPL (Hydroperoxyde lyase), afin de disposer d'un panel précis de données concernant la synthèse de GLVs. Ces observations serviront de bases à l'élaboration d'un procédé biotechnologique, dans un premier temps : l'extraction brute de GLVs sera envisagée et ensuite l'établissement d'un procédé biotechnologique de production exploitant les richesses découvertes chez la feuille de betterave.

### 4.2. Les substrats de GLVs dans la feuille de betterave

#### 4.2.1. Composition générale de la feuille de betterave

Nos travaux de thèse ont débuté par la caractérisation de la composition des feuilles de betteraves (Tableau 6). Comme attendu, les feuilles végétales sont composées en majeure partie d'eau environ 89%. Ensuite, la famille de molécules la plus largement représentée est la fibre telle que la cellulose ou la lignine (Lee et al. 2009). Ensuite, les protéines composent 1.8% du poids de la feuille avec notamment une grande richesse en protéine RubisCO qui permet la fixation du CO<sub>2</sub> dans la matière organique (Servaites et al. 1987).

Molécules	Composition (% de PF)
Eau	89.0% ± 1.2
Fibres	3.8% ± 0.4
Protéines	1.8% ± 0.3
Lipides	0.1% ± 0.03
Autres	5.3% ± 0.4

Tableau 6 : Valeurs moyennes des principales classes de composés retrouvés dans les feuilles de betteraves.

Enfin, les lipides, disponibles en faibles quantités, constituent les matières de réserve ou les précurseurs de produits métaboliques tels que les arômes. La dernière classe regroupe les composés divers, tels que les alcaloïdes (la bétaine), les glucides, l'amidon et d'autres molécules de réserves.

#### 4.2.2. Teneur en GLVs

L'extraction brute de GLVs à partir des feuilles de betteraves est réalisable par des techniques de distillation. Au cours de cette expérience, afin de ne pas surestimer la quantité en GLVs présente au sein des tissus, des précautions doivent être prises. La voie de synthèse des GLVs ne doit pas être activée au cours de l'analyse, sous peine d'entraîner une surestimation des teneurs en GLVs dans les tissus végétaux. De ce fait, les feuilles de betteraves, initialement conservées dans l'azote liquide, sont maintenues congelées jusqu'à l'extraction Likens-Nikerson (3.1.5.1. *Extraction selon Likens-Nikerson*). Cette technique de distillation permet d'isoler la majorité des éléments volatils, tout en conservant l'intégrité des molécules sensibles aux hautes températures. Au cours de cette extraction, l'augmentation de température est inévitable, ce qui peut provoquer l'activation des enzymes de la voie de la LOX (lipoxygénase, hydroperoxyde lyase, ...). Pour éviter cette activation, les échantillons broyés sont préalablement conservés quatre semaines à -80°C, les HPLs présentes dans les feuilles à sa récolte ne supportent pas cette congélation et sont irréversiblement inactivées (4.3.3.5. *Influence du stockage des feuilles de betteraves*) et n'interviennent pas lors du réchauffement du broyat. L'extraction Likens-Nikerson est réalisée à l'éther pendant 90 minutes. Les extraits éthérés sont ensuite analysés en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et quantifiés par GC-FID (3.1.5.3. *Analyse chromatographique des GLVs*). Un profil chromatographique représentatif est montré à la figure 17.

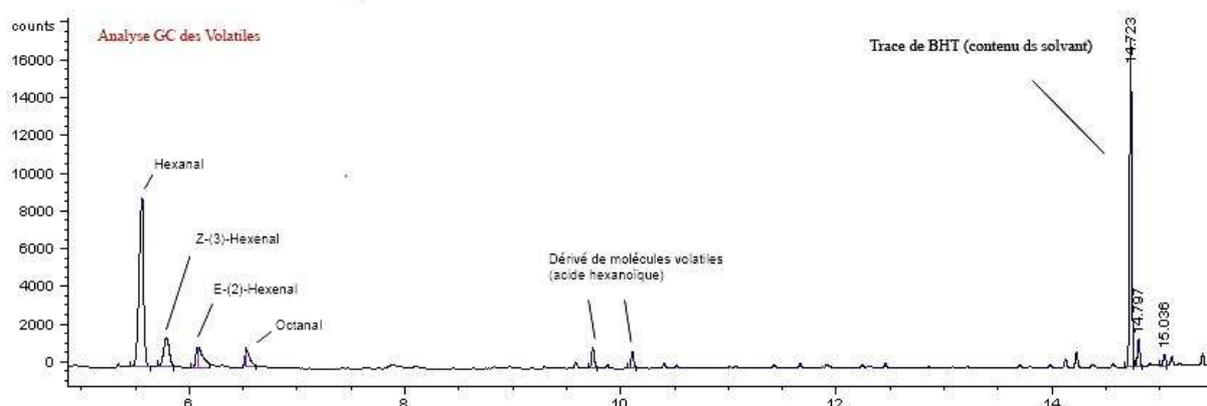


Figure 17 : Chromatogramme GC-MS obtenu après l'extraction Likens Nikerson d'un échantillon de 2 grammes de feuilles de betteraves (Étalon interne : Octanal ; Solvant d'extraction : éther)

Après les extractions Likens-Nikerson, on a distingué trois GLVs différents : l'hexanal, le (3Z)-hexénal et le (2E)-hexénal. Les autres GLVs sont soit altérés (la présence d'acide hexanoïque peut être un indicateur de cette dégradation), soit perdus durant l'extraction ou ne sont pas synthétisés par l'HPL de feuilles de betteraves. Parmi ceux-ci, signalons l'absence de GLVs en C<sub>9</sub>, dérivant des 9-HPOs et des activités 9-LOX et 9-HPL). Également aucun GLV de la famille des alcools n'a été détecté. La teneur en hexanal et en hexénal a ensuite été mesurée par GC-FID. Lors de cette seconde analyse, des pics de (3Z)-hexénal et de (2E)-hexénal ont été identifiés, l'(2E)-hexénal est présent en plus large quantité et provient majoritairement de l'isomérisation du (3Z)-hexénal ayant lieu durant l'analyse chromatographique. Afin d'obtenir une quantification correcte, les deux pics d'aldéhydes sont additionnés. La quantité de C<sub>6</sub>-aldéhydes présente dans les feuilles de betteraves est approximativement de **0,911 µg/g** de poids frais (Tableau 7). Ce taux est faible et inexploitable industriellement, mais illustre le fait qu'une partie des GLVs est accumulée dans les tissus végétaux et n'est pas dispersée à l'extérieur du végétal.

Nom du GLV	Concentration ( $\mu\text{g}^{-1}$ de PF)
Hexanal	0.699 ( $\pm 0.154$ )
Z-(3)-Hexénal	0.138 ( $\pm 0.034$ )
E-(2)-Hexénal	0.074 ( $\pm 0.018$ )

Tableau 7 : Teneurs en GLVs dans les feuilles de betterave estimées après extraction Lickens Nikerson et analyse GC FID (Standard interne : Octanal)

Ces teneurs en GLVs sont très faibles, l'extraction d'1 kg de C<sub>6</sub>-aldéhydes nécessite le traitement de plus de 1000 tonnes de feuilles de betteraves. Au vu de ses faibles résultats, la méthode d'extraction pourrait être mise en doute, mais un ajout de l'étalon interne avant ou après l'extraction n'influence pas les résultats. Une adsorption des composés volatils par SPME (3.1.5.2. *Solid Phase Micro Extraction*) a été réalisée afin de corroborer les premiers résultats. À nouveau, pour cette expérience les échantillons sont préalablement congelés afin d'inactiver l'enzyme HPL présente dans le végétal. L'analyse SPME-GCMS donne des résultats légèrement différents de l'analyse classique par extraction (Figure 18). Des pics d'hexanal, de (2Z)-hexénal, de (3Z)-hexénal et de (2E)-hexénal sont détectés. L'injection par SPME réduit les contraintes thermiques appliquées à l'échantillon, ce qui permet de détecter un isomère supplémentaire lors de l'analyse. Cette molécule est un intermédiaire réactionnel entre le (3Z)-hexénal et le (2E)-hexénal. Les taux de molécules extraites ne peuvent être quantifiés, mais sont faibles selon la taille des pics chromatographiques. Cependant, au contraire des résultats précédents les GLVs dérivant de l'acide linoléinique sont majoritaires.

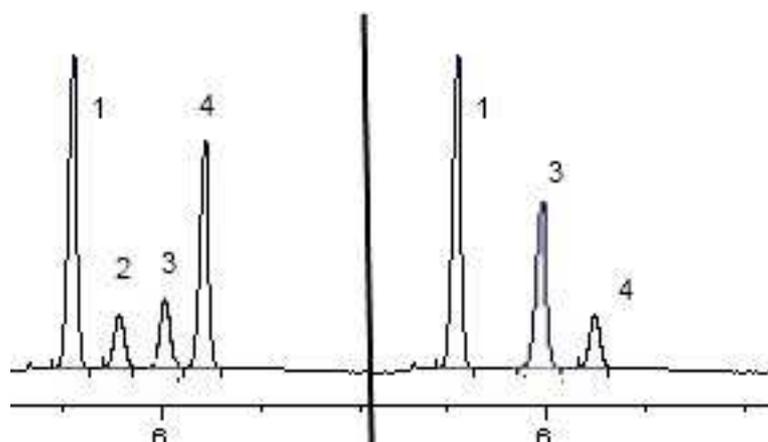


Figure 18 : Comparaison d'un spectrogramme SPME (à gauche) et de GC-FID (à droite) concernant l'analyse des molécules volatiles extraites du broyage à froid de feuilles de betteraves (1. Hexanal, 2. (2Z)-hexénal, 3. (3Z)-hexénal, 4. (2E)-hexénal)

### 4.2.3. Teneur en molécule grasse

Les molécules grasses sont les précurseurs métaboliques initiaux des GLVs (1.3.2. *La lipoxygénase*). Dans les feuilles de végétaux, la matière grasse est principalement composée de triglycérides et de phospholipides. Les expériences réalisées vont contribuer à étudier l'extraction et l'exploitabilité de ces molécules, et également à quantifier les substrats disponibles au sein de la feuille en vue de la synthèse de GLVs.

#### 4.2.3.1. Extraction totale de la fraction grasse

Les feuilles de betteraves sont pauvres en molécules grasses (4.2.1. *Composition générale de la feuille de betterave*), pour obtenir un extrait qualitativement et quantitativement satisfaisant, trois méthodes d'extraction ont été réalisées : la méthode classique par Soxhlet (3.1.6.1. *La méthode d'extraction Soxhlet*), l'extraction à froid selon Folch (3.1.6.2. *La méthode d'extraction Folch*) et l'extraction selon Blight and Dyer (3.1.6.3. *La méthode d'extraction Blight And Dyer*).

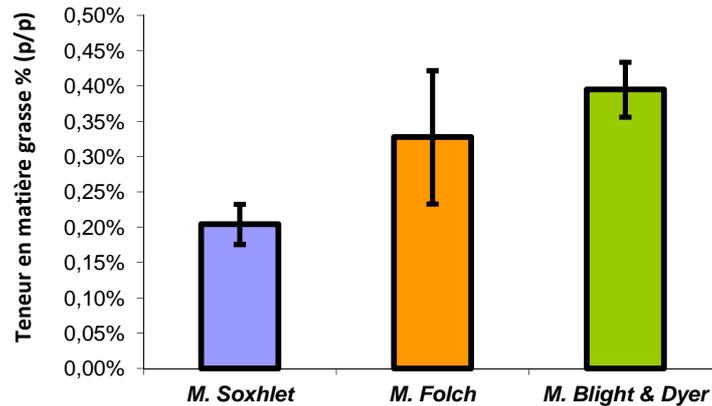


Figure 19 : Mesures gravimétriques (moyenne de trois essais, en % de poids frais) de la matière grasse totale extraite à l'aide de trois méthodes d'extraction différentes).

Les trois méthodes donnent des résultats différents (Figure 19), la méthode Blight & Dyer extrait la plus grande quantité des molécules de la fraction grasse, mais également beaucoup de composés chlorophylliens pouvant interférer dans la suite des expériences. La méthode Soxhlet est la plus sélective par contre les hautes températures appliquées durant l'extraction dégradent les molécules sensibles telles que certains phospholipides ou galactolipides. L'extraction Folch est un bon compromis entre les deux autres méthodes alliant sélectivité et efficacité. La teneur en matière grasse concernant cette méthode est estimée à  $0.35\% \pm 0.09$  (p/p) de poids frais.

#### 4.2.3.2. Identification des classes de matière grasse

Les phospholipides et les galactolipides sont les premiers précurseurs des GLVs mais les triglycérides ou les acides gras libres peuvent être introduits par la plante dans la voie de LOX (Cacas et al. 2005). Les acides linoléiques ou linoléiques peuvent intégrer la voie des GLVs indépendamment de leur état d'estérification. La séparation de la matière grasse a été réalisée par deux méthodes différentes, la première expérience est une séparation sur couche mince (3.1.7.1. Chromatographie sur couche mince à haute résolution) afin de pouvoir identifier les lipides et phospholipides présents dans les feuilles de betteraves.

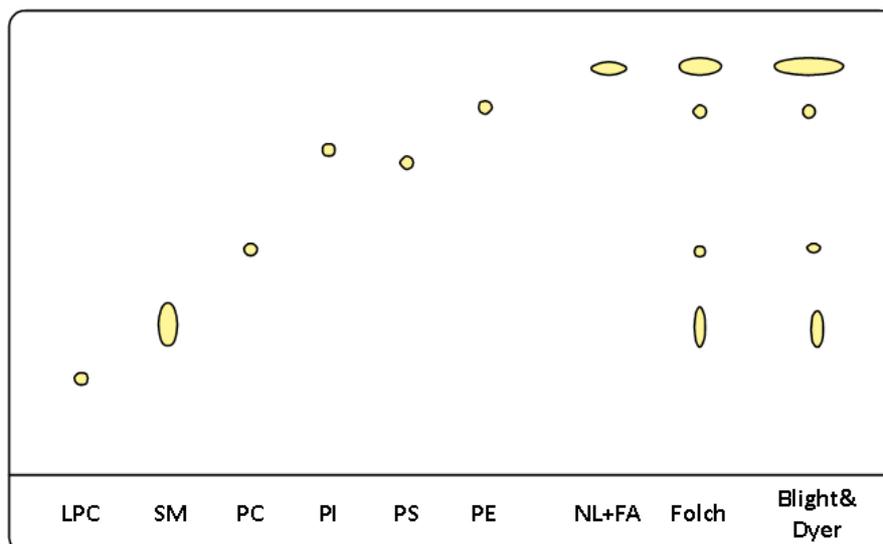


Figure 20 : Chromatographie sur couche mince des phospholipides extraits de feuilles de betteraves (LPC : Lyso-phosphatidyl Choline, SM : Sphingo-Myéline, PC : Phosphatidyl Choline, PI : Phosphatidyl Inositol, PS : Phosphatidyl Sérine, PE : Phosphatidyl Ethanolamine, NL + FA Fraction lipides neutres et acides gras libres, extraits Folch et extraits Blight&Dyer)

Cette séparation a été réalisée sur les extraits Folch et Blight & Dyer (Figure 20), la séparation de l'extrait Soxhlet n'est pas suffisamment résolue afin d'être exploitable. Les séparations sur couches minces révèlent que les Sphingomyélines (SM), Phosphatidyl Choline (PC) et Phosphatidyl Ethanolamine (PE) sont les phospholipides les plus représentés dans les extraits.

La seconde expérience est un dosage gravimétrique des principales classes de matière grasse après une séparation par SPE (3.1.7.2. Fractionnement par SPE) (Figure 21). Cette séparation a permis d'isoler les classes de molécules suivantes : lipides neutres (NL) dont esters de stérol (SE), galactolipides et triglycérides (TG), stérols (S), diglycérides (DG) et monoglycérides (M), les acides gras libres (FA) et les phospholipides (PL).

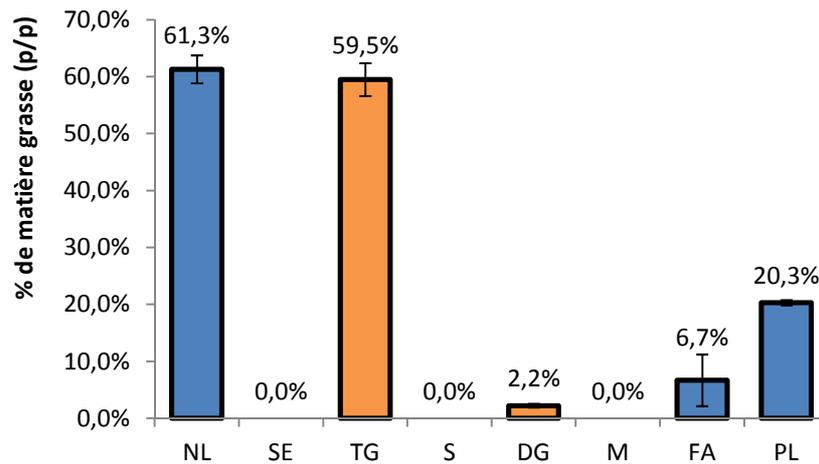


Figure 21 : Dosage gravimétrique des fractions grasses après séparation par SPE des extraits Folch. Légende : lipides neutres (NL) dont esters de stérol (SE), galactolipides et triglycérides (TG), stérols (S), diglycérides (DG) et monoglycérides (M), acides gras libres (FA) et phospholipides (PL)

L'addition de chaque classe de lipides donne un pourcentage de 88% par rapport à la quantité initiale, ce qui signifie que 12% des molécules extraites par la méthode Folch n'ont pas été éluées de la colonne aminopropyl. Parmi les lipides, les galactolipides (et les triglycérides) sont les plus représentés, ils constituent logiquement les substances de réserves de la plante, et forment une fraction de matière grasse disponible pour la synthèse de GLVs. Ensuite viennent les phospholipides constituant les membranes et les acides gras libres qui représentent 6.7% des lipides, ces deux classes plus aisément accessibles sont également des substrats pour les enzymes de la voie de la LOX.

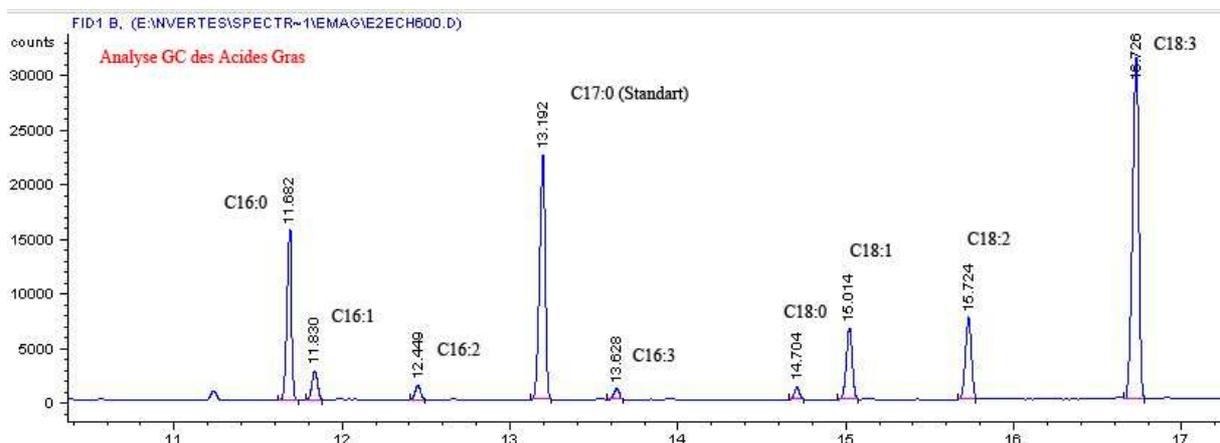


Figure 22: Chromatogramme type du profil en acides gras de feuilles de betteraves des fractions triglycérides, phospholipides et acides gras libres (Standard Interne : Acide décaheptanoïque C<sub>17:0</sub>)

#### 4.2.3.3. Profil en acides gras

Chacune des fractions, obtenues après la séparation des classes de matière grasse a été analysée (3.1.6.4. Détermination du profil en acide gras) en vue de connaître leur composition en acides gras (voir annexe 2). Les différences entre chacune des fractions sont minimales, un profil moyen est représenté à la figure 23. Ce profil chromatographique type reprend exclusivement des acides gras à 16 ou 18 carbones tels que l'acide linoléique ( $C_{18:2}$ ), l'acide linoléique ( $C_{18:3}$ ) ou l'acide palmitique ( $C_{16:0}$ ). Des analyses en GC-FID donne une quantification plus précise (Figure 23).

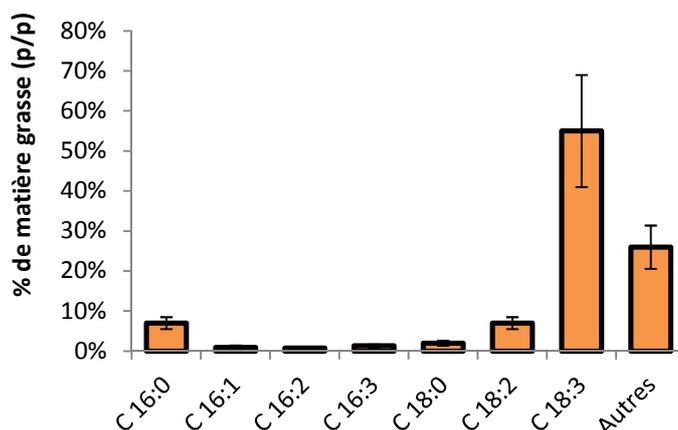


Figure 23 : Profil en acides gras réalisé par GC-FID (Standard Interne : acide decaheptadecanoïque  $C_{17:0}$ )

Les acides linoléiques et linoléiques constituent respectivement 55.0% et 7.0% des acides gras présents dans les feuilles de betteraves. Les substances de réserves telles que les triglycérides, les phospholipides, ou les acides gras libres présentent sensiblement les mêmes profils dans lesquels 60% des acides gras sont disponibles pour la production de GLVs. Les résultats obtenus séparément pour chaque classe de matière grasse sont disponibles en annexe.

#### 4.2.4. Teneur en oxylipines

Les oxylipines sont des composés oxydés issus de la métabolisation des molécules grasses par les enzymes de la voie de la LOX, cette famille inclut notamment les HPOs, les hydroxydes (HOs), les GLVs, les jasmonates ou les divinyl éthers. L'extraction et l'analyse de ces molécules permettent de distinguer les voies métaboliques empruntées au sein de la betterave (3.1.8. Évaluation des teneurs en oxylipines). La méthode d'analyse est composée de deux séparations HPLC successives. La première sépare les différentes classes d'oxylipines : jasmonates (Groupe A), divinyl éther (Groupe B), HOs et HPOs dérivant de l'acide linoléique (Groupe C) et HOs et HPOs dérivant de l'acide linoléique (Groupe D). Une seconde analyse sépare les molécules présentes dans chacun de ces quatre groupes. Enfin, une troisième séparation chromatographique permet de déterminer les rapports isomériques R et S des molécules étudiées. Tous ces dosages sont réalisés sur des échantillons frais en séparant le limbe et la tige de la feuille de betterave. La première analyse chromatographique en phase inverse permet de distinguer deux pics importants de taille équivalente correspondant aux groupes C et D (HOs et HPOs dérivant des  $C_{18:2}$  et des  $C_{18:3}$ ). Les petits pics en début de spectre confirment la présence de jasmonates et d'OPDAs (Groupe A). Par contre, aucun pic ne correspond au divinyl éther (Groupe B) n'a pu être mis en évidence. Les résultats concernant respectivement les oxylipines libres et estérifiées sont illustrés aux figures 24 et 25.

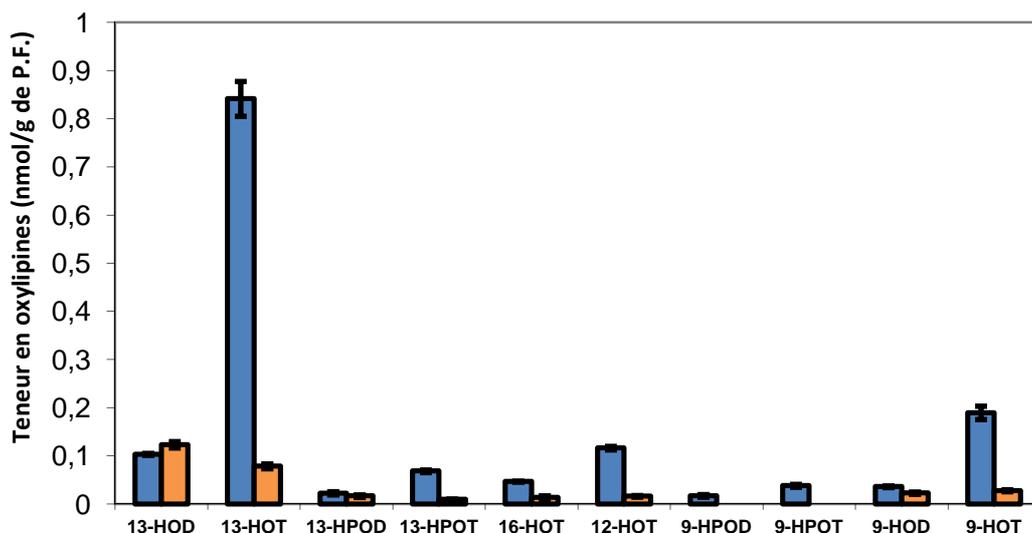


Figure 24 : analyse HPLC des HPOs et des HOs non estérifiés présents dans le limbe ■ et les tiges ■ de feuilles de betteraves (nmol/g de poids frais) (SI: 13-γ-HOT)

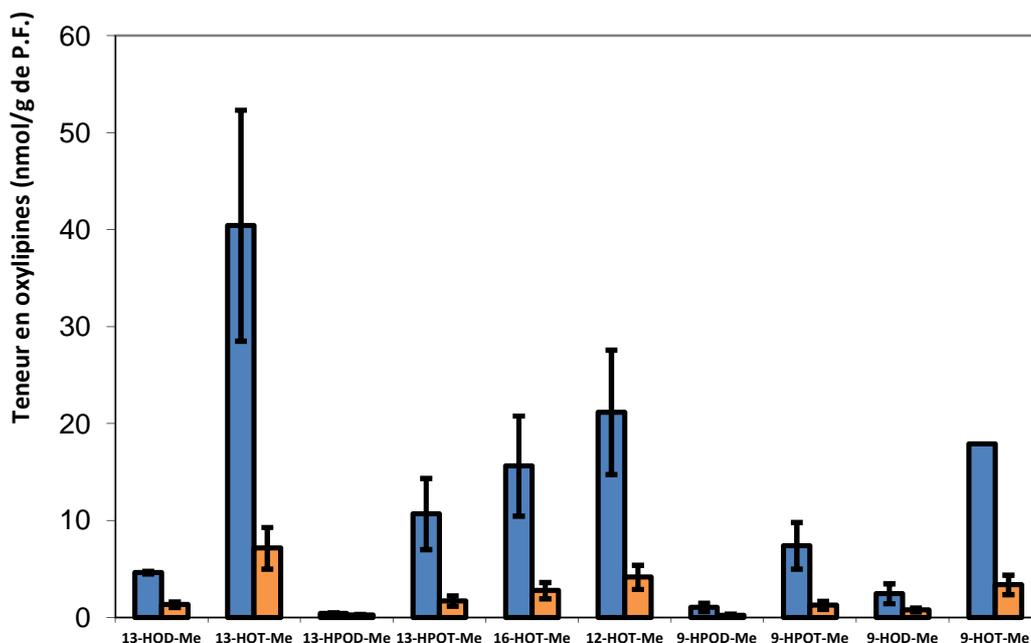


Figure 25 : analyse HPLC des HPOs et des HOs estérifiés présents dans le limbe ■ et les tiges ■ de feuilles de betteraves (nmol/g de poids frais) (SI: acide riconoléique)

La première constatation est la différence importante de concentration entre les HPOs/HOs libres (0,8nmol/g de poids frais) et les oxylipines estérifiées (65nmol/g de poids frais). Toutefois, cette mesure est cohérente avec le fractionnement de la matière grasse, celle-ci étant majoritairement estérifiée sous forme de triglycérides et peu disponible sous forme d'acides gras libres. La seconde observation montre que les teneurs en HOs et HPOs sont plus importantes dans le limbe de la feuille de betterave, la tige pauvre en molécules de réserve n'est pas un site favorable à la synthèse d'oxylipines. Enfin, les composés majoritaires correspondent aux 13-HOT, 12-HOT et 9-HOT, ces molécules dérivent de l'oxydation de C<sub>18:3</sub> mais n'interviennent pas dans la synthèse des GLVs. Par contre, les teneurs en 9-HPOD, 9-HPOT, 13-HPOD et 13-HPOT, substrats spécifiques, de l'HPL sont relativement faibles (Tableau 8).

	Tige		Feuille	
	Libre	Estérifiée	Libre	Estérifiée
<b>9-HPOD</b>	0,001	0,23	0,017	0,74
<b>9-HPOT</b>	0,001	0,68	0,038	5,71
<b>13-HPOD</b>	0,017	0,25	0,022	0,38
<b>13-HPOT</b>	0,01	0,87	0,069	8,08
	<b>0,029</b>	<b>2,03</b>	<b>0,146</b>	<b>14,91</b>

Tableau 8 : Teneur en HPOs substrats spécifiques de l'HPL dans les feuilles et les tiges de betteraves (nmol/g de P.F.),

Les 13-HPOT et 9-HPOT sont donc les principaux hydroperoxydes exploitables présents dans les feuilles de betteraves fraîches, ce sont les précurseurs directs du (3Z)-hexénal et du (3Z,6Z)-nonédiène. Une comparaison entre des échantillons frais et des échantillons conservés huit mois à -20°C est effectuée de manière à quantifier l'instabilité des molécules grasses dont notamment les oxylipines (Figure 26 et 27).

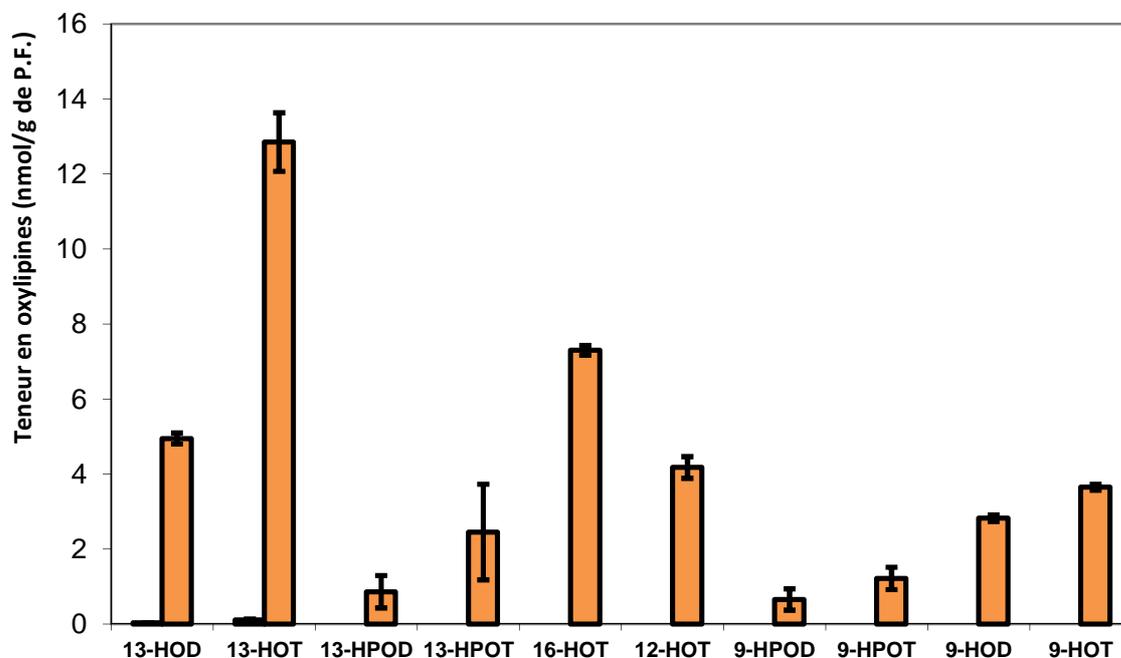


Figure 26 : analyse HPLC des HPOs et des HOs non estérifiés présents dans le limbe de feuilles de betteraves fraîches ou stockées 8 mois à -20°C (nmol/g de poids frais) (SI: 13-γ-HOT)

Le profil des oxylipines reste le même au cours du temps de stockage, seules les concentrations augmentent fortement ; la teneur totale en HPOs et HOs passe de 65 à plus de 800 nmol/g de P.F. dans le limbe de la feuille de betterave après 8 mois de conservation à -20°C. Les teneurs en oxylipines d'intérêts (9- et 13-HPOD ainsi que 9- et 13-HPOT) avoisinent 50 nmol/g de poids frais, soit 4 à 5 fois plus que les teneurs dans les feuilles fraîches. Ensuite, les proportions isomériques des oxylipines (Tableau 9) mesurées lors de la dernière analyse (3.1.8.5. Analyse Chirale-HPLC) sont proches de 50/50 entre les isomères R et S, et ce, aussi bien dans les feuilles jeunes que chez les plus anciennes.

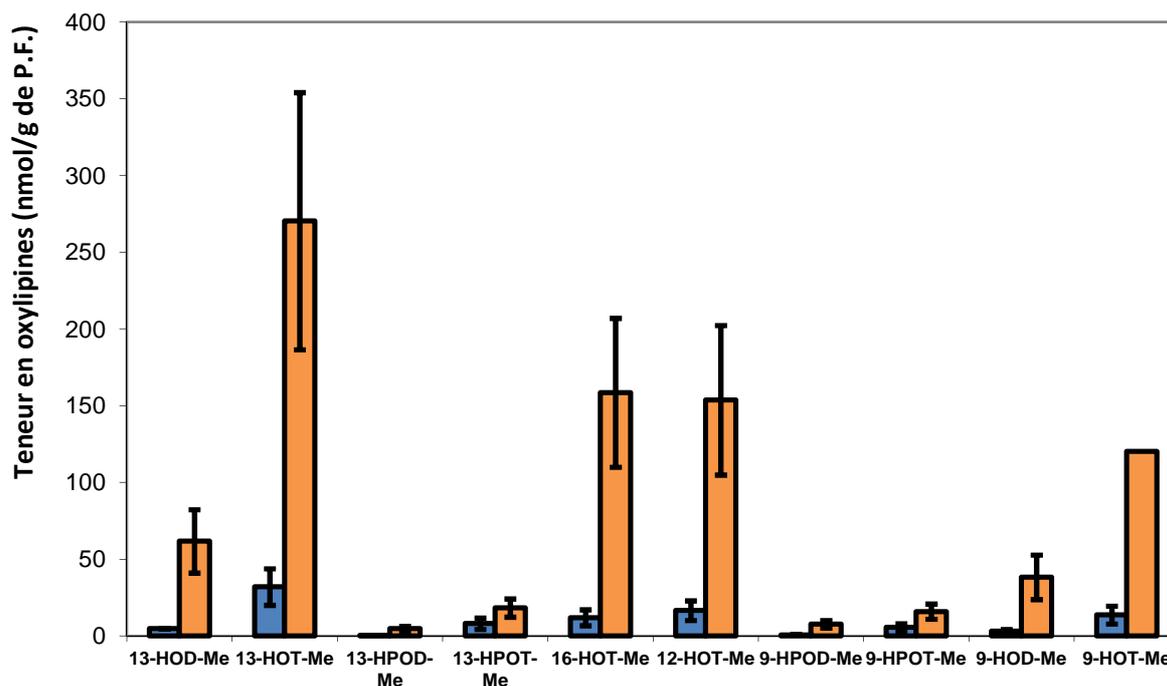


Figure 27 : Analyse HPLC des HPOs et des HOs estérifiés présents dans le limbe de feuilles de betteraves fraîches ou stockées 8 mois à -20°C (SI:acide riconoleique) (nmol/g de poids frais)

Ces mélanges racémiques illustrent que la production d'oxylipines est le fruit d'une oxydation non stéréospécifique par l'oxygène atmosphérique et non due à l'action d'une enzyme telle que la LOX (Coffa et al. 2005). La betterave semble donc ne pas exprimer l'enzyme LOX dans ces feuilles et le pool d'HPOs disponible pour la synthèse d'arômes volatils ne provient pas de l'activité enzymatique.

Oxylipines	S/R Ratio
9-HOD	51/49
9-HOT	49/51
9-HPOT	33/67
13-HOD	63/37
13-HOT	64/36
13-HPOT	68/32

Tableau 9 : Rapports isomériques pour différents HOs et HPOs extraits de feuilles

### 4.3. Les enzymes impliquées dans la synthèse des GLVs

Les teneurs en composés précurseurs de GLVs sont peu élevées dans les feuilles de betteraves, cependant les enzymes les métabolisant peuvent être retrouvées en large quantité. Les enzymes principales (Lipase, LOX, HPL et ADH) ainsi que leur sélectivité en matière de produits et de substrats ont été étudiées par différentes techniques de dosage.

#### 4.3.1. L'activité lipase

La lipase est une enzyme initiatrice de la voie de la LOX, par l'hydrolyse des liaisons ester au sein des des acides gras, l'accessibilité du substrat est considérablement augmentée. L'hydrolyse par la lipase reste facultative vis-à-vis de l'oxydation, les acides gras estérifiés peuvent être oxydés par la LOX. Toutefois, les hydroperoxydes estérifiés doivent être hydrolysés avant d'être clivés par l'HPL. Les teneurs en phospholipides étant relativement faibles, l'analyse des lipases concerne exclusivement les lipases métabolisant les tri-, di- et monoglycérides. Deux méthodes de dosage ont été réalisées

afin de déterminer la quantité de lipases extracellulaires disponibles dans les feuilles de betterave, aussi bien les dosages qualitatifs (3.1.9.1. Mise en évidence de l'hydrolyse de la tributyrine) que quantitatifs (3.1.9.2. Titration des acides gras) n'ont permis de mettre en évidence une quelconque activité lipase dans les extraits de feuilles de betteraves.

### 4.3.2. L'activité LOX

La LOX catalyse la production d'HPOs, précurseurs de la plupart des phyto-oxylipines, dont les GLVs. Lors des analyses précédentes, l'origine non enzymatique des HPOs a été démontrée par les ratios isomériques (S/R) des HPOs inférieurs à 95/5. Les dosages de l'activité LOX (3.1.10. Dosage de l'activité lipoxygénase) confirment ces mesures, après dosage aucune activité LOX (aussi bien LOX-9 que LOX-13) n'a pu être détectée dans les feuilles de betteraves. La plante doit se satisfaire des HPOs disponibles après auto-oxydation de la matière grasse. Néanmoins dans les extraits de feuilles, la présence de caroténoïdes ou de composés chlorophylliens inhibant l'activité LOX et faussant la mesure d'activité n'est pas à exclure. L'enzyme peut également être adhérente à des débris cellulaires et être impossible à extraire.

### 4.3.3. L'activité des enzymes de la famille CYP74s

Les enzymes HPL, AOS (Allène oxyde synthase) et DES (Divinyl éther synthase) sont capables de métaboliser les HPOs disponibles en générant respectivement des GLVs, des jasmonates ou des divinyl éthers. Cette dernière classe de composés n'a pas été détectée lors des analyses HPLC sur les oxylipines, nous considérons donc l'activité DES comme négligeable au sein des feuilles de betteraves. Par contre, AOS et HPL entrent en compétition pour le même substrat et représentent l'activité totale des enzymes CYP74s.

#### 4.3.3.1. Activité consommatrice des HPOs

L'activité consommatrice des HPOs ou activité totale des enzymes CYP74s est mesurée par spectrométrie UV (3.1.11. Dosage de l'activité) sur les quatre substrats disponibles : 9-HPOD, 9-HPOT, 13-HPOD et 13-HPOT. Lors de cette analyse, la betterave est comparée à la tomate, plante riche en enzymes dégradant les 13-HPOs, à savoir à la fois 13-AOS et 13-HPL (Figure 28).

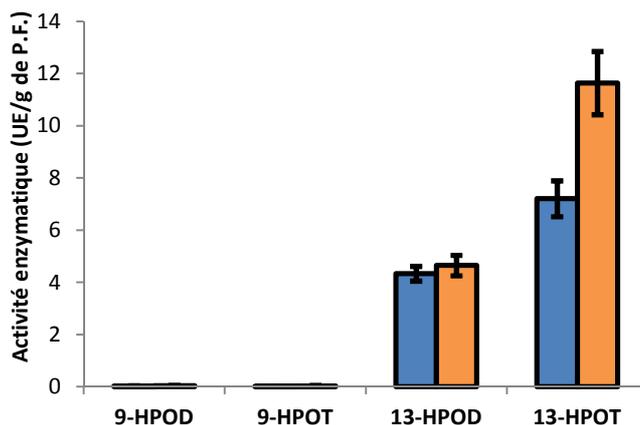


Figure 28 : Moyennes de trois mesures spectrométriques de l'activité de dégradation des hydroperoxydes (UE/g de poids frais) dans les feuilles de betteraves et de tomates selon l'isomère HPO servant de substrat.

Les 13-HPOs sont les seuls isomères dégradés par les enzymes AOS et HPL de la feuille de betterave ou de la tomate, l'activité ciblant les 9-HPOs est négligeable. Le 13-HPOT dérivé de l'acide linoléique, précurseur du (3Z)-hexénal et de l'acide jasmonique est le substrat préférentiel de ces enzymes CYP74. La spécificité en fonction du substrat est comparable à celle de la tomate, mais l'activité est

environ 50% plus importante, ce qui fait de la betterave une plante abondante en activité spécifique des 13-HPO.

#### 4.3.3.2. Activité productrice de C<sub>6</sub>-aldéhydes

La différence entre les activités consommatrices des HPOs et productrices de GLVs permet de distinguer les activités AOS [ $A_{AOS}$ ] et HPL [ $A_{HPL}$ ] (3.1.12. Dosage de l'activité allène oxyde synthase). Les mesures de production d'aldéhydes sont réalisées par spectrométrie UV et confirmées par chromatographique gazeuse sur les métabolites dérivant des 9- et 13-HPOs. Les résultats obtenus sont comparés à ceux observés chez la tomate (Figure 29).

