

Synthèse bibliographique : la divinyl éther synthase de plantes

Phryné Hoyaux ⁽¹⁾, Marie-Laure Fauconnier ⁽¹⁾, Jérôme Delcarte ⁽¹⁾, Patrick du Jardin ⁽²⁾, Michel Marlier ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Unité de Chimie générale et organique. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B–5030 Gembloux (Belgique). E-mail : hoyaux.p@fsagx.ac.be

⁽²⁾ Unité de Biologie végétale. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B–5030 Gembloux (Belgique).

Reçu le 5 février 2001, accepté le 20 mars 2001.

La divinyl éther synthase, une enzyme appartenant à la voie de la lipoxygénase, transforme chez les tubercules de pomme de terre les 9-hydroperoxydes d'acides gras en acides colneléique et colnelénique, deux éthers divinylés d'acides gras. L'enzyme n'a été mise en évidence que dans un nombre assez limité de végétaux cependant très différents. Outre dans les tubercules de pomme de terre, on rencontre également cette enzyme dans les racines de tomate, les bulbes d'ail, les plantes de tabac ainsi que dans des algues marines. L'enzyme, membranaire, serait localisée dans la fraction microsomique. Chez le tubercule de pomme de terre, l'enzyme possède une masse molaire supérieure à 100.000 Da, un pH optimum de 9 et une spécificité élevée pour les 9-hydroperoxydes d'acides gras en tant que substrat. Des études menées à l'aide de produits marqués ont permis d'élucider le mécanisme réactionnel. Les acides colneléique et colnelénique peuvent être dégradés enzymatiquement ou non en aldéhydes et oxo-acides. Il est à noter que ces mêmes composés sont formés par l'action de l'hydroperoxyde lyase sur les 9-hydroperoxydes d'acides gras. Comme pour beaucoup d'autres enzymes de la voie de la lipoxygénase, l'implication des produits réactionnels de la divinyl éther synthase dans la résistance aux agents pathogènes a été suggérée. On a pu, en effet, corrélérer la teneur en acides colnelénique et colneléique avec la résistance de *Solanum tuberosum* à *Phytophthora infestans*.

Mots-clés. Divinyl éther synthase, hydroperoxyde d'acides gras, voie de la lipoxygénase, acide colneléique, acide colnelénique, éther divinylé d'acides gras, pomme de terre, *Solanum tuberosum* L.

Divinyl ether synthase in plants: a review. Divinyl ether synthase, an enzyme of the lipoxygenase pathway transforms, in potato tubers, 9-hydroperoxides of fatty acids into colneleic and colnelenic acid, two divinyl ethers of fatty acids. The enzyme has been described in a limited number of quite different plants. The enzyme has also been detected in tomato roots, garlic bulbs, tobacco plants and in marine algae. The enzyme is bound to membranes and is located in the microsomal fraction. The molecular weight of the enzyme exceeds 100,000 Da, its optimal pH is around 9 and its high specificity for 9-hydroperoxides as substrate is described. The reactional mechanism has been elucidated using radio-labelled molecules. Colneleic and colnelenic acid can be degraded enzymatically or not into aldehydes and oxo-acids. Those last compounds are also formed by the action of hydroperoxide lyase on 9-hydroperoxides of fatty acids. As other enzymes of the lipoxygenase pathway, reaction products of divinyl ether synthase are involved in pathogenic resistance. Colneleic and colnelenic acid content in potato plants has been correlated with resistance to *Phytophthora infestans*.

Keywords. Divinyl ether synthase, fatty acid hydroperoxide, lipoxygenase pathway, colneleic acid, colnelenic acid, fatty acid divinyl ether, potato, *Solanum tuberosum* L.