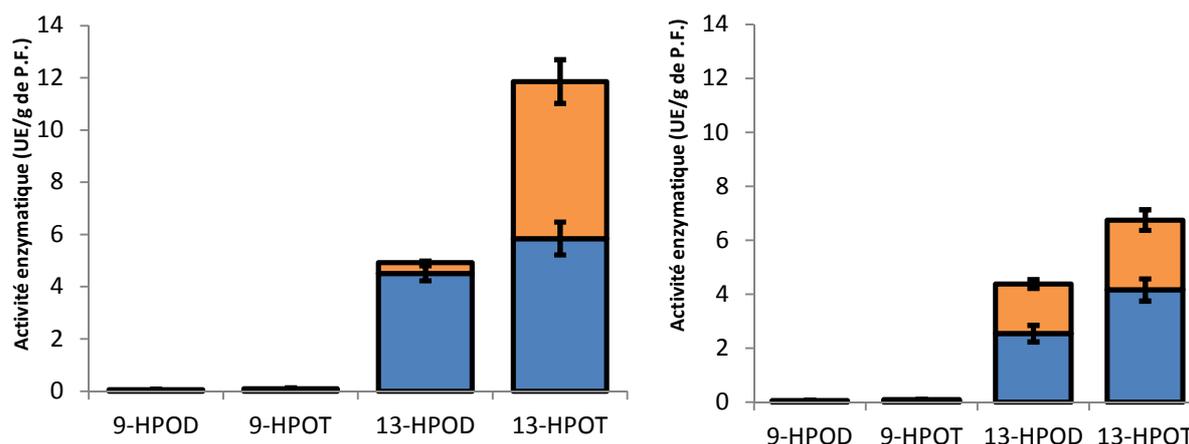


Figure 29 : Moyennes de mesures chromatographiques de l'activité HPLs ■ de feuilles de betteraves (gauche) ou de feuilles de tomates (droite). L'activité AOS ■ est déduite d'après les mesures concernant l'activité CYP74 totale. Les 4 isomères d'HPOs substrats sont étudiés pour cette mesure d'activité.

Afin de qualifier le rapport entre ces deux activités enzymatiques, un coefficient  $K_f$ , équivalent à  $[Activité_{HPL}]/[Activité_{AOS}]$  décrit le comportement des enzymes CYP74, HPLs et AOSs, vis-à-vis du substrat. Chez la tomate, l'activité HPL constitue environ 60% de l'activité CYP74 et  $K_f$  est proche de 1,5 pour les deux substrats : 13-HPOD et 13-HPOT. Par contre chez la betterave, ce coefficient varie selon le substrat. Le 13-HPOD est un substrat quasiment exclusif de l'HPL, l'activité AOS est très faible, le coefficient  $K_f$  relatif au 13-HPOD est donc très élevé : 11. Concernant le 13-HPOT, les activités sont identiques et le  $K_f$  est proche de 1. Du point de vue de l'intensité, les activités enzymatiques productrices de C<sub>6</sub>-aldéhydes pour chacun des 13-HPOs sont identiques. La betterave possède un haut potentiel de synthèse de C<sub>6</sub>-aldéhydes que ce soit de l'hexanal ou du (3Z)-hexéanal. Dans le cadre de la synthèse de ce second produit, l'activité AOS sera considérée comme une enzyme parasite venant consommer une partie du substrat et le  $K_f$  sera un indicateur de qualité de la source enzymatique.

#### 4.3.3.3. Activité HPL de différentes variétés de betteraves

Les variétés de betterave sucrière sont le fruit d'une sélection exigeante alliant haut rendement, faible tare en terre et excellents taux de germination. Trois firmes principales sont présentes sur le marché belge SESVanderHave (Tienen, Belgium), Pype (Dadizele, Belgium), et KWS Benelux (Einbeck, Germany). Ces sociétés vendent chacune des variétés avec des caractéristiques spécifiques. Des plantes riches en sucre, à forte croissance racinaire, hâtives, résistantes à la rhizomanie, à la cercosporiose, à l'oïdium ou aux nématodes, ou des variétés destinées à l'alimentation animale. Un échantillon des variétés vendues a été étudié en vue d'évaluer si des  $[A_{HPL}]$  différentes sont retrouvées au sein de ces variétés (Figure 30).

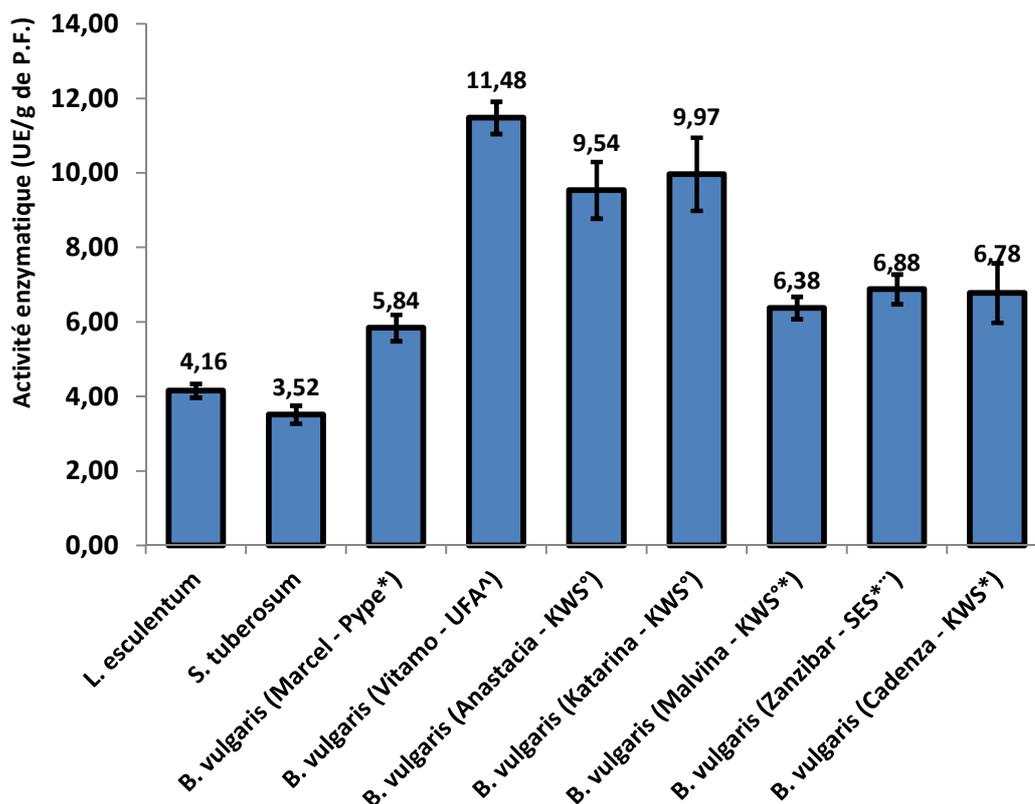


Figure 30 : Activité HPL (substrat : 13-HPOT) de différentes de variétés de betteraves, les caractéristiques de ces variétés sont reprises à l'aide de symboles : \* variétés résistantes à la rhizomanie, ° variétés de culture hâtive, ^ variétés fourragères destinées à l'alimentation animale et \*\* variétés à haut rendement en sucre. Les mesures sont réalisées au 1 septembre sur des betteraves cultivées en serres depuis 3 mois.

Des différences importantes existent entre les variétés de betterave, la variété Marcel servant jusqu'ici de base aux expériences est la plus pauvre en  $[A_{HPL}]$ . Par contre, la variété fourragère (Vitamo-UFA) est très riche, et ce, en plus de posséder une masse foliaire plus importante que les autres variétés. Toutefois en tant que plante fourragère, le feuillage de cette betterave est déjà valorisé d'un point de vue agroalimentaire. D'un autre côté, les variétés hâtives disposent également d' $[A_{HPL}]$  supérieures. Récoltées tôt dans la saison, elles semblent être les variétés idéales en vue d'une valorisation au sein d'un procédé de production de GLVs. Pour la suite des analyses de synthèse de GLVs, la variété de betterave Anastacia (de KWS Benelux) a été sélectionnée.

#### 4.3.3.4. Évolution de l'activité HPL au cours de la saison

Les betteraves sont plantées en mars pour être récoltées de septembre à novembre. L' $[A_{HPL}]$  varie avec l'état physiologique de la plante dû au fait que l'enzyme intervient dans les mécanismes de défense. L'activité enzymatique va également varier selon les conditions de culture (Figure 31).

L' $[A_{HPL}]$  croît avec la vitalité de la plante, la phase de croissance démarre en mai jusqu'à atteindre un maximum à la moitié de l'été. L'activité décroît alors petit à petit pour chuter plus rapidement à partir des premières gelées nocturnes de l'automne. Bénéficier de feuilles de betteraves au milieu de l'été pour avoir un potentiel de production de GLVs élevé est l'optimum.

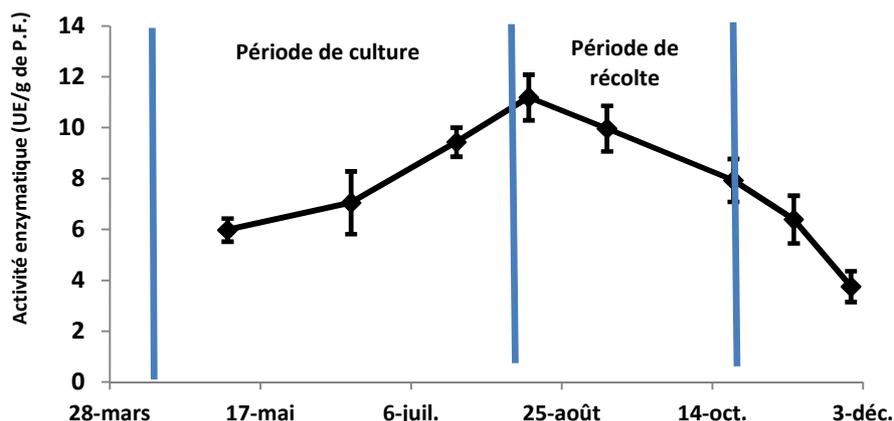


Figure 31 : Mesure moyenne de l'activité HPL (UE/G de PF) de mars à décembre sur des plants de betteraves cultivés en champs ( variété : Anastasia KWS)

Cependant à cette période, l'activité photosynthétique est maximale et la betterave accumule de grandes quantités de sucre dans sa racine. L'ablation de feuilles en juillet-août ampute donc considérablement le rendement en sucre de la culture. Dès lors, la période optimale de collecte de feuilles est fixée lors des deux premiers mois de la récolte. Après ses premiers résultats, trois autres paramètres ont été suivis au cours de la saison : les teneurs en acide linoléique, en 13-HPOT et en (3Z)-hexénal (Figure 32).

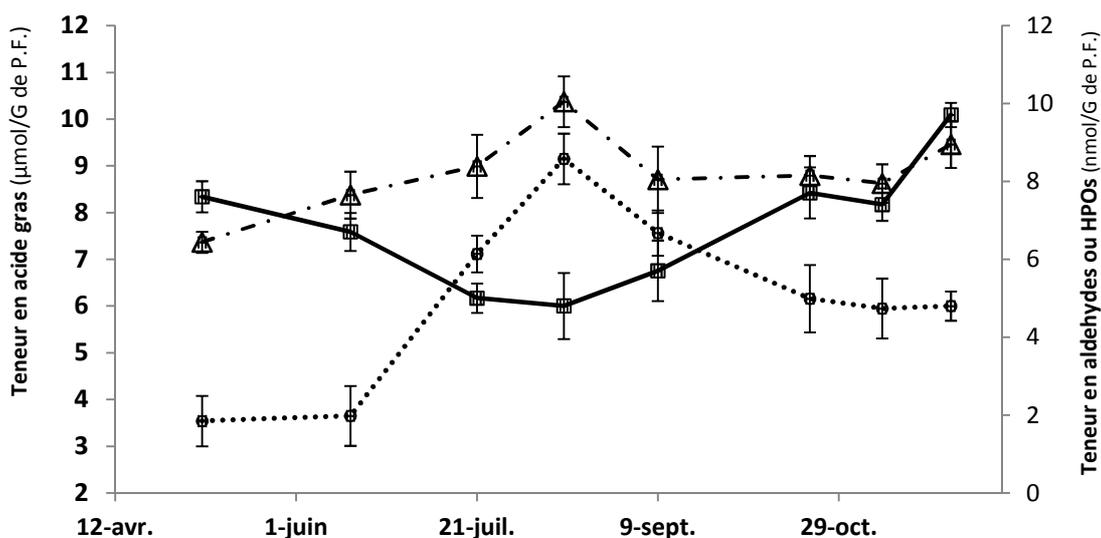


Figure 32 : Mesure de la teneur  $\circ$  en acide linoléique ( $\mu\text{mol}/\text{G}$  de PF),  $\Delta$  en 13-HPOT (nmol/G de PF) et en  $\square$  (3Z)-hexénal (nmol/g de PF) au cours de la saison sur des plants de betteraves en champs (variété : Anastasia KWS)

L'évolution des teneurs en acides gras  $\text{C}_{18:3}$  et en HPOs est semblable à celle de l' $[A_{\text{HPL}}]$ . Ces substances de réserve atteignent leur niveau maximum à la moitié de l'été. Par opposition, la teneur en  $\text{C}_6$ -aldéhydes est minimale en été. D'une part les températures sont élevées, favorisant l'évaporation des molécules volatiles et d'autre part, les plantes analysées ne présentent pas de symptômes d'agressions par des pathogènes ou des ravageurs; de ce fait la synthèse des GLVs n'est pas activée. Par la suite, le niveau de (3Z)-hexénal augmente et devient plus important notamment durant les premières gelées. Ces périodes de gel provoquent des blessures aux feuilles activant les voies de défense.

#### 4.3.3.5. Influence du stockage des feuilles de betteraves sur l'extraction des HPLs

La récolte des feuilles a lieu de septembre à novembre. Dès lors, afin de bénéficier de matériel végétal au cours du reste de l'année, les végétaux doivent être stockés. Des essais de conservation sont menés sur les feuilles de betteraves à 04°C ou à -20°C, en comparaison avec des plantes vivantes dont la racine n'a pas été récoltée. L' $[A_{HPL}]$  est mesurée pendant un mois sur base de ces trois sites de stockage (Figure 33).

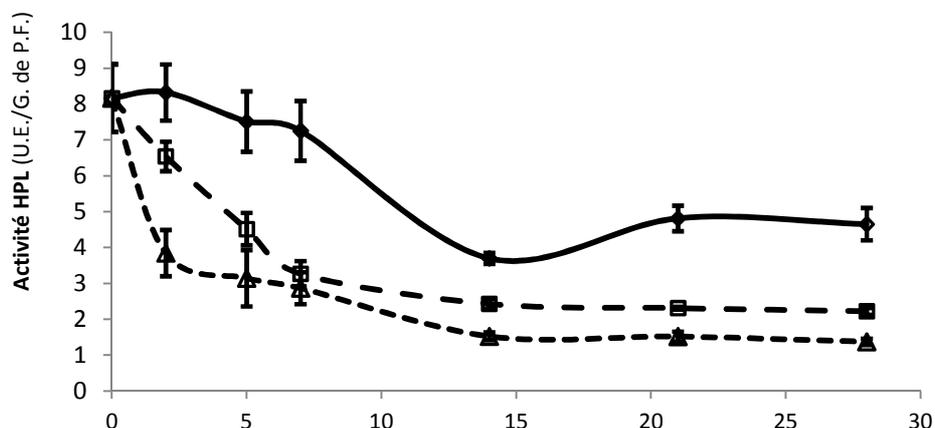


Figure 33 : Évolution de l'activité HPL au cours d'un stockage d'une période de 28 jours sur des feuilles de betteraves, les échantillons concernent des feuilles sur plantes vivantes non récoltées ◇, ou des feuilles conservées à 4°C □ ou à -20°C △ (sable limoneux, variété : Anastasia KWS)

Lors des deux essais de stockage, l'activité HPL des feuilles chute de plus de 50% dans les 5 premiers jours. Après cette intense diminution, l'activité HPL est ensuite stabilisée entre 15 ou 25% de sa valeur initiale jusqu'au terme des 28 jours. Le manque de stabilité affecte également les enzymes extraites des membranes des chloroplastes par des détergents. L'HPL ne supporte pas la congélation, mais doit être conservée à 4°C. A cette température l'activité chute progressivement jusqu'à atteindre 0 après une heure. Lors de cet essai, les feuilles au champ présentent également une chute importante d'activité. Cette chute est probablement due à un changement climatique, à savoir des gelées nocturnes deux jours successifs entre J=8 et J=10. L'enzyme est très sensible aux baisses de température ce qui rend son stockage très difficile. Néanmoins, les feuilles peuvent être conservées trois jours au frigo avant leur utilisation.

#### 4.3.3.6. Variation de l'activité HPL selon le pH et la température

Le pH et la température sont les principaux facteurs qui vont influencer la catalyse du clivage des HPOs en C<sub>6</sub>-aldéhydes. Le pH influence le *folding* de l'enzyme, mais également la solubilité des hydroperoxydes modifiant l'accessibilité du substrat. Les réactions de clivage sont généralement favorisées par les hautes températures, du moins lorsque l'enzyme reste stable.

Le pH influence l'activité de manière importante (Figure 34), l'optimum se situe entre 6,0 et 7,0 pour la catalyse des deux isomères 13-HPOs. En s'écartant de l'optimum vers des pH basiques, l'activité chute petit à petit, par contre à un pH de 5 ou moins, les 13-HPOs perdent leur solubilité et l'activité HPL tombe à 0. La température a également une importance capitale sur l'activité enzymatique, les hautes températures favorisent en général les clivages, mais peuvent déstabiliser les enzymes (Figure 35).

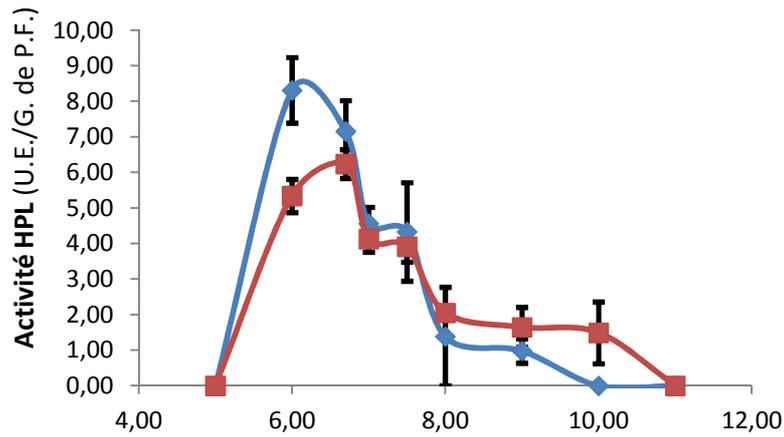


Figure 34: Évolution de l'activité HPL (UE/g de PF) sur les 13-HPOD  $\square$  et 13-HPOT  $\diamond$  selon le pH du milieu de réaction

La température optimale pour l'activité HPL est proche de 22°C, mais l'enzyme garde 50% de son activité entre 15 et 40°C (Figure 35).

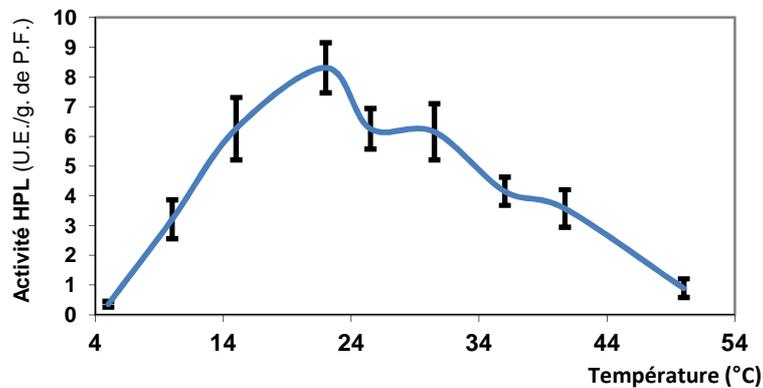


Figure 35 : Évolution de l'activité HPL (UE/g de PF) sur le 13-HPOT selon la température de réaction.

#### 4.3.3.7. Vitesse de réaction selon la teneur en substrat

HPL est une enzyme instable qui possède un « turn-over » très élevé et donc une cinétique de réaction également très rapide. La mesure de cette vitesse de réaction a été menée sur un extrait brut de feuille de betterave afin d'étudier le comportement de l'enzyme selon la concentration en substrat (Figure 36).

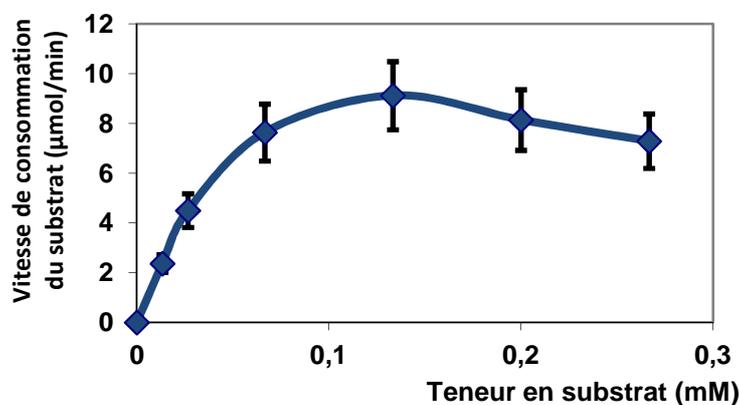


Figure 36: Vitesse moyenne de la réaction enzymatique ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) selon la teneur en 13-HPOT (mM) durant les deux premières minutes de réaction.

La vitesse de la réaction croît avec la teneur en substrat jusqu'à 0.15mM, au-delà de cette valeur on observe un phénomène d'inhibition, la vitesse de consommation du substrat chutant progressivement. Concernant les enzymes P450 cette inhibition vis-à-vis du substrat est fréquente et appelée suicide enzymatique. L'activité enzymatique peut se poursuivre à des teneurs en HPOs plus élevées, jusque 10mM (données non présentées). Cependant la réaction est fortement ralentie et la biotransformation reste souvent incomplète due à l'instabilité de l'HPL.

#### 4.3.4. L'activité ADH

L'ADH, enzyme métabolisant la transformation des aldéhydes à courtes chaînes en alcools, est peu répandue chez les plantes, elle a été exclusivement détectée en très faible quantité dans les feuilles de thé. Les dosages réalisés sur les feuilles de betteraves (3.1.13. Dosage de l'activité alcool déshydrogénase) n'ont détecté aucune activité. D'ailleurs, les profils en GLVs extraits des tissus végétaux ne contiennent pas de composés alcooliques (*Enfin, les lipides*, disponibles en faibles quantités, constituent les matières de réserve ou les précurseurs de produits métaboliques tels que les arômes. La dernière classe regroupe les composés divers, tels que les alcaloïdes (la bétanine), les glucides, l'amidon et d'autres molécules de réserves.

4.2.2. Teneur en GLVs).

### 4.4. Bilan général des teneurs en substrats et en enzymes

#### 4.4.1. Teneur en précurseurs de GLVs

La synthèse des GLVs est une voie de défense primordiale au sein du monde végétal. La plupart des plantes supérieures possèdent dans leurs feuilles les précurseurs métaboliques de ces molécules aromatiques. Le profil de GLVs synthétisés varie selon l'espèce végétale et selon la voie métabolique empruntée. Les feuilles de betteraves ont été étudiées de manière à distinguer la voie enzymatique empruntée tout en collectant des mesures concernant l'adaptation éventuelle d'une extraction brute d'arômes ou d'un procédé biotechnologique de valorisation des précurseurs. À partir des mesures effectuées, différents enseignements peuvent être tirés (Figure 37) :

- Les mesures des teneurs en GLVs sont au maximum de **0,811µg** de C<sub>6</sub>-GLVs / gramme de feuilles de betteraves, ce qui est inférieur aux teneurs émises dans l'atmosphère par les plantes soumises à des stress (Frag et Pare 2002). Seules des traces de (3Z)-hexénal, de (2E)-hexénal et d'hexanal ont pu être retrouvées dans les tissus végétaux.
- La matière grasse est un constituant secondaire : **2169 µg** de substrat disponibles / gramme de feuilles de betteraves, ce qui correspond à 0,39% de la masse foliaire. Au sein de cette famille de molécules, seuls les acides hexadécatriénoïques C<sub>16:3</sub>, linoléiques C<sub>18:2</sub> et linoléiques C<sub>18:3</sub> sont utilisables pour la production d'oxylipines, ils représentent respectivement 1,3%, 7,0% et 55,0% de l'ensemble des acides gras. Ces teneurs correspondent à 50,7µg de C<sub>16:3</sub>, 273µg de C<sub>18:2</sub> et 2184µg de C<sub>18:3</sub> par gramme de feuilles de betteraves.
- Parmi les oxylipines, les HPODs et HPOTs sont les précurseurs proches des GLVs. De la même manière que ces derniers, ces molécules ne s'accumulent pas dans les feuilles de végétaux; leur haute réactivité et leur cyto-toxicité élevée entraînent une métabolisation rapide (Stumpe et Feussner 2006). Chez la betterave, les teneurs en oxylipines sont très faibles, elles atteignent au maximum **7,36 nmol/g** pour les 9-HPOs et **9.38 nmol/g** pour les 13-HPOs. 98,6% de ces oxylipines sont estérifiées et devront être hydrolysées avant une éventuelle métabolisation en GLVs.

- Au total, **783,3µg** de GLVs peuvent être potentiellement produits par gramme de feuilles de betteraves (soit 0,078%). La source la plus représentée et constituant 99,6% des précurseurs est la matière grasse. De la même manière, à partir des précurseurs plus d'une tonne de feuilles de betteraves est nécessaire pour produire 1kg de GLVs en considérant atteindre un rendement de transformation des précurseurs égal à 100%. Ces dosages démontrent que les feuilles de betteraves orientent les réactions vers la synthèse de C<sub>6</sub>-GLVs, qui sont les seuls arômes volatils détectés après l'extraction Lickens-Nikerson. De plus, ces composés dérivent en plus large partie de l'acide linoléique et concernent exclusivement des aldéhydes excluant la présence d'alcools.

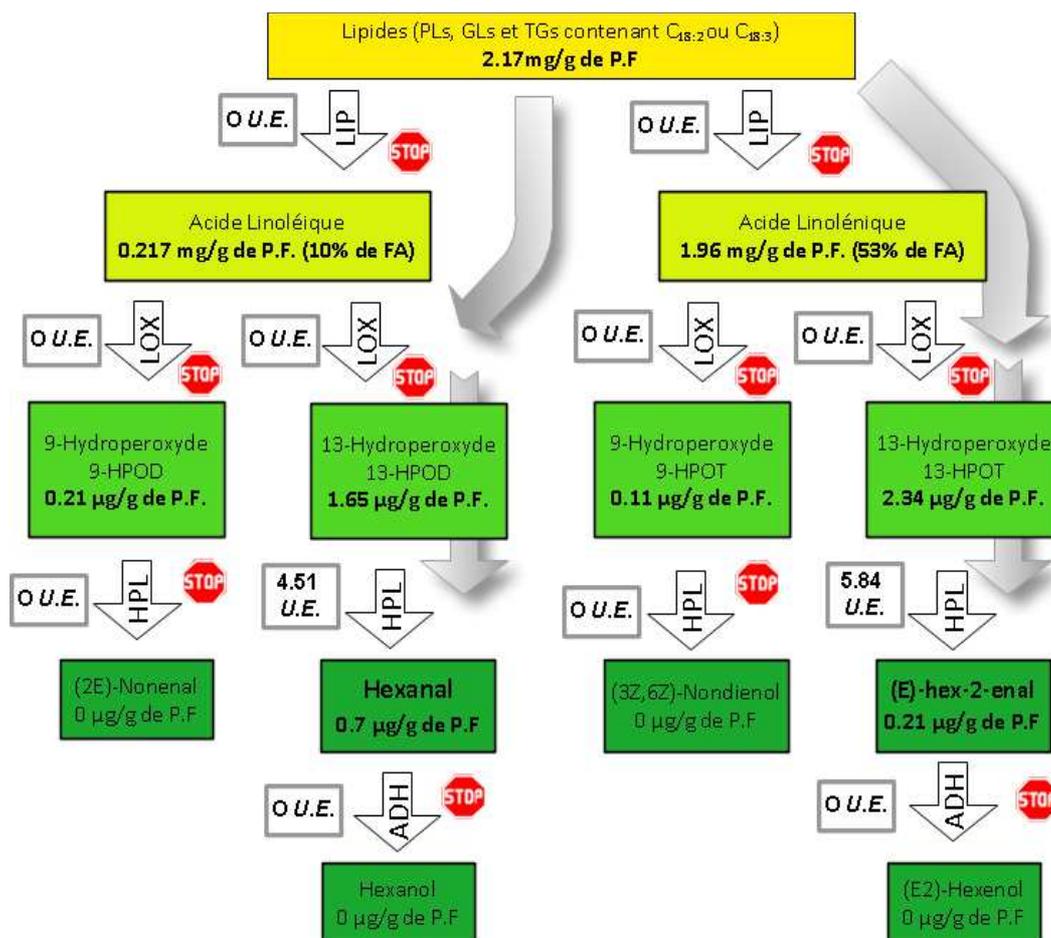


Figure 37 : Bilan général de la voie de l'HPL au sein de la feuille de betterave

Les mesures d'activité enzymatique complètent l'étude sur la production des GLVs par les feuilles de betteraves. De la même manière que pour les précurseurs, les dosages enzymatiques ont permis de relier la physiologie à la voie de synthèse des GLVs chez la betterave.

- Les activités LIP, LOX et ADH sont nulles dans les feuilles de betteraves. Tout d'abord, les lipases impliquées dans la synthèse des GLVs sont généralement des galactolipases ou des phospholipases, peu actives et difficiles à doser sans méthodes spécifiques. Les LOXs et les ADHs sont peu présentes, non exprimées dans les feuilles de betteraves ou inactivées par des composés naturellement présents dans les feuilles de végétaux, notamment les composés phénoliques (Loomis et Battaile 1966).
- Malgré des lacunes au niveau enzymatique, la betterave a la particularité de contenir de haute teneur en activité HPL. Cette enzyme est indisponible dans le commerce à cause de son instabilité et de la difficulté de sa purification. De fait, les végétaux riches en activité HPL sont

donc très recherchés pour servir d'outils enzymatiques à la production de GLVs. D'un point de vue qualitatif, l'activité HPL est spécifique des 13-HPOs et adaptée à la synthèse d'hexanal ou de (3Z)-hexéanal, et de ses dérivés. D'un point de vue quantitatif, les feuilles contiennent entre 5 et 10 UE/g de P.F. au début de la récolte sucrière (septembre).

- La présence d'HPL est parasitée par la présence d'autres hydroperoxydases (enzymes dégradant les HPOs) dont notamment les AOS qui sont spécifiques des 13-HPOT catalysant les réactions de synthèse de l'OPDA et de l'acide jasmonique. Ces enzymes sont abondantes et peuvent consommer les HPOs servant de substrats.
- D'un point de vue industriel, les feuilles de betteraves doivent être récoltées quelques heures avant leur utilisation en tant que source d'activité HPL pour conserver une intensité d'activité maximale. Les plantes ciblées seront des variétés de betteraves sucrières hâtives aux feuillages volumineux et sains. La collecte doit être abondante en début de récolte betteravière afin de bénéficier d'un maximum d'activité. Le stockage de ces feuilles à 4°C avant extraction de l'enzyme ne doit pas être envisagé plus de deux trois jours.

---

## 5 : Enrichissement de la feuille en activité HPL

---

### 5.1. Généralités

Les voies enzymatiques de la LOX peuvent être stimulées par l'intermédiaire de stress, tels que des blessures mécaniques (Conconi et al. 1996), des traitements à l'acide salicylique (Weichert et al. 1999) ou au méthyl jasmonate (Avdiushko et al. 1995; Kohlmann et al. 1999), l'application d'éliciteurs biotiques (Rusterucci et al. 1999) ou des infections avec des microorganismes pathogènes (Croft et al. 1993; Rance et al. 1998). Parmi les métabolites dérivant de la voie enzymatique de la LOX, les C<sub>6/9</sub>-volatils sont fréquemment les premiers composés synthétisés détectables dans l'atmosphère. Ils sont émis en tant que signaux intra ou inter individus, c'est une méthode de communication basique répondant rapidement à divers challenges biotiques en induisant un ensemble de réponses envers cette stimulation (Kishimoto et al. 2008). De la même manière qu'au niveau de la synthèse de l'acide jasmonique, la synthèse des C<sub>6/9</sub>-volatils est régulée à la fois localement et systématiquement afin que les tissus végétaux non endommagés sécrètent également ces molécules quelques heures après la stimulation avec pour objectif une amplification de la réponse de défense (Howe et Schillmiller 2002). Parmi les stress applicables, les blessures mécaniques et le traitement au méthyl jasmonate modifient sélectivement l'activité des enzymes de la voie de la LOX et augmentent la synthèse de C<sub>6/9</sub>-aldéhydes au détriment de la synthèse de jasmonates et de ses dérivés (Avdiushko et al. 1995) tandis que les infections par des pathogènes ont des effets plus variés. Au-delà de ces mécanismes de défense directs, des rhizobactéries promouvant la croissance des plantes (plant growth-promoting rhizobacteria ou PGPR) sont capables de renforcer la résistance d'une plante face à un ou plusieurs pathogènes en stimulant des mécanismes inductibles (Ongena et al. 2004). Parmi les PGPRs, l'habilité de *Pseudomonas putida BTP1* à induire une résistance accrue chez le pois a été clairement associée à la stimulation de deux activités enzymatiques : la LOX et l'HPL. L'activité enzymatique accrue est également détectée chez les plantes saines traitées avec le PGPR, mais des taux supérieurs sont atteints après une mise en contact de deux jours avec le pathogène. Les analyses montrent également que les feuilles de plantes traitées par *Pseudomonas putida BTP1* présentent une teneur en (Z3)-hexénal plus élevée, cette molécule à la propriété fongicide est le produit final de la voie de l'HPL (Ongena et al. 2005). Dans ce chapitre, la stimulation des voies de défense à l'aide de trois méthodes de stress est effectuée en vue d'enrichir les feuilles de betteraves en activité HPL, l'utilisation de PGPRs capables de renforcer les réponses de défense est également étudiée.

### 5.2. Augmentation des teneurs en acides gras libres

La première réponse de la plante face à un stress est l'accumulation de précurseurs de molécules signales et notamment d'AGPIs libres. Cette accumulation de précurseurs active les enzymes tels que la LOX (Stumpe et Feussner 2006). Afin d'investiguer ces changements au sein de la fraction lipidique de la feuille, les lipides totaux ont été extraits (3.1.6.3. La méthode d'extraction Blight And Dyer) entre 1H et 48H après l'application du stress (3.2.2. Stress des plantules). Les acides gras libres sont séparés par SPE et analysés par chromatographie gazeuse. Les résultats montrent que les blessures mécaniques et que les traitements aux méthyl jasmonate ont un effet notable sur l'accumulation des C<sub>18</sub>-AGPIs libres. Par contre, les infections par les pathogènes ne modifient pas ces taux de composés. L'augmentation des teneurs en AGPIs est de courte durée, entre une et 4 heures après l'application du stress. De 24 à 48 heures après l'application du stress, les niveaux d'acide linoléique libre contenu dans le limbe de la feuille redescendent aux valeurs initiales pré-stimulation (Figure 38). Ces résultats montrent également que l'hydrolyse des lipides de réserve n'est pas spécifique, mais que le taux de tous les acides gras libres est augmenté, et pas seulement ceux des C<sub>18</sub>-AGPIs (données non illustrées-voir annexes).

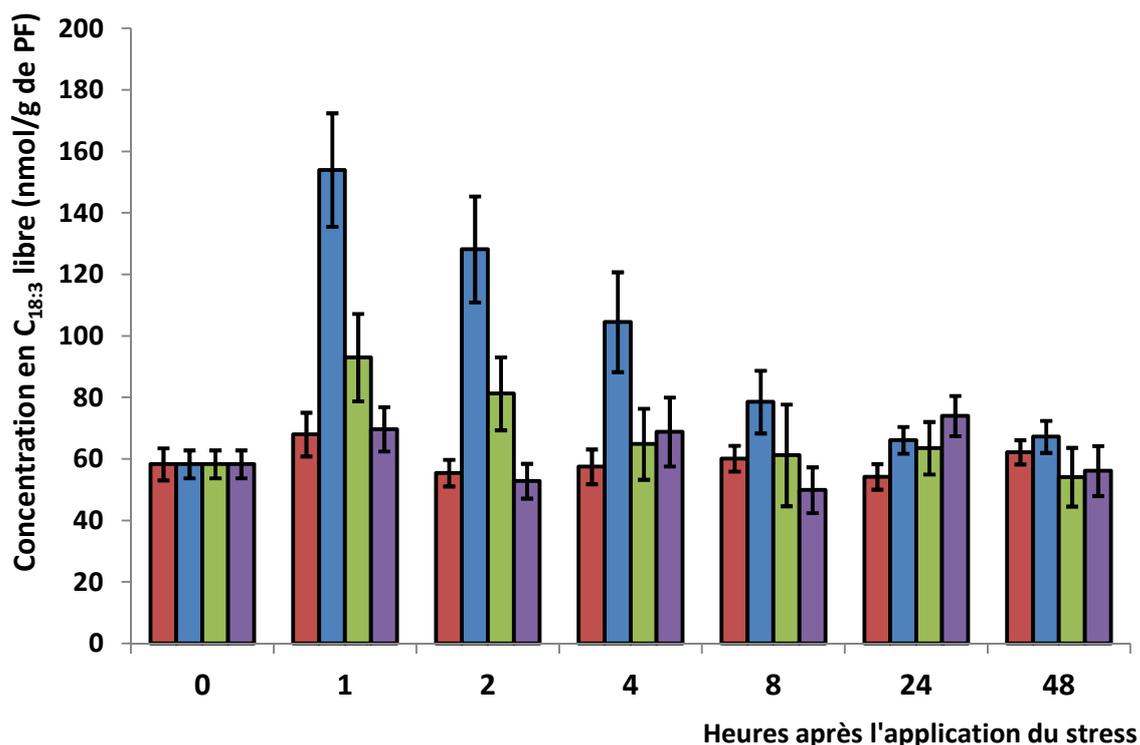


Figure 38: Niveaux moyens d'acide linoléique libre dans le limbe de feuilles de betteraves ciblées par des essais de stimulation (■ : les plantes contrôles, ■ : plantes stimulées par des blessures mécaniques, ■ : plantes stimulées par des traitements au méthyl jasmonate et ■ : plantes stimulées par des infections via des micro-organismes pathogènes par *Pseudomonas syringae aptata*)

### 5.3. Modification du rapport enzymatique entre AOS et HPL

La balance physiologique entre les activités AOS et HPL chapeaute les mécanismes de défense des plantes, menant à la synthèse de jasmonates ou de GLVs à partir d'acides gras polyinsaturés à 18 carbones. Selon le point de vue de la production industrielle d'arômes, cette balance doit pencher le plus possible vers l'activité HPL afin de maximiser la synthèse de GLVs. Chez la betterave, comme précédemment observé dans d'autres végétaux, les blessures mécaniques et les traitements au méthyl jasmonate entraînent un accroissement de l'activité HPL entre une heure et quatre heures après la stimulation (Figure 39). Cette augmentation n'est pas associée à une diminution de l'activité AOS, au contraire, cette seconde enzyme présente également un pic d'activité une heure après la stimulation avec un retour plus rapide au niveau enzymatique initial. Par opposition, l'infection à l'aide de microorganismes pathogènes ne modifie pas les activités enzymatiques, si ce n'est une légère augmentation de l'activité AOS à court terme (Figure 40).

À partir des activités enzymatiques obtenues, les coefficients  $K_f$  sont calculés pour chacun des différents stress appliqués (Figure 41). Ces stimulations entraînent des modifications spécifiques concernant la métabolisation des hydroperoxydes. D'une manière générale, le coefficient est maximal entre une et deux heures après la stimulation dans chacun des cas de stress. Sa valeur chute ensuite en dessous de son niveau initial. L'augmentation est la plus importante pour la stimulation par blessure mécanique, la valeur du  $K_f$  dépasse 1,8 entre une heure et huit heures après la stimulation.

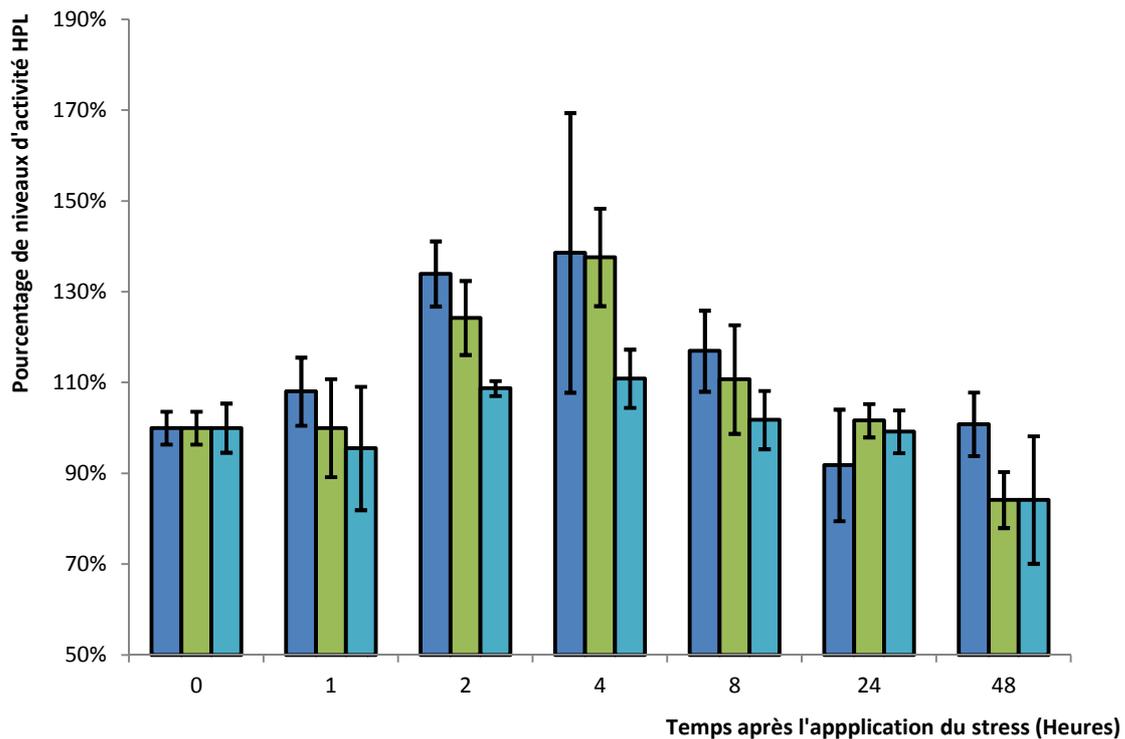


Figure 39 : Niveaux moyens d'activité HPL par rapport à une plante contrôle non stressée (à laquelle correspond un niveau d'activité de 100%) dans les feuilles de betteraves soumises à différents stress : ■ stimulation par blessures mécaniques, ■ traitements au méthyl jasmonate et ■ infection via des micro-organismes pathogènes (*Pseudomonas syringae aptata*).

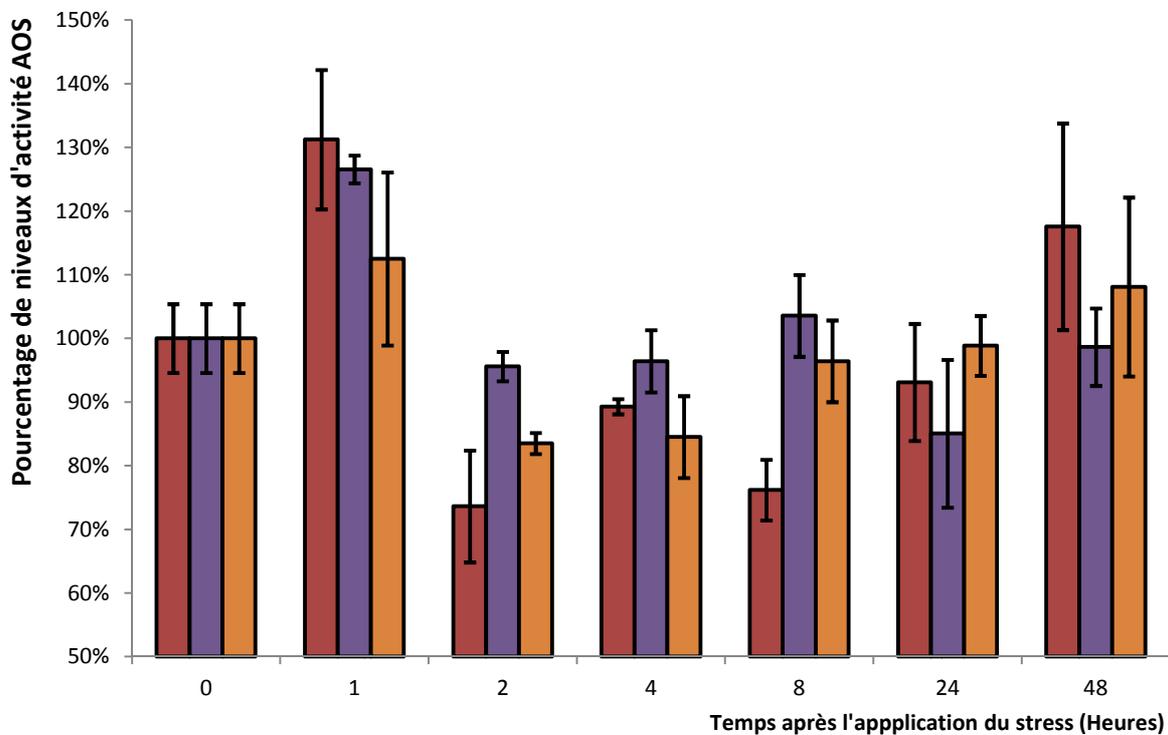


Figure 40 : Niveaux moyens d'activité AOS par rapport à une plante contrôle non stressée (à laquelle correspond un niveau d'activité de 100%) dans les feuilles de betteraves soumises à différents stress : ■ stimulation par blessures mécaniques, ■ traitements au méthyl jasmonate et ■ infection via des micro-organismes pathogènes (*Pseudomonas syringae aptata*).

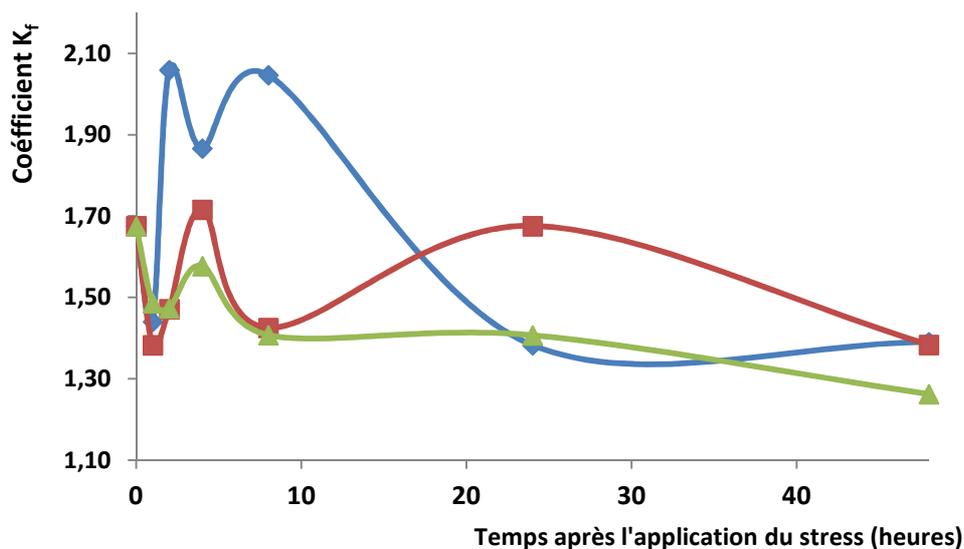


Figure 41 : Évolution du coefficient  $K_f$  à la suite de différents essais de stimulations ( ◆ : stimulation par blessures mécaniques, ■ : traitements au méthyl jasmonate et ▲ : infection pathogène par *Pseudomonas syringae aptata*)

#### 5.4. Induction de résistance systémique et implication sur le système enzymatique

Des tests de résistance systémique induite (ISR) à l'aide de *Pseudomonas putida BTP1* ont également été menés en vue de stimuler le système de défense de la betterave (3.2.3. Expériences d'ISR). En l'absence d'infection avec un pathogène, aucune activation des activités HPL ou des activités AOS n'a été observée chez les plantes traitées avec le PGPR (données non illustrées). Dans le cadre d'infection (Figure 42), les tableaux montrent que les traitements à l'ISR ne sont pas capables de réduire le taux d'infection par *Pseudomonas syringae aptata* et les dommages s'étendent au-delà des zones d'inoculation autant pour les plantes traitées que pour les non traitées.

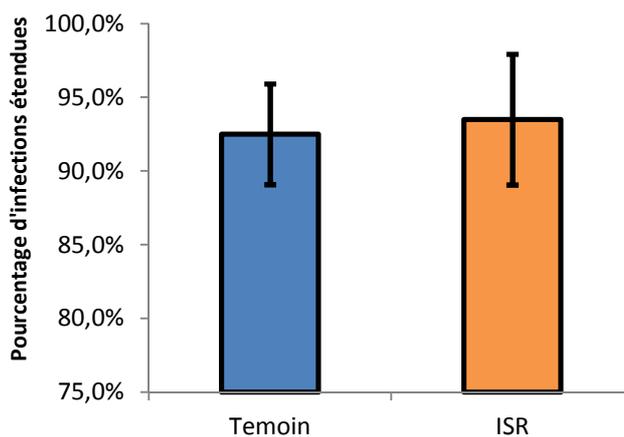


Figure 42: Pourcentage de plants de betterave âgée de 4 semaines présentant une extension des zones d'infections par *Pseudomonas syringae aptata* ; ■ plants témoins, ■ plants traités par le PGPR.

Après analyses des activités enzymatiques, on observe que les infections stimulent l'activité AOS jusqu'à deux jours après l'inoculation par le pathogène. L'activité AOS augmente de plus de 50% dans le cas de plantes traitées avec les PGPRs (Figure 40). En général, l'activité HPL reste stable tandis que l'activité AOS augmente entre 48 et 96 heures après l'infection. Si cette infection est associée avec

des stimulations via l'ISR, les activités HPL et les activités AOS sont légèrement plus élevées. La balance d'activité penche vers l'AOS ( $K_f$  moyen = 0.62) chez les plantes infectées alors qu'elle reste plus stable chez les plantes non infectées ( $K_f$  moyen = 0.71).

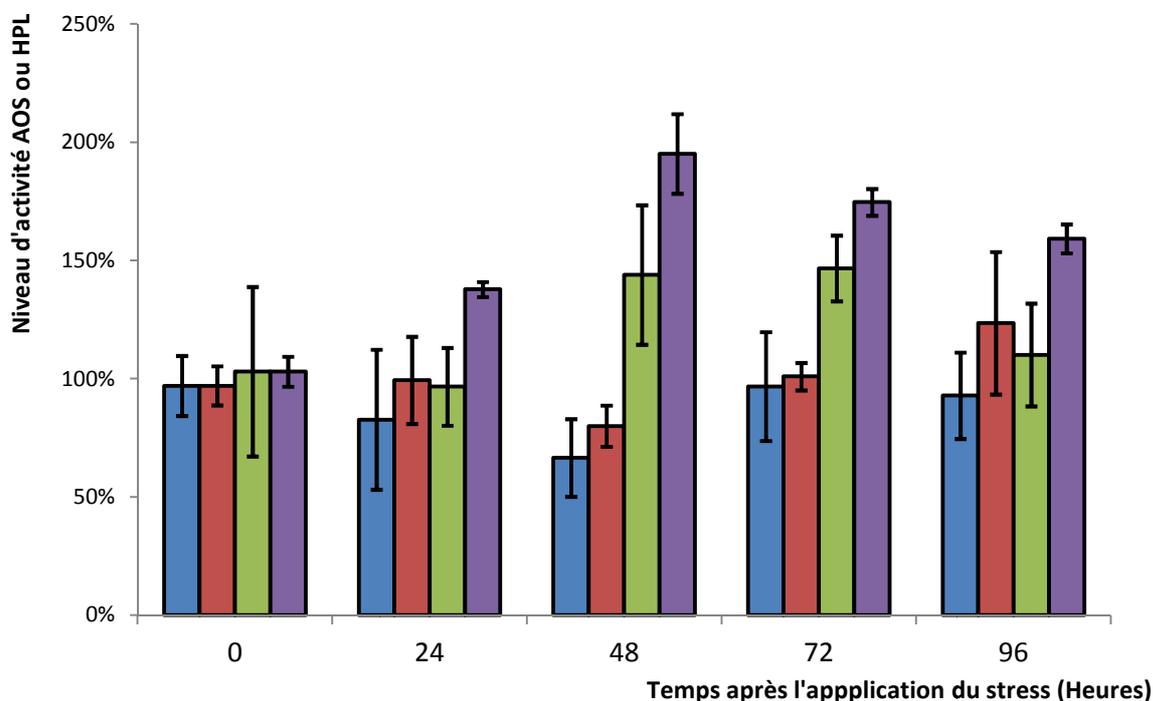


Figure 43 : Niveaux moyens d'activité AOS ou HPL par rapport à des plantes contrôles (à laquelle correspond un niveau d'activité de 100%) chez les feuilles de betteraves préalablement mises en contact avec *Pseudomonas putida* BTP1 et soumises à une infection par le pathogène *Pseudomonas syringae aptata*, ■ : activité HPL sur des plantes non traitées, ■ : activité HPL sur des plantes traitées avec *Pseudomonas putida* BTP1, ■ : activité AOS sur des plantes non traitées, ■ : activité AOS sur des plantes traitées avec *Pseudomonas putida* BTP1.

## 5.5. Bilan général sur la stimulation de l'activité HPL

Les expériences réalisées lors de ce chapitre ont pour objectif d'accroître le potentiel de production des GLVs par les feuilles en stimulant le système de défense de la plante, ceci permet également de récolter des informations sur le type particulier de stimuli activant la voie de synthèse des GLVs.

- L'application des stress, quels qu'ils soient entraîne tout d'abord une libération des acides linoléiques estérifiés au sein des feuilles de betteraves. Cette hydrolyse permet de garantir une bonne accessible à ces molécules.
- De la même manière, l'activation des défenses immunitaires va s'étendre aux enzymes impliquées dans les voies de défense de la plante et notamment la voie de l'HPL. Concernant la synthèse de GLVs, la période propice pour exploiter les ressources enzymatiques est située entre deux et quatre heures après la stimulation. L'activité HPL est en augmentation alors que l'activité AOS reste à sa valeur initiale. Ce phénomène est particulièrement marqué pour les stress mécaniques et le traitement au méthyl jasmonate.
- Réduire l'influence de l'AOS qui parasite l'activité HPL en consommant les HPOs est réalisable. En effet, lors des premières heures de conditions de stress, le coefficient  $K_f$  (rapport entre les activités HPL et AOS) atteint des valeurs de 2,1 et 1,9 alors qu'il est proche de 1,7 dans l'état non stimulé.
- Le type de stimuli appliqué module la réponse enzymatique de la plante, les blessures mécaniques et les traitements au méthyljasmonate stimulent l'activité HPL de manière

positive. Par contre, les infections via *Pseudomonas syringae aptata* sont inefficaces dans l'optique d'une amplification de l'activité HPL. Ces stimuli n'accroissent pas l'activité HPL, mais au contraire la réduisent 24 heures après leur application. Ce phénomène est d'autant plus marqué lors de l'utilisation de PGPRs dans le cadre de l'induction d'une résistance systémique. Malgré l'absence de réduction des taux d'infections par les microorganismes pathogènes, les PGPRs accentuent la réponse immunitaire de la plante en renforçant l'activité AOS.

<b>Stimuli appliqués</b>	<b>Augmentation maximale de l'activité HPL</b>	<b>Temps</b>	<b>Augmentation de l'activité AOS</b>
<b>Blessures mécaniques</b>	+ 39%	4h	- 11%
<b>Traitement au méthyljasmonate</b>	+ 38%	4h	- 4%
<b>Infection par microorganismes</b>	+ 11%	4h	- 15%
<b>Infection et ISR</b>	+ 24%	4h	+ 59%

Tableau 10 : Bilan de la stimulation de l'activité HPL selon le stress appliqué

D'un point de vue global à la suite de ces stimulations, les feuilles de betteraves ont un potentiel de production de GLVs plus élevé tout en réduisant la consommation parasite de substrat par l'AOS. Cependant, 24 heures après le traitement, le  $K_f$  tend à diminuer vers des valeurs inférieures à son niveau initial.

---

## 6 : Production de GLVs : améliorations technologiques

---

### 6.1. Schéma général

À partir des différentes observations concernant, la voie enzymatique de synthèse des GLVs au sein de la feuille de betterave, un procédé industriel de biotransformation a été établi. Ce procédé va tirer parti des richesses mises en évidence dans les chapitres précédents et va comporter des solutions alternatives aux manquements. Le procédé de synthèse des GLVs repris à la page suivante (Figure 45) représente un système théorique de biotransformation d'une huile végétale en GLVs. Ce système inclut le *downstream processing* et les différentes étapes de contrôle, il transpose les réactions enzymatiques de la voie de la LOX décrite in vivo dans un environnement industriel. Certaines étapes de ce procédé sont optionnelles, elles permettent d'augmenter le rendement ou la spécificité du produit final. Dans son intégralité, ce procédé de production est adapté à la synthèse de produits naturels (les matières premières sont exclusivement d'origine végétale et animale) et alimentaires (les procédés impliqués dans la fabrication sont autorisés par le codex alimentarius). Dans ce chapitre les étapes de production sont successivement décrites et optimisées, trois paramètres sont calculés afin d'évaluer cette optimisation :

- La **capacité de production** correspond à la quantité de produits fabriqués, c'est une valeur absolue exprimée en g/l ou en mol/l à un moment t correspondant à la durée optimale de synthèse. C'est donc le paramètre primordial qui est le plus représentatif de l'efficacité du procédé de production.
- Le **rendement** : c'est le rapport entre la quantité de produits obtenue et le substrat ajouté. Dans la plupart des expériences, le coût du substrat est très faible par rapport à la valeur du produit final. Dès lors, ce paramètre revêt moins d'importance que la capacité de production, mais son optimisation peut faciliter la mise en œuvre du procédé complet en réduisant la demande en substrat et la production de déchet.
- La **productivité** correspond à la quantité de produits obtenus par unité de volume et de temps. La productivité est un paramètre variable durant la production, c'est pourquoi on parlera également de **productivité moyenne** qui correspond à la productivité observée et calculée sur toute la durée de la production. Cette productivité moyenne sera donc fortement dépendante de l'échelle de production. Notons également que lorsque la teneur en produits diminue au court du temps, la productivité devient négative.

Chacune des réactions décrites ci-après est une opération unitaire réalisée en batch, elles sont étudiées de manière à pouvoir être introduites dans un procédé industriel en continu.

### 6.2. Synthèse du substrat de la LOX

#### 6.2.1. Choix du substrat

L'huile végétale servant de substrat initial à la production de GLVs doit être choisie avec précaution. La nature des GLVs synthétisés va essentiellement dépendre du profil en acides gras de l'huile végétale. Selon les résultats obtenus lors de la caractérisation de la feuille de betterave, la teneur en 13-HPL est très élevée (4.3.3.2. *Activité productrice de C6-aldéhydes*), la production sera dirigée vers l'hexanal ou les isomères de l'hexénal selon l'acide gras de départ (Tableau 11). D'un point de vue économique l'hexénal et ses isomères ont plus d'applications aromatiques que l'hexanal ; d'ailleurs leur prix de vente est nettement plus élevé (350\$ pour l'hexanal et les prix pouvant atteindre plus de 1000\$ le litre pour l'hexénal et ses isomères). L'huile de lin a donc été choisie comme substrat initial de nos essais de production. Après plusieurs contacts avec différents fournisseurs d'huiles végétales en Belgique, l'huile de lin raffinée de chez Vandeputte a été sélectionnée sur base de leur offre.

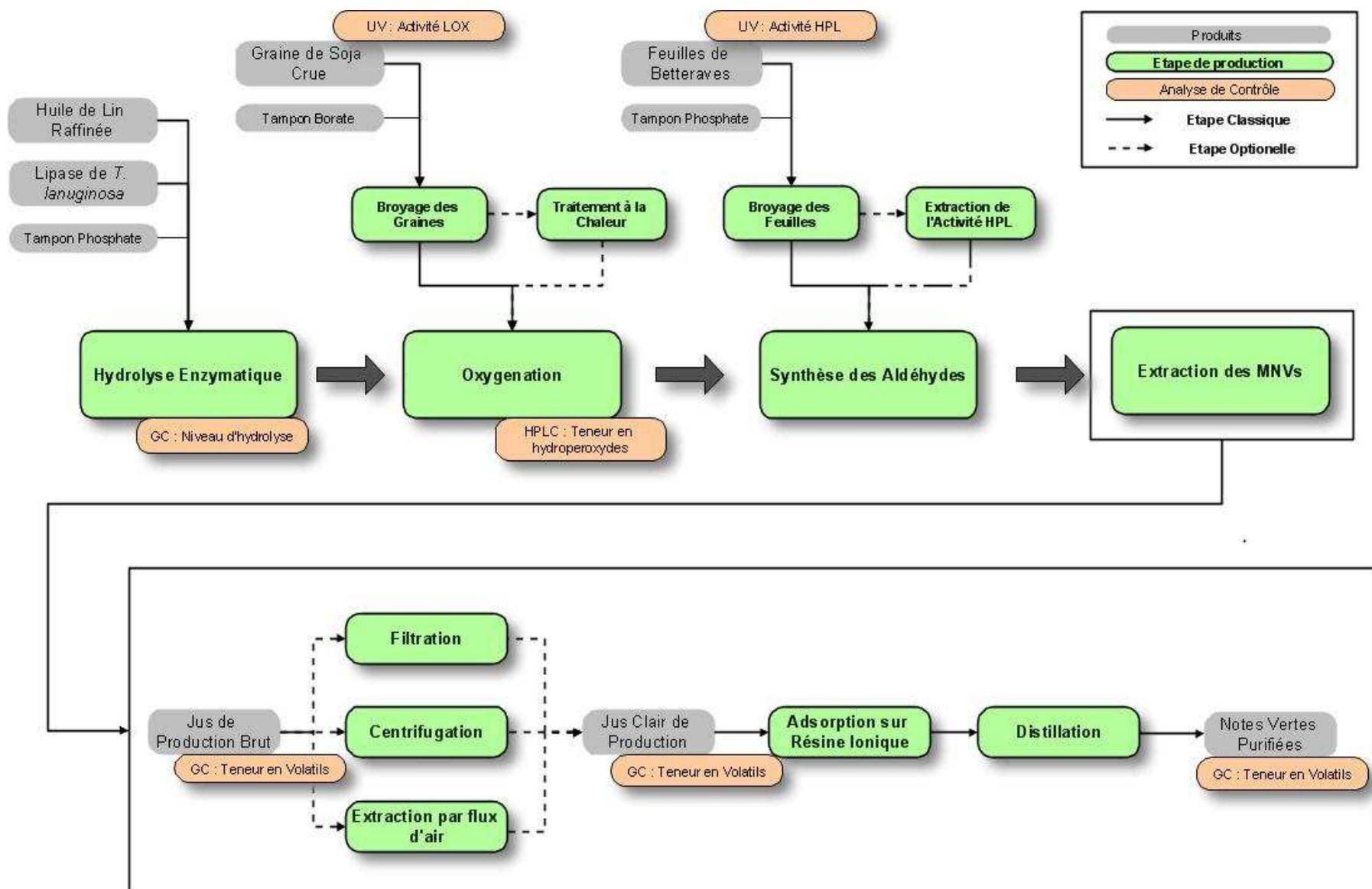


Figure 44 : Vue générale du procédé industriel de production de C6-GLVs à partir de feuilles de betteraves

Cette huile possède plus de 50% de C<sub>18:3</sub> et environ 15% de C<sub>18:2</sub>. Le potentiel de production de C<sub>6</sub>-aldéhydes à partir de cette huile végétale est donc très élevé (Figure 45).

	Composition en acide gras % (p/p)		Potentiel de production de C <sub>6</sub> -GLVs (g/L d'huile)	
	C18:2	C18:3	Hexanal	Hexénal(s)
Huile de tournesol	61%	23%	196	80
Huile de carthame	78%	2%	251	5
Huile de lin	16%	54%	50	170
Huile de Kiwi	5%	62%	17	197

Tableau 11 : Quatre huiles végétales et leur potentiel de production de C<sub>6</sub>-GLVs

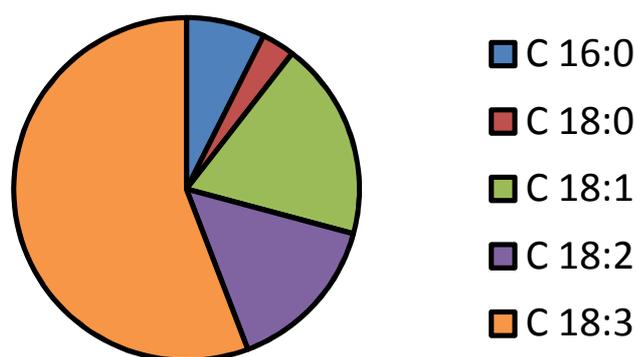


Figure 45 : Profil en acide gras de l'huile de lin raffinée (Vandeputte, Mouscron, Belgique)

## 6.2.2. Mise au point de la méthode d'hydrolyse

Avant de pouvoir être exploitée, la matière grasse végétale doit être hydrolysée sous forme d'AGPIs libres. À ce sujet, trois méthodes différentes d'hydrolyse sont comparées (3.4.2. Hydrolyse alcaline de l'huile de lin ; 3.4.1. Hydrolyse enzymatique de l'huile de lin). La première méthode est une hydrolyse alcaline avec du NaOH 10N par chauffage à reflux en présence d'éthanol (Goers et al. 1989; Fauconnier et Marlier 1996). La deuxième méthode est également une hydrolyse alcaline sous agitation en présence de NaOH 10N par chauffage dans un bain-marie à 100°C, mais ne nécessite pas l'utilisation d'un alcool (Nemeth et al. 2004). Enfin la dernière méthode est une hydrolyse enzymatique à partir de lipases produites par de *Thermomyces laguninosus* (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark). Concernant nos expériences, chacune de ces trois méthodes est appliquée à un échantillon d'huile de lin raffinée purée à plus de 95%.

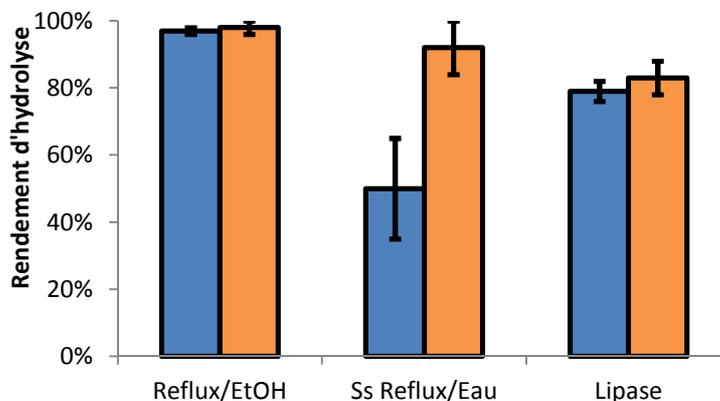


Figure 46 : Rendement d'hydrolyse de l'huile de lin selon différentes méthodes. Les temps T1 et T2 correspondent à 30 minutes et 60 minutes pour les hydrolyses chimiques et à 16 heures et 24 heures pour l'hydrolyse enzymatique

Le temps d'hydrolyse varie considérablement selon la méthode utilisée, l'hydrolyse chimique est rapide (entre 30 et 60 minutes) tandis que l'hydrolyse enzymatique est beaucoup plus longue (entre 12 et 24 heures). Le graphique ci-dessus illustre que l'hydrolyse enzymatique, malgré un rendement inférieur à l'hydrolyse chimique à l'éthanol, est un excellent procédé pour l'obtention d'acides gras libres (Figure 46). Malgré la durée élevée de cette réaction, cette hydrolyse est un choix opportun de réaction : d'une part, le travail à température faible et sans solution astringente réduit les dangers inhérents à la réaction. Et d'autre part, ce procédé fait partie des procédés acceptés pour l'obtention de substances aromatisantes naturelles à partir de substrat végétal. La simplicité de la mise en œuvre de cette réaction donne également plus de flexibilité à l'élaboration du processus (1.2.3. Utilisation des GLVs). Les rendements moyens de cette étape d'hydrolyse enzymatique sont présentés dans le tableau 12 :

Hydrolysats d'huile de lin	
Triglycérides (%)	11,32 ± 0,78
Acides gras (%)	84,58 ± 0,5
Lipides polaires (%)	4,1 ± 1,3

Tableau 12: Teneurs moyennes en classe de matière grasse après une hydrolyse enzymatique de l'huile de lin raffinée pendant 24 heures à 37°C.

### 6.3. Synthèse des hydroperoxydes

La deuxième étape de la synthèse est la production d'HPOs par la LOX. Comme nous l'avons montré dans la section 8.3.2., cette enzyme, absente dans les feuilles de betteraves, doit être extraite d'une source alternative. La source sera choisie en fonction de sa disponibilité, de sa spécificité et de son prix.

#### 6.3.1. Sélection de la source de lipoxigénase

Dans la littérature, une source de LOX sort du lot : le soja (*Glycine max*) est reconnu pour posséder un très haut niveau de 13-LOX au sein de ses graines. En outre, une collaboration internationale avec le Pr. Ndoye m'a permis d'obtenir également des graines de niébé (*Vigna unguiculata*) réputées particulièrement riches en LOX. Afin de choisir judicieusement la source enzymatique, des dosages de l'activité LOX ont été menés sur ces produits végétaux. Pour rappel, les activités LOX de type I produisent exclusivement des 13-HPO à pH basique et les activités de LOX de type II génèrent un mélange d'isomères 9- et 13-HPOs à pH neutre.

Les teneurs en LOX de type I sont plus élevées que les teneurs en LOX de type II (Figure 47) pour chacune des sources analysées. Néanmoins, afin de supprimer cette faible activité parasite, un chauffage à 70°C pendant 5 minutes peut être effectué. Ce traitement va dénaturer les LOX de type II, sensibles à la chaleur, sans réduire la teneur en LOX de type I (Németh et al. 1998). L'activité LOX de type I produisant exclusivement des 13-HPOs est maximale dans les germes et les graines de soja avec comme substrat préférentiel l'acide linoléique. D'un point de vue pratique, les graines sont choisies par rapport aux germes, car leur disponibilité est supérieure et, car le broyage est plus aisé. Des analyses sur des graines d'origines différentes ont également été réalisées afin de comparer différents fournisseurs de graines de soja. Par manque d'informations disponibles sur les variétés des graines de soja obtenues, seul le facteur fournisseur est pris en compte. Ces graines de soja sont disponibles fraîches et non torréfiées. Trois distributeurs de graines ont répondu à nos demandes fournissant des graines non torréfiées : Alpro situé en Belgique producteur d'aliments dérivés du soja, Cargill et Chemvalley deux grossistes en produits végétaux.

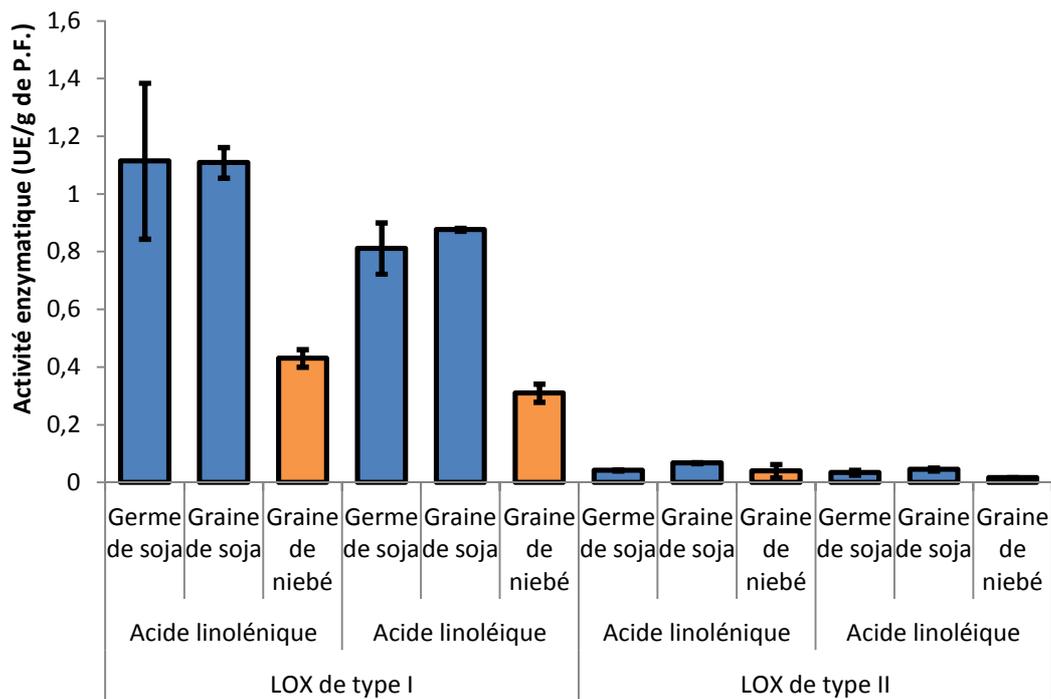


Figure 47 : Activité moyenne en LOX de type I et LOX de type II extraite de graines de soja ■, de graines de niebé ■ et de germes de soja ■ selon le substrat : l'acide linoléique ou l'acide linolénique. L'activité est exprimée en UE (1UE = 1µmol de HPO produite par seconde).

La différence d'activité entre les graines de Cargill et Alpro est minime (Figure 48), ces deux sources sont riches en activité LOX de type I et l'activité LOX de type II, après le traitement à la chaleur conseillé, est très faible (données non illustrées). Pour des choix de proximité, l'entreprise Alpro est sélectionnée pour la livraison de graines de soja non torréfiées.

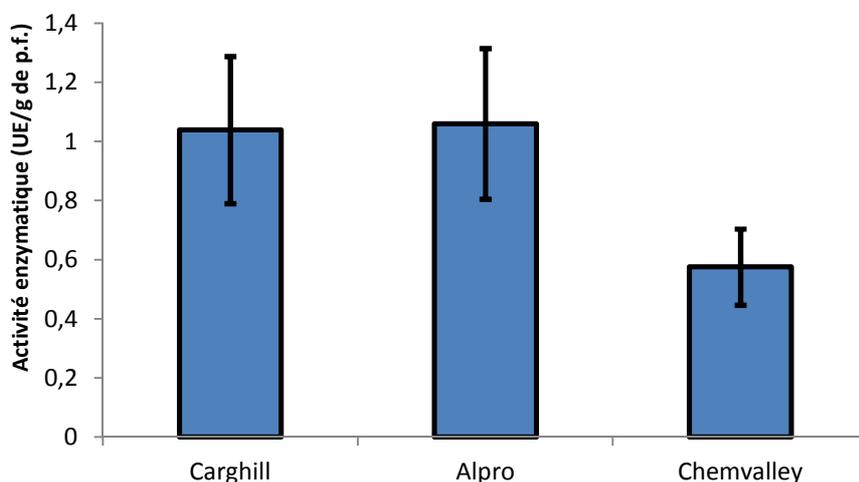


Figure 48 : Mesures spectrométriques d'activité LOX de type I sur des échantillons de graines de soja provenant de différents distributeurs : Alpro (Gent, Belgium), Cargill (London, United Kingdom) et Chemvalley (Dallas, United States)

### 6.3.2. Synthèse d'hydroperoxydes à l'aide de la 13-LOX de soja

La production d'HPOs à partir de graines de soja et d'huile de lin hydrolysée a déjà fait l'objet de différentes publications (Whitehead et al. 1995; Noordermeer et al. 2002). Au cours de nos essais de synthèses, nous avons reproduit les procédés décrits dans la littérature. Les graines de soja broyées sont plongées dans un milieu de réaction à 4°C et à pH 9,2 contenant les AGPIs produits

par hydrolyse enzymatique de l'huile de lin. Le bioréacteur de 20 litres est alimenté par de l'air comprimé (fournissant l'oxygène nécessaire à l'oxydation) et la réaction est poursuivie pendant 20 à 60 minutes selon la teneur initiale en AGPIs (3.4.3.2. *Production des hydroperoxydes*). Dès le démarrage de la réaction, la pO<sub>2</sub> chute rapidement à 0 suite à la consommation de l'oxygène par la LOX. En fin de réaction lorsque la pO<sub>2</sub> remonte au-delà de 95%, l'apport en oxygène et l'agitation sont arrêtés. Le rendement maximal de la réaction enzymatique est situé entre 45,02% et 56,18% (Tableau 13). L'utilisation d'oxygène pur peut permettre d'atteindre un rendement plus élevé (jusqu'à 80% dans la littérature) (Fauconnier 1997), mais entraîne des coûts supplémentaires qui ne semblent pas justifiés à cette étape réactionnelle.

Concentration en acide gras (g/L)	Apport en substrat		Capacité de production		Rendement	
	C18:2 (mM)	C 18:3 (mM)	13-HPOD (mM)	13-HPOT (mM)	Substrat C18:2	Sustrat C18:3
10	5.43	16.76	1.76 ± 0.24	6.9 ± 1.21	32.42% ± 4.42	41.16% ± 7.22
20	10.86	33.53	3.54 ± 0.41	15.84 ± 3.54	32.61% ± 3.78	47.25% ± 10.56
50	27.14	83.81	8.47 ± 2.12	38.2 ± 4.65	31.21% ± 7.81	45.58% ± 5.55
80	43.43	134.10	19.55 ± 4.51	75.34 ± 6.54	45.02% ± 10.38	56.18% ± 4.88
150	81.43	251.44	32.52 ± 6.32	125.24 ± 15.42	39.94% ± 7.76	49.81% ± 6.13

Tableau 13 : Capacités de production et rendements des réactions enzymatiques de transformation d'AGPIs en 13-hydroperoxydes. Les réactions sont réalisées en triplicate.

Au-delà de 150g/L de substrat, le milieu de réaction devient visqueux, la solubilisation de l'oxygène se réduit, la réaction ralentit et le rendement chute de manière importante. Dans certains cas, la mousse très dense produite lors de la synthèse peut inonder le briseur de mousse et s'échapper du bioréacteur entraînant une perte de milieu et a fortiori une baisse de rendement. Les réactions de synthèse réalisées à 80g/l d'acides gras sont les plus rentables en ajustant les conditions expérimentales.

## 6.4. Production de GLVs

### 6.4.1. Synthèse de C<sub>6</sub>-aldéhydes à l'aide de 13-HPL (v.1.0)

À partir des 13-HPOs préalablement produits par la 13-LOX de soja, la production de C<sub>6</sub>-aldéhydes (hexanal, (2E)-hexénal et (3Z)-hexénal) est réalisée dans un bioréacteur agité. Les 13-HPLs nécessaires à cette réaction sont extraites des feuilles de betteraves broyées dans un moulin Stephan (3.4.4.1. *Broyage et préparation des feuilles de betteraves*). Le végétal est ajouté le plus rapidement possible à un milieu tamponné contenant les HPOs. L'agitation est fixée à 250 RPM, la température à 25°C et le pH à 6.5. Les paramètres durée, teneur en substrat et en enzymes sont modifiés en vue de l'optimisation.

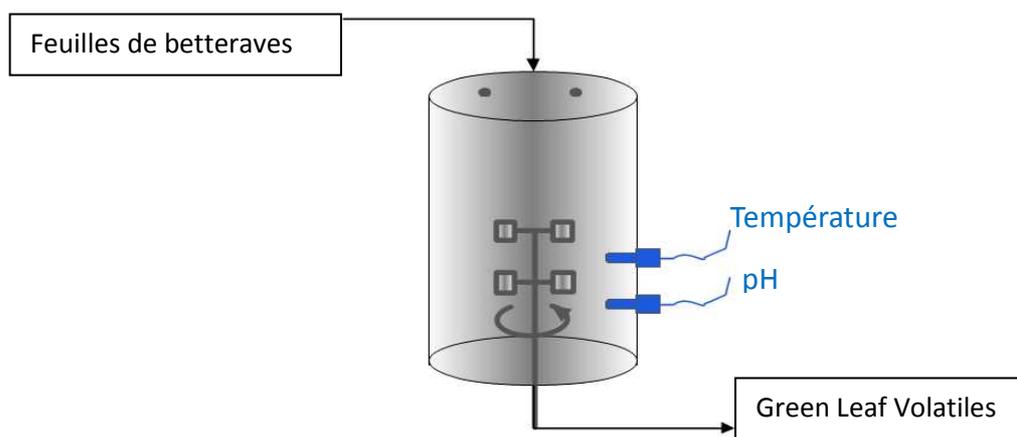


Figure 49: Système de production des GLVs v.1.0

Des productions d'un volume de 2 et 100 litres sont réalisées. Il est également important de signaler qu'afin de respecter les conditions strictes du codex alimentaire, aucun détergent n'est ajouté au cours des étapes de production des GLVs. L'HPL n'est donc pas extraite des membranes et sa disponibilité est réduite.

#### 6.4.1.1. Influence de la durée de la réaction

La réaction enzymatique catalysée par l'HPL, possédant un turn-over très élevé, est rapide. Par contre, l'instabilité enzymatique, ajoutée à l'inhibition par le substrat selon le « phénomène d'enzyme suicide » (1.3.3.3. L'hydroperoxyde lyase) réduit considérablement le temps de travail de l'enzyme.

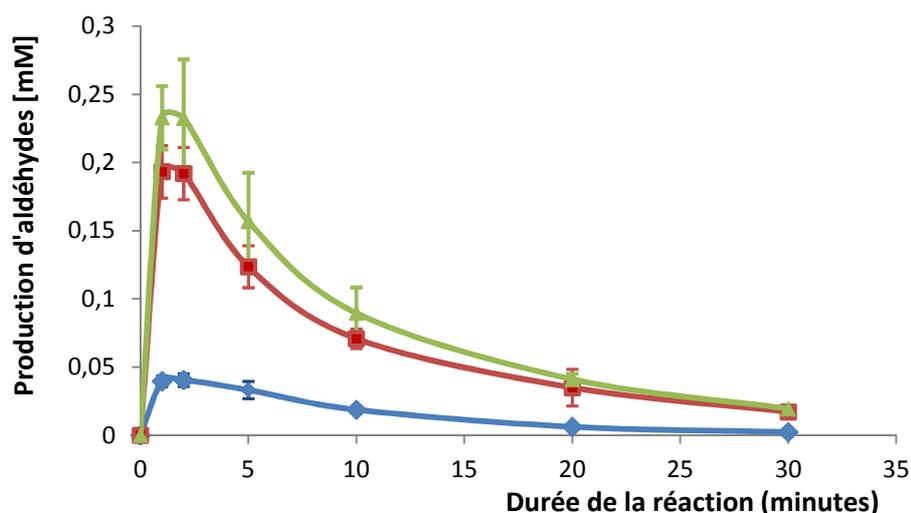


Figure 50 : Production en C<sub>6</sub>-aldéhydes dans le milieu réactionnel d'un volume de 2 litres selon le temps de réaction (la teneur en substrat est de 1mM en 13-HPOT et de 0,26mM de 13-HPOD; SI : Octanal). ■ : (2E)-hexénal + (3Z)-hexénal ; ◆ : hexanal ; ▲ : total C<sub>6</sub>-aldéhydes

La solution de 13-HPOs produite lors des étapes précédentes (1mM de 13-HPOT et 0,26mM de 13-HPOD) est consommée par les HPLs. D'un point de vue industriel, ces résultats suggèrent de travailler dans un laps de temps court (de une à deux minutes) pour la production d'aldéhydes dans un bioréacteur de 2 litres. La prolongation de la réaction au-delà de cette durée réduit la capacité de production. Par déduction au niveau du graphique, on peut conclure que la productivité est positive jusqu'à deux minutes et devient ensuite négative. La capacité de production en C<sub>6</sub>-aldéhydes atteint un maximum équivalent à un rendement de 25% après une à deux minutes de réaction. Ensuite, les concentrations en GLVs baissent. Après 30 minutes de réaction, le niveau de GLVs devient négligeable. Différents auteurs suggèrent que cette disparition est due à la formation de base de Schiff avec des protéines (Noordermeer et al. 2002). Cependant, l'ajout d'hexanal et d'hexénal au départ de la production enzymatique, montre une disparition plus intensive de l'hexénal (données non illustrées). Or, dans le cadre de la production de base de Schiff, la complexation des aldéhydes n'est pas sélective. Cette observation suggère plutôt une consommation spécifique d'hexénal par des enzymes végétales extraites des feuilles de betteraves (Nemeth et al. 2004; Rabetafika et al. 2008). D'ailleurs, ces réactions de consommation d'aldéhydes peuvent être ralenties et arrêtées par modification du pH (réduction du pH à des valeurs de 4 ou moins).