1. INTRODUCTION

La divinyl éther synthase est une enzyme qui appartient à la voie de la lipoxygénase et qui catalyse la conversion des 9-hydroperoxydes de l'acide linoléique et de l'acide linolénique respectivement en acide colneléique et acide colnelénique. Ces derniers composés, des éthers divinylés d'acides gras ne sont présents que très

rarement chez les végétaux. La divinyl éther synthase n'a, à l'heure actuelle, fait l'objet que de peu d'études malgré l'implication potentielle de ses produits dans des phénomènes aussi importants que la résistance des pommes de terre au mildiou (*Phytophthora infestans*). Nous nous proposons dans le cadre de cet article bibliographique de faire le point sur les connaissances actuelles sur la divinyl éther synthase.

2. LA VOIE DE LA LIPOXYGÉNASE

La voie enzymatique de métabolisation des acides gras polyinsaturés chez les végétaux, connue sous le nom de “cascade enzymatique de la lipoxygénase” (**Figure 1**), débute par la libération des acides gras suite à l’action d’une lipase (ou d’une acyle hydrolase) sur les triglycérides, phospholipides et glycolipides. Parmi ces acides gras libres, les acides linoléique et linoléinique servent de substrat à la lipoxygénase (E.C.1.13.11.12) qui, en présence d’oxygène, les transforme en hydroperoxyde de l’acide correspondant. La lipoxygénase est une dioxygénase intramoléculaire à fer non hémunique qui catalyse l’incorporation d’oxygène sur des molécules d’acides gras polyinsaturés possédant un système (Z), (Z)-1,4-pentadiénique pour former un hydroperoxyde diénique conjugué. En fonction de l’origine botanique de l’enzyme et selon les conditions réactionnelles (pH, température), des 9-hydroperoxydes et/ou des 13-hydroperoxydes de l’acide linoléique ou linoléinique seront formés. Ceci explique la grande diversité de composés que l’on retrouvera en fin de chaîne enzymatique (Gardner, 1991 ; Siedow, 1991 ; Fauconnier, Marlier, 1997a). Ces hydroperoxydes d’acides gras, très réactifs, peuvent alors être métabolisés en composés possédant un rôle dans la physiologie du végétal (acide jasmonique, traumatine) ou responsable de l’odeur “verte” dégagée par les plantes et les fruits (aldéhydes

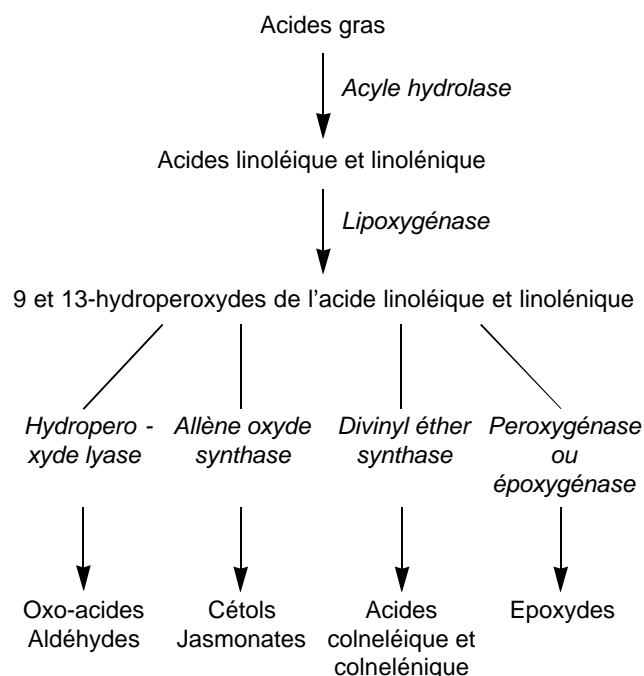


Figure 1. La voie de la lipoxygénase — *The lipoxygenase pathway.*

et alcools à six ou neuf atomes de carbone) (Fauconnier, Marlier, 1997b). Quatre voies métaboliques principales coexistent : celle de l’hydroperoxyde lyase qui clive les hydroperoxydes d’acides gras en oxo-acides et aldéhydes, celle de l’allène oxyde synthase qui catalyse la conversion des hydroperoxydes d’acides gras en allènes oxydes d’acides gras précurseurs d’ - et de -cétoles et d’acide jasmonique, celle de la peroxygénase ou époxygénase hydroperoxyde dépendante provoque l’époxydation des hydroperoxydes d’acides gras et enfin celle de la divinyl éther synthase qui transforme les hydroperoxydes d’acides gras en éthers divinylés d’acides gras.