#### 6.4.1.2. Influence de la teneur en substrat et de la teneur en enzyme

L'hexanal a peu d'intérêt d'un point de vue aromatique, l'optimisation des réactions de production concerne donc exclusivement les isomères d'hexénal, réunies sous le terme **C<sub>6</sub>-en-aldéhydes**. Lors

de la synthèse, l'HPL est inhibée par son propre substrat, et par opposition plus la quantité de substrat est importante, plus le nombre de sites actifs d'HPL sollicités est élevé. Ce phénomène antagoniste est également valable pour la quantité d'enzymes ajoutées. L'HPL extraite des feuilles de betteraves est accompagnée d'enzymes dégradant les GLVs produits. L'optimisation de la réaction enzymatique est très complexe suite à l'intervention ces quatre différents phénomènes de stimulation ou d'inhibition. De plus, les feuilles de betteraves contiennent également d'autres enzymes qui vont entrer en compétition vis-à-vis du substrat avec l'HPL, telles que les AOS. Le facteur  $K_f$  mesuré à l'aide des dosages spectrométriques d'activité HPL à 234 et à 340nm sur la matière première illustre cette activité secondaire présente dans les feuilles de betteraves, il représente le rapport entre l'activité HPL et l'activité des autres enzymes dégradant les 13-HPOT. Les résultats obtenus lors d'une synthèse longue de deux minutes avec diverses teneurs en substrats et en enzymes sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Activité HPL (UE/ml)	13-HPOT Concentration (mM)	Capacité de production de C <sub>6</sub> -en-Aldéhydes (mM)	Rendement	Productivité moyenne (mM/min)
0,2 ( $K_f=1,36$ )	1	0.33±0.08	33.1%±8.3	0,17±0.04
0,4 ( $K_f=1,61$ )		0.48±0.11	48.4%±11.2	0,24±0.06
0,6 ( $K_f=1,38$ )		0.46±0.04	46.1%±4.1	0,23±0.02
0,8 ( $K_f=1,23$ )		0.40±0.07	39.6%±7.0	0,20±0.04
0,2 ( $K_f=1,36$ )	3	0.53±0.03	17.5%±1.2	0,27±0.03
0,4 ( $K_f=1,61$ )		0.75±0.01	24.9%±0.3	0,38±0.01
0,6 ( $K_f=1,38$ )		1.24±0.12	41.4%±4.0	0,62±0.06
0,8 ( $K_f=1,23$ )		1.16±0.25	38.7%±8.3	0,58±0.13
0,2 ( $K_f=1,36$ )	5	0.54±0.1	10.8%±2.0	0,27±0.05
0,4 ( $K_f=1,61$ )		0.85±0.07	16.9%±1.4	0,43±0.04
0,6 ( $K_f=1,38$ )		1.40±0.03	28.1%±0.6	0,70±0.02
0,8 ( $K_f=1,23$ )		1.38±0.12	27.7%±2.4	0,69±0.05
0,2 ( $K_f=1,36$ )	10	0.86±0.07	8.6%±0.7	0,43±0.04
0,4 ( $K_f=1,61$ )		1.45±0.24	14.5%±2.4	0,73±0.12
0,6 ( $K_f=1,38$ )		2.89±0.45	28.9%±4.5	1,45±0.23
0,8 ( $K_f=1,23$ )		3.02±0.78	30.2%±7.8	1,51±0.39
0,2 ( $K_f=1,36$ )	15	0.45±0.12	3.0%±0.8	0,23±0.06
0,4 ( $K_f=1,61$ )		0.95±0.09	6.3%±0.6	0,48±0.05
0,6 ( $K_f=1,38$ )		1.33±0.18	8.9%±1.2	0,67±0.09
0,8 ( $K_f=1,23$ )		1.65±0.19	11.0%±1.3	0,83±0.10

Tableau 14 : Capacités de production, rendements, et productivité de la synthèse de C<sub>6</sub>-en-aldéhydes ((2E)-hexénal/(3Z)-hexénal) pour une durée de 2 minutes à température et pH optimaux dans un réacteur de 2L et évolution selon la teneur en enzymes et en substrats (Standard Interne : Octanal).

Les sources de substrats et d'enzymes sont peu coûteuses, le rendement de la réaction importe donc considérablement moins que la capacité de production d'aldéhydes. Lors des expériences, la capacité de production la plus élevée est obtenue avec des concentrations en 13-HPOT de 10mM. Au-delà de cette teneur, les rendements diminuent fortement tandis que l'inhibition par le substrat devient intense. D'un autre côté, l'augmentation de la teneur en enzyme entre 0.2 et 0.8UE/ml entraîne une augmentation de la capacité de production, même si les différences sont

faibles entre 0.6 et 0.8 UE/ml (Figure 51). Des teneurs en HPL supérieures à 0,8UE/ml n'ont pas été envisagées, ces niveaux d'activité auraient entraîné l'introduction massive de feuilles broyées provoquant des contraintes hydrodynamiques importantes, et le gain en capacité de production pour ces teneurs supérieures aurait été très faible (Nemeth et al. 2004). Le facteur  $K_f$  influence peu la capacité de production, cependant lorsque la concentration en substrat est faible, la compétition pour le substrat entre AOS et HPL est plus intense et la capacité de production est modifiée. Ce phénomène est plus visible pour les essais entre de 1 et 5mM avec des taux d'enzymes de 0,4 à 0,8UE/ml.

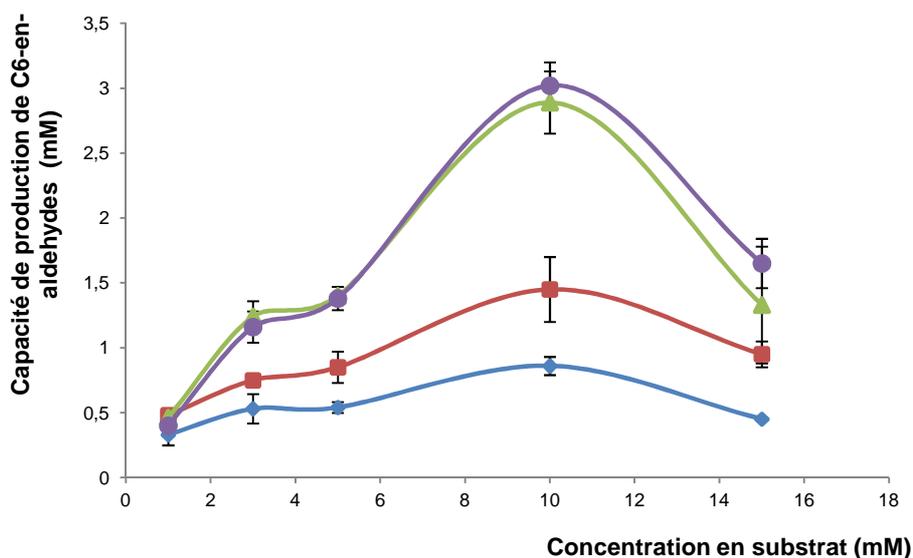


Figure 51: Courbe de synthèse de (2E)-hexénal combiné au (3Z)-hexénal selon la teneur en substrat utilisée. Les courbes représentent des activités en HPL différentes : ◆ = 0,2UE/ml, ■ = 0,4UE/ml, ▲ = 0,6UE/ml, ● = 0,8UE/ml.

### 6.4.1.3. Ajouts dosés

La caractérisation de l'activité HPL a montré que l'inhibition de la production des C<sub>6</sub>-aldéhydes apparaissait au-delà de 0,15mM (4.3.3.7. Vitesse de réaction selon la teneur en substrat). Également, nous avons pu observer que la capacité de production du procédé industriel chute avec la teneur en substrat à partir de 15mM (Tableau 14). Afin de réduire ces phénomènes d'inhibition, l'ajout de substrat en mode fed-batch a été envisagé. Les HPOs sont ajoutés au fur et à mesure de l'avancement de la réaction (Figure 52). Dans un premier temps, des essais sont réalisés en ajoutant 1mM de substrat après une minute d'intervalle.

Cette expérience montre l'intérêt de la modulation de l'ajout de substrat lors de la synthèse d'aldéhydes. La capacité de production, malgré la chute de rendement, augmente au fur et à mesure des ajouts (Figure 52). Si l'on compare ces résultats avec la production classique en batch cette capacité de production augmente de 0.75mM à 0.81mM, tout en pouvant prolonger la synthèse de deux à trois minutes. Cependant, la consommation d'aldéhydes par des enzymes parasites devient supérieure à la synthèse au-delà de 3 minutes. Une réduction de la période entre les ajouts a été adaptée, et afin de ne pas submerger l'activité enzymatique la quantité d'HPOs ajoutée a été diminuée pour réduire le phénomène d'inhibition dû à l'apparition de gradients de concentration.

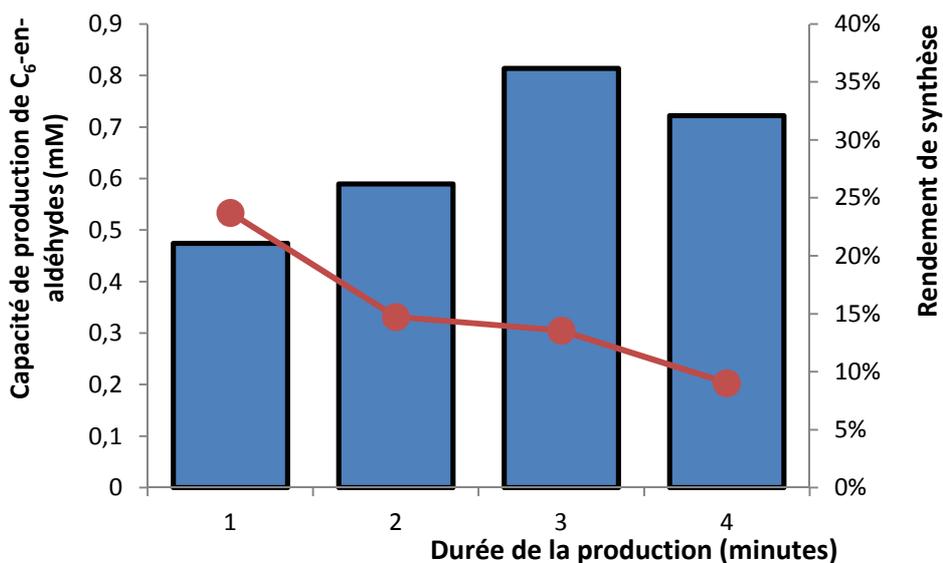


Figure 52 : Capacité de production ■ et rendement ● de la production de C<sub>6</sub>-en-aldéhydes avec ajouts fed-batch d'1mM par minute de HPOs (13-HPOT) au cours de la synthèse, l'activité HPL initiale du milieu est de 0.42 UE/ml

La réduction de la période d'attente entre chaque ajout de substrat a un impact positif sur la synthèse de GLVs en réduisant la métabolisation des aldéhydes produits. La capacité de production en aldéhyde dépasse les 1.3mM en 1m30 (Figure 53). Par contre, la diminution de la teneur de l'ajout de 1mM à 0,75mM réduit la productivité malgré une légère hausse de rendement. À titre de comparaison, l'utilisation d'ajouts dosés de 1mM toutes les 30 secondes a permis d'augmenter la capacité de production à 1.36mM soit 80% de plus que le système classique et 60% de plus que l'ajout à période de 60 secondes. Dans l'hypothèse, d'un mélange parfaitement homogène, l'ajout continu de substrat à un débit optimal permettra d'augmenter considérablement le rendement de la réaction et doit être envisagé lors du scale-up de la production.

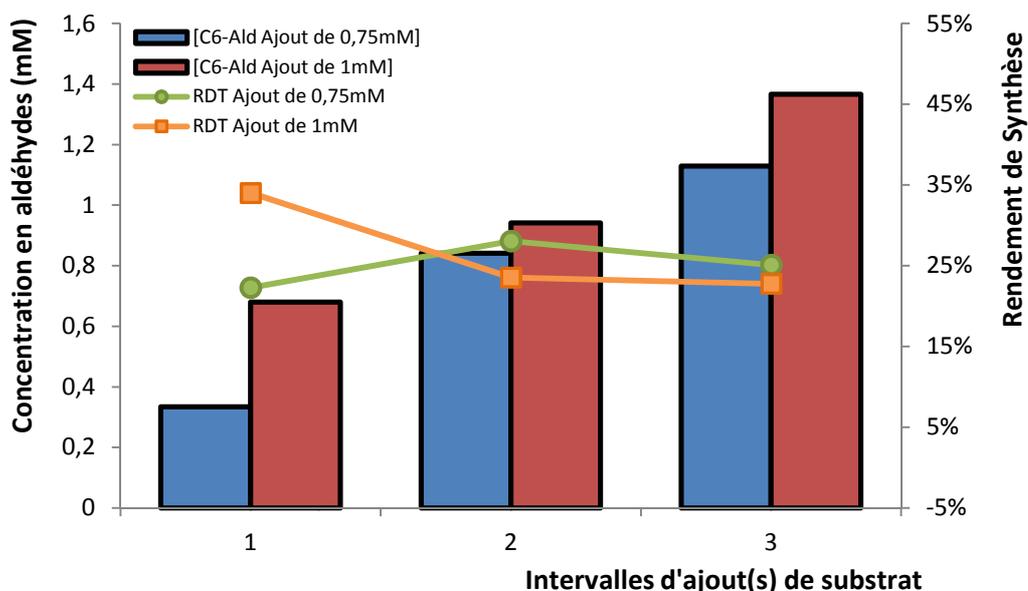


Figure 53 : Capacité de production ■ et rendement ● de la production de C<sub>6</sub>-en-aldéhydes avec ajouts fed-batch de 0.75mM par 30 secondes de HPOs (13-HPOT) comparés à la capacité de production ■ et au rendement ■ de la production de C<sub>6</sub>-en-aldéhydes avec ajouts fed-batch de 1mM par 30 secondes de HPOs (13-HPOT), l'activité HPL initiale du milieu est de 0,61 UE/ml

#### 6.4.1.4. Scale-up de la production

L'accroissement de volume d'un processus industriel implique l'apparition de phénomènes d'inhomogénéité de mélange. Dans notre contexte particulier, la distribution imparfaite du substrat va entraîner l'apparition de zone où des concentrations inhibitrices sont atteintes dans la cuve tandis que d'autres zones n'atteignent le seuil d'inhibition. Le mélange a également un impact sur la dispersion des feuilles de betteraves au sein du bio-réacteur. Celles-ci, ajoutées au départ de la réaction enzymatique, sont également assujetties aux gradients de concentration. Au cours du scale-up de notre procédé, le volume de travail a été porté à 100L (75L de milieu), dans ce bioréacteur la quantité de feuilles ajoutée ne peut dépasser les 15kgs sous peine d'entraîner des problèmes importants de mélange suite à une augmentation de la viscosité et de l'encombrement de la solution.

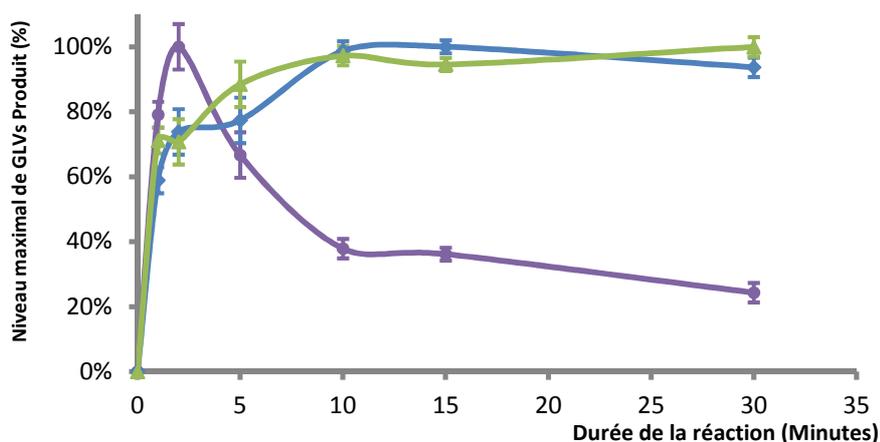


Figure 54: Évolution de la capacité de production d'essai de synthèse de GLVs en bioréacteur de 100L (substrat 13-HPOT). ▲ = 15mM en HPOs ; ◆ = 1mM en HPOs ; ● = 0,15mM en HPOs

Pour une même concentration en substrat, l'augmentation de volume entraîne un allongement de la durée optimale de réaction. Cette nouvelle durée de production est fixée selon la concentration en substrat. À 1mM, la capacité de production maximale est atteinte après 10 minutes de réaction et non plus après 1 minute (Figure 54). L'augmentation du temps de réaction s'accroît avec la teneur en substrat, et la durée optimale de réaction pour un substrat de 15mM équivaut à 30 minutes. Par ailleurs, l'ensemble des paramètres doit être adapté à des productions à grande échelle. Au terme des premiers essais, la durée de la réaction enzymatique a été allongée de 2' à 30', de manière à obtenir la capacité de production la plus haute possible pour des concentrations en substrat entre 1mM et 15mM en 13-HPOs (Tableau 15).

Activité HPL (UE/ml)	Temps (Min)	HPOT Concentration (mM)	Capacité de production des C <sub>6</sub> -Aldéhydes (mM)	Rendement	Productivité moyenne (10E-2 mM/min)
0.5 (K <sub>f</sub> =1.05)	5	0.15	0.072 ± 0.012	48.00% ± 8.00	1,44 ± 0,24
		1	0.134 ± 0.032	13.40% ± 3.20	2,68 ± 0,64
		1.5	0.163 ± 0.018	10.87% ± 1.20	3,26 ± 0,36
		5	<b>0.321 ± 0.054</b>	6.42% ± 1.08	6,42 ± 1,08
		10	0.299 ± 0.101	2.99% ± 1.01	5,98 ± 2,02
		15	0.211 ± 0.054	1.41% ± 0.36	4,22 ± 1,08
	15	15	0.15	0.028 ± 0.04	18.67% ± 2.67

30	1	0.151 ± 0.045	15.10% ± 4.50	1,01 ± 0,30
	1.5	0.175 ± 0.035	11.67% ± 2.60	1,17 ± 0,26
	5	<b>0.502</b> ± 0.102	10.04% ± 2.04	3,35 ± 0,68
	10	0.377 ± 0.020	3.77% ± 0.20	2,51 ± 0,13
	15	0.398 ± 0.045	2.65% ± 0.30	2,65 ± 0,30
	0.15	0.031 ± 0.004	20.67% ± 2.67	0,10 ± 0,00
	1	0.148 ± 0.012	14.80% ± 1.22	0,49 ± 0,02
	1.5	0.254 ± 0.013	16.93% ± 0.87	0,85 ± 0,03
	5	<b>0.541</b> ± 0.061	10.82% ± 1.22	1,80 ± 0,06
	10	0.484 ± 0.077	4.84% ± 0.77	1,61 ± 0,05
	15	0.374 ± 0.070	2.49% ± 0.47	1,25 ± 0,04

Tableau 15 : Essais de production de GLVs ((2E)-hexénal/(3Z)-hexénal) dans un bio-réacteur de 100L ; étude de l'influence de la teneur en substrat (13-HPOT)

La capacité de production la plus élevée est obtenue avec une teneur de 5mM de 13-HPOs transformés en 0.541mM de C<sub>6</sub>-en-aldéhydes après 30 minutes de réaction. Cette valeur est 3 fois inférieure aux résultats obtenus dans les mêmes conditions à l'échelle de 2L. La productivité moyenne chute également de manière spectaculaire de 1,51 mM/min à 0,018 mM/min). Ce phénomène est explicable par l'augmentation de la durée de réaction liée à l'augmentation du temps de mélange. L'augmentation du temps de mélange étant elle-même influencée par l'augmentation de volume et par la viscosité du milieu de production, plus importante à grande échelle des suites d'un broyage moins efficace. Ensuite, par transposition des problèmes détectés à faible échelle, la mise en place d'alimentation fed-batch est également envisageable à grande échelle. 0.167mM de 13-HPOs sont ajoutés toutes les 30 secondes, pour atteindre 10mM au terme des 30 minutes de synthèse (Tableau 16).

Activité HL (UE/ml)	Temps (Min)	HPOT Concentration (mM)	Capacité de production des C <sub>6</sub> -Aldéhydes (mM)	Rendement	Productivité moyenne (mM/min)
0.5	0,5	0.167	0.263 ± 0.175	157.54% ± 104.49	0,526 ± 0,349
	1	0.333	0.101 ± 0.015	30.36% ± 4.36	0,101 ± 0,015
	2	0.667	0.153 ± 0.021	23.00% ± 3.19	0,077 ± 0,011
	3,5	1.167	0.294 ± 0.041	25.22% ± 3.53	0,084 ± 0,012
	6	2	0.399 ± 0.035	19.95% ± 1.77	0,067 ± 0,006
	11	3.667	0.596 ± 0.121	16.25% ± 3.31	0,054 ± 0,011
	15	5	0.690 ± 0.087	13.81% ± 1.74	0,046 ± 0,006
	30	10	0.843 ± 0.099	8.43% ± 0.99	0,028 ± 0,003

Tableau 16 : Ajouts dosés de 0.1667mM toutes les 30 secondes lors d'une production de (2E)-hexénal/(3Z)-hexénal en bioréacteur de 100L.

L'application des ajouts dosés à des bioréacteurs de grand volume permet d'augmenter la capacité de production de 0.48mM à 0.84mM. Cette augmentation est considérable, mais les concentrations obtenues sont toujours nettement inférieures à celles obtenues en cuves de 2L. Logiquement, la productivité moyenne baisse au fur et à mesure du temps, illustrant le fait que la production d'aldéhydes ralentit au cours de la synthèse.

## 6.4.2. Mise au point de la méthode de récupération des produits

### 6.4.2.1. Adsorption sur résine apolaire à faible échelle (v.1.1)

Au terme de la réaction de production, les aldéhydes doivent être extraits du milieu en vue de leur distillation. Le jus brut de production est filtré au travers d'un tamis métallique afin d'être débarrassé des débris végétaux et de constituer le jus clair. Ce jus contient des molécules solubles et faiblement solubles dans l'eau, et l'apparition d'une phase organique n'est pas à exclure. Afin d'extraire les aldéhydes, le jus clair est dirigé vers une colonne d'extraction contenant de la résine apolaire, cette résine est spécifique à l'absorption des molécules hydrophobes peu concentrées présentes dans un milieu aqueux. Les résines MN-100, MN-102 et MN-202 (Purolite, Llantrisant, Wales, UK) ont été testées en vue de l'extraction des GLVs produits (Tableau 17). Développées pour l'épuration des eaux, les résines sont peu coûteuses et disponibles en grandes quantités. Leurs propriétés absorbantes sont élevées, mais la sélectivité est faible.

		Pourcentage de récupération (%)				
		Élution 1	Élution 2	Élution 3	Élution 4	Élution 5
<b>MN-100</b>	Z-(3)- et E-(2)-Hexenal	54.43±4.51	82.56±3.54	89.73±2.15	92.43±1.51	94.16±2.60
	Hexanal	40.97±2.78	67.45±2.78	70.23±1.89	73.28±2.54	73.28±1.99
<b>MN-102</b>	Z-(3)- et E-(2)-Hexenal	56.42±4.91	79.88±4.45	88.65±4.51	93.45±3.54	95.66±4.35
	Hexanal	41.21±4.31	67.45±3.78	71.21±2.77	74.77±1.45	76.24±1.15
<b>MN-202</b>	Z-(3)- et E-(2)-Hexenal	61.54±8.11	82.65±6.54	91.82±5.61	96.74±3.54	97.54±2.54
	Hexanal	43.87±4.54	66.24±3.99	70.11±3.66	74.56±1.21	76.04±0.94

Tableau 17 : Essai d'extraction de solutions de C<sub>6</sub>-aldéhydes. Extraction de 2L solution concentrée à 10mM dans une colonne d'extraction contenant 250g en résine Purolite. L'élution est réalisée à l'éthanol.

La résine MN-202 présente les meilleurs taux d'extraction des trois résines testées. Aux termes de 4 éluions à l'aide de 100ml d'éthanol plus de 95% des C<sub>6</sub>-aldéhydes sont récupérés. Ce mécanisme d'extraction est plus efficace pour les aldéhydes dérivant du 13-HPOT, l'hexanal restant plus en solution. Le système de production présenté à la figure 55 est adapté pour l'ajout concerté de substrats et l'extraction sur colonne de résine. Le solvant utilisé pour l'élution est l'éthanol ou l'isopropanol, il est réutilisé à plusieurs reprises jusqu'à saturation.

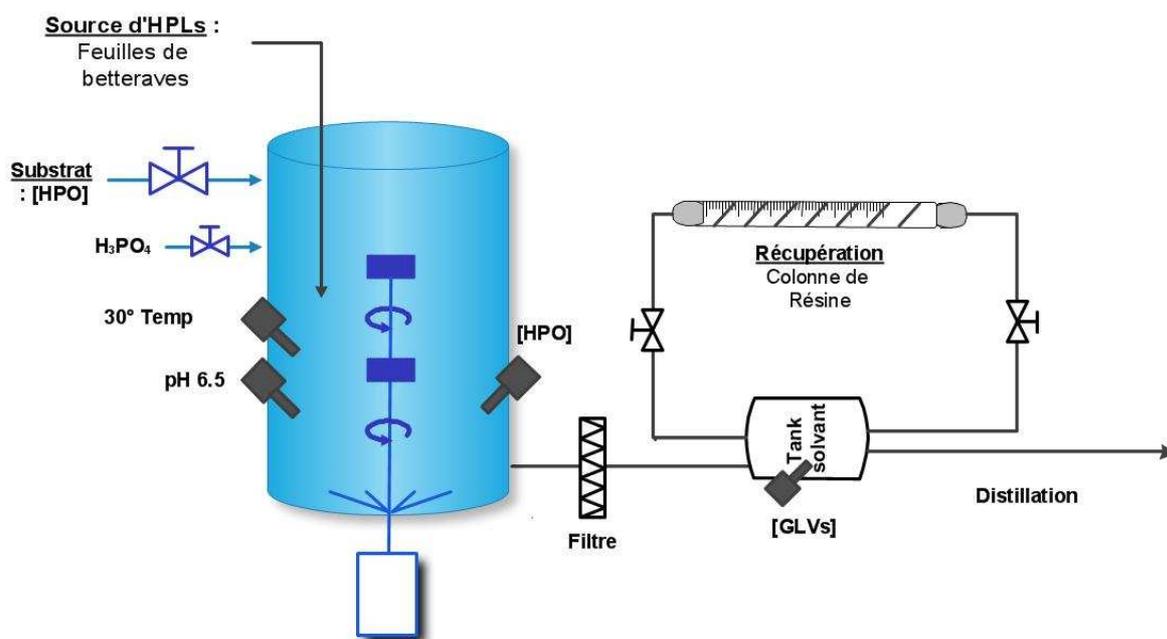


Figure 55 : Système de production de GLVs v.1.1

### 6.4.2.2. Extraction par flux d'air à faible échelle

Cette technique, compatible avec la précédente, consiste à injecter dans le bas du bio-réacteur un débit de gaz défini pour que celui-ci, lors de son passage dans la solution, entraîne les molécules à faible tension de vapeur telles que les C<sub>6</sub>-aldéhydes. L'air est ensuite acheminé vers un piège à froid à -70°C afin de condenser les molécules entraînées. Ce piège à froid est constitué d'un fin tuyau plongé dans l'acétone refroidie à -70°C, la longueur de ce tuyau est adaptée pour une condensation optimale des C<sub>6</sub>-aldéhydes selon le débit d'air injecté dans le bioréacteur. La température du milieu de production ainsi que le débit d'air injecté peuvent influencer considérablement l'extraction des GLVs du milieu de production.

Les premières expériences ont été réalisées pour tester des débits d'extraction variant entre 1 et 10 vvm (Figure 56). Les résultats présentés dans la figure ci-dessus illustrent clairement la diminution du pourcentage de molécules extraites lorsque le débit d'air diminue et souligne donc l'importance de disposer d'un système adaptable à des débits en air élevés (Figure 56). L'utilisation de débit faible ralentit l'extraction des molécules. Cependant, l'utilisation de haut débit en gaz entraîne des contraintes mécaniques, notamment des zones de hautes pressions ou des difficultés de dispersions des bulles gazeuses. Les tests d'extraction ont été comparés avec l'extraction sur colonne MN-202. Les températures du milieu de réaction sont comprises entre 20°C et 40°C, fourchette entre laquelle l'HPL garde une activité importante.

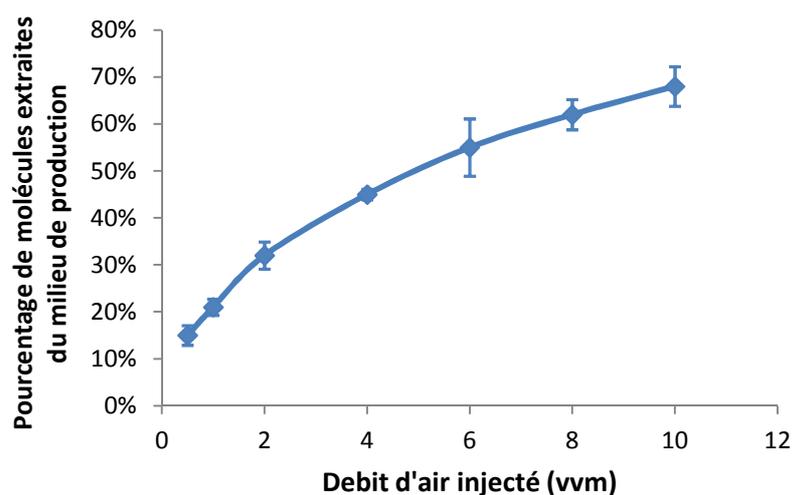


Figure 56 : Pourcentage d'extraction des aldéhydes du milieu de production en trente minutes selon le débit d'air injecté

L'entraînement gazeux est moins efficace que l'adsorption sur colonne (Tableau 18). Après 25 minutes d'extraction à 30°C, 75% des C<sub>6</sub>-aldéhydes sont récupérés. La différence de rendement par rapport à l'adsorption n'est que de 13.4%. Lors de l'extraction par flux d'air, les manipulations sont réduites à leur strict minimum. Le jus brut de production ne doit pas être filtré ou centrifugé avant son extraction, et l'utilisation de solvant ou d'alcool pour l'élution est supprimée. Ce système peut être adapté dans le cadre d'une extraction continue concomitante de la réaction enzymatique. La remétabolisation des GLVs est ainsi fortement réduite.

Temps en min (Élution)	Entraînement gazeux			Adsorption sur colonne
	20°C	30°C	40°C	MN-202
5 (1)	18.92%±0.94	35.50%±1.66	28.81%±0.21	52.71%±2.36
10 (2)	37.75%±3.21	66.19%±1.47	58.83%±3.54	74.44%±2.12

<b>15 (3)</b>	43.08%±4.11	71.84%±2.54	62.99%±4.51	80.96%±4.51
<b>20 (4)</b>	43.65%±3.77	73.02%±3.01	63.58%±4.21	85.65%±5.64
<b>25 (5)</b>	43.77%±0.98	73.39%±2.99	64.02%±5.09	86.79%±5.55

Tableau 18 : Comparaison de rendements des méthodes d'extraction par flux d'air à 10vvm pendant 25 minutes sur des solutions d'Hexanal (5mM) et de Z-(3)-Hexenal (20mM) face à une extraction sur colonne de résine

### 6.4.2.3. Adaptation de l'extraction en continu lors de la synthèse à faible et grande échelles

L'extraction gazeuse par flux d'air a été adaptée aux deux échelles de bio-réacteurs 2L et 100L. Afin de maximiser la récupération des aldéhydes produits, l'extraction sur colonne de résine est également effectuée sur la solution contenue dans le bio-réacteur. Lors des essais, le débit de gaz a été maximisé selon les contraintes mécaniques : dans le fermenteur de 2L, 4vvm ont pu être maintenus tandis qu'à grande échelle seul 1,3 vvm a pu être adapté.

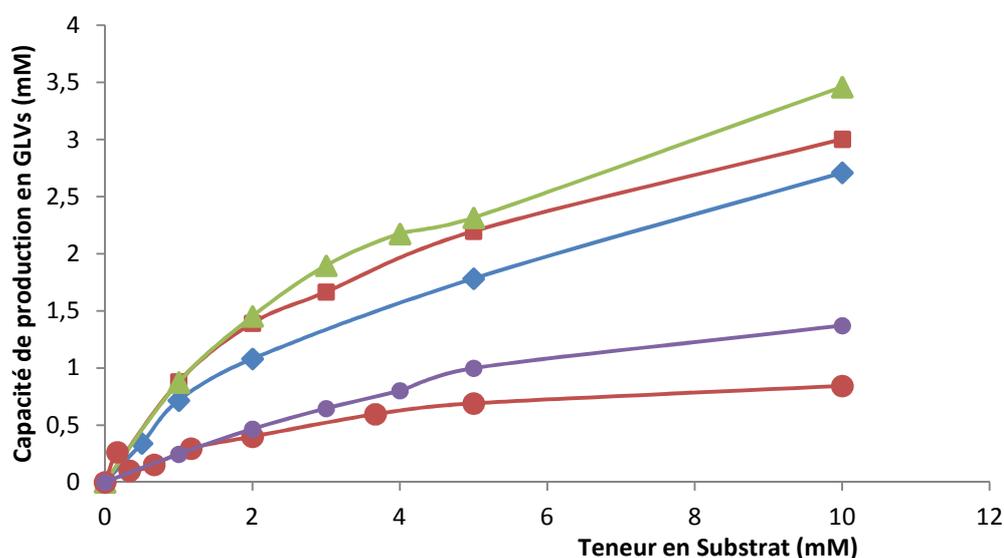


Figure 57 : Adaptation de l'extraction par flux d'air à la production de GLVs ((2E)-hexénal/(3Z)-hexénal). Les lignes suivantes décrivent les productions à grande échelle (● : flux d'air OFF, ● : flux d'air 1,3vvm ON), les lignes suivantes représentent les essais en 2L (◆ : Flux d'air OFF ; ■ Flux d'air ON :2vvm ; ▲ flux d'air ON 4vvm)

L'augmentation de la capacité de production est nette en tous points. Dans un volume de 2L la capacité maximale passe de 2.71 mM à 3.46 mM (en 2 minutes de réaction) et en 100L de 0.84 à 1.37mM (en 30 minutes de réaction) et ce malgré le faible débit d'air utilisé (Figure 57). Lors des différentes productions, la proportion moyenne d'aldéhydes récupérés par entraînement gazeux est de 47%, la petite majorité des composés restant dans le réacteur. En fin de réaction après diminution du pH à 3, les GLVs restants sont récupérés par filtration et adsorption sur résines de type MN-202. Ces molécules sont extraites par filtration et passage sur la résine d'adsorption. L'extraction par flux d'air permet de récupérer une fraction des GLVs métabolisés durant la synthèse.

### 6.4.3. Purification des C<sub>6</sub>-aldéhydes par distillation

Au terme des étapes de production et d'extraction, les extraits du piège à froid et de l'élution de la résine sont regroupés afin d'être distillés. Ce jus d'extraction est composé d'éthanol, de GLVs et d'intermédiaires réactionnels, tels que les HPOs, les AGPIs, d'autres molécules volatiles ou de l'eau. Un essai a été mené sur un mélange test de composition suivante (Tableau 19). Cet essai est effectué sur le distillateur semi-pilote NGW (3.4.5.2. Distillation).

Composé	Volume
Éthanol	2920
GLVs	60
<i>Hexanal</i>	20
<i>(2E)-Hexenal</i>	20
<i>(2E)-Nonenal</i>	20
HPOs (13-HPOD et 13-HPOT)	10
AGPIs (C18 :2 et C18 :3)	10

Tableau 19: Composition du mélange test de distillation

La distillation a été menée par fraction de 500ml, selon le volume maximal du collecteur. La pression régnant dans le distillateur est réduite et stabilisée à 50 mbars. Les 6 premières fractions sont récoltées à une température de 15°C en tête de colonne. Par la suite la température est augmentée par paliers afin de récolter les différents produits présents dans la solution à purifier. Les six premières fractions récoltées à 15°C peuvent être regroupées dans un échantillon de 2915 ml (Tableau 20). Elles contiennent exclusivement de l'éthanol sans mélange azéotropique. La fraction 7 contient quant à elle la majorité des C<sub>6</sub>-aldéhydes (pureté 95%), ainsi que des traces de C<sub>9</sub>-aldéhydes et d'éthanol. La fraction 8 est constituée des C<sub>9</sub>-aldéhydes (pureté 95%) tandis que la fraction R non distillée va contenir les HPOs et AGPIs non évaporés. La distillation permet donc de récupérer un mélange pur en GLVs. Les composés à températures d'ébullition proches tels que l'Hexanal et l'(2E)-hexenal ne peuvent pas être séparés avec ce type de matériel.

Fraction	Température (°C)	Pression (mbars)	Vol. Collecteur (ml)	Vol. Piège à Froid (ml)	Teneur en GLVs (%)
1	15	50	472	12	0,0%
2	15	50	481	15	0,0%
3	15	50	475	10	0,0%
4	15	50	489	7	0,0%
5	15	50	461	12	0,0%
6	15	50	451	20	0,0%
7	25	50	38	2	94,8%
8	35	50	15	0	95,2%
R	N/A	N/A	27	0	N/A

Tableau 20 : Fractions récoltées lors de la distillation du mélange test

#### 6.4.4. Description du système de production

La synthèse de GLVs naturels à l'aide de feuilles de betteraves est un challenge innovant et relativement complexe dû aux nombreux paramètres influençant l'activité HPL et la synthèse des GLVs. Les expériences réalisées ont permis d'établir un système de production à l'échelle laboratoire et pilote. Ce procédé reprend l'une après l'autre les réactions enzymatiques dans l'ordre physiologique correspondant au modèle in vivo. Ces réactions successives réalisées dans des conditions douces de pH et de température peuvent être intégrées au sein d'un procédé continu de transformation. Le lien entre les différents compartiments de réaction est réalisé à l'aide de vannes régulant l'échange de réactifs et de produits entre les bioréacteurs. Le schéma du procédé proposé est illustré ci-dessous (Figure 58).

La production débute par l'hydrolyse de l'huile de lin raffinée au sein d'un **bioréacteur A** agité à pH 7 et à 37°C. Cette réaction est réalisée à l'aide de lipase commerciale produite par *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes, Bagsværd, Denmark). Les AGPIs libres produits au cours de la réaction sont isolés du milieu par centrifugation, tandis que la lipase immobilisée est récupérée et recyclée.

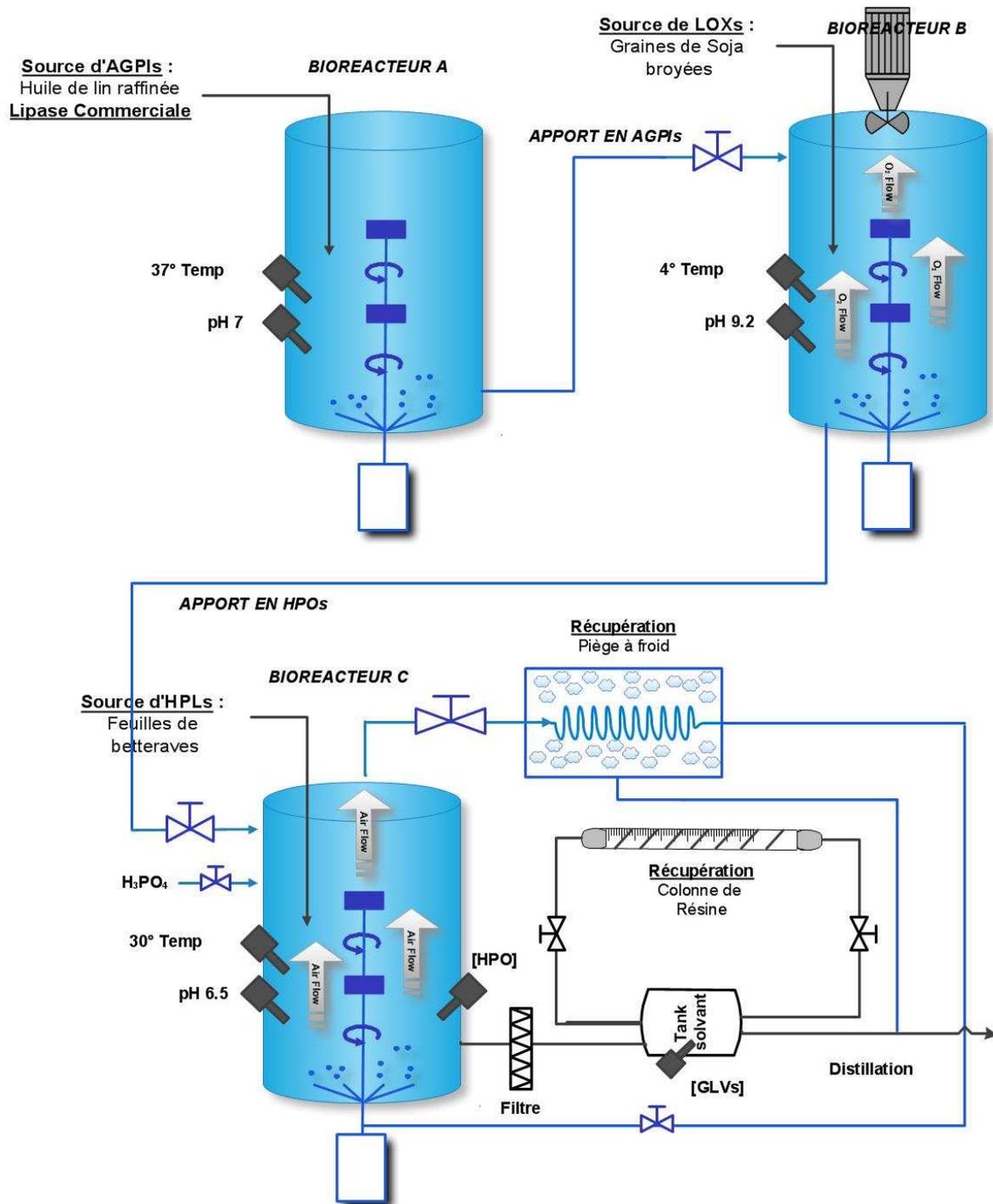


Figure 58 : Système de production de GLVs v.1.2

Ensuite, au sein du **bioréacteur B**, les acides gras libres sont transformés au cours d'une oxydation à l'aide d'oxygène et de la LOX extraite de graines de soja non torréfiées. Cette seconde réaction est menée à 4°C et à pH 9,2 afin de favoriser l'oxydation spécifique au niveau du carbone 13 de la chaîne aliphatique de l'AGPI. Le milieu de production ne subit aucun traitement particulier et est utilisé en l'état en tant que source d'HPOs. Cette solution est injectée au sein d'un **bioréacteur C** contenant des feuilles de betteraves broyées et un mélange tampon (pH=6.5), le débit utilisé est adapté à la consommation des HPOs par l'HPL végétale, afin de ne pas atteindre des teneurs inhibitrices en HPOs. Dans le même temps, un flux d'air est introduit à la base du **bioréacteur C**, ce flux extrait les molécules volatiles par entraînement. Ces composés sont condensés au niveau d'un

piège à froid. L'air débarrassé de ces molécules est ensuite réinjecté au sein du bio-réacteur. Au fur et à mesure de la réaction, l'apport en HPOs est réduit suite à la déstabilisation progressive des HPLs de feuilles de betteraves. La réaction est arrêtée à partir du moment où la vitesse de production des aldéhydes devient inférieure à la vitesse de leur consommation. À cet instant, l'injection d'air est également interrompue et le milieu contenu dans le **bioréacteur C** est acidifié à pH 3 à l'aide d'acide phosphorique. Le milieu de réaction est successivement filtré et purifié sur une colonne de résine MN-202 de manière à extraire les GLVs restés en solution. Après l'élution à l'éthanol, les égouts des colonnes de résines et du piège à froid sont combinés pour former le jus de production qui sera distillé.

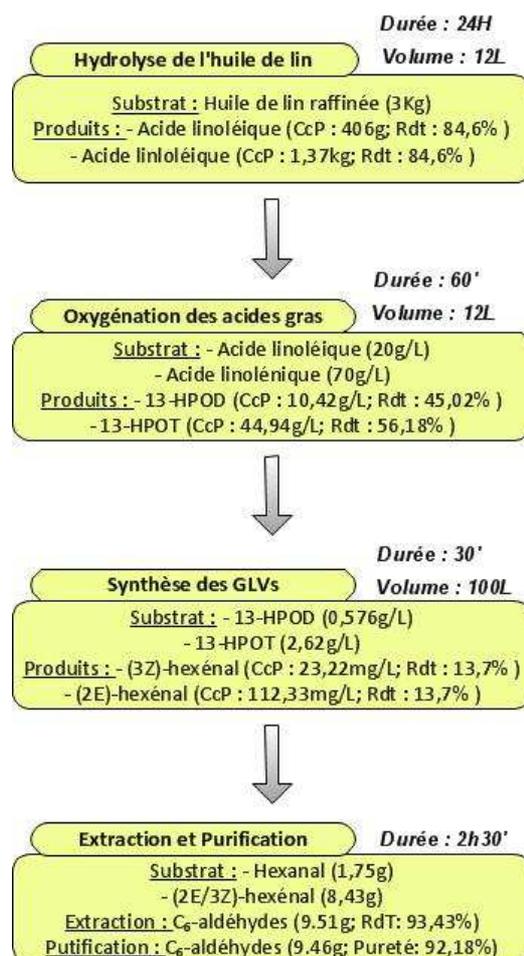


Figure 59 : Description quantitative de la production des GLVs.  
Abréviation : CcP = capacité de production ; RdT = Rendement

D'un point quantitatif (Figure 59), l'hydrolyse enzymatique de l'huile de lin raffinée présente un rendement final de 85% à l'échelle de 20 litres pour la production d'acides linoléiques ou linoléiques. Ces AGPIs sont directement utilisés afin de produire les HPOs par l'intermédiaire de la LOX de soja disponible auprès de l'entreprise Alpro. Le rendement d'oxydation via l'air comprimé est respectivement de 45% et de 56% pour la synthèse du 13-HPOD et du 13-HPOT en bioréacteurs de 20 litres équipés de briseurs de mousse. La concentration maximale de ces HPOs est de 150mM, elle constitue la solution de substrat utilisable, après dilution à 10mM dans le tampon pH6.5, pour la synthèse de C<sub>6</sub>-aldéhydes réalisée à la suite. Au sein des bioréacteurs de 2 litres, la capacité de production de cette nouvelle synthèse équivaut en moyenne à 3,46mM pour un rendement de 34,6%, tandis que pour les bioréacteurs de 100 litres le rendement est de 13,7% et la capacité de production de 1,37mM. Au total, à grande échelle, 102,75mM de C<sub>6</sub>-aldéhydes sont produits (17% de (3Z)-hexéanal et 83% de (2E)-hexéanal, ce qui équivaut à 10,18g de C<sub>6</sub>-

aldéhydes. Après purification, 9,46g de molécules aromatiques à un degré de pureté de 95% sont récupérés par réaction dans un fermenteur de 100L. Les réactions ont une durée courte excepté l'hydrolyse enzymatique de l'huile de lin, celles-ci peuvent donc être combinées afin de réduire les coûts de production. Les AGPIs et les HPOs sont produits ponctuellement et conservés au sein de solution stock (avant ou après purification). Par contre, la synthèse de GLV est menée en boucle, en conservant le solvant d'élution jusqu'à sa saturation et en purgeant régulièrement le piège à froid. De cette manière, les concentrations finales en GLVs sont plus importantes et l'étape de purification est combinée à plusieurs réactions de synthèse.

---

## 7 : Production de GLVs : Utilisation d'HPL recombinante

---

### 7.1. Identification de la 13-HPL de la feuille de betterave

L'enzyme 13-HPL de la feuille de betterave est une protéine difficilement extractible et très instable, une nouvelle approche pour pallier à ces problèmes est la synthèse de 13-HPLs recombinantes à partir de la séquence de la betterave (BvHPL). La betterave sucrière n'a jamais fait l'objet de campagne de séquençage et peu d'informations sont disponibles sur son code génétique. Jusqu'à présent aucun gène de la voie de synthèse des GLVs n'a été détecté ou séquencé dans son génome. Dans le cadre de nos recherches, le séquençage du gène HPL va faciliter la compréhension des phénomènes d'instabilité et d'inhibition. En outre, l'extraction du gène *BvHPL* et son clonage dans une bactérie recombinante peuvent permettre de bénéficier d'une source d'HPL exempte d'activité CYP74 parasite ou d'activités enzymatiques dégradant des GLVs (1.5.3.5. L'utilisation de protéines recombinante).

#### 7.1.1. Screening des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des GLVs

Les gènes de la phospholipase B (PLB), la phospholipase D (PLD), la LOX et l'ADH sont successivement impliqués dans la synthèse de GLVs. Leur recherche au sein des ARNms extraits de la feuille de betterave a été réalisée à l'aide de couples amorces reprenant des domaines conservés de ces familles d'enzymes. Concernant l'AOS et l'HPL, des amorces dégénérées basées sur les séquences ARN de ces différentes enzymes provenant d'autres espèces végétales ont été construites (voir annexe 3). Après la réalisation d'amplifications PCR avec les amorces classiques, les gènes PLB, PLD et ADH ont été partiellement séquencés. Le gène de la LOX n'a par contre pas été détecté dans les ARN messagers. Cette absence confirme les résultats d'activité nulle chez la feuille de betterave. La recherche de gènes à l'aide d'amorces dégénérées a également été fructueuse pour l'HPL avec deux couples d'amorces tandis que pour AOS aucun couple n'a permis d'obtenir une amplification.

1. Séquence partielle de PLB : entre 70 % et 80 % d'homologie élevée avec les gènes PLB de divers végétaux :

```
...CTCAACTGGCTAAACCCTCTGTAAACCTGGAAGTGTATCTCTATCTCAAACTGGCAGGAAGTCCCAGGCC
TCTGTCTCTGCCTCTGCCAAGAGTCACAGACTTCTGCTGAGCAAATGCTGGGCGCAGAGCTCATGGAAGCTTC
TCAAGAAAAAGTGTCCTACTTCTCCTCGTTGATGTTGGCCACCTTCACAAAGCTTGCACTCGCAAAGAGTGCTC
ATTTGCACTTCTATGTCCAGAGGATGAGAAACCATTTTTAGATTTTCATCCAGCATATNTCTGACTTTTTCTCC
TAAACTGGTATTCTTAAGGGACATTGAAATCTTTGACATAGATGGAACTTTTCAGGAACAGGAAGNACAC...
```

2. Séquence partielle de PLD : Entre 75 % et 80 % d'homologie élevée avec les gènes PLD de divers végétaux : *Lycopersicon esculentum*, *Medicago truncatula*, *Solanum lycopersicum*, *Glycine max* ou *Ricinus communis* :

```
...GTGATTTGCCTGGTCACCTCCTCCGCTATCTATTGGTGTCTAGTGAAGGAGATGTCTCAGAGCTCCCAG
GCTTTGAGTTCTTCCCGACACCAAGGCACGAGTGCTTGGTGTTAAATCTGACTATCTCCCAATCTTAACT
ACCTAATCTAATCAATATTGAGAAGTAACATCCATCTTCTCATGCTTTTGCGAATCATACTGGAGTTTTAGACA
GAATAATAAAGTAGTAGCTTGGTGATTTTAGATTTCTGCATCTGGTTTTACTTTTTAAACTTACAAGGGTTTA
TGTGATATTGGTGGTTAGAATACCAGGTCAATGAGATTGTTAACTNTGTACTGTATTTGCGAGTATCTC
GATATGTATTATGGCGTGAGAGAATCTCT...
```

3. Séquence partielle d'ADH : Entre 75 % et 80 % d'homologie élevée avec les gènes ADH de divers végétaux : *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Glycine max*, *Sorghum bicolor* ou *Solanum tuberosum* :

```
...TCATCTTCGTGCATCCATGCGGTTTCATGTATCTGATACTTTACCTTTCAACATAAGGTCGAATTCCTTGTGA
TATCCTTAAAGGCGAGTTCATGGGTGATAAATTTACAGCTCAAGTTCTTGTTCATGTTCTTCCACGACGC
CTGGTATATCAGNNNTACGTGGTTTATCGTTTGCATGGAAGTCCCTTAAAGTTTCTCTCGTTTCAGGAAGTTC
```

...ACGGGGTGCCTGTTGAAGGCGTCTTCTTTGTTGGGTTACCAACCAGATGAGTACTACCGCGACGATCATG  
GACACATCCAAGGCTGAAATCATGGCTTGCTGTTCCAGTACATTCGACGCTT

4. Séquences partielles d'HPL : Entre 65 % et 70 % d'homologie élevée avec les gènes HPL de divers végétaux : *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana tabacum*, *Ricinus communis*, *Capsicum annuum*:

..GTAAGGAGCTCATACTAAGGTTAGAAGTTGCTACGGACACCCTGAAGAGAAGCTCTAAAGTATGGGT  
ATCTTCCTGTTAAACAACTTGGACACCATGTGGACAACCATTGAACAATCTATCTCAAAGATAAACTGCCA  
ACTGTTACCCCCCTACNAAAATGCCTCTTCAACTTCTTTGCCAAGGAATGCTTGGAGCTGACCCCTATAAAT  
ACTCAAAGAAGCTCTGCGAAACAGGTCATGTTATGGTTGATAAATGGCTTGGCGTACAACCTACCCATTATC  
AATATTGGTATACTCCAACCATTTGAAGAAATCTTCTACATTCTTTCACATACCCCTATCTATTGGTTAAAGGN  
GATTATGAGAACTTTGTAGTTTCGTTTCGAAAGAAGCTCGTGAAGTGAACGAGGTNAATCCGAGTTTG  
GGTTAACTGAAGAAGATATCATCCACAACCTTGCATTCAACCTTGATTCAATGCTTTGGGGCGGGTTT...

...TNTACTGAGGANCTCATACTAAGGTTAAGAAGTTGCTACGGACACCCTGAAGAGAAGCTCTAAGTATGG  
GTATCTTCCTGTTAAACAACTTGGACACCATGTGGACAACCATTGAACAATCTATCTCAAAGATAAACTGC  
CAACTTGTTCACCCCCCTACAAAATGCCTCTTCAACTTCTTTGCCAAGGAATGCTTGGAGCTGACCCATAA  
ATTACTCAAAGAAGCTCTGCGAAACAGGTCATGTTATGGTTGATAAATGGCTTGGCGTACAACCTACCCA..

## 7.2. Séquençage de BvHPL par RACE-PCR

Le séquençage de la partie amplifiée par les deux amorces dégénérées a permis de synthétiser de nouvelles amorces spécifiques à BvHPL et adaptées à la RACE-PCR (25-30 nucléotides,  $T_m > 60$  °C). Cette technique précédemment décrite (3.3.3. RACE-PCR) permet d'obtenir à partir d'une partie centrale le séquençage des extrémités 5' et 3'. L'utilisation conjointe des amorces GSP1, nGSP1, GSP2, nGSP2, AP1 et AP2 ainsi que des séquences d'ADN greffées aboutit à l'amplification et le séquençage du gène de l'HPL ([HQ615688.1](#)) de la betterave : *BvHPL* dont la partie codante est mise en gras ci-dessous.

CGCCCTCGCTAGGCGATAAGAGAAAAAACCAGGCGCAACAACCATATTGAGTATTAGAAAAATGACTGGCCATATCAAC  
AGCTATGTCAGCCCCAATCCAACCCCAACAATAATCCCTACACCTCCGCGAGCGGCAACTTGGCGCTCCGCACACT  
CCCGGGTGGCTATGGCTTCCCTATTCTCGGGCGATAGGGGATAGGCTAAATTACACTTGGTTCCAAGGGCAAGACACT  
TCTTTAGGAAAAAATGGACACATATAAGAGTAGTGTGTTTAGAACCAATATACCTCCTTGTTCCTTTCTTTATCGATG  
TCAACCCAAACGTAATTGCTGTCTTGTATGTTCCATCTTTTCTCACCTTTTGTATGGATATCATTGATAAGAAGAATGT  
TCTGTTGGAAATTTACCGCTAGTACCAAGTTACGCGGGGATAGGAGAGTTGGTGTATCTTGATACAACCTGAGGAG  
CTACATACTAAGGTTAAGAAGTTTCCACGACACCTGAAGAGAACTCTAAAGTATGGGTATCTTCTTGTAAACAAA  
CTTGGACACCATGTGGACAACCATTGAACAATCTATCTCAAAGATAAACTGCCAACTTGTTCANCCCCNTACAAAAT  
GCCTCTCAACTTCTTTGCCAAGGAATGCTTGGAGCTGACCCATAAATTAACAAAGAACTCTGCGAAACAGGTCAT  
GTTATGGTTGATAAATGGCTTGGCGTACAACCTACCCATTATCAATATTGGTATACTCCAACCATTTGAAGAAATCTTC  
TTACATTCTTTCACATACCCCTATCTATTGGTTAAAGNGATTATGAGAACTTTGTAGTTTCGTTTCGAAAGAAGCTCGT  
GAAGTGAATTGAACGAGGTAATCCGAGTTTGGGTTAACAGAAGAAGATATCATCCACAACCTGCTATTCAACCTGGAT  
TCAATGCATTTGGCGGGTTTCGATTTTCTTGCCTGCATTGCTTAACAATCTAGTACTAAACAATGGTGCATACAAGAAG  
TGTTGAGGAAAGAAGTGAAGGGAAAAATTGTAGCTCACCTTCATCATTGAGTTTTACTGCAATTCAAGACATGCCTAATGTG  
CAATCATTGCTGTACGAAACACTAAGGTTAAACCCCTGTACCATTCAATATGGGCGGGCAAGAAAGGACTTTGTGTT  
ACAATCGCATGATTCAAGATTTGATGTAAGAAGGGTGAAGTTGCTTTGTGGGTATCAAACACTTGTGATGAGGGATCCG  
AAGGTGTTGATGACCCGAAACGTTCCGTTCCGGATCGTTTATGGGCGAGAAGGGTGAATGAATTGTTGAACATTTGT  
TCTGGTGAATGGACCGACAAGTGCAGAAAGCTGATGCATCAAATAAGCAGTGTGCAGGAAAAGATTATGTTCTTTTAC  
TGCATGCTTGTTCGAGATTTGTTCTTACGATATGATTCTATAACGCTTGATTCTATCTGGGGCAATCACGGAGTTGA  
GAAAGCTAAGTGA<sup>AAATCTAGGAGTAATCTATGCAATGTGTAATATACATTATGTGTATGTCAGTATGTCTTTGGAG  
ATGATCATGAATAAGAAGCTTGAACGACTATTATGATATTAAGAAAAACCTTTCTTAGGGGGCGCCAGGCCATAAG  
GGGTTCCCCACCTGACCAAAAGCTTTTTTTTTTTT</sup>

La séquence comprend un codon STOP (TGA) situé à 15 nucléotides avant le codon ATG relatif à la première méthionine, ce qui permet de confirmer que le gène obtenu est complet. La partie codante est composée de 1470 nucléotides pour une protéine de 490 acides aminés avec un poids calculé de 54551 daltons, les pourcentages d'homologie les plus élevés avec d'autres séquences ARN d'HPLs sont repris dans le tableau suivant (Tableau 21) :

Organisme végétal	% d'homologie	Classe
<i>Nicotiana attenuata</i>	67	13-HPL
<i>Nicotiana tabacum</i>	67	13-HPL
<i>Capsicum annum</i>	66	13-HPL
<i>Fortunella margarita</i>	65	13-HPL
<i>Ricinus communis</i>	66	13-HPL
<i>Solanum tuberosum</i>	65	13-HPL
<i>Citrus sinensis</i>	65	13-HPL
<i>Citrus jambhiri</i>	65	13-HPL
<i>Citrus aurantium</i>	65	13-HPL
<i>Lycopersicon esculentum</i>	65	13-HPL
<i>Populus trichocarpa</i>	65	13-HPL
<i>Medicago sativa</i>	65	9-HPL
<i>Psidium guajava</i>	64	13-HPL

Tableau 21 : Pourcentage d'homologie entre *BvHPL* et les gènes connus d'HPL végétale

Les niveaux d'homologie calculés indiquent que *BvHPL* est probablement une enzyme appartenant à la famille CYP74B spécifique des 13-HPOs. La séquence protéique est la suivante :

MSAPIPTPTTIPTPPSGNLPRLTLPGGYGFPILGPIGDRLNNTWFGQDFFRKKMDTYKSSVFRTNIPPCFPFFID  
VNPVIAVLDVPSFSLFDMDIIDKKNVVLVGNFMPSTKFTGDRRVGVYLDTEELHTKVKNFATDTLKRNSKVVWS  
SLLTNLDTMWTTIEQSISKDTANLFXPXQKCLFNFLCQGM LGADPINYSKELCETGHVMVDKWLAVQLLPIINIGI  
LQPFEEIFLHSFTYPYLLVKGDYELCSFVSKEAREVIERGKSEFGLTEEDIIHNLNLFNLFNAFGGSIFLPALLNNLVLN  
NGAIQEVLRKEVRENCSSPSSLSFTAIQDMPNVQSFVYETLRLKPPVPLQYGRARKDFVLQSHDSRFDVKKGELLCG  
YQTLVMRDPKVFDDPETFVDRFMGEKGDENLYLFWSNQPQNAKADASNKQCAGKDYVPFTAFLADFLRY  
DSITLDSSGAI TGVEKAK

De la même manière que pour la séquence génomique, la séquence protéique a été étudiée en vue de définir les pourcentages d'homologie avec des enzymes HPL et AOS d'organismes différents (Tableau 22).

Organisme végétal	CYP74	Identité	Positives	Publication
<i>Nicotiana attenuata</i>	HPL	63	78	Unpublished
<i>Nicotiana tabacum</i>	HPL	63	78	Unpublished
<i>Ricinus communis</i>	HPL	62	77	Unpublished
<i>Populus trichocarpa</i>	HPL	63	76	Unpublished
<i>Citrus jambhiri</i>	HPL	61	79	(Gomi et al. 2003)
<i>Citrus sinensis</i>	HPL	61	78	Unpublished
<i>Fortunella margarita</i>	HPL	61	78	(Pan et al. 1995)
<i>Citrus aurantium</i>	HPL	60	78	Unpublished
<i>Solanum lycopersicum</i>	HPL	60	74	(Howe et al. 2000)
<i>Psidium guajava</i>	HPL	62	78	(Tijet et al. 2000)
<i>Solanum tuberosum</i>	HPL	59	74	(Vancanneyt et al. 2001)
<i>Vitis vinifera</i>	HPL	60	76	Unpublished
<i>Capsicum annum</i>	HPL	59	74	Unpublished
<i>Arabidopsis thaliana</i>	HPL	55	71	(Bate et al. 1998)
<i>Medicago truncatula</i>	HPL	56	73	(Hughes et al. 2006)
<i>Medicago sativa</i>	HPL	56	74	(Noordermeer et al. 2000)
<i>Nicotiana attenuata</i>	AOS	39	60	(Ziegler et al. 2001)
<i>Solanum tuberosum</i>	AOS	38	59	(Farmaki et al. 2007)
<i>Glycine max</i>	AOS	38	60	(Kongrit et al. 2007)
<i>Solanum lycopersicum</i>	AOS	39	59	(Howe et al. 2000)

Tableau 22 : Pourcentage d'homologie et d'identité de *BvHPL* avec d'autres HPL ou AOS

L'étude de l'alignement des séquences protéiques suggère également l'appartenance du gène séquencé à la famille des 13-HPL (Figure 60). Des séquences conservées sont identifiées dans les régions C- et N-terminales, qui codent pour des particularités importantes de ces enzymes, par exemple la reconnaissance du substrat ou la formation du noyau hème (Howe et al. 2000). 12

nucléotides sont également mis en évidence, ils concernent des substitutions spécifiques au sein de la famille CYP74 entre les AOS et les HPLs. Enfin, deux zones relatives aux enzymes P450 sont mises en évidence, la première reprend le motif PPxFP, alternative à PPGP, séquence capitale pour la stabilité et l'activité des enzymes P450 (Szczesnaskorupa et al. 1993). La seconde concerne la différence flagrante entre les séquences AOS et HPL au niveau C-terminal.

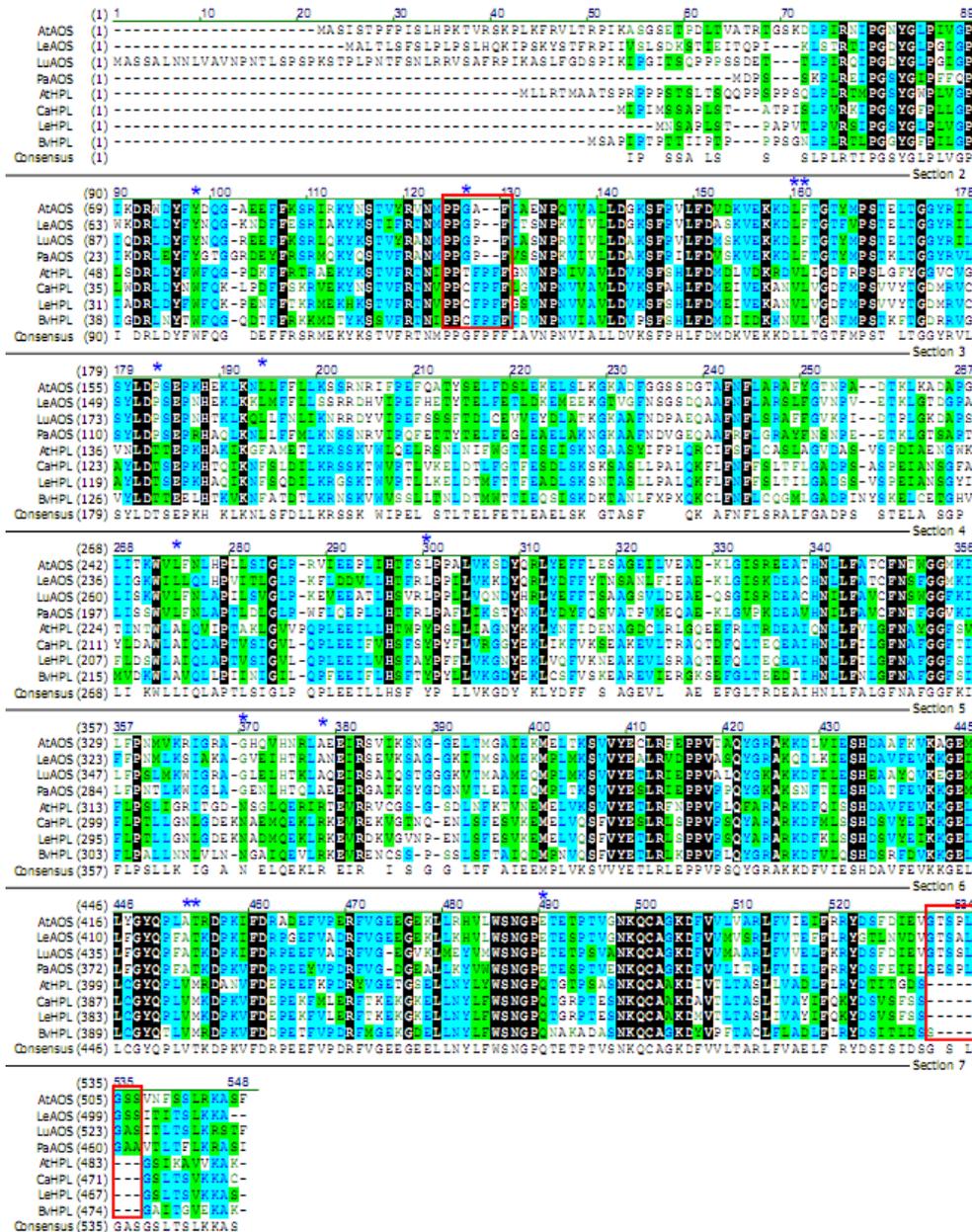


Figure 60 : Alignement de séquences protéiques de différentes enzymes HPLs et AOS de plantes. L'alignement est réalisé à l'aide de l'algorithme ClustalW. Les séquences d'AOS sont d'*Arabidopsis thaliana* AtAOS-(Laudert et al. 1996) de *Lycopersicon esculentum* LeAOS-(Howe et al. 2000), du *Linum usitatissimum* LuAOS-(Song et al. 1993) et de *Parthenocarpum argentatum* PaAOS-(Pan et al. 1995). Les séquences d'HPL d'*Arabidopsis thaliana* AtHPL-(Bate et al. 1998) de *Lycopersicon esculentum* LeHPL-(Howe et al. 2000) et de *Capsicum annuum* CaHPL-(Matsui et al. 1996). Les nucléotides écrits en blanc sur fond noir sont des acides aminés conservés dans la famille CYP74, les séquences partiellement conservées sont en bleu et les blocs conservés en vert. Les substitutions spécifiques au des sous-familles sont indiquées par un astérisque bleu au sommet des colonnes et les séquences d'intérêt entourées d'un cadre rouge.

L'arbre phylogénétique réalisé avec les principales séquences nucléotidiques connues d'HPLs est disponible ci-dessous (Figure 61). BvHPL est située au sein des 13-HPL strictes de plantes

dicotylédones et fait partie de la famille CYP74B, confirmant ainsi les hauts pourcentages d'homologie calculés avec cette famille d'enzyme.

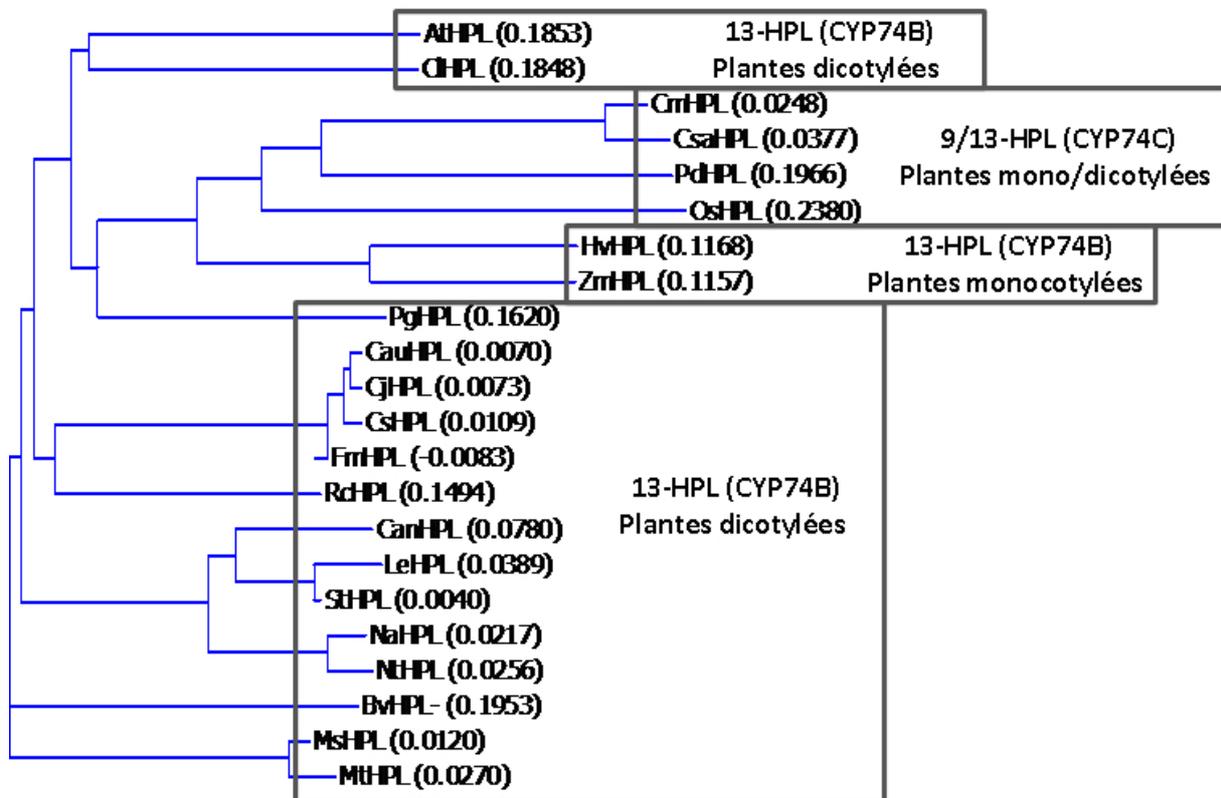


Figure 61: Arbre phylogénétique de différentes HPLs retrouvées chez les plantes. Les alignements sont réalisés avec l'algorithme ClustalX et l'analyse est réalisée en utilisant la méthode « Neighbor-joining » développée par Phylip avec un coefficient de correction de Kimura pour les substitutions et un bootstrap de 1500 données. Les différentes HPLs sont extraites des végétaux suivants et sont disponibles avec leur numéro d'accèsion sur NCBI : *Arabidopsis thaliana* (AtHPL, AF087932), *Beta vulgaris* (BvHPL-[HQ615688.1](#)), *Capsicum annuum* (CaHPL, U51674), *Citrus aurantium* (CauHPL, DQ866816), *Citrus jambhiri* (CjhHPL, AB077765), *Citrullus lanatus* (CihHPL, AY703450), *Citrus sinensis* (CsiHPL, AY242385), *Cucumis melo* (CmHPL, AF081955), *Cucumis sativus* (CsaHPL, AF229811), *Furtenella margarita* (FmhHPL, GU997105), *Hordeum vulgare* (HvHPL, AJ318870), *Lycopersicon esculentum* (LeHPL, AF230372), *Medicago sativa* (MsHPL, AJ249245), *Medicago truncatula* (MthHPL, AJ316562), *Nicotiana attenuata* (NaHPL, AJ414400), *Oryza sativa* (OsHPL, AK105964), *Prunus dulcis* (PdHPL, AJ578748); *Psidium guajava* (PghHPL, AF239670), *Solanum tuberosum* (StHPL, AJ310520), et *Zea mays* (ZmHPL, AY540745).

### 7.3. Clonage de BvHPL

L'amplification de l'entièreté du gène BvHPL est un premier pas vers son clonage. Des sites d'enzymes de restriction *KpnI* et *HindIII* ont été introduits dans la séquence via amplification PCR. Lors de l'amplification, les 17 acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale sont supprimés de la séquence clonée (permettant la formation d'une enzyme plus active une fois extraite et exprimée) tandis que le codon STOP originel est conservé. BvHPL est introduit dans la souche *E. coli* M15 (contenant un plasmide de répression pREP4) via le plasmide pQe-31. Le gène BvHPL se retrouve sous le contrôle du promoteur/opérateur *lac* dérivant du phage T5. Ce promoteur très efficace gère la transcription de la protéine. Tandis que le plasmide répresseur présent en plusieurs exemplaires dans la même cellule exprime fortement le répresseur *lac* venant se fixer sur l'opérateur *lac* bloquant la transcription du gène. L'expression de la protéine clonée est initiée par l'ajout d'isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), cette molécule vient se fixer de manière irréversible sur la protéine répresseur de l'opéron *lac*, celui-ci n'est plus réprimé et la transcription peut débuter.

## 7.4. Production de 13-HPL recombinante

La production d'enzymes en fermenteur avec le système décrit ci-dessus est relativement complexe. Deux difficultés majeures doivent être résolues. Premièrement, les HPLs produites par *E. coli* sont des enzymes membranaires, cette culture de bactéries devra donc être lysée et les enzymes solubilisées avec un détergent adéquat afin de rendre les enzymes produites disponibles. Ensuite, la nature hémique de l'enzyme peut poser problème : la bactérie doit disposer des éléments nutritionnels nécessaires à la production de ce type de structure. Le milieu de culture choisi est le milieu Terrific Brooth TB (de composition suivante : tryptone 12g/L, extrait de levure 24g/l, glycérol 4g/l et solution  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.17M et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.72M pH 7) accompagné des antibiotiques spécifiques de la construction génétique, à savoir l'ampicilline (200mg/L) et la kanamycine (50mg/L). L'acide  $\delta$ -aminolévulinique, précurseur de noyau hème est ajouté en tant qu'additif à une concentration de 2.5mM (Littlejohn et al. 2000; Delcarte 2002). Outre le milieu de culture, la température est un paramètre capital pour la production d'HPLs recombinantes, différents auteurs ont montré que cette enzyme avait tendance à former des corps d'inclusion (Howe et al. 2000). Ce sont des agrégats de protéines insolubles et inactives retrouvés dans le cytoplasme des bactéries. La réduction de la température supprime efficacement la formation de ces corps d'inclusion. En effet, la cause principale de la formation d'agrégats est l'interaction entre zones hydrophobes et ces forces diminuent considérablement avec la température (Bollag et al. 1996). La production sera donc menée à 37 °C dans un premier temps, afin de maximiser la multiplication cellulaire, elle sera ensuite refroidie à 20 °C pour l'étape d'induction de la synthèse d'HPLs recombinantes. L'agitation est maintenue entre 150 et 250 rpm. L'induction est effectuée par ajout d'IPTG à une concentration de 0.1mM dès que la densité optique de la culture a atteint l'unité (Delcarte 2002). La culture est menée pendant 24 à 72 heures (Figure 62).

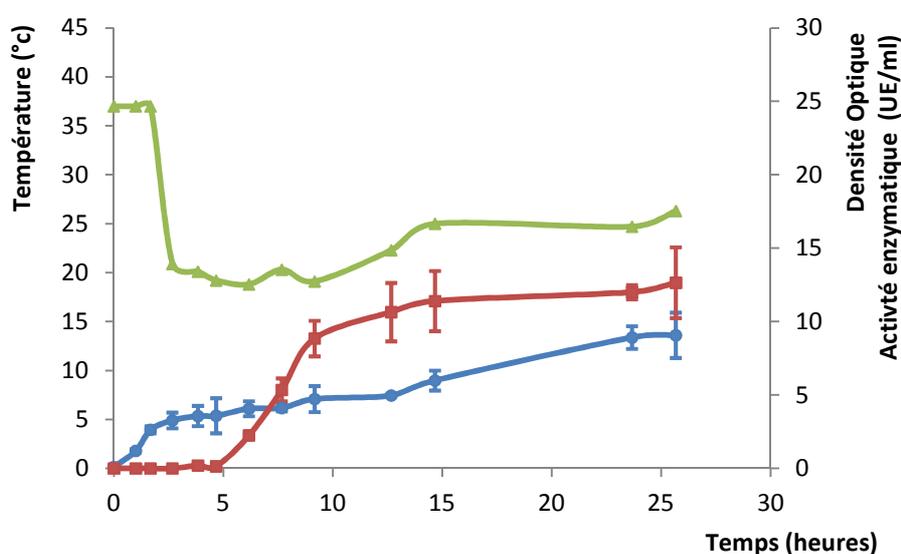


Figure 62 : Évolution moyenne de la densité optique  $\blacklozenge$ , de la température  $\blacktriangle$  et de l'activité HPL  $\blacksquare$  (U.E./ml) lors de la culture de *Escherichia coli* M15 exprimant BvHPL dans un fermenteur de 2 litres.

Après extraction par détergent, l'activité enzymatique de la culture microbienne est proche de 12 UE/ml de milieu. Au cas où l'utilisation de détergents est interdite, l'étape d'extraction des enzymes peut être supprimée, l'activité mesurée est nettement plus faible (1,56 UE/ml pour cette même culture). Le refroidissement du bioréacteur par l'eau de ville n'est pas suffisamment performant, l'utilisation d'un bain thermostaté recirculant est envisagée afin d'obtenir une température stable de 20 °C après l'induction. L'allongement de la durée de production est envisageable au vu des courbes d'activités.

## 7.5. Production de C<sub>6</sub>-aldéhydes à l'aide de 13-HPL recombinante

L'utilisation d'HPL recombinante pour la production de GLVs est coûteuse et nécessite l'ajout d'inducteurs et d'antibiotiques. Par ailleurs, la synthèse et l'extraction de l'enzyme doivent être mises en œuvre en prévision de la production de C<sub>6</sub>-aldéhydes. La source enzymatique produite sera exempte de toute activité parasite consommant le substrat ou les aldéhydes synthétisés. De plus, les HPLs recombinantes bénéficient d'une stabilité accrue par rapport aux productions de protéines natives. Ces caractéristiques garantissent une productivité positive tout au long de la synthèse et un allongement possible de la durée de production

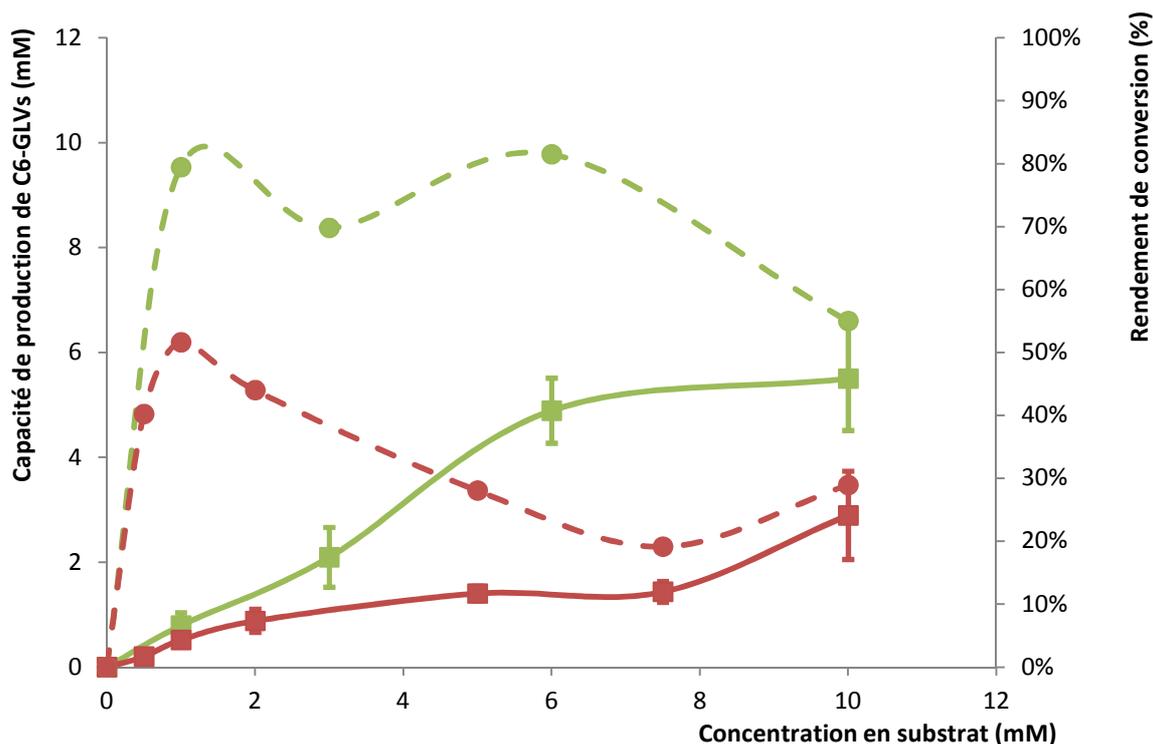


Figure 63 : Rendements moyens en pourcentage (● = HPLs extraites de *Beta vulgaris* ; ● = HPLs extraites de *Escherichia coli*) et capacités de production moyennes en mM de GLVs (■ = HPLs extraites de *Beta vulgaris* ; ■ = HPLs extraites de *Escherichia coli*) d'une synthèse longue de deux ou de cinq minutes dans un bio-réacteur de 2 litres avec respectivement 0.5UE/L d'enzymes de feuille de betterave (variété : Katarina) ou d'enzymes HPLs recombinantes.

À l'aide des HPLs recombinantes, la capacité de production augmente de plus 100 % (Figure 63), le rendement est également doublé. La production de GLVs avec l'enzyme recombinante est beaucoup plus efficace, néanmoins les limitations dues à l'inhibition face au substrat sont toujours apparentes. L'adaptation des ajouts dosés à ce type de synthèse va permettre de réduire cette inhibition. Par contre l'extraction par flux gazeux est inutile sachant que les aldéhydes ne sont pas consommés par des réactions enzymatiques parasites.

### 7.5.1. Comparaison de trois 13-HPLs issues de végétaux différents

Dans le cadre de l'optimisation finale du procédé de production, une comparaison a été réalisée sur des HPLs recombinantes provenant de végétaux différents. La 13-HPL de la *Beta vulgaris*, mais également la 13-HPL de *Capsicum annuum*, précédemment isolée et clonée par K. Matsui (Matsui et al. 1996) dans le même système d'expression que celui utilisé précédemment. Le gène HPL isolé de *Olea europea* par Padilla a également été cloné de la même manière à la suite de notre collaboration avec l'université de Séville (Padilla et al. 2010).

		Km (mM)	Vmax (μmol/min)	pH optimum	Température Optimale
<b>OepHPL</b>	13-HPOD	0,10	1,01	8 -- 9	35°
	13-HPOT	0,15	1,48		
<b>BvHPL</b>	13-HPOD	0,41	4,21	6 -- 7	25°
	13-HPOT	0,48	12,52		
<b>CaHPL</b>	13-HPOD	0,37	6,41	7--7.5	25°
	13-HPOT	0,48	14,59		

Tableau 23 : Paramètres cinétiques Km et Vmax de trois HPLs recombinantes produites respectivement à partir de *Olea europea*, *Beta vulgaris* et *Capsicum annum* et exprimée dans *E. coli* M15 via le plasmide pQe-31. Ces paramètres ont été calculés selon la loi de Lineweaver-Burk sur des mesures spectrométriques d'activités enzymatiques extraites de cellules cultivée en fiole.

Les HPLs recombinantes synthétisées à partir des séquences *BvHPL* et *CaHPL* présentent une activité enzymatique importante. Les paramètres  $K_m$ ,  $V_{MAX}$ ,  $T_{OPT}$  sont semblables, seul le pH optimum est légèrement plus acide pour *BvHPL* (Tableau 23). Par opposition la production d'*OepHPL* est très faible, les extraits de cultures d'*E. coli* sont peu actifs. Le pH et la température optimaux sont également plus éloignés des conditions standards. Cette enzyme recombinante ne sera pas utilisée dans le cadre de la synthèse de GLVs en bioréacteurs agités.

## 7.6.2. Comparaison des clones producteurs d'HPLs

La production d'HPLs recombinantes a été réalisée de la même manière pour les deux clones *BvHPL* et *CaHPL*. La culture est menée selon les paramètres décrits dans le chapitre précédent (7.4. Production de 13-HPL recombinante), seule la durée totale est allongée à 72H.

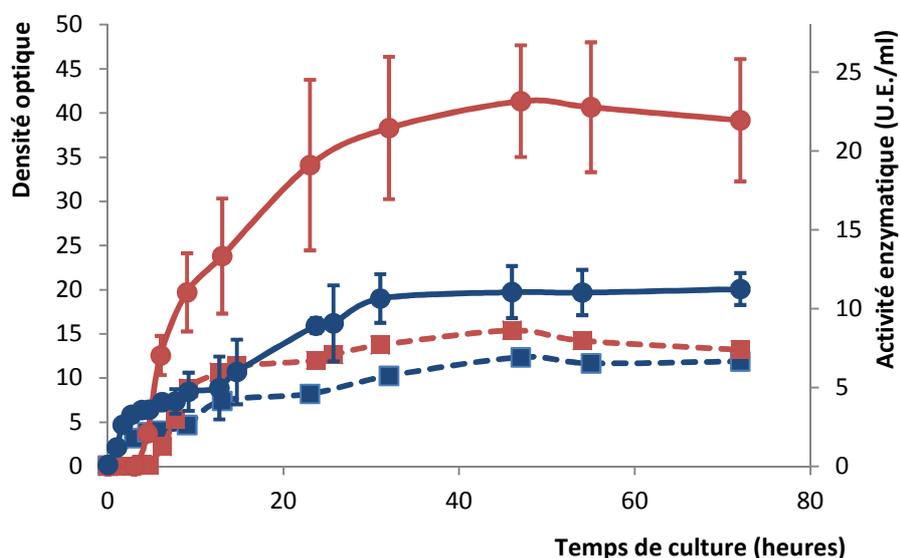


Figure 64 : Évolution de la densité optique (■ bactéries exprimant CaHPL ; ■ bactéries exprimant BvHPL) et de l'activité enzymatique (● bactéries exprimant CaHPL ; ● bactéries exprimant BvHPL) de cultures en volume de deux litres d'*Escherichia coli* recombinants exprimant des gènes HPLs différents.

La culture du clone *CaHPL* génère une activité enzymatique deux fois plus importante que celle de *BvHPL* pour une densité optique sensiblement égale en fin de culture (Figure 64). L'augmentation de l'activité enzymatique est progressive et la valeur maximale est atteinte environ 48 heures après l'induction. Cette activité reste ensuite stable jusqu'à 72 heures. Les enzymes produites sont majoritairement membranaires. Les HPLs, extraites des membranes ou non, peuvent être

employées pour la synthèse des GLVs en bioréacteurs agités. La solution enzymatique est diluée de manière à fournir un taux enzymatique entre 0,5 et 1 UE/ml au sein du bioréacteur.

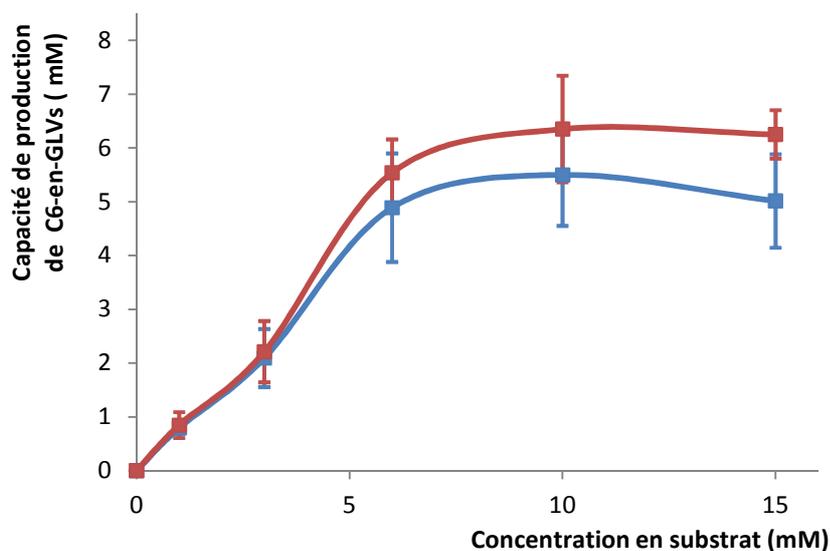


Figure 65 : Production après 30 minutes de synthèse de C<sub>6</sub>-en-aldéhydes ( ■ à l'aide d'HPLs produites à partir de BvHPL ; ■ à l'aide d'HPLs produites à partir de CaHPL ) à partir d'extrait enzymatique composé d'HPL recombinante. La teneur en activité HPL est de 0,75 UE/ml.

La synthèse aromatique qui découle de ses deux productions d'enzymes recombinantes est supérieure (jusqu'à 6,55 mM) à celle obtenue à partir d'un extrait de betterave (valeur maximale = 3.74mM) (Figure 65). Entre les deux cultures, à faible concentration en substrat, la capacité de production est identique. Par contre, à haute concentration en substrat, la capacité de production de GLVs à l'aide de CaHPL est légèrement supérieure.

## 7.7. Discussion

La recherche des gènes impliqués dans la voie de la LOX au sein des ARN messagers exprimés par la betterave a permis de mettre en évidence les gènes de phospholipase B, phospholipase D, ADH et HPL. Par contre, ni le gène de la LOX, ni celui-ci l'AOS n'ont pu être identifiés. Par la suite, le gène HPL a pu être amplifié par RACE-PCR et séquencé dans son intégralité. La taille de la protéine est proche des 55kdaltons, ce qui correspond à une des 4 sous-unités identiques de l'enzyme HPL. Au niveau de la séquence nucléotidique, l'homologie confirme la sélectivité de l'enzyme pour les 13-HPOs observée au cours de la caractérisation, le gène est notamment très proche des 13-HPLs de *Nicotiana* et de *Citrus*.

Le clonage a été effectué au sein d'un système d'expression développé par Qiagen et constitué d'une souche *E.coli* M15 dans laquelle on introduit un plasmide de répression et un plasmide d'expression. Ce système permet d'atteindre des taux d'activité HPL plus élevés que ceux retrouvés au sein des feuilles de betteraves. Trois séquences de 13-HPLs différentes ont été clonées de cette manière afin de produire des enzymes : BvHPL (*Beta vulgaris*), CaHPL (*Capsicum annum*) et OepHPL (*Olea europea*). L'activité enzymatique obtenue avec OepHPL est très faible, tandis que l'expression de BvHPL et CaHPL dans la souche transformée permet d'obtenir, après lyse et extraction, de hautes teneurs en enzymes.

Les synthèses de GLVs réalisées à partir de ces extraits enzymatiques produits par culture de microorganismes recombinants donnent des résultats plus élevés que la production à partir de l'enzyme de feuilles de betteraves. Une capacité de production maximale entre 5,5mM et

6,34 mM peut être obtenue selon le gène utilisé pour la préparation des enzymes recombinantes. La figure 66 ci-dessous illustre le procédé complet de production utilisant les enzymes recombinantes.

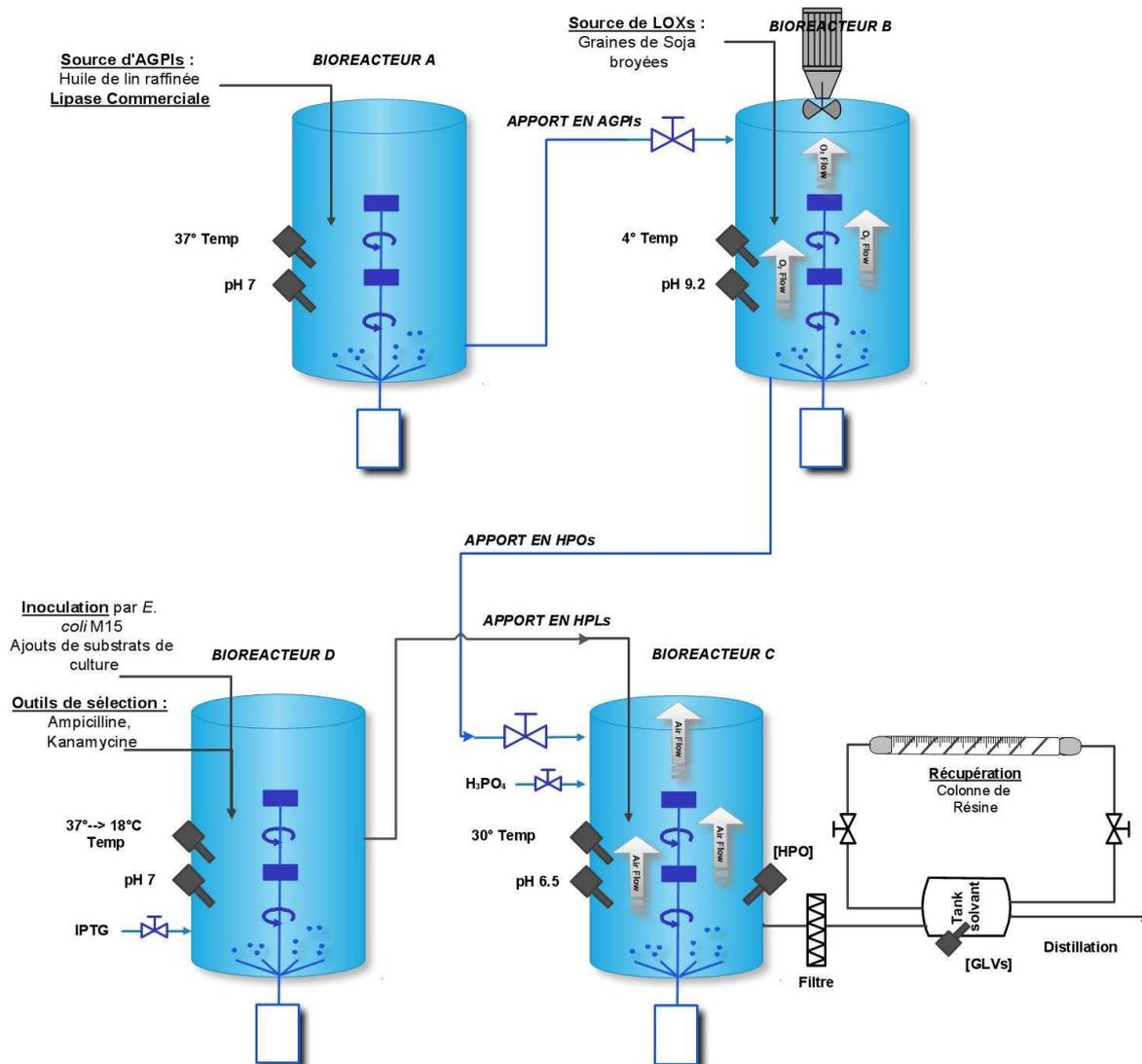


Figure 66 : Système de production de GLVs v.2.0

Ce système est semblable au procédé v1.2 excepté l'addition d'un **bioréacteur D** au sein duquel a lieu la culture de micro-organismes recombinants. Cette culture est réalisée sur milieu TB (Terrific Broth) enrichi en acide  $\delta$ -aminolévulinique accompagné d'ampicilline et de kanamycine, ces antibiotiques maintiennent une pression de sélection sur le clone exprimant l'enzyme HPL. Les enzymes produites peuvent être extraites de la membrane du clone avant d'être introduites dans le **bioréacteur C** pour la synthèse des GLVs. La production est menée en mode fedbatch pendant 15 à 30 minutes selon les concentrations en substrat et en enzyme. En l'absence d'enzymes dégradant les aldéhydes, la présence du système d'extraction par flux d'air n'est plus requise.

---

## 8. Discussion générale

---

### 8.1. Préambule

Le monde de l'aromatique est en constante évolution afin de satisfaire les consommateurs. Depuis quelques années, les produits de label « naturel » envahissent le marché mondial des substances aromatisantes, parmi ceux-ci les green leaf volatiles (GLVs) ont une place importante dans la formulation des boissons, des friandises et des plats préparés. La recherche scientifique décrite dans ce travail est une première étape vers l'élaboration d'un procédé de production de GLVs naturels pour l'industrie alimentaire à partir d'un substrat peu valorisé. Ce travail décrit partiellement la voie enzymatique de synthèse de ces arômes et son implication dans les systèmes de défense, afin d'utiliser ces connaissances en vue d'optimiser le système de production. Les réactions enzymatiques du procédé proposé reproduisent la synthèse in-vivo des GLVs et sont accréditées par les normes de synthèse d'arômes naturels.

### 8.2. La feuille de betterave : source d'enzymes ou de substrats ?

#### 8.2.1. Localisation et réactions initiales

La description et le dosage des différents composés impliqués dans la synthèse des GLVs au sein des feuilles de betteraves ont permis de tirer quelques enseignements importants au niveau physiologique. Tout d'abord, la localisation des HPLs dans la membrane des chloroplastes a été confirmée par plusieurs équipes scientifiques (Mita et al. 2005; De Domenico et al. 2007). Les substances lipidiques utilisées dans la production des GLVs sont majoritairement des constituants de membranes d'organites ou de cellules, telles que des phospholipides ou des galactolipides, deux classes représentant plus de 80 % de la matière grasse de la feuille. Au sein de ces familles de composés, les acides gras estérifiés sont majoritairement des précurseurs de GLVs : 8,8 % d'acide linoléique et 56,2 % d'acide linoléique. Malgré l'absence d'activité détectable de galactolipase au sein des feuilles de betteraves (Geimel 1987), l'activation physiologique de synthèse de GLVs est associée à une hydrolyse des phospholipides ou des galactolipides. D'ailleurs, la brève application de stress augmente le taux d'acides gras libres, ce qui permet à la plante de disposer d'un pool de substrats disponibles pour la synthèse d'oxylipines (Conconi et al. 1996).

#### 8.2.2. Formation et disponibilité des oxylipines

Indépendamment d'une hydrolyse préalable, les molécules grasses peuvent être oxydées afin de former des hydroperoxydes (HPOs) et des hydroxydes (HOs) d'acides gras, ces deux familles de molécules font partie de la classe des oxylipines libres ou estérifiées selon leur structure chimique. Au sein des feuilles de betteraves, la stéréochimie racémique de ces molécules oxydées exclut une origine enzymatique au profit de phénomènes d'auto-oxydation non spécifique. De cette observation, il découle l'absence d'activité lipoxigénase (LOX) dans les feuilles de betteraves confirmée par les multiples essais d'analyse d'activité. Ce manque est difficilement explicable physiologiquement, car cette enzyme oriente spécifiquement l'oxydation de la matière grasse afin de bénéficier de substrats adéquats pour la synthèse des GLVs. Jusqu'à présent, les voies de synthèse des GLVs ou d'autres oxylipines décrites dans la littérature intègrent systématiquement une activité LOX. Cependant, la plante peut être capable d'exprimer ponctuellement cette enzyme afin de bénéficier d'un pool d'HPOs métabolisable. Les techniques de dosages et des extractions peuvent également être non adaptée, sachant l'inhibition possible de cette enzyme par des substances naturellement présentes dans les feuilles, telles que des caroténoïdes, ou la tendance de la LOX à s'adhérer aux débris cellulaires ou aux fractions particulières. Également, la richesse de la betterave en enzymes métabolisant les HPOs peut masquer la production de ces molécules par

une éventuelle activité LOX. Enfin, la LOX de betterave peut avoir un caractère particulier et notamment une structure membranaire ce qui rendrait son extraction difficile et l'amplification de sa partie codante par PCR difficile.

D'un point de vue analytique, 98,8 % des HOs/HPOs analysés sont estérifiés, ils proviennent soit de l'oxydation d'une molécule estérifiée soit de l'insertion d'une molécule libre oxydée à une molécule de cholestérol. Dans le cadre d'une auto-oxydation des acides gras, les phénomènes d'encombrements stériques pouvant apparaître sont inexistantes contrairement à l'oxydation de matières grasses estérifiées par la LOX. Ceci explique les taux plus élevés d'Hos/HPOs estérifiés par rapport à ceux détectés dans d'autres plantes (Fauconnier 2008). De plus, après conservation des feuilles congelées à -20 °C pendant 8 mois, le taux d'oxylipines augmente d'un facteur 13. Ces nouvelles molécules sont produites exclusivement par auto-oxydation, sachant que les feuilles, au moment de leur congélation, ne contiennent aucune activité LOX. Parmi ces HOs/HPOs 95,4 % sont estérifiées, par conséquent le pourcentage de molécules libres oxydées augmente de 1,2 % à 4,6 %. Les AGPIs libres sont donc plus enclin à subir une auto-oxydation de par leur plus haute réactivité, leur accessibilité aisée (les molécules estérifiées étant majoritairement des phospholipides et des galactolipides protégés au sein des membranes). Au sein de ces molécules, les HOs/HPOs dérivant de l'acide linoléique sont majoritaires et les sites d'oxydation prédominants sont les carbones C9, C13 et C16, chacun d'entre eux étant adjacent à une insaturation. L'augmentation de la teneur en oxylipines est valable pour les précurseurs des GLVs à proprement dits, à savoir le 9-HPOD, le 9-HPOT, le 13-HPOD et le 13-HPOT. En général, 98.9 % de ces HPOs sont estérifiés et 92,3 % dérivent de l'acide linoléique (seulement 7,7 % de l'acide linoléique). Parmi ces molécules, la fonction hydroperoxyde est majoritairement introduite sur le 13<sup>ème</sup> carbone de la chaîne (57,7 % des cas). Cette localisation étant la plus accessible dans le cadre de l'oxydation. Toutefois, les différences de concentrations entre 9-HPOs et 13-HPOs sont faibles, écartant l'action potentielle de l'oxydation stéréospécifique d'une 9-LOX ou d'une 13-LOX qui aurait pu être présente au sein des feuilles.

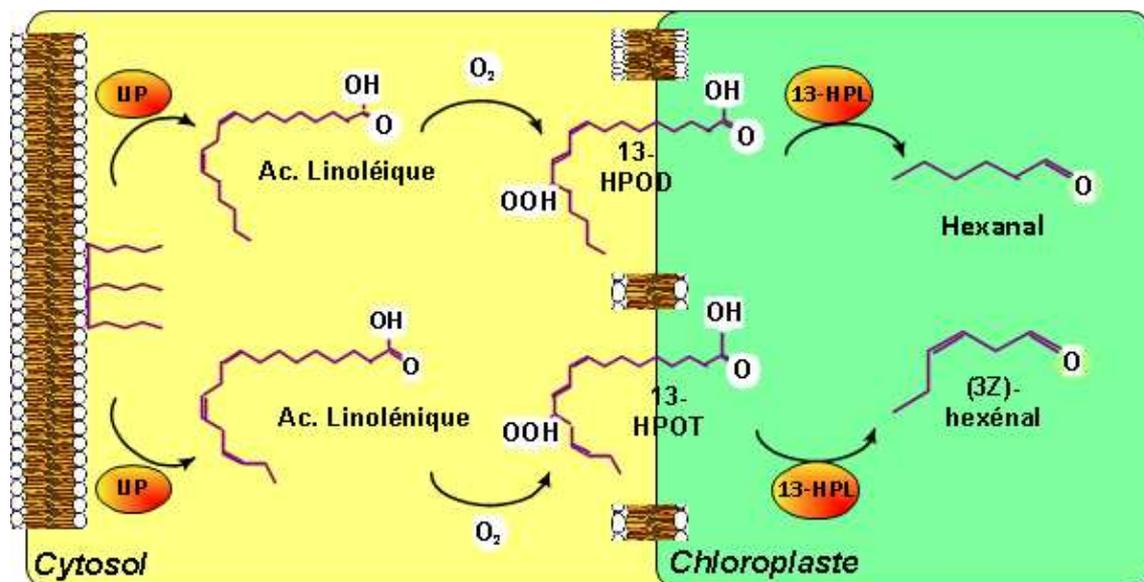


Figure 67 : Représentation des voies métaboliques de la synthèse des GLVs les plus empruntées au sein des feuilles de betteraves. La localisation des différentes réactions au sein de la cellule végétale est également illustrée.

Les 9- et 13-HPOs sont des intermédiaires réactionnels très réactifs chez les végétaux, ils peuvent intégrer pas moins de sept voies enzymatiques différentes par l'intervention d'enzymes les dégradant (Baysal et Demirdoven 2007). Chez la betterave, l'activité hydroperoxydase ou activité consommatrice des HPOs est élevée, et concerne principalement les activités hydroperoxyde lyase (HPL) et allène oxyde synthase (AOS). Les deux enzymes luttent pour leurs substrats préférés,

le 13-HPOD et le 13-HPOT (les 9-HPOs ne sont pas métabolisés). Tenant compte des hydroperoxydes métabolisés par ces deux enzymes, le 13-HPOD est métabolisé à plus de 95 % par la 13-HPL en hexanal. Tandis qu'au sujet des 13-HPOs, 13-HPL et 13-AOS se partagent équitablement le substrat générant respectivement du (3Z)-hexénal et de l'acide 12,13(S)-epoxy-9(Z),11,15(Z)-octadecatriénoïque, précurseur de l'OPDA et de l'acide jasmonique.

### 8.2.3. Teneur initiale en GLVs et synthèse in vivo

Les GLVs détectés dans les tissus végétaux des feuilles de betteraves sont exclusivement à 6 carbones, ils dérivent des 13-HPOD ou des 13-HPOT par l'action de 13-HPLs. Toutefois, les valeurs observées sont faibles en comparaison aux teneurs émises par certaines plantes dans l'atmosphère lors de l'application de stimuli des voies de synthèse (Frag et Pare 2002; Myung et al. 2006). Plusieurs auteurs ont affirmé que les GLVs, le (3Z)-hexényl-1-acétate excepté, ne s'accumulent pas dans les tissus des végétaux, et sont directement sécrétés dans le milieu extérieur se dispersant dans l'atmosphère ou la rhizosphère (Matsui et al. 2006; Baysal et Demirdoven 2007). Cette hypothèse semble se confirmer au sein des feuilles de betteraves rendant l'extraction brute des GLVs de la feuille impossible en vue d'une application industrielle. Le GLV le plus concentré est l'hexanal, cependant l'addition des aldéhydes dérivant de l'acide linoléique présent individuellement en quantité également plus faible, à savoir le (2E)-hexénal, le (3Z)-hexénal ou le (3E)-hexénal, donne une teneur supérieure. Aucun GLV alcoolique n'a été détecté et l'activité alcool déshydrogénase (ADH) est négligeable. Chez la betterave, la voie de synthèse des GLVs est orientée vers la production d'hexanal et de (3Z)-hexénal. Toutefois, en vue de l'adaptation d'un tel procédé biotechnologique, des sources alternatives de lipase et de LOX devront être utilisées. L'utilisation d'ADHs exogènes peut également être envisagée pour la production d'hexanol, de (3Z)-hexénol ou de (2E)-hexénol.

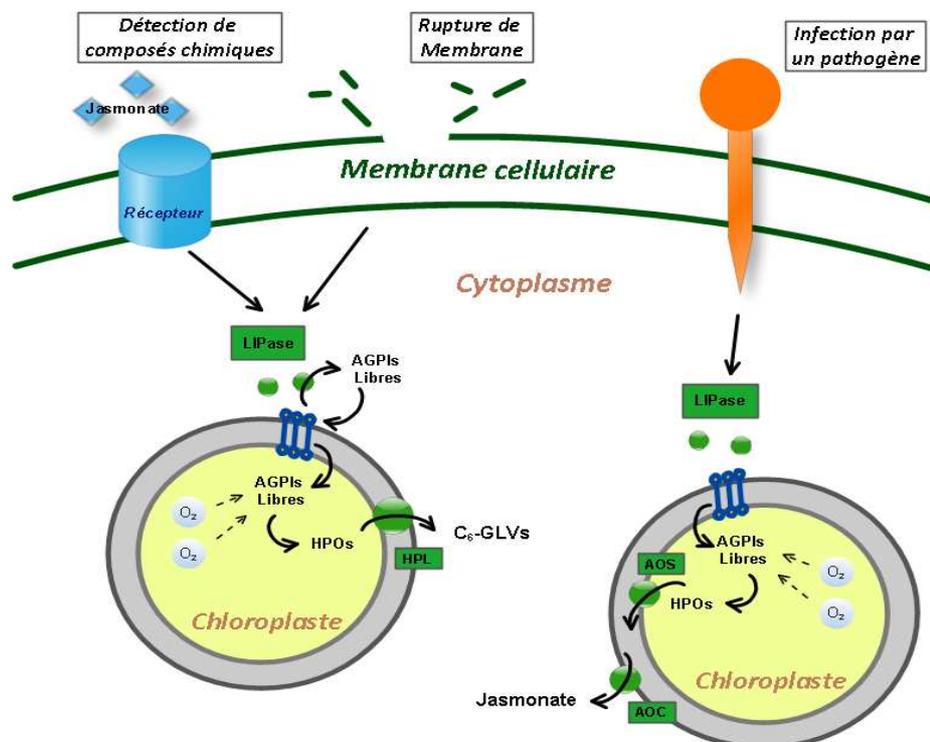


Figure 68: Stimulation des voies de défense de la plante à l'aide de trois stimuli différents. Les premières étapes sont communes, les stimuli activent l'hydrolyse des AGPIs estérifiés des parois du chloroplaste. Ces AGPIs libérés à l'intérieur de l'organite ou dans le cytosol subissent une auto-oxydation pour former des hydroperoxydes. Ces molécules sont majoritairement la cible de l'enzyme HPL dans le cadre des stimulations par la détection de composés chimiques ou lors la rupture de membranes cellulaires, et de l'enzyme AOS dans le cas d'une infection par des micro-organismes pathogènes.

D'un point de vue physiologique, la synthèse des GLVs par HPL est déclenchée par des stimuli résultant de la simple rupture des membranes cellulaires ou par la détection de composés chimiques spécifiques (Matsui 2006) (Figure 68). Par opposition, l'infection par des microorganismes pathogènes stimule plutôt l'activité AOS et la synthèse d'OPDA. Dans un premier temps, les acides gras estérifiés dans les substances de réserve sont libérés par des hydrolases afin de servir de précurseurs métaboliques accessibles pour les enzymes. Par opposition aux hydrolases, l'activité LOX reste nulle, et les oxylipines servant de substrats aux enzymes sont produites par auto-oxydation et ne sont donc pas renouvelées enzymatiquement. L'HPL est activée plus rapidement que l'AOS et conserve une activité importante dans une période de temps allant de une à quatre heures après la stimulation. L'activité AOS augmente principalement à la suite d'infection par des microorganismes pathogènes et intervient à partir de 24 heures jusqu'à plusieurs jours après la stimulation initiale. Cette activité AOS est également renforcée par l'utilisation de PGPRs stimulant une résistance systémique induite avant l'infection par un pathogène.

### **8.3. L'élaboration d'un procédé industriel de GLVs**

#### **8.3.1. La betterave : plante de contraste entre richesse et pauvreté**

La teneur en GLVs dans les feuilles est inférieure à 1 µg/g de poids frais, l'adaptation d'un système d'extraction brute des composés volatils n'est donc pas envisageable. De plus, les taux de substrats disponibles sont insuffisants pour développer un procédé industriel à partir de cette seule ressource. Néanmoins, la feuille de betterave bénéficie de quantité élevée d'HPL, cette enzyme est capable de dégrader à la fois les 13-HPODs et les 13-HPOTs (la vitesse de métabolisation est légèrement supérieure pour les 13-HPOTs). Des activités enzymatiques supérieures à 10 U.E./g ont été mesurées dans les feuilles, ce niveau est supérieur à toutes les valeurs retrouvées dans la littérature concernant les feuilles de végétaux. La variété, l'âge et l'état physiologique de la plante ont une influence sur ces niveaux. Afin de disposer d'un taux maximum d'enzymes, les feuilles de betterave sélectionnées sont issues de variétés hâtives ou de variétés fourragères bénéficiant d'un feuillage sein et abondant. Au cours de la saison, l'activité enzymatique augmente jusqu'au milieu de l'été pour diminuer petit à petit jusqu'à l'arrachage des betteraves. Cependant, la récolte des feuilles n'est pas envisageable en été, car elle stoppe la photosynthèse amputant considérablement l'accumulation de sucre dans la racine. Le meilleur compromis est la valorisation des betteraves récoltées dans les premiers jours, les variétés hâtives sont d'ailleurs les plus riches en activité HPL. L'enzyme est extraite de la feuille par broyage (et peut être solubilisée via des détergents), elle possède une activité optimale à température ambiante et à pH proche de la neutralité. De cette manière, la production industrielle qui en découle sera peu coûteuse en énergie et l'utilisation de mélange tampon sera réduite. Les GLVs produits à partir de cette activité enzymatique sont exclusivement à 6 carbones : l'hexanal, le (3Z)-hexéanal et son isomère le (2E)-hexéanal. Les autres isomères moins stables ne sont pas détectés. Les feuilles de betteraves sont également riches en 13-AOS dégradant les 13-HPOTs, cette seconde enzyme proche de l'HPL au niveau structure ne peut être inhibée sélectivement par rapport à 13-HPL, excepté par des composés de synthèse très coûteux. La présence de cette enzyme parasite la dégradation des 13-HPOTs et doit être prise en compte lors de l'élaboration du procédé biotechnologique.

#### **8.3.2. Enrichissement de feuilles de betteraves**

En vue d'enrichir les feuilles de betterave autant en substrats qu'en enzymes, des expériences de stimulation du système de défense de la plante ont été réalisées. Au cours de ces stimulations, la quantité de substrat n'est pas strictement augmentée, mais la proportion d'acides gras libres s'accroît suite à l'application de différents stress (Conconi et al. 1996). Ce phénomène est surtout

visible dans le cas de l'application de blessures mécaniques, le taux d'acide linoléique libre triple en l'espace d'une heure. Cette libération est de courte durée, et les niveaux reviennent à leur valeur initiale huit heures après la stimulation. La libération d'acide gras propage un signal d'agression qui entraîne également l'expression d'enzymes impliquées dans les systèmes de défense. L'HPL et la plupart des CYP74 enzymes font partie des premières protéines dont la transcription est influencée par ces stimuli d'agressions biotiques ou abiotiques. Dans le cadre de nos expériences, des blessures mécaniques, des traitements au méthyl jasmonate et des infections via des bactéries pathogènes ont été appliqués en vue d'augmenter spécifiquement le niveau d'activité HPL. Les deux premiers types de stimuli ont entraîné une augmentation de l'activité HPL entre 30 % et 40 % (Kandel et al. 2007). Cette augmentation est momentanée, et le niveau enzymatique revient à la normale entre 8 et 24 heures après la stimulation. Afin de prolonger cette augmentation d'activité, l'inoculation de la rhizosphère avec des PGPRs (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) stimulant le système immunitaire de la plante a été adaptée. Cependant, les plantes traitées pendant 2 mois avec des PGPRs ne présentent pas une activité HPL plus importante. Par contre l'activité AOS, parasite d'un point de vue industriel, est largement augmentée lors de l'utilisation de PGPRs. Les applications de méthyl jasmonate ou les blessures mécaniques sur de jeunes plants de betteraves présentent le potentiel d'augmenter l'activité HPL en réduisant quelque peu l'activité AOS. Cependant, à l'échelle d'une culture en champ, l'application de ces deux techniques peut s'avérer difficile. La pulvérisation de méthyljasmonate sur les plantes sera coûteuse pour un impact peu marqué, la lacération des feuilles par le matériel agricole adapté est applicable dans un délai de 2-3h avant la récolte. L'utilisation de stimulations de l'activité HPL est à double tranchant si les feuilles de betteraves ne sont pas consommées par le processus industriel entre une et quatre heures après la stimulation. La valorisation de ces méthodes de stimulation est faible, d'une part à cause de la courte durée de la stimulation et d'autre part suite aux contraintes expérimentales qu'entraîne la mise en œuvre de ces stimulations à l'échelle d'un champ de plusieurs hectares de betteraves.

### **8.3.3. Le procédé industriel de A à Z**

#### ***8.3.3.1. La production d'hydroperoxydes***

L'établissement d'un procédé industriel de production de GLVs a été décrit partiellement dans la littérature (Noordermeer et al. 2002; Nemeth et al. 2004). Sur base des ces travaux et des observations réalisés sur les feuilles de betteraves, un procédé industriel de synthèse de GLVs a été adapté, il comprend quatre étapes : la production d'AGPIs libres et d'HPOs (à partir d'une l'hydrolyse de l'huile de lin raffinée par une lipase commerciale et l'oxydation d'AGPIs libres par la LOX extraite de graines de soja non torrifiées ; la manutention et la disponibilité aisée font de ces ingrédients une alternative idéale dans le cadre d'une substitution de la 13-LOX de betterave), la synthèse des GLVs par la 13-HPL de la betterave et la purification de ces molécules volatiles. Les rendements d'hydrolyse obtenus sont supérieurs à 90 % pour un traitement de 24 heures à 37 °C et pH 7 avec la lipase immobilisée de *T. lagunisa*. L'hydrolyse présente une température et un pH optimaux proches des conditions standards ce qui est un avantage considérable facilitant la mise en œuvre d'un procédé de production industrielle. Ensuite, la synthèse d'HPOs est limitée, principalement par l'apport en O<sub>2</sub> de l'air comprimé, le rendement maximal reste néanmoins élevé (environ 55 %). L'utilisation de ces substrats bon marché garantit une large marge économique, et constitue une base adaptée pour la production d'arômes naturels alimentaires.

#### ***8.3.3.2. La synthèse des Green Leaf Volatiles***

La synthèse de GLVs est réalisée à partir de la solution de 13-HPOs. Cette réaction produit essentiellement du (3Z)-hexénal et du (2E)-hexénal. La capacité de production est faible malgré l'utilisation de hautes activités HPLs issues de la feuille de betterave. Quatre facteurs réactionnels perturbent cette réaction chimique et réduisent les rendements de synthèse.

1. La présence dans les feuilles d'enzymes dégradant les 13-HPOs et entraînant une transformation parasite du substrat.

Dans la littérature, sept voies enzymatiques différentes concernent la dégradation des 13-HPOs. Parmi les enzymes impliquées dans ces voies enzymatiques, AOS et DES sont semblables à l'HPL au niveau du folding et du mécanisme d'action, elles font d'ailleurs également partie également de la famille CYP74. Lors de la synthèse des GLVs, l'extraction d'enzymes possédant une activité hydroperoxydase est inévitable, et ces enzymes ne peuvent être sélectivement inhibées par rapport à l'HPL en modifiant les conditions de réaction. Ce problème d'activité parasite reste secondaire puisque le coût du substrat est très faible. D'ailleurs, l'ajout de substrat est réalisé de manière à fournir suffisamment de 13-HPOs à HPL, et inévitablement aux enzymes parasites, en évitant d'atteindre des teneurs inhibitrices pour l'HPL.

2. L'instabilité très importante de l'HPL : une fois extraite de la membrane du chloroplaste, l'enzyme devient progressivement inactive.

L'instabilité de l'HPL a fait l'objet de plusieurs études scientifiques. Cette instabilité découle soit de mécanismes radicalaires secondaires à la réaction de production d'aldéhydes inhibant irréversiblement le site actif de l'enzyme, soit d'associations substrats-enzymes indissociables. Cette méconnaissance de l'inhibition réduit les perspectives de développement de solutions à ces problèmes d'instabilités.

3. L'inhibition suicide de l'HPL par son substrat. Lorsque l'enzyme est exposée à des concentrations supérieures à 0,15 mM, elle est sujette à une inhibition irréversible.

Afin de réduire, l'inhibition irréversible de l'enzyme vis-à-vis du substrat, les synthèses peuvent être réalisées par l'intermédiaire d'un fed-batch modulant l'apport en HPOs. De cette manière, les enzymes ne sont plus confrontées à des concentrations fortement inhibitrices. Au cours de ce fed-batch, l'apport est constamment modifié de manière à maintenir une concentration faiblement inhibitrice de l'HPL dans le bio-réacteur. Il est important de garder à l'esprit que l'instabilité décrite dans le point précédent réduit progressivement la consommation de substrat.

4. La consommation des GLVs synthétisés par des enzymes parasites présentes également dans le substrat végétal.

Afin de réduire la consommation des aldéhydes par de tierces enzymes, ces molécules sont continuellement extraites au cours de la réaction. Les molécules volatiles sont entraînées par un flux d'air injecté dans le fond du bio-réacteur et sont ensuite condensées au sein d'un piège à froid. Au terme de la réaction enzymatique, lorsque la capacité de production est maximale et les aldéhydes ayant échappé à l'extraction par flux gazeux sont préservés par acidification du milieu de réaction ; la chute du pH inhibe complètement l'activité des enzymes qui dégradent les aldéhydes produits.

### **8.3.3.2.1. Modélisation de la réaction de synthèse des GLVs**

Cette réaction est l'étape limitante de la synthèse des GLVs, elle va déterminer la capacité de production maximale que l'on peut atteindre. La complexité de cette réaction est importante, d'autant plus si l'on tient compte des innovations (l'extraction par flux gazeux et les ajouts dosés de substrats) mises en place afin d'augmenter la capacité de production des GLVs. Pour ce modèle, tous les phénomènes influençant la production de C<sub>6</sub>-aldéhydes à partir d'HPOs dans un bioréacteur agité peuvent être symbolisés par l'équation générale suivante (affectant un impact positif ou négatif à chacun des termes):

$$\text{Prod GLVs} = K_{SY} - K_{IN} - K_{ST} - K_{CO} + K_{FG} + K_{AD}$$

- $K_{SY}$  = Paramètre de synthèse des GLVs à partir d'une solution de substrat et d'enzyme. La quintessence de la réaction chimique est la transformation des HPOs par HPL en GLVs, ce terme représente la base de la synthèse.
- $K_{IN}$  = Paramètre d'inhibition qui représente la chute du rendement de synthèse suite à l'inhibition d'HPL par son propre substrat. Selon nos observations, cette inhibition est proportionnelle à la concentration en substrat.
- $K_{ST}$  = Le paramètre d'instabilité de l'enzyme réduisant le temps de travail et entraînant une chute progressive de l'activité enzymatique. Les conditions de réactions influence principalement ce terme, notamment la température, le pH, et la teneur en extrait enzymatique.
- $K_{CO}$  = Coefficient de consommation des GLVs par les enzymes parasites, présentes dans la source d'activité HPL. Après leur synthèse, les GLVs peuvent être métabolisés par des enzymes contaminant les extraits ou les feuilles de betterave. La proportion de ces enzymes varie en fonction de la saison et de la quantité de ressources enzymatiques ajoutée.
- $K_{FG}$  = Paramètre qui illustre l'extraction en continu des GLVs par flux gazeux, et qui réduit ainsi le phénomène de consommation des GLVs produits.
- $K_{AD}$  = Coefficient décrivant l'impact de l'utilisation des ajouts dosés en substrats permettant de réduire les phénomènes d'inhibition de l'enzyme

### 8.3.3.2. Description et optimisation de la réaction de synthèse des GLVs

Le procédé industriel, établi ci-après (Figure 69), inclut les adaptations réalisées au cours de ce travail. La synthèse des GLVs est réalisée sous forme d'une série de réactions successives dans un bioréacteur agité, après chaque réaction les GLVs sont extraits de manière à saturer le piège à froid et le système d'extraction sur résine en GLVs. Ces deux sources de GLVs sont ensuite combinées avant d'être purifiées par distillation. Le système de production est illustré ci-dessous avec la description des valeurs appliquées aux paramètres de réaction selon les conditions expérimentales.

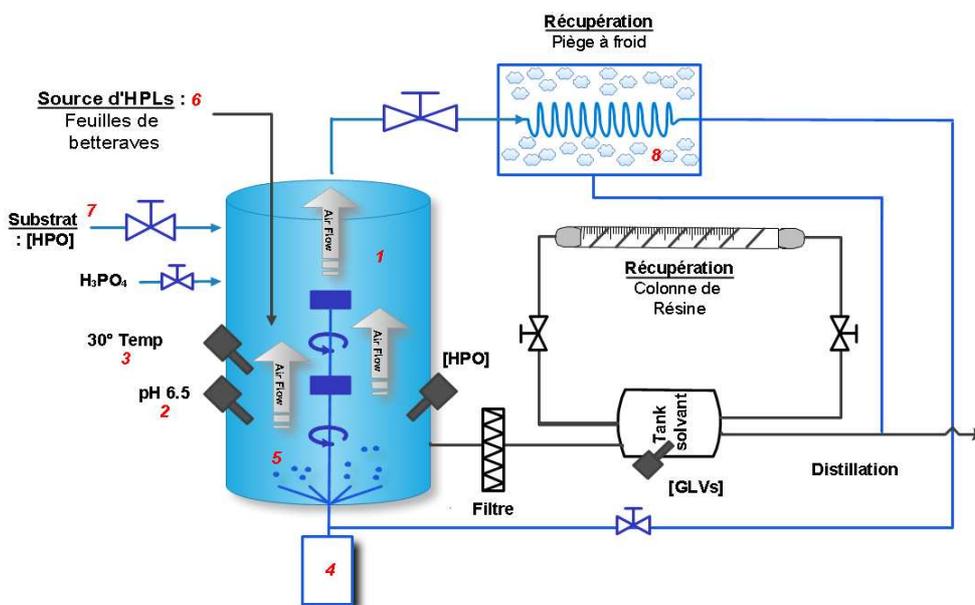


Figure 69: Synthèse des GLVs en bioréacteur optimisé

Paramètres	Valeur
1. Temps de réaction	La durée de la réaction est fixée au moment où la production de GLVs est nulle (c.-à-d. lorsque les facteurs $K_{SY}$ et $K_{CO}$ s'équivalent). Le temps de réaction est adapté au volume du bio-réacteur et à l'instabilité de l'HPL. Dans nos expériences, il est modifié selon le volume utilisé : 2L - 3 min. ; 100 L - 30 min.
2. pH	Le pH dans le milieu de réaction est fixé entre 6,5 et 6,7, ce qui équivaut au pH optimum de l'HPL de betterave. Au terme de la synthèse, le pH est réduit à 2 afin de stopper les réactions enzymatiques, bloquant à la fois la synthèse des GLVs ainsi que leur dégradation.
3. Température	L'augmentation de la température accroît le facteur $K_{FG}$ mais réduit $K_{SY}$ et augmente $K_{ST}$ . Lors de nos expériences, la température de réaction est fixée à 30 °C, cette valeur est adaptée pour obtenir un taux d'extraction des aldéhydes acceptable par flux d'air et une activité HPL suffisante.
4. Agitation	Un coefficient $K_{IN}$ faible correspond à un milieu homogène. L'agitation est élevée de manière à conserver une homogénéité optimale dans le bioréacteur. Elle est fixée à 900RPM (2L) et 250RPM (100L) pour éviter des phénomènes de cavitation.
5. Débit d'air	L'augmentation de ce paramètre accroît $K_{FC}$ . L'air extrait les GLVs, le débit est fixé à 10vvm pour les 2 L, et à 4vvm pour les 100 L, ces valeurs ont été fixées à la suite d'expériences de caractérisation, elles sont optimales, mais nécessitent parfois d'être adaptées aux contraintes matérielles.
6. Teneur en enzyme	L'apport en feuille accroît $K_{SY}$ mais également $K_{CO}$ . Plus la teneur en enzymes est importante plus la synthèse d'aldéhydes est élevée même si au-delà de 0,8UE/ml les gains sont peu importants. Toutefois ce n'est pas forcément le cas lorsque la teneur en HPL dans les feuilles est faible et contaminée par la présence d'enzymes parasites dégradant les GLVs ou les HPOs. Par conséquent, l'apport de feuilles est limité à 20 % du volume du réacteur, cette valeur évite l'apparition de contraintes de viscosité trop importante lors de l'opération de mélange.
7. Teneur en substrat	La gestion du substrat est capitale pour obtenir un $K_{IN}$ minimum et un $K_{SY}$ et un $K_{AD}$ très élevé. La teneur finale en substrat cumulant les ajouts dosés au cours de la réaction est comprise entre 2 et 15 mM avec un optimum à 10 mM pour les mesures obtenues en 2L et 100L.
8. Le piège à froid	La température du piège à froid est fixée à -70 °C, et son volume est dimensionné pour être adapté au débit gazeux injecté dans le bio-réacteur.

Tableau 24 : Optimisation des paramètres de la synthèse des GLVs

### 8.3.3.2.3. Résultats et comparaison à la littérature

La capacité de production maximale obtenue avec ce procédé industriel est de 3,46 mM en bioréacteur de 2L et 1,37 mM en 100L. Ces concentrations sont inférieures à celles retrouvées dans la littérature (Tableau 25), mais dans notre cas, les volumes de travail sont beaucoup plus élevés :

	Plante	Vol. (ml)	Isomère	Temps de réact (min)	Prod. Alim.	Prot. Recomb.	Capacité de production (mM)
Nemeth (2004)	Poivron	4	(2E)-/(3Z)-hexenal	10	oK		9,5
Rebhock (1998)	Pois	5	(2E)-/(3Z)-hexenal	10			10,61
Noordermeer (2002)	Luzerne	N/A	(2E)-/(3Z)-hexenal	N/A		oK	2,15
Marczy (2002)	Epinard	N/A	Hexanal	60			12,2
Gigot (2011)	Betterave	1000	(2E)-/(3Z)-hexenal	2	oK		3,46
Gigot (2011)	Poivron	1000	(2E)-/(3Z)-hexenal	10	oK	oK	6,35
Gigot (2011)	Betterave	50000	(2E)-/(3Z)-hexenal	30	oK		1,37

Tableau 25 : Récapitulatif des essais de synthèses de GLVs développés dans ce travail et dans la littérature. Le détail comprend l'auteur, l'organisme végétal, le volume de la production de GLVs, les isomères produits, le temps de réaction, la compatibilité avec le codex alimentarius, l'utilisation de protéines recombinantes ainsi que la capacité de production.

De plus, à l'exception des productions de Nemeth, les différents procédés ne sont pas adaptables en vue d'une synthèse d'arômes naturels pour le marché des produits alimentaires. En effet, ces procédés utilisent avec un détergent, le triton X-100, afin d'extraire l'enzyme de la membrane ; ce produit est prohibé dans l'industrie alimentaire. Dès lors, les résultats obtenus à l'aide de notre système de production sont prometteurs sachant que la source d'enzyme HPL, ne subit pas d'extraction enzymatique préalable, mais est simplement utilisée broyée le plus finement possible.

#### **8.3.3.2.4. Optimisations envisageables du procédé décrit**

- *L'utilisation de feuilles contenant une activité enzymatique supérieure* : Les auteurs ont montré dans la littérature que l'influence d'une teneur plus élevée que 0,8UE/ml (par rapport à 0,6UE/ml) apportait de légers gains de capacité de production (Nemeth et al. 2004). Néanmoins, une solution disposant d'un niveau en enzymes plus élevé peut être utilisée avec des teneurs en substrats supérieures à 10mM et ainsi augmenter la capacité de production. Selon les contraintes réactionnelles (200 g de feuilles/L au maximum) et la teneur optimale en HPL dans la feuille (10UE/g), le taux maximum d'activité disponible au sein d'un bio-réacteur peut atteindre 2UE/ml. Cette valeur peut apporter des gains considérables au niveau de la capacité de production.
- *L'extraction de l'HPL* : HPL est une enzyme membranaire, en l'absence d'extraction, l'enzyme est peu accessible pour le substrat et cette accessibilité dépend essentiellement de l'efficacité du broyage des feuilles. L'utilisation de la technique développée par Husson et Berger (2002) relative à l'extraction d'HPL de la membrane du chloroplaste en l'absence de détergent peut augmenter la capacité de production du procédé tout en respectant les normes agroalimentaires relatives à la production de substances aromatisantes naturelles. Toutefois, cette méthode est difficile à envisager pour des volumes supérieurs à 10 ml.
- *L'étude de l'hydrodynamique des bioréacteurs* : La vitesse de la réaction de clivage des 13-HPOTs par l'HPL est très élevée. À ce titre, l'efficacité de l'opération de mélange revêt beaucoup d'importance afin de favoriser une réaction rapide et complète. L'importance de l'hydrodynamique est mise en évidence par la chute de rendement due à l'augmentation de volume du bio-réacteur.
- *Un système de dispersion d'ajouts de substrats* : scinder l'ajout de substrat en différents endroits du bio-réacteur va réduire l'apparition de gradient de concentration autour de la zone d'ajouts et augmenter la capacité de production.
- *L'inhibition spécifique des autres hydroperoxydases (essentiellement l'AOS)* : actuellement aucune molécule spécifiquement inhibitrice n'a été découverte (excepté des molécules de synthèse très coûteuse), de même l'application de conditions de réaction favorisant spécifiquement l'HPL n'est pas réalisable. Néanmoins, l'application de stimuli au niveau de la plante vivante peut modifier l'expression des enzymes impliquées dans la dégradation des HPOs et ainsi réduire la proportion d'AOS présente dans la feuille.
- *Production de (3Z)-hexénol* : ce composé volatil est le GLV le plus valorisé au sein du monde industriel, il est stable et présente un pouvoir aromatisant élevé. Sa synthèse est réalisée en poursuivant la transformation biocatalytique de (3Z)-hexénal en alcool à l'aide d'ADH extraite de *S. cerevisiae*. Plusieurs auteurs ont déjà montré la faisabilité de la combinaison de ses deux réactions métaboliques au sein d'une seule étape de synthèse.

#### **8.3.3.3. Downstream-processing des GLVs**

L'extraction des GLVs du bio-réacteur est une étape délicate connaissant la faible quantité de produits synthétisés. Afin de maximiser les rendements, deux techniques d'extraction sont combinées. La première est une extraction classique des GLVs produits sur une résine échangeuse d'ions adaptée à l'épuration des eaux : la résine Macronet de chez Purolite déjà évoquée dans la littérature (Noordermeer 2002). La seconde est l'entraînement gazeux des GLVs par un flux d'air injecté dans le fermenteur, cette méthode permet d'extraire les arômes en continu et de les

condenser dans un piège à froid afin de réduire leur disparition du milieu de réaction. Cette technique d'extraction récupère environ 67 % des GLVs d'une solution de 10mM en 10 minutes avec un débit gazeux optimal (environ 8vvm). Dans le cadre de la synthèse de GLVs, cette méthode concerne 47 % des arômes recueillis en fin de procédé. La seconde méthode d'adsorption sur résine récoltant 53 % après une élution de la MN-202 à l'aide d'éthanol. Le taux de GLVs extrait de la solution de production atteint 93,5 % à l'aide de cette méthode combinée. Les solutions extraites du piège à froid et de l'élution de colonne sont couplées et envoyées vers la distillation. Dans ce travail, nous avons démontré que la distillation d'un mélange éthanol/intermédiaires de réactions/GLVs est réalisable sans perte de plus de 5 % des produits aromatiques. Nous disposons donc de méthodes d'extraction et de purification efficaces et adaptables à des volumes élevés de production.

#### **8.3.3.4. Gestion des déchets du procédé industriel**

Le système de production suggéré génère peu de déchets. L'air injecté pour l'extraction par flux gazeux est recyclé pendant la réaction et continuellement réinjecté dans le bio-réacteur. L'éthanol qui contient les GLVs après l'élution est collecté pendant la distillation et également réutilisable. Par contre, le milieu de réaction débarrassé des molécules volatiles doit être éliminé. Les débris de feuilles de betteraves peuvent être chaulés afin d'être amenés à un pH basique avant de servir d'amendement pour les cultures, d'ailleurs la valeur nutritive vis-à-vis du sol n'est pas altérée lors du procédé de production.

#### **8.3.4. Synthèses à l'aide d'HPLs recombinantes**

L'utilisation d'HPLs recombinantes issues du génie génétique a également été envisagée dans la littérature avec un succès relatif. Ce système entraîne des manipulations supplémentaires afin de bénéficier d'enzymes stables, mais supprime les contraintes d'utilisation de végétaux issus de grande culture, à savoir la dépendance de la saison et la disponibilité. Les enzymes HPLs ont été produites au sein de vecteurs d'expression procaryotes ou eucaryotes permettant d'atteindre des niveaux d'activité élevés. Ces enzymes recombinantes sont débarrassées d'activités parasites consommatrices de substrats ou de produits de réactions. Néanmoins, elles restent sensibles à l'inhibition vis-à-vis du substrat. Leur stabilité est leur second avantage, celle-ci est légèrement accrue par la suppression d'une séquence N-terminale influençant l'expression et la stabilité de l'enzyme (Howe et al. 2000). Dans le cadre de nos expériences, l'enzyme *BvHPL*, extraite du génome de la betterave, a été produite au sein d'un microorganisme procaryote : *E. coli*. Le taux d'enzyme produit atteint 11,24 UE/ml après 48 h de culture. Après récupération, ces enzymes (0,8UE/ml) sont utilisées pour la synthèse de GLVs avec une capacité de production de 5,50 mM. Ces chiffres sont supérieurs aux résultats obtenus avec l'HPL de feuilles de betteraves (3,74 mM). L'utilisation de protéine recombinante augmente donc sensiblement la capacité de production. L'utilisation des gènes *OepHPL* (*Olea europea*), *BvHPL* (*Beta vulgaris*) et *CaHPL* (*Capsicum annuum*) afin de constituer une source d'HPL recombinante plus efficace a permis d'évaluer l'influence du choix de la séquence exprimée. Ces trois enzymes présentent entre elles une homologie élevée, et une activité enzymatique spécifique des 13-HPOs. Toutefois, l'activité dérivant des clones *OepHPL* est faible tandis que l'activité des clones *BvHPL* et *CaHPL* (jusqu'à 23,15 UE/ml) dépasse largement l'activité disponible dans les feuilles de betteraves. Les productions de GLVs en bioréacteur de deux litres à l'aide de ces deux clones sous forme de solution enzymatique (enzymes sous forme extraites ou non extraites) à 0,75 UE/ml représentent une capacité de production moyenne supérieure (6,35mM pour l'enzyme de *Capsicum annuum* légèrement plus stable que l'enzyme exprimée du génome de la betterave). D'un point de vue industriel, l'utilisation des HPLs recombinantes est une avancée prometteuse par rapport à l'utilisation des HPLs natives extraites de feuilles ; sachant que la législation sur la synthèse des substances aromatisantes naturelles est favorable quant à l'utilisation de protéines recombinantes

dans le procédé de production. Néanmoins, dans le cadre de la synthèse d'arômes destinés au secteur agroalimentaire, l'extraction des enzymes du microorganisme à l'aide de détergent pose problème, car la plupart des produits tensioactifs et déstabilisants des membranes sont prohibés pour la production d'aliments. Pour les produits alimentaires, les enzymes recombinantes devront être utilisées sans extraction préalable réduisant le niveau enzymatique de plus de 80 % (environ 3 UE/ml). Également, les productions de protéines recombinantes nécessitent l'emploi d'antibiotiques (pour maintenir la pression de sélection des clones) et d'inducteurs très coûteux. Enfin les manipulations supplémentaires engendrées par l'utilisation de cette technique pèsent également dans la balance.

### 8.3.5. Exploitation des résultats

Dans le cadre de l'élaboration d'un procédé de synthèse d'arômes naturels alimentaires, la rentabilité du procédé est capitale. Une évaluation des coûts de production est réalisée ci-dessous et disponible en annexe 5. Cette estimation concerne une entreprise travaillant à pause avec huit employés, celle-ci produit quotidiennement 22,5 kg de (2E)-/(3Z)-hexéanal. Au total, 6,4 tonnes de feuilles de betteraves sont nécessaires pour cette production (Tableau 26). Elle est réalisée dans une cuve de 5m<sup>3</sup> avec un rendement de 13,67 % pour la production des GLVs (équivalent à celui de l'échelle pilote). Les détails relatifs à chaque section sont disponibles en annexe.

Étape de Synthèse	Coûts journaliers (€)
Achat et traitement des feuilles de betteraves	714
Hydrolyse de la matière grasse	1286
Oxygénation de la matière grasse	528
Production de GLVs	546
Extraction purification	350
Distillation	1473
Personnel et dépense diverse	2678
Production de GLVs quotidienne (kg)	22.5

Tableau 26 : Évaluations des coûts des étapes de productions selon la teneur en GLVs produites par jour dans une entreprise travaillant 24 heures.

L'estimation des coûts s'élève à environ 7100 euros par jour pour la production de 22,5 kg de (2E)-/(3Z)-hexéanal et de 1 à 2 kg d'hexanal. Ce qui équivaut à 315 € de coût de production par kilo de GLVs dans une entreprise tournant à plein régime et disposant des technologies précédemment décrites. La valeur de 1 kg de (2E)-/(3Z)-hexéanal varie à l'heure actuelle sur le marché mondial entre 450 et 850 € selon la pureté. Ces valeurs garantissent un bénéfice suffisant pour la production d'arômes à grande échelle. Basé sur ces calculs, le développement d'un procédé industriel de production de GLVs (à une échelle de plusieurs m<sup>3</sup>) à partir d'huile de lin et de feuilles de betterave est envisageable, si les arômes produits peuvent être écoulés sur le marché.

---

## 9. Perspectives

---

### 9.1. L'extension du procédé industriel envisageable à d'autres substrats végétaux ?

Le procédé décrit au cours de ce travail est centré sur l'utilisation des feuilles de betterave, sous-produits de l'industrie betteravière. Toutefois, le procédé industriel développé est adaptable à d'autres végétaux, dans la mesure où ceux-ci sont largement disponibles à faibles coûts. La condition essentielle est de bénéficier de haute teneur enzymatique en HPL, le choix des substrats et des réactifs est ensuite adapté selon la spécificité de l'enzyme. Les conditions d'extraction et de purification sont également adaptées à la nature du GLV produit. Au niveau des installations et du matériel, le système est totalement transposable à d'autres ressources végétales.

Culture agricole	Superficie (h)
Pomme de terre	66734
Betterave	85527
Chicorée	15402
Pois	9374
Mais (épis)	5584
Prairie	201282

Tableau 27 : Surfaces cultivées de différentes espèces végétales en Belgique pouvant intégrer le processus industriel décrit dans ce travail.

En Belgique, les feuilles de différentes cultures sont actuellement peu valorisées et constituent une réserve importante de sous-produits principalement recyclée dans l'alimentation animale ou dans la fertilisation des sols. Le tableau ci-dessus reprend les cultures agricoles constituées d'un feuillage abondant non valorisé pouvant contenir de hautes activités HPL (Tableau 27). D'autres cultures de plantes moins répandues peuvent également être envisagées.

### 9.2. L'instabilité de l'HPL : un obstacle incontournable ?

L'instabilité de l'enzyme ampute considérablement la bio-transformation industrielle condamnant le producteur à réduire la durée de la production enzymatique. Actuellement, des recherches approfondies sont menées au sujet de la biochimie de l'HPL. Les mécanismes entourant l'inhibition irréversible de l'enzyme par son substrat sont en effet toujours mal connus. Cependant, les hypothèses de la déstabilisation du site actif par des intermédiaires réactionnels radicalaires ou par des associations irréversibles au substrat semblent les plus acceptables, mais ces hypothèses ne sont pas validées et des observations contradictoires ont été obtenues à ce sujet. Également, la nature du détergent extracteur est potentiellement liée à l'instabilité de l'enzyme extraite. Des solutions viables d'un point de vue industriel doivent être mises en œuvre afin de contrecarrer ce manque de stabilité. Jusqu'à présent seules des conditions d'extraction coûteuses, fastidieuses et protégées par un brevet permettent de contourner cette difficulté et de disposer de stocks d'enzymes stables pendant plusieurs semaines.

### 9.3. HPLs recombinantes : l'avenir de la production d'arômes GLVs naturels ?

Les niveaux d'activités enzymatiques obtenus avec les vecteurs d'expression sont plus élevés que ceux mesurés dans les organes de végétaux. Au cours de nos expériences d'expression, à l'aide de la souche *E. coli* M15 nous avons pu atteindre 23,15UE/ml (par rapport à 11,21UE/g dans les

feuilles de betteraves). Ces résultats élevés sont confirmés par différentes publications concernant l'expression d'HPL dans les vecteurs procaryotes. Par extrapolation d'échelle, les taux de production de GLVs à l'aide de ce procédé de synthèse sont compris entre 5,67mM et 6,31 mM selon le degré d'optimisation (3,71 mM à l'aide du substrat végétal). Toutefois, l'utilisation de cette source brute d'HPL nécessite l'usage de détergents pour l'extraction de l'enzyme. Dernièrement, afin de contourner ce problème, différents auteurs ont cloné le gène HPL dans des vecteurs eucaryotes *Pichia pastoris* et *Yarrowia lipolytica*. Les protéines clonées adjointes d'un court peptide d'excrétion sont synthétisées extra-cellulairement. Cependant, lors de ces expériences seules des activités faibles (1,8UE/ml) sont obtenues. Néanmoins, grâce à l'émergence d'outils génétiques de plus en plus performants, la production d'HPLs non membranaires par des microorganismes eucaryotes reste la solution alternative la plus adaptée aux problèmes posés par la synthèse de GLVs via une activité HPL. Cette technique peut s'affranchir des principaux problèmes observés lors des expériences de production d'arômes.

- Aucune activité hydroperoxydase différente de HPL n'est synthétisée par les vecteurs génétiques. Les HPOs seront donc exclusivement dégradés en vue de la synthèse de GLVs.
- La consommation des aldéhydes au sein de voies métaboliques alternatives sera supprimée, les microorganismes ne produisant pas d'enzymes stimulant la dégradation de ces molécules.
- L'enzyme native, sécrétée active dans le milieu de culture, possède une instabilité réduite. Elle peut être stabilisée par le peptide excréteur et garder son activité de manière prolongée.
- En l'absence de reconsumption des aldéhydes produits et avec une instabilité réduite, un fed-batch adapté à la sécrétion progressive des enzymes est adaptable. L'inhibition d'HPL par son substrat peut être ainsi réduite.

Toutefois, les manipulations sont plus complexes avec la nécessité de développer une culture cellulaire, celle-ci peut être menée simultanément lors de la production d'arômes dans le même bio-réacteur. La température et le pH optimal de culture sont compatibles avec l'activité HPL, la transformation peut être réalisée en une seule étape, seules des précautions doivent être prises au sujet de la sortie des gaz utilisés pour la croissance cellulaire. Ceux-ci peuvent contenir des GLVs qui peuvent être collectés par condensation du flux d'air contenant les molécules aromatiques.

#### **9.4. Quelle dimension de scale-up pour la production de GLVs ?**

À partir de substrats peu coûteux, les possibilités de scale-up sont élevées. Toutefois, il faut tenir compte des contraintes hydrodynamiques importantes se développant à grande échelle. L'augmentation de volume implique également un scale-up des opérations de traitement de la matière première. Dès lors, la première difficulté sera de disposer d'un apport suffisant en feuilles de betteraves et de disposer notamment d'une zone de stockage avec des conditions optimales. Le broyage des feuilles doit être dimensionné en fonction de la quantité de feuilles nécessaires à la réaction. Par exemple, si le volume utile du fermenteur est de 3m<sup>3</sup>, il faut 2.400.000 UE à un niveau de 10 UE/g de feuilles (dans des conditions optimales), c'est-à-dire 240 kg de feuilles pour chacune des réactions de production de GLVs. Le dimensionnement des étapes d'extraction et de purification doit être également ajusté, la production nécessitant un distillateur de grand volume. Enfin, l'étude de l'hydrodynamique des réacteurs est capitale afin de gérer l'addition de substrat au sein du bio-réacteur et d'éviter l'apparition de gradients de concentration trop importants.

# Rappel des publications

---

## Articles scientifiques :

Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.-L., Wathelet, J.-P., Muhovski, Y., du Jardin P. & Thonart, P. (2010). Production of green leaf volatiles using sugar-beet as novel and natural source of HPLs. *Process Biochemistry*. Submitted.

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 volatile. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(3), 451-460

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(6), 1115-9.

## Posters et présentation orale :

Gigot, C. (2009, December 16). *Development of a biotransformation process of hydroperoxides into natural green leaf volatiles using sugar beet leaves*. Paper presented at Journée de réflexion : "génie des procédés appliqué aux bio-industries", Gembloux, Belgique.

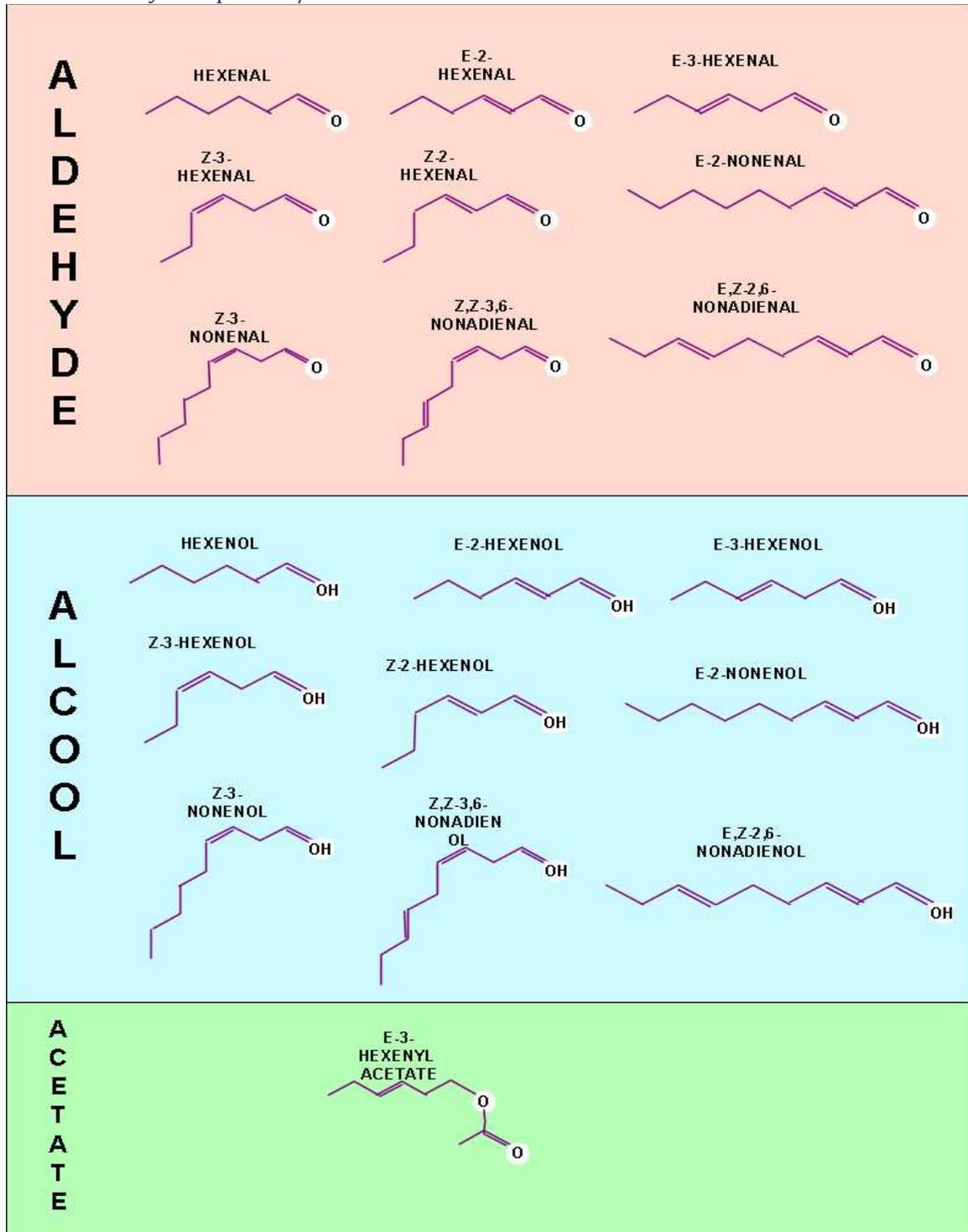
Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.-L., Wathelet, J.-P., du Jardin, P., & Thonart, P. (2009, June 02). *Pilot scale biotransformation of vegetal oil into natural green note flavor using sugar beet leaves as sources of hydroperoxide lyase*. Paper presented at Regulatory Oxylipins : an international symposium, Lausanne, Suisse.

Gigot, C., Rabetafika, H.-N., Fauconnier, M.-L., Destain, J., Ongena, M., Aldric, J.-M., Wathelet, J.-P., du Jardin, P., & Thonart, P. (2008). *Sugar beet leaves valorisation through green notes production from linseed oil*. Paper presented at 30th Symposium for Biotechnology on Fuels and Chemicals, Denver, USA.

Rabetafika, H.-N., Gigot, C., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Destain, J., du Jardin, P., Thonart, P., & Wathelet, J.-P. (2007). *Sugar beet leaves as source of lyase in bioprocess producing green note aldehydes*. Paper presented at - Ghent, Belgium.

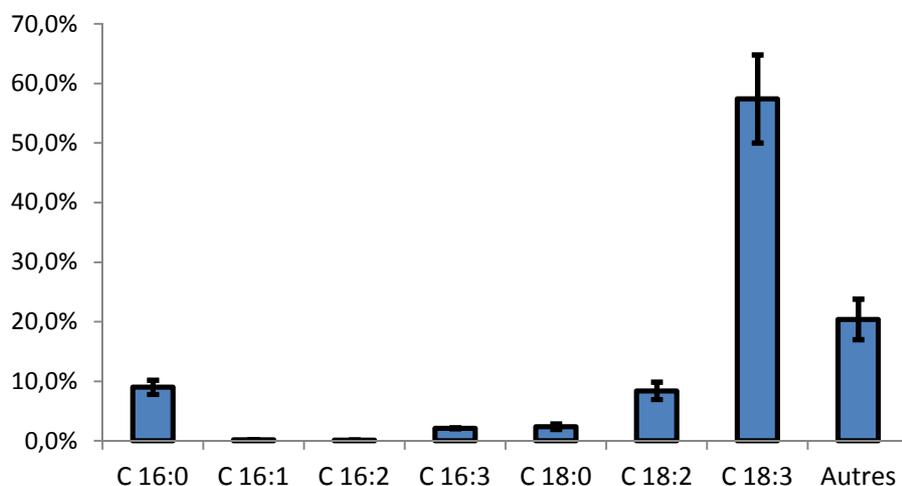
# Annexes

Annexe 1 : Formule développée de l'ensemble des GLVs qui peuvent être produits au travers de la voie enzymatique LOX/HPL.

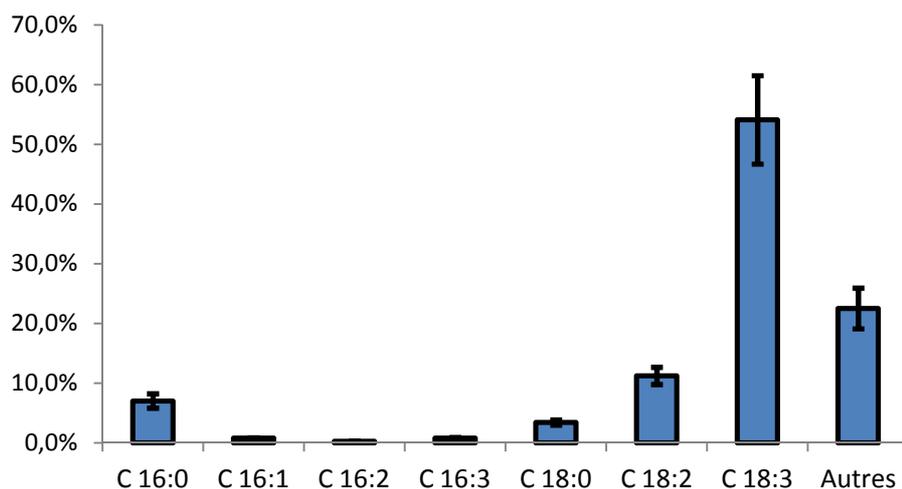


Annexe 2 : Profil en acides gras des différentes classes de lipides (diglycérides, triglycérides, lipides polaires et acides gras libres) isolées de la matière grasse de la feuille de betterave.

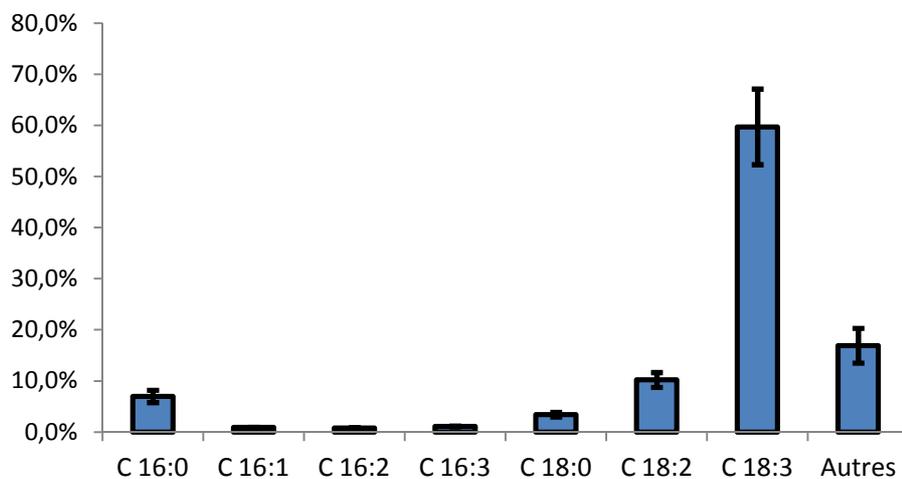
1. Galactolipides - Triglycérides



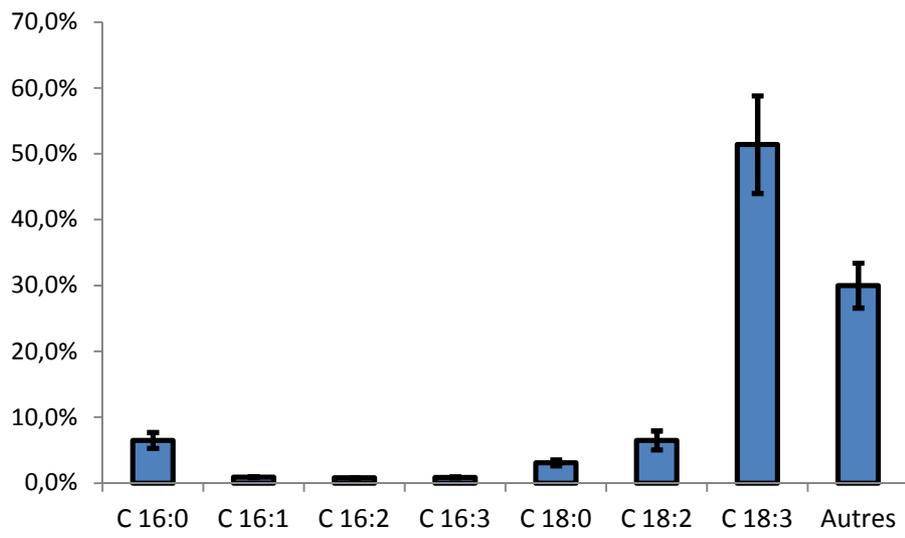
2. Diglycérides



3. Acides gras libres

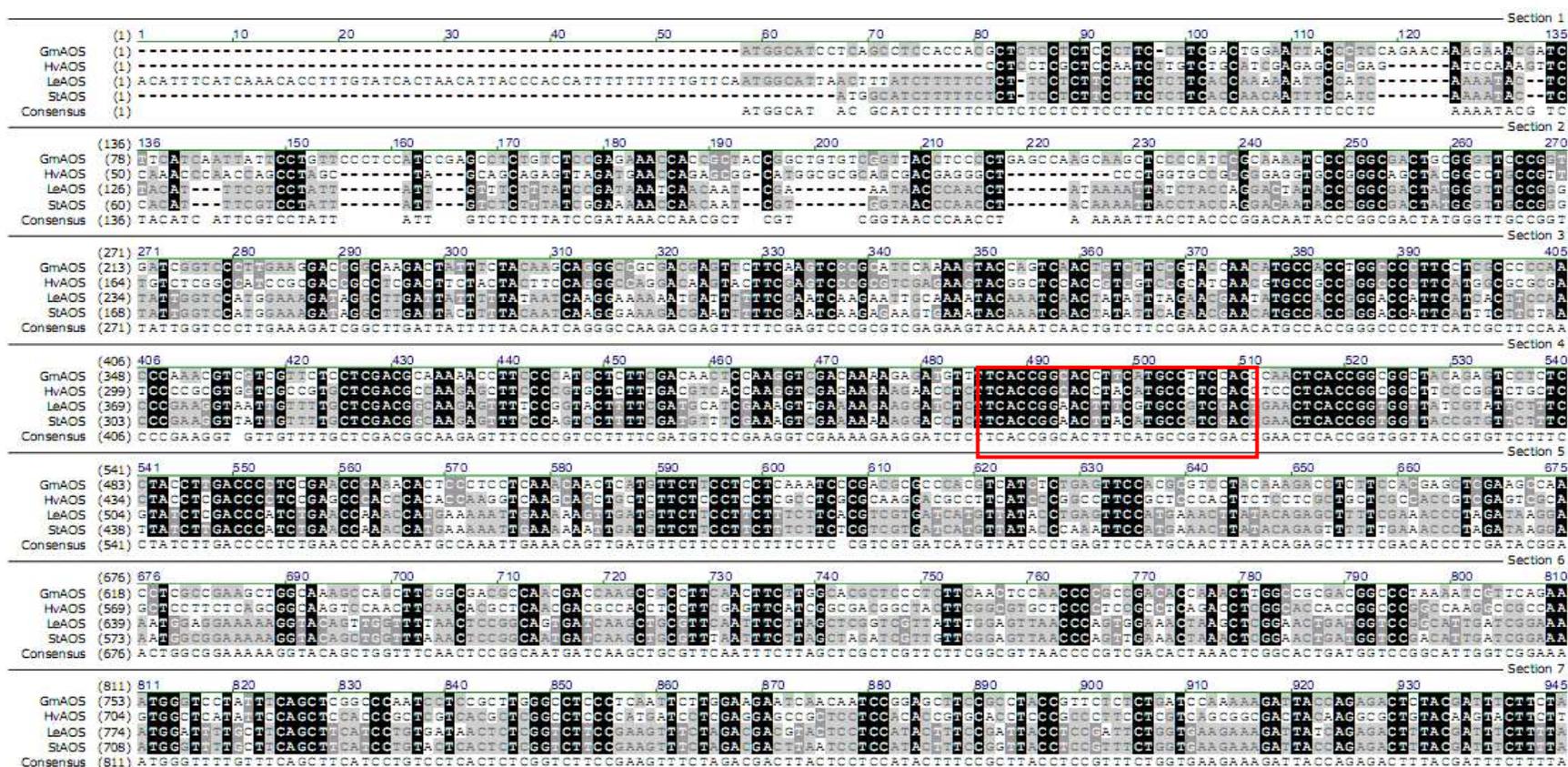


#### 4. Lipides polaires



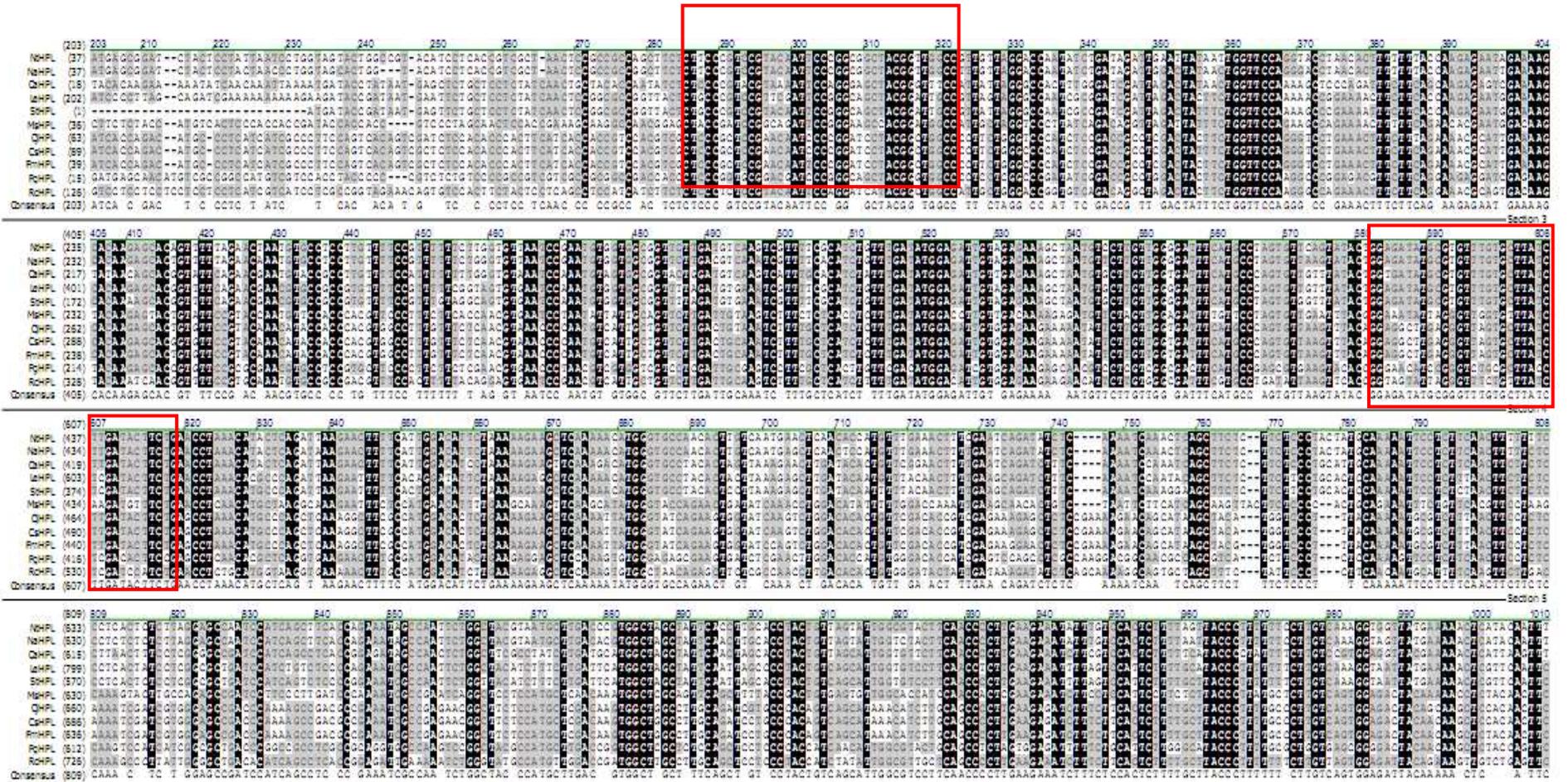
Annexe 3 : Alignement de séquences connues de AOS/HPL, sélection des zones avec des taux d'homologie élevés et construction des amorces dégénérées en vue de la détection des gènes (GmAOS : Glycine max , HvAOS Hordeum vulgare, LeAOS Lycopersicum esculentum ; StAOS : Solanum tuberosum, NtHPL :Nicotiana tabacum ; NaHPL : Nicotiana attenuata ; CaHPL : Capsicum annuum ; LeHPL : Lycopersicum esculentum ; StHPL : Solanum tuberosum ; MtHPL : Medicago truncatula ; CjHPL : Citrus jambhiri ; Cs : Citrus sinensis ; Fm : Fortunella margarita ; Pg : Psidium guajava ; Rc : Ricinus communis)

- DGAOS-1 : 5'-TTCACCGMACYTWCRTGCCBTCSAC-3'
- DGAOS-2 : 5'-CAYAAYTYKVVTTTCGCYACYKKCTTCA-3'
- DGAOS-3 : 5'-TGAAGMMRGTRGCGAABRMARRTRTG-3'
- DGAOS-4 : 5'-TCCTTYCTBGCAAAYGGYTGGTAYCCG-3'



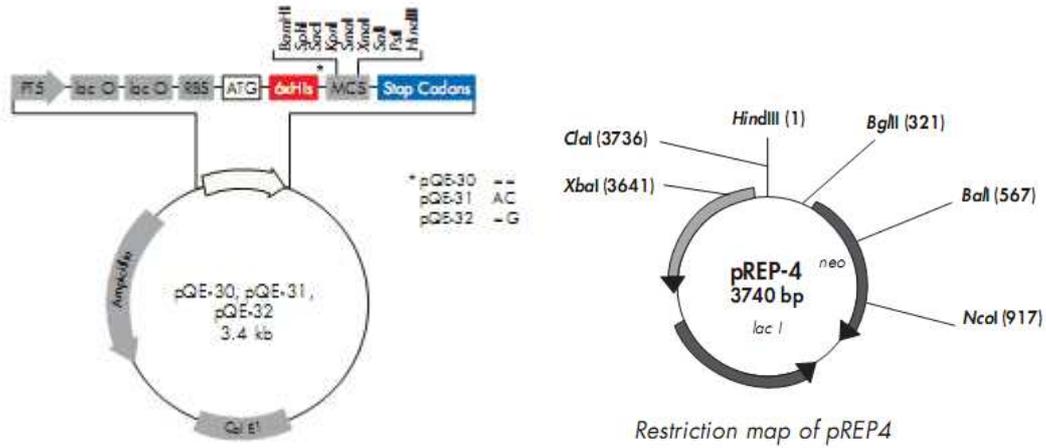


- DGHPL-5 : 5'-CCAAGAATGAATGAACAAAAGTTATG-3'
- DGHPL-6 : 5'-TAATTCAGCAATTCTTTCTTTTCG-3'





Annexe 4 : Le vecteur pQe-31 comprenant la séquence BvHPL ainsi que le plasmide pREP-4 sont introduits dans la souche *E. coli* M15. Les constructions de ces deux plasmides sont reprises ci-dessous ainsi que le gène BvHPL cloné dans pQe-31 avec sa traduction protéique.



1	CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTAATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA
	KpnI ~~~~~
+1	Met Arg Gly SerHis His HisHis His HisThr Asp ProHisAla Ser SerVal Pro AlaAlaPro
91	TTCATTAAG AGGAGAAATT AACTATGAGA GGATCTCACC ATCACCATCA CCATACGGAT CCGCATGCGA GCTCGGTACC TGCCGCTCCG
+1	HisThrPro Gly TrpHis Gly PhePro Ile LeuGlyPro Ile GlyAsp Arg LeuAan Tyr ThrTrpPhe Gln Gly Gln Asp ThrPhe
181	CACACTCCCG GGTGGCATGG CTTCCTATT CTCGGGCGGA TAGGGATAG GCTAAATTAC ACTTGGTTCC AAGGGCAAGA CACTTCTTT
+1	Arg Lys Lys Met AspThr Tyr Lys Ser Ser ValPheArg Thr Aan Ile Pro ProCysPheProPhePhe Ile AspVal Aan ProAanVal
271	AGGAAAAAAA TGGACACATA TAAGAGTAGT GTGTTTAGAA CCAATATACC TCCTTGTTTT CCTTCTTTA TCGATGTCAA CCCAAAAGTA
+1	Ile Ala Val Leu AspVal Pro SerPheSer HisLeuPhe Asp MetAsp Ile Ile Asp Lys LysAanVal Leu ValGly Aan PheMetPro
361	ATTGCTGTCC TTGATGTCC ATCTTTTCT CACCTTTTG ATATGGATAT CATTGATAAG AAGAAATGTC TTGTTGGAAA TTTTCATGCT
+1	SerThrLys Phe Thr Gly Asp Arg Arg Val Gly Val Tyr Leu AspThr Thr GluGlu Leu HisThrLys Val LysAan Phe AlaThrAsp
451	AGTACCAAGT TCACGGGGGA TAGGAGATT GGTGTGATC TTGATACAAC TGAGGAGCTA CATACTAAGG TTAAGAACTT TGCCACGGAA
+1	ThrLeuLys Arg AanSer Lys Val Trp Val SerSerLeu Leu ThrAan Leu AspThr Met TrpThrThr Ile GluGln Ser Ile SerLys
541	ACCTGAAGA GAAACTCTAA AGTATGGGTA TCTTCTTGT TAACAACTT GGACACCATG TGGACAACCA TTGAACAATC TATCTCCAAA
+1	AspLys Thr Ala AanLeuPheXxxProXxx GlnLysCysLeuPheAanPheLeuCysGln GlyMetLeuGly AlaAspPro IleAanTyr
631	GATAAAACTG CCAACTTGT CANCCCCNTA CAAAAATGCC TCTTCAACTT CCTTGCCAA GGAATGCTTG GAGCTGACCC TATAAATTAC
+1	SerLysGlu LeuCysGlu Thr GlyHis Val MetValAspLys TrpLeuAla Val GlnLeuLeuProIle Ile AanIle Gly IleLeuGln
721	TCAAAAGAAC TCTCGAACAC AGGTCAATGTT ATGGTGTGTA AATGGCTTGC CGTACAACCT CTACCCATTA TCAATATTGG TATACTCCAA
+1	ProPheGlu Glu IlePheLeuHisSerPheThrTyrPro Tyr LeuLeu Val LysGly Asp TyrGluLys LeuCysSerPheValSerLys
811	CCATTTGAAG AAATCTTCTT ACATTCTTC ACATACCCCT ATCTATTGGT TAAAGNGAT TATGAGAAAC TTTGTAGTTT CGTTTCGAAA
+1	GluAlaArg Glu Val Ile Glu ArgGly Lys SerGluPheGly LeuThr Glu GluAsp Ile Ile HisAan LeuLeuPheAan LeuGlyPhe
901	GAAGCTCGTG AAGTGATTGA ACGAGGTAAA TCCGATTTG GGTAAACAGA AGAAGATATC ATCCACAACCT TGCTATTCAA CCTTGGATTG
+1	AanAlaPhe Gly GlyPheSer IlePheLeuProAlaLeuLeuAanAanLeu ValLeuAanAanGlyAla Ile GlnGlu Val LeuArgLys
991	AATGCAATTTG GCGGGTTTTG GATTTTCTTG CTTGCATTGC TTAACAATCT AGTACTAAAC AATGGTGCAA TACAAGAAGT GTTGAGGAAA
+1	GluValArg Glu AanCysSerSerProSer SerLeuSerPheThrAla Ile GlnAspMet ProAanVal Gln SerPheVal TyrGluThr
1081	GAAGTGAGGG AAAATTGTAG CTCACCTTCA TCATTGAGTT TACTGCAAT TCAAGACATG CCTAATGTGC AATCATTCGT GTACGAAACA
+1	LeuArgLeu Lys ProProVal ProLeuGln TyrGlyArgAla ArgLysAapPheVal LeuGlnSerHisAapSerArgPheAspValLys
1171	CTAAGGTTAA AACCCCTGT ACCACTCAA TATGGGCGGG CAAGAAAGGA CTTTGTGTTA CAATCGCATG ATTCAAGATT TGATGTAAG
+1	LysGlyGlu LeuLeuCysGly TyrGln Thr LeuValMetArg AspProLys ValPheAapAspProGlu ThrPheValProAspArgPhe
1261	AAGGGTGAAT TGCTTTGTGG GTATCAACA CTTGTGATGA GGGATCCGAA GGTGTTTGAT GACCCGGAAA CGTTCTGTC GSAATCGGTT
+1	MetGlyGlu Lys GlyAspGlu LeuLeuAan TyrLeuPheTrpSerAanGly ProGlnAanAlaLysAla AspAlaSerAanLysGlnCys
1351	ATGGGCGAGA AGGGTGAATG ATTGTTGAAC TATTTGTTCT GTGCGAATGG ACCGAGAAT GGGAAAAGCTG ATGCATCAAA TAAGCAGTG
+1	AlaGlyLys Asp TyrVal ProPheThr AlaCysLeuPheLeuAlaAapLeuPheLeuArg TyrAapSer Ile ThrLeuAspSerSerGly
1441	GCAGGAAAAG ATTATGTTC TTTTACTGCA TGCTTGTGTT TGGCAGATTT GTTCTTACGA TATGATTCTA TAACGCTTGA TTACTCTGGG
	HindIII ~~~~~
+1	AlaIleThr GlyValGluLysAlaLys ***
1531	GCAATCACGG GAGTTGAGAA AGCTAAGTGA AAGCTAATT AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC AGTAATGACC TCAGAAGTCC

Annexe 5 : Simulation de bilan financier d'une PME produisant 22,5 kg d'aldéhydes quotidiennement et employant 8 personnes dans un horaire à pause. Les coûts journaliers sont calculés pour chacune des étapes du procédé. 6,4 tonnes de betteraves sont traitées quotidiennement, elles sont broyées et constituent 44,8 10<sup>E6</sup> UE d'activité HPL.

**Étape 1** : Récolte des feuilles de betteraves et manutention en vue d'une utilisation industrielle du matériel végétal afin de les incorporer dans les opérations de broyage et d'homogénéisation



<b>Feuilles de betteraves</b>			
<b>Récolte et Transport</b>			
Tonnage de feuilles (T/jour)	6,4		
Production feuille (T/ha)	45	Surface d'arrachage (ha pour 1T)	0,142
		Coût arrachage standard (€/ha)	350
		Coût d'arrachage (€/T)	50
		Supplément tapis effeuillage (€/ha)	35
		Supplément (€)	5
		Vitesse arrachage (ha/h)	0,9
		Durée arrachage (h)	0,12
Prix d'achat feuille (€/T)	15		
Transport (€/T)	10		
Prix d'achat usine (€/T)	80	Prix d'achat total (€)	510,4
<b>Manutention</b>			
Lavage (€/T)	5	Lavage (€)	32
Stockage (€/T)	2	Stockage (€)	12,8
Transport (€/T)	2	Transport (€)	12,8
<b>Broyage - Mixage</b>			
Prix du Broyeur (€)	50000	Amortissement (€/an)	10000
		Amortissement (€/j)	111
Durée (h/T)	0,5	Coût énergétique (€/T)	5,4
Coût broyage (€/j pour 6,4T)	146		
Teneur en HPL (10E6 UE/T)	7	Capacité de prod (HPL) (10E6 UE)	44,8
			<b>Coût total (€/J) 714</b>

**Étape 2 :** 830 kg d'huile de lin raffinée sont hydrolysés lors d'une réaction enzymatique menée dans une cuve de 3 m<sup>3</sup> pendant 24h à l'aide d'une lipase commerciale. À l'issue de cette réaction, environ 300 kg d'acide linoléique libre sera produit.

<b>Hydrolyse de la Matière grasse</b>					
<b>Huile à hydrolyser (kg/J)</b>	830				
<b>Matériel</b>					
Cuve d'hydrolyse-3m <sup>3</sup> (€)	120000	Amort. 5 ans (€/an)	24000	Amort. (€/j)	267
Centrifugeuse (€)	60000	Amort. 5 ans (€/an)	12000	Amort. (€/j)	133
<b>Coût des produits d'Hydrolyse</b>					
Huile de lin (€/kg)	0,97	Coût total huile lin (€/J)	805,1		
Lipase (€/j)	30				
Tampon pH 7 (€/j)	30				
Durée de réaction (h)	24	Rendement de réaction	95,00 %		
Température (°C)	37	Coût calorifique (€/J)	0,55		
<b>Purification</b>					
Centrifugation	20				
Durée (min)	5	Coût de centrifugation (€/j)	20		
		Rendement de récupération	70 %		
		Teneur en acide linoléique	55 %		
		Productivité (kg ac lin/j)	303,5		
					<b>Coût total (€/J) 1286</b>

**Étape 3 :** L'acide linoléique est ensuite oxygéné à l'aide de la LOX extraite de graine de soja. Cette oxygénation est réalisée en cuve de 200L, 16 fois par jour, le pH est fixé à 9,2 et la température à 4 °C, l'oxygénation est réalisée à l'aide d'air comprimé introduit dans le réacteur.

<b>Oxygénation Matière grasse</b>					
<b>Matériel</b>					
Cuve d'oxygénation-200L (€)	25000	Amort. 5 ans (€/an)	5000	Amort. (€/j)	56
Nombre de réactions/jour	10				

<b>Oxygénation "Air"</b>					
huile hydrolysée (kg)	310				
Soybean Seeds (kg)	150	Prix (euro/kg)	0,55	Coût (€/J)	83
		Broyage	1	Coût (€/J)	150
Tampon pH 9 (€/j)	25				
Air comprimé (vvm)	7,5	Volume total production (m <sup>3</sup> )	1		
		Volume air comprimé (m <sup>3</sup> )	300	Coût (€/J)	100
Durée de réaction	40	Rendement de réaction	55 %		
Température	2	Coût calorifique (€/J)	115		
		Productivité (kg OOH/j)	170,5		
<b>Coût total (€/J)</b>					<b>528</b>

**Étape 4 :** Les hydroperoxydes sont clivés par l'HPL contenue dans les feuilles de betteraves broyées, cette réaction est concomitante avec la précédente. Elle est réalisée en cuve de 5m<sup>3</sup> à pH 6,5 et à 30 °C. Les aldéhydes produits sont partiellement extraits de la solution par l'injection d'air comprimé

<b>Production de GLVs</b>					
Cuve d'hydrolyse-5m <sup>3</sup> (€)	150000	Amort. 5 ans (€/an)	30000	Amort. Quotidien (€/j)	333
Nombre de réactions/jour	16				
Feuilles de betteraves (T)	6,4				
OOH produit (kg)	170				
Acidifiant (€/J)	40	Rendement de réaction	13,2 %		
Durée de réaction (min)	60	Coût calorifique (€/J)	92,1		
		Productivité (kg NV/j)	22,5		
Injection air comprimé	0,4				
Volume air (m <sup>3</sup> /min)	1,2	Temps (min)	960		
Volume total (m <sup>3</sup> /J)	1152	Prix (€/J)	384		
Piège à froid (€/J)	30				
<b>Coût total (€/J)</b>					<b>546</b>

**Étape 5 :** Les aldéhydes restant en solution sont extraits de la solution par adsorption sur une résine hydrophobe, ils sont ensuite élués à l'éthanol et combinés avec les aldéhydes récoltés au sein du piège à froid. Ce jus de production est distillé afin de constituer un mélange aromatique pur à 95 %.

<b>Extraction et Purification</b>					
<b>Filtration</b>					
Filtration (€/j)	50	Coût énergétique (€/j)	25		
<b>Extraction sur colonne</b>					
Résine (kg/J)	100	Prix (€/kg)	2,14		
		Coût résine (€/J)	214	Recyclage (€/j)	21
Éluant (kg)	100	Prix (€/kg)	0,4		
		Coût éluant (€/J)	40		
<b>Distillation</b>					
<b>Matériel</b>					
Distillateur industriel	40000	Amort. 20 ans (€/an)	2000	Amort. (€/J)	22,22
<b>Coût énergétique (€/j)</b>					
Distillation (Chauffage kg/éluant)	0,22	Distillation (Chauffage €/J)	22,4		
Distillation (Évaporation kg/éluant)	14	Distillation (Évaporation €/J)	1432,2		
<b>Coût total (€/J)</b>					<b>1827</b>

**Étape 6 :** Cette PME fonctionne avec 9 membres d'un personnel travaillant à pause, 3 équipes de 3 personnes se succèdent pendant les 90 jours de travail possible.



<b>Personnel et coûts divers</b>				
Charges financières (€)	5000	Coût (€/j)	13,6986301	
Packaging (€)	2000	Coût (€/j)	5,47945206	
	<b>Rémunération mensuelle (€)</b>	<b>Nombres de travailleurs</b>	<b>Coûts mensuels (€)</b>	<b>Coûts journaliers (€)</b>
Techniciens	26000	7	182000	2022
Chef Technicien	28000	1	28000	311
Ingénieur	33000	1	31000	344
<b>Coût total (€/J)</b>				<b>2678</b>

# Bibliographie

---

- Afitlhile M., Fukushige H., McCracken C. et Hildebrand D. (2005). Allene oxide synthase and hydroperoxide lyase product accumulation in *Artemisia* species. Plant Science, **169** (1): 139-146.
- Akacha N.B., Boubaker O. et Gargouri M. (2005). Production of hexenol in a two-enzyme system: kinetic study and modelling. Biotechnology Letters, **27** (23-24): 1875-1878.
- Andreou A. et Feussner I. (2009). Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. Phytochemistry, **70** (13-14): 1504-1510.
- Arimura G., Kost C. et Boland W. (2005). Herbivore-induced, indirect plant defences. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, **1734** (2): 91-111.
- Arimura G., Matsui K. et Takabayashi J. (2009). Chemical and Molecular Ecology of Herbivore-Induced Plant Volatiles: Proximate Factors and Their Ultimate Functions. Plant and Cell Physiology, **50** (5): 911-923.
- Arimura G., Ozawa R., Horiuchi J., Nishioka T. et Takabayashi J. (2001). Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. Biochemical Systematics and Ecology, **29** (10): 1049-1061.
- Arimura G., Shiojiri K. et Karban R. (2010). Acquired immunity to herbivory and allelopathy caused by airborne plant emissions. Phytochemistry, **71** (14-15): 1642-1649.
- 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** (1): 95-102.
- Avdiushko S., Croft K.P.C., Brown G.C., Jackson D.M., Hamiltonkemp T.R. et Hildebrand D. (1995). Effect of Volatile Methyl Jasmonate on the Oxylin Pathway in Tobacco, Cucumber, and *Arabidopsis*. Plant Physiology, **109** (4): 1227-1230.
- Axerold B., Chesbrough T.M. et Laakso S. (1981). Lipoxygenase from soybean. Methods enzymology. Academic Press, New York: 441–451.
- Bate N.J., Sivasankar S., Moxon C., Riley J.M.C., 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** (4): 1393-1400.
- Baysal T. et Demirdoven A. (2007). Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. Enzyme and Microbial Technology, **40** (4): 491-496.
- Belkner J., Wiesner R., Kühn H. et Lankin V.Z. (1991). The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. FEBS Letters, **279** (1): 110-114.
- Berger R.G. (1995). Aroma biotechnology, Springer Berlin. 240p.
- Blechert S., Brodschelm W., Hölder S., Kammerer L., Kutchan T.M., Mueller M.J., Xia Z.Q. et Zenk M.H. (1995). The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences, **92** (10): 4099.
- Blee E. (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. Progress in Lipid Research, **37** (1): 33-72.
- Blee E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends in Plant Science, **7** (7): 315-321.
- Blee E. et Joyard J. (1996). Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. Plant Physiology, **110** (2): 445-454.
- Blight E.J. et Dyer W. (1959). A rapid method of Total Lipid extraction and purification. Lipids, **37** (1): 911-917.
- Bollag D., Edelstein S. et Rozicky M. (1996). Proteins methods, Wiley-Liss. 415p.
- 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** (4): 293-299.
- Brändén C.I., Jörnvall H., Eklund H. et Furugren B. (1975). Alcohol dehydrogenases. The Enzymes, **11** (A): 103–190.

- Brash A., Tijet N. et Whitehead I.M. (2001). Muskmelon (*Cucumis melo*) hydroperoxide lyase and uses thereof, US Patent. **7037693**.
- Brash A.R. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **274** (34): 23679-23682.
- Brunerie P. (1989). Procédé de synthèse du cis-3-hexène-1-ol à partir d'acide gras insaturé, French Patent. **8912901**.
- Buescher R.H. et Buescher R.W. (2001). Production and Stability of (E, Z)-2, 6-Nonadienal, the Major Flavor Volatile of Cucumbers. *Journal of Food Science*, **66** (2): 357-361.
- Cacas J.L., Vaillau F., Davoine C., Ennar N., Agnel J.P., Tronchet M., Ponchet M., Blein J.P., Roby D. et Triantaphylides C. (2005). The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant, Cell and Environment*, **28** (11): 1367-1378.
- 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. *PLoS One*, **3** (4).
- Chem J.A.F. (2006). Volatile Compound Biosynthesis by Green Leaves from an *Arabidopsis thaliana* Hydroperoxide Lyase Knockout Mutant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** (21): 8199-8205.
- Chen G., Hackett R., Walker D., Taylor A., Lin Z. et Grierson D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology*, **136** (1): 2641-2651.
- Clarke J.D., Volko S.M., Ledford H., Ausubel F.M. et Dong X. (2000). Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in cpr-Induced Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12** (11): 2175-2190.
- Coffa G., Imber A.N., Maguire B.C., Laxmikanthan G., Schneider C., Gaffney B.J. et Brash A.R. (2005). On the Relationships of Substrate Orientation, Hydrogen Abstraction, and Product Stereochemistry in Single and Double Dioxygenations by Soybean Lipoxygenase-1 and Its Ala542Gly Mutant. *Journal of Biological Chemistry*, **280** (46): 38756-38766.
- Coffa G., Schneider C. et Brash A.R. (2005). A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338** (1): 87-92.
- Conconi A., Miquel M., Browse J.A. et Ryan C.A. (1996). Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiology*, **111** (3): 797-803.
- Creelman R.A. et Mullet J.E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 355-381.
- Croft K.P.C., 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** (1): 13-24.
- Cumbee B., Hildebrand D.F. et Addo K. (1997). Soybean flour lipoxygenase isozymes effects on wheat flour dough rheological and breadmaking properties. *Journal of Food Science*, **62** (2): 281-&.
- Darras A.I., Terry L.A. et Joyce D.C. (2005). Methyl jasmonate vapour treatment suppresses specking caused by *Botrytis cinerea* on cut *Freesia hybrida* L. flowers. *Postharvest Biology and Technology*, **38** (2): 175-182.
- 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): 1-13.
- Degenhardt D.C., Refi-Hind S., Stratmann J.W. et Lincoln D.E. (2010). Systemin and jasmonic acid regulate constitutive and herbivore-induced systemic volatile emissions in tomato, *Solanum lycopersicum*. *Phytochemistry*, **71** (17-18): 2024-2037.

- Delcarte J. (2002). Production d'une hydroperoxyde lyase recombinante (CYP74B) et contribution à la compréhension du mécanisme réactionnel. Gembloux (Belgique), Faculté universitaire des sciences agronomiques, 165p.
- 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**.
- Drouet P., Thomas D. et Legoy M.D. (1994). Production of 13 (S)-hydroperoxy-9 (Z), 11 (E)-octadecadienoic acid using soybean lipoxygenase 1 in a biphasic octane-water system. Tetrahedron letters, **35** (23): 3923-3926.
- Fallik E., Archbold D.D., Hamilton-Kemp T.R., Clements A.M., Collins R.W. et Barth M.M. (1998). (E)-2-hexenal can stimulate *Botrytis cinerea* growth in vitro and on strawberries in vivo during storage. Journal of the American Society for Horticultural Science, **123** (5): 875-881.
- Fammartino A., Cardinale F., Gobel C., Mene-Saffrane L., Fournier J., Feussner I. et Esquerre-Tugaye M.-T. (2007). Characterization of a Divinyl Ether Biosynthetic Pathway Specifically Associated with Pathogenesis in Tobacco. **143**: 378-388.
- Farag M.A. et Pare P.W. (2002). C-6-green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. Phytochemistry, **61** (5): 545-554.
- Farmaki T., Sanmartin M., Jimenez P., Paneque M., Sanz C., Vancanneyt G., Leon J. et Sanchez-Serrano J.J. (2007). Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. Journal of Experimental Botany, **58** (3): 555-568.
- 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** (11): 4232-4236.
- Fauconnier M.L. (1997). Contribution à l'étude de la production du (E)-Hex-2-ène naturel par synthèse enzymatique. Gembloux (Belgique), Faculté universitaire des sciences agronomiques, 291p.
- Fauconnier M.L. et Marlier M. (1996). An efficient procedure for the production of fatty acid hydroperoxides from hydrolyzed flax seed oil and soybean lipoxygenase. Biotechnology Techniques, **10** (11): 839-844.
- Fauconnier M.L., Mpambara A., Delcarte J., Jacques P., Thonart P. et Marlier M. (1999). Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase. Biotechnology Letters, **21** (7): 629-633.
- Feussner I. et Wasternack C. (2002). The lipoxygenase pathway. Annual Review of Plant Biology, **53**: 275-297.
- Feussner I., Wasternack C., Kindl H. et Kühn H. (1995). Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. Proceedings of the National Academy of Sciences, **92** (25): 11849-11853.
- Finkenstadt V.L., Liu L.S. et Willett J.L. (2007). Evaluation of poly(lactic acid) and sugar beet pulp green composites. Journal of Polymers and the Environment, **15** (1): 1-6.
- Folch J., Lees M. et Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, **226** (1): 497-509.
- 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** (1): 306-317.
- Frost C.J., Appel M., Carlson J.E., De Moraes C.M., Mescher M.C. et Schultz J.C. (2007). Within-plant signalling via volatiles overcomes vascular constraints on systemic signalling and primes responses against herbivores. Ecology Letters, **10** (6): 490-498.
- Frost C.J., Mescher M.C., Dervinis C., Davis J.M., Carlson J.E. et Moraes C.M.d. (2008). Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile cis-3-hexenyl acetate. New Phytologist, **180** (3): 722-734.
- Fu X., Zhu X., Gao K. et Duan J. (1995). Oil and Fat Hydrolysis with Lipase from *Aspergillus* Sp. Journal of the American Oil Chemists Society, **72** (5): 527-531.

- Fukushige H. et Hildebrand D.F. (2005). A simple and efficient system for green note compound biogenesis by use of certain lipoxygenase and hydroperoxide lyase sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53** (17): 6877-6882.
- Galliard T. et Phillips D.R. (1976). The enzymic cleavage of linoleic acid to C9 carbonyl fragments in extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and the possible role of lipoxygenase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, **431** (2): 278-287.
- Gardner H. et Plattner R. (1984). Linoleate hydroperoxides are cleaved heterolytically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent. Lipids, **19** (4): 294-299.
- 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** (3): 1059-1072.
- Gargouri M., Akacha N.B. et Legoy M.D. (2004). Coupled hydroperoxide lyase and alcohol dehydrogenase for selective synthesis of aldehyde or alcohol. Applied Biochemistry and Biotechnology, **119** (2): 171-180.
- 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** (1): 59-65.
- Geimel F.F.A. (1987). Comparison of galactolipase activity and free fatty acid levels in chloroplasts of chill-sensitive and chill-resistant plants. European Journal of Biochemistry, **166**: 233.
- Goers S.K., Ghossi P., Patterson J.T. et Young C.L. (1989). Process for producing a green leaf essence, US Patents. **4806379**.
- Gomi K., Yamamoto H. et Akimitsu K. (2003). Epoxide hydrolase: a mRNA induced by the fungal pathogen *Alternaria alternata* on rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush). Plant Molecular Biology, **53** (1): 189-199.
- 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** (10): 1219-1231.
- Gosset V., Gobel C., Laine G., Delaplace P., du Jardin P., Feussner I. et Fauconnier M.L. (2008). The Role of Oxylipins and Antioxidants on Off-Flavor Precursor Formation during Potato Flake Processing. American Chemical Society, **56** (23): 11285-11292.
- Grechkin A. (1998). Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. Progress in Lipid Research, **37** (5): 317-352.
- Grechkin A.N. (2002). Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, **68-9**: 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** (1-3): 31-34.
- 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** (3): 258-264.
- Hamberg M. (1988). Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid: Identification of an allene oxide cyclase. Biochemical and Biophysical Research Communications, **156** (1): 543-550.
- Hamberg M. (2002). Biosynthesis of new divinyl ether oxylipins in *Ranunculus* plants. Lipids, **37** (4): 427-433.
- Hatanaka A. (1993). The Biogenesis of Green Odor by Green Leaves. Phytochemistry, **34** (5): 1201-1218.
- Hatanaka A., Kajiwara T. et Harada T. (1975). Biosynthetic pathway of cucumber alcohol: trans-2, cis-6-nonadienol via cis-3, cis-6-nonadienal. Phytochemistry, **14**: 2589-2592.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Matsui K. et Toyota H. (1992). Substrate-Specificity of Tea Leaf Hydroperoxide Lyase. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, **47** (9-10): 677-679.

- Hatanaka A., Kajiwaru T., Sekiya J. et Fujimura K. (1979). Participation of 13-hydroperoxide in the formation of n-hexanal from linoleic acid in tea chloroplasts. Agricultural and Biological Chemistry, **43**: 175–176.
- Hause B., Stenzel I., Miersch O., Maucher H., Kramell R., Ziegler J. et Wasternack C. (2000). Tissue specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. The Plant Journal, **24** (1): 113-126.
- Hofmann E., Zerbe P. et Schaller F. (2006). The crystal structure of Arabidopsis thaliana allene oxide cyclase: insights into the oxylipin cyclization reaction. The Plant Cell Online, **18** (11): 3201.
- Holtz R.B., McCulloch M.J., Garger S.J., Teague R.K. et Phillips H.F. (2001). Method for providing green note compounds, US Patents. **6274358**
- Hornostaj A.R. et Robinson D.S. (2000). Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds. Food Chemistry, **71** (2): 241-247.
- 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** (2): 711-724.
- Howe G.A. et Schillmiller A.L. (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. Current Opinion in Plant Biology, **5** (3): 230-236.
- Hughes R.K., Belfield E.J. et Casey R. (2006). CYP74C3 and CYP74A1, plant cytochrome P450 enzymes whose activity is regulated by detergent micelle association, and proposed new rules for the classification of CYP74 enzymes. Biochemical Society Transactions, **34** (Pt 6): 1223-1227.
- Hughes R.K., Belfield E.J., Muthusamay M., Khan A., Rowe A., Harding S.E., Fairhurst S.A., Bornemann S., Ashton R., Thorneley R.N.F. et Casey R. (2006). Characterization of Medicago truncatula (barrel medic) hydroperoxide lyase (CYP74C3), a water-soluble detergent-free cytochrome P450 monomer whose biological activity is defined by monomer-micelle association. Biochemical Journal, **395**: 641-652.
- Hughes R.K., Domenico S.D. et Santino A. (2009). Plant Cytochrome CYP74 Family: Biochemical Features, Endocellular Localisation, Activation Mechanism in Plant Defence and Improvements for Industrial Applications. Chembiochem, **10** (7): 1122-1133.
- Hughes R.K., West S.I., Hornostaj A.R., Lawson D.M., Fairhurst S.A., Sanchez R.O., Hough P., Robinson B. et Casey R. (2001). Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. Biochemical Journal, **353** (Pt 2): 345.
- 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** (7): 1991-1995.
- Hyun Y., Choi S., Hwang H.J., Yu J., Nam S.J., Ko J., Park J.Y., Seo Y.S., Kim E.Y., Ryu S.B., Kim W.T., Lee Y.H., Kang H. et Lee I. (2008). Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. Developmental Cell, **14** (2): 183-192.
- 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. Plant Cell, **13** (10): 2191-2209.
- Itoh A. et Howe G.A. (2001). Molecular Cloning of a Divinyl Ether Synthase: identification as a CYP74 enzyme. Journal of Biological Chemistry, **276** (5): 3620-3627.
- 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** (48): 46051-46058.

- Itoh A. et Vick B.A. (1999). The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, **1436** (3): 531-540.
- Kandel S., Sauveplane V., Compagnon V., Franke R., Millet Y., Schreiber L., Werck-Reichhart D. et Pinot F. (2007). Characterization of a methyl jasmonate and wounding-responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation in&nbsp;vitro. FEBS Journal, **274** (19): 5116-5127.
- Kanisawa T. et Itoh H. (1988). Method for preparing green aroma compounds, US Patents. **4769243**
- 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** (6): 1220-1225.
- Kishimoto K., Matsui K., Ozawa R. et Takabayashi J. (2005). Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene Activate Defense Genes and Induce Resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, **46** (7): 1093-1102.
- 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** (11): 2127-2132.
- Kishimoto K., Matsui K., Wawa R. et Takabayashi J. (2006). Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. Plant Science, **170** (4): 715-723.
- Kohlmann M., Bachmann A., Weichert H., Kolbe A., Balkenhohl T., Wasternack C. et Feussner I. (1999). Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. European Journal of Biochemistry, **260** (3): 885-895.
- Kongrit D., Jisaka M., Iwanaga C., Yokomichi H., Katsube T., Nishimura K., Nagaya T. et Yokota K. (2007). Molecular Cloning and Functional Expression of Soybean Allene Oxide Synthases. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **71** (2): 491-498.
- Kost C. et Heil M. (2006). Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. Journal of Ecology, **94** (3): 619-628.
- Kubo I., Fujita K.I., Kubo A., Nihei K.I. et Lunde C.S. (2003). Modes of antifungal action of (2E)-Alkenals against *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51** (14): 3951-3957.
- Kuroda H., Kojima H., Kaneda H. et Takashio M. (2005). Characterization of 9-Fatty Acid Hydroperoxide Lyase-Like Activity in Germinating Barley Seeds That Transforms 9 (S)-Hydroperoxy-10 (E), 12 (Z)-octadecadienoic Acid into 2 (E)-Nonenal. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **69** (9): 1661-1668.
- 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** (8): 1545-1554.
- Laine G., Göbel C., du Jardin P., Feussner I. et Fauconnier M.L. (2006). Study of Precursors Responsible for Off-Flavor Formation during Storage of Potato Flakes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **54** (15): 5445-5452.
- 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** (3-4): 201-208.
- Laudert D., Pfannschmidt U., Lottspeich F., Holländer-Czytko H. et Weiler E.W. (1996). Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. Plant Molecular Biology, **31** (2): 323-335.
- Lee J., Son C., Kim M., Kim M., Kim H., Kwak E., Kim S. et Kim M. (2009). Red beet (*Beta vulgaris* L.) leaf supplementation improves antioxidant status in C57BL/6J mice fed high fat high cholesterol diet. Summer, **3** (2): 114-121.

- Li C.Y., Schillmiller A.L., Liu G.H., Lee G.I., Jayanty S., Sageman C., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Yagi K., Kobayashi Y. et Howe G.A. (2005). Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell*, **17** (3): 971-986.
- Liaquat M. (2011). Optimized synthesis of (Z)-3-hexen-1-yl caproate using germinated rapeseed lipase in organic solvent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68** (1): 59-65.
- Liavonchanka A. et Feussner I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, **163** (3): 348-357.
- Littlejohn T.K., Takikawa O., Skylas D., Jamie J.F., Walker M.J. et Truscott R.J.W. (2000). Expression and Purification of Recombinant Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Protein Expression and Purification*, **19** (1): 22-29.
- Loomis W.D. et Battaile J. (1966). Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, **5** (3): 423-438.
- Márczy J.S., Németh Á., Samu Z., Hágner-Veress Á. et Szajáni B. (2002). Production of hexanal from hydrolyzed sunflower oil by lipoxygenase and hydroperoxid lyase enzymes. *Biotechnology Letters*, **24** (20): 1673-1675.
- Matoba T., Sakurai A., Taninoki N., Saitoh T., Kariya F., Kuwahata M., Yukawa N., Fujino S. et Hasegawa K. (1989). N-Hexanol Formation from N-Hexanal by Enzyme Action in Soybean Extracts. *Journal of Food Science*, **54** (6): 1607-1610.
- Matsui K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, **9** (3): 274-280.
- 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** (2): 175-178.
- 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*.
- Matsui K., Miyahara C., Wilkinson J., Hiatt B., Knauf V. et 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** (6): 1189-1196.
- Matsui K., Shibata Y., Tateba H., Hatanaka A. et Kajiwara T. (1997). Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **61** (1): 199-201.
- Matsui K., Shibutani M., Hase T. et Kajiwara T. (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett.*, **394** (1): 21-24.
- Matsui K., Ujita C., Fujimoto S., Wilkinson J., Hiatt B., Knauf V., Kajiwara T. et Feussner I. (2000). Fatty acid 9-and 13-hydroperoxide lyases from cucumber. *Febs Letters*, **481** (2): 183-188.
- Maucher H., Hause B., Feussner I., Ziegler J. et Wasternack C. (2000). Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *The Plant Journal*, **21** (2): 199-213.
- Miersch O., Kramell R., Parthier B. et Wasternack C. (1999). Structure-activity relations of substituted, deleted or stereospecifically altered jasmonic acid in gene expression of barley leaves. *Phytochemistry*, **50** (3): 353-361.
- Mita G., Gallo A., Greco V., Zasiura C., Casey R., Zacheo G. et Santino A. (2001). Molecular cloning and biochemical characterization of a lipoxygenase in almond (*Prunus dulcis*) seed. *European Journal of Biochemistry*, **268** (5): 1500-1507.
- 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. 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** (419): 2321-2333.

- Myung K., Hamilton-Kemp T.R. et Archbold D.D. (2006). Biosynthesis of trans-2-Hexenal in Response to Wounding in Strawberry Fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **54**: 1442-1448.
- 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** (26): 7639-7644.
- Nellen A., Rojahn B. et Kindl H. (1995). Lipoxygenase forms located at the plant plasma membrane. Zeitschrift für Naturforschung. C. A journal of biosciences, **50** (1-2): 29-36.
- 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 Microb. Technol., **34** (7): 667-672.
- Németh Á.S., Szajáni B., Márczy J.S. et Simon M.L. (1998). A Simple and Rapid Method Enhancing of Lipoxygenase-1 to Lipoxygenase-2+Lipoxygenase-3 Isoenzyme Activity Ratio in Soybean Meal Extracts. Biotechnology Techniques, **12** (5): 389-392.
- Noordermeer M.A., Feussner I., Kolbe A., Veldink G.A. et Vliegthart J.F.G. (2000). Oxygenation of (3Z)-alkenals to 4-hydroxy-(2E)-alkenals in plant extracts: a nonenzymatic process. Cloning and characterization of alfalfa hydroperoxide lyase, **277**: 112-116.
- Noordermeer M.A., Goot W., Kooij A.J., Veldsink J.W., Veldink G.A. et 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** (15): 4270-4274.
- Noordermeer M.A., van Dijken A.J.H., Smeekens S.C.M., Veldink G.A. et Vliegthart J.F.G. (2000). Characterization of three cloned and expressed 13-hydroperoxide lyase isoenzymes from alfalfa with unusual N-terminal sequences and different enzyme kinetics. FEBS Lett., **267** (9): 2473-2482.
- Noordermeer M.A., Veldink G.A. et Vliegthart J.F.G. (1999). Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z: 2E-enal isomerase. FEBS Lett, **443** (2): 201-204.
- Ongena M., Duby F., Rossignol F., Fauconnier M.L., Dommes J. et Thonart P. (2004). Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. Molecular Plant-Microbe Interactions, **17** (9): 1009-1018.
- Ongena M., Jourdan E., Schafer M., Kech C., Budzikiewicz H., Luxen A. et Thonart P. (2005). Isolation of an N-alkylated Benzylamine Derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as Elicitor of Induced Systemic Resistance in Bean. Molecular Plant-Microbe Interactions, **18** (6): 562-569.
- Padilla M.a.N., Hernández M.L., Pérez A.G., Sanz C. et Martínez-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** (9): 5649-5657.
- Pan Z.Q., Durst F., Werckreichhart D., Gardner H.W., Camara B., Cornish K. et Backhaus R.A. (1995). The Major Protein of Guayule Rubber Particles Is a Cytochrome-P450 - Characterization Based on Cdna Cloning and Spectroscopic Analysis of the Solubilized Enzyme and Its Reaction-Products. Journal of Biological Chemistry, **270** (15): 8487-8494.
- Porta H. et Rocha-Sosa M. (2002). Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. Plant Physiology, **130** (1): 15-21.
- Prigge S.T., Boyington J.C., Faig M., Doctor K.S., Gaffney B.J. et Amzel L.M. (1997). Structure and mechanism of lipoxygenases. Biochimie, **79** (11): 629-636.
- Rabetafika H., 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** (6): 1115-1119.
- Rance I., Fournier J. et Esquerre-Tugaye M.T. (1998). The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic

- plants expressing antisense lipoxygenase sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **95** (11): 6554-6559.
- Rayko H., Ouml, rg Z., Markku K., auml, nen et Ian T.B. (2004). Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in *Nicotiana attenuata*. The Plant Journal, **40**: 35-46.
- Rehbock B., Ganszer D. et Berger R.G. (1998). Efficient generation of 2E-hexenal by a hydroperoxide lyase from mung bean seedlings. Food Chemistry, **63** (2): 161-165.
- Riley J.C.M., Willemot C. et Thompson J.E. (1996). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit. Postharvest Biology and Technology, **7** (1): 97-107.
- Rodrigo D., Jolie R., Van Loey A. et Hendrickx M. (2007). Thermal and high pressure stability of tomato lipoxygenase and hydroperoxide lyase. Journal of Food Engineering, **79** (2): 423-429.
- Royo J., Vancanneyt G., Perez A.G., Sanz C., Stormann K., Rosahl S. et SanchezSerrano 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** (35): 21012-21019.
- Rusterucci C., Montillet J.L., Agnel J.P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J.J., Etienne P., Suty L. et Blein J.P. (1999). Involvement of Lipoxygenase-dependent Production of Fatty Acid Hydroperoxides in the Development of the Hypersensitive Cell Death induced by Cryptogein on Tobacco Leaves. Journal of Biological Chemistry, **274** (51): 36446-36455.
- Ruther J. (2000). Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, **890** (2): 313-319.
- Salas J.J., Sanchez C.S., Garcia-Gonzalez D.L. et Aparicio R. (2005). Impact of the suppression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase on the quality of the green odor in green leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **53** (5): 1648-1655.
- Schmelz E.A., Engelberth J., Alborn H.T., O'Donnell P., Sammons M., Toshima H. et Tumlinson J.H. (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **100** (18): 10552-10557.
- Schreier P. et Lorenz G. (1982). Separation, partial purification and characterization of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato fruits. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, **165**: 173.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R. et Lewinsohn E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. The Plant Journal, **54**: 712-732.
- Sekiya J., Kajiwaru T., Munechika K. et Hatanaka A. (1983). Distribution of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in the leaves of various plant species. Phytochemistry, **22** (9): 1867-1869.
- Servaites J.C., Tucci M.A. et Geiger D.R. (1987). Glyphosate Effects on Carbon Assimilation, Ribulose Bisphosphate Carboxylase Activity, and Metabolite Levels in Sugar Beet Leaves. Plant Physiol., **85** (2): 370-374.
- Shibata Y., Matsui K., Kajiwaru T. et Hatanaka A. (1995). Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. Biochem Biophys Res Commun, **207** (1): 438-443.
- Shibata Y., Matsui K., Kajiwaru T. et Hatanaka A. (1995). Purification and Properties of Fatty-Acid Hydroperoxide Lyase from Green Bell Pepper Fruits. Plant and Cell Physiology, **36** (1): 147-156.
- Shiojiri K., Kishimoto K., Ozawa R., Kugimiya S., Urashimo S., Arimura G., Horiuchi J., Nishioka T., Matsui K. et Takabayashi J. (2006). Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **103** (45): 16672-16676.

- Smith J.L., De Moraes C.M. et Mescher M.C. (2009). Jasmonate and salicylate mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science*, **65** (5): 497-503.
- Song W.C. et Brash A.R. (1991). Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **253** (5021): 781-784.
- Song W.C., Funk C.D. et Brash A.R. (1993). Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90** (18): 8519-8523.
- Speirs J., Lee E., Holt K., Yong-Duk K., Steele Scott N., Loveys B. et Schuch W. (1998). Genetic Manipulation of Alcohol Dehydrogenase Levels in Ripening Tomato Fruit Affects the Balance of Some Flavor Aldehydes and Alcohols. *Plant Physiology*, **117** (3): 1047-1058.
- Stenzel I., Hause B., Miersch O., Kurz T., Maucher H., Weichert H., Ziegler J., Feussner I. et Wasternack C. (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **51** (6): 895-911.
- Stumpe M., Carsjens J.G., Goebel C. et Feussner I. (2008). Divinyl ether synthesis in garlic bulbs. *Journal of Experimental Botany*, **59** (4): 907-915.
- Stumpe M. et Feussner I. (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, **5** (2): 347-357.
- Stumpe M., Göbel C., Demchenko K., Hoffmann M., Klösger R., Pawlowski K. et Feussner I. (2006). Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *The Plant Journal*, **47** (6): 883-896.
- Stumpe M., Kandzia R., Gobel C., Rosahl S. et Feussner I. (2001). A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS Letters*, **507** (3): 371-376.
- Suurmeijer C., Pérez-Gilabert M., van Unen D.J., van der Hijden H., Veldink G.A. et Vliegenthart J.F.G. (2000). Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase. *Phytochemistry*, **53** (2): 177-185.
- Szczesnaskorupa E., Straub P. et Kemper B. (1993). Deletion of a conserved tetrapeptide, PPGP, in P450 2C2 results in loss of enzymatic activity without a change in its cellular location. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **304** (1): 170-175.
- Taki N., Sasaki-Sekimoto Y., Obayashi T., Kikuta A., Kobayashi K., Aina T., Yagi K., Sakurai N., Suzuki H., Masuda T., Takamiya K., Shibata D., Kobayashi Y. et Ohta H. (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **139** (3): 1268-1283.
- Tan Y. et Siebert K.J. (2004). Quantitative Structure–Activity Relationship Modeling of Alcohol, Ester, Aldehyde, and Ketone Flavor Thresholds in Beer from Molecular Features. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52** (10): 3057-3064.
- Thomma B., Eggermont K., Broekaert W.F. et Cammue B.P.A. (2000). Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38** (5): 421-427.
- 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** (2): 281-289.
- Tijet N., Wäspi U., Gaskin D.J.H., 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** (7): 709-720.

- 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** (23-24): 3423-3428.
- Ueda J. et Kato J. (1980). Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology*, **66** (2): 246.
- Utsunomiya Y., Nakayama T., Oohira H., Hirota R., Mori T., Kawai F. et Ueda T. (2000). Purification and inactivation by substrate of an allene oxide synthase (CYP74) from corn (*Zea mays* L.) seeds. *Phytochemistry*, **53** (3): 319-323.
- Vaghela M.N. et Kilara A. (1995). A Rapid Method for Extraction of Total Lipids from Whey-Protein Concentrates and Separation of Lipid Classes with Solid-Phase Extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **72** (10): 1117-1121.
- Valecillos C. et Fermin G. (2010). Cloning and sequencing of the hydroperoxide lyase (HPL) gene and genetic transformation in guava. *International Symposium on Guava and other Myrtaceae, Merida and Aguascalientes, Mexico.*: 245-250.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P. et Sanchez-Serrano J.J. (2001). Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (14): 8139-8144.
- Vick B.A. et Zimmerman D.C. (1976). Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase in Germinating Watermelon Seedlings. *Plant Physiology*, **57** (5): 780-788.
- Vick B.A. et Zimmerman D.C. (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **111** (2): 470-477.
- Vick B.A. et Zimmerman D.C. (1987). Pathways of Fatty Acid Hydroperoxide Metabolism in Spinach Leaf Chloroplasts. *Plant Physiology*, **85** (4): 1073-1078.
- Wasternack C. et Kombrink E. (2009). Jasmonates: Structural Requirements for Lipid-Derived Signals Active in Plant Stress Responses and Development. *ACS Chemical Biology*, **5** (1): 63-77.
- Weber H., Chetelat A., Caldelari D. et Farmer E.E. (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell*, **11** (3): 485-493.
- Weichert H., Stenzel I., Berndt E., Wasternack C. et Feussner I. (1999). Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves--preferential induction of the reductase pathway by salicylate (1). *FEBS Lett*, **464** (3): 133-137.
- Whitehead I.M., Muller B.L. et Dean C. (1995). Industrial use of soybean lipoxygenase for the production of natural green note flavor compounds. *Cereal foods world*, **40** (4): 193-197.
- Ziegler J., Keinänen M. et Baldwin I.T. (2001). Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry*, **58** (5): 729-738.
- Zimmerman D.C. et Coudron C.A. (1979). Identification of Traumatol, a Wound Hormone, as 12-Oxo-trans-10-dodecenoic Acid 1. *Plant Physiology*, **63** (3): 536-541.