3. LA DIVINYL ÉTHER SYNTHASE

3.1. Preuve de la nature enzymatique de cette voie métabolique

Les acides colneléique et colnelénique (**Figure 2**) ont été pour la première fois mis en évidence dans le tubercule de pomme de terre par Galliard et Phillips en 1972. Ces auteurs ont supposé que la voie métabolique à l’origine de ces composés était de nature enzymatique et ils ont même été plus loin en émettant l’hypothèse que les 9-hydroperoxydes issus de l’action de la lipoxygénase devaient être un intermédiaire dans la formation de ces acides colneléique et colnelénique. Ces deux hypothèses ont été vérifiées par le fait que l’ajout de 9-hydroperoxydes à un extrait brut de tubercule de pomme de terre fournit bien les éthers divinylés attendus tandis que l’ajout de ces mêmes hydroperoxydes à un extrait préalablement chauffé à 100°C ne donne ni acide colneléique ni acide colnelénique. Le processus est donc sensible à la chaleur, ce qui conforte l’idée de Galliard et Phillips sur sa nature enzymatique.

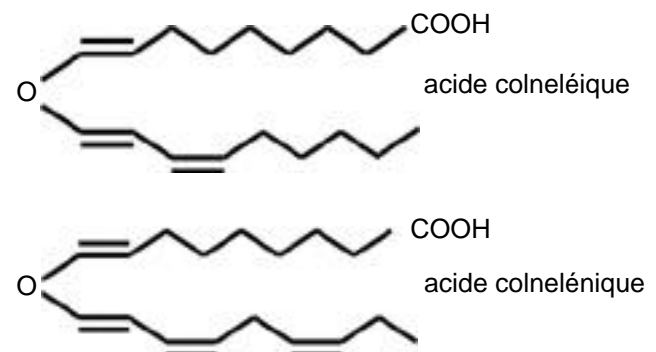


Figure 2. Structure de l’acide colneléique et de l’acide colnelénique — *Structure of colneleic and colnelenic acids.*

3.2. La divinyl éther synthase dans le monde végétal

Distribution dans les végétaux. Outre les acides colneléique et colnelénique découverts par Galliard et Phillips (1972) dans les tubercules de pomme de terre, des composés analogues, à savoir les acides étheroléique et étherolénique, ont été mis en évidence dans les bulbes d'ail (*Allium sativum* L.) (Grechkin *et al.*, 1995). Caldelari et Farmer (1998) ont, pour leur part, démontré que les racines de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sont capables de synthétiser les acides colneléique et colnelénique. Enfin, Weber *et al.* (1999) ont montré que les plantes de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) synthétisent les acides colneléique et colnelénique en réponse à certains agents pathogènes, tel le virus de la mosaïque du tabac. Des éthers divinylés ont également été mis en évidence dans des algues marines telles que l'algue rouge *Polysiphonia latissima* (Harv.) Kütz. ou l'algue brune *Laminaria sinclairii* (Harv.) Farlow *et al.* (Gerwick, 1996). Ces différentes études nous montrent donc que les éthers divinylés d'acides gras peuvent être synthétisés par des végétaux fort différents (algue, monocotylée pour l'ail et dicotylées pour la pomme de terre, la tomate et le tabac).

Distribution au sein de la plante. Grechkin et Hamberg (1996) ont montré que la majeure partie de l'activité divinyl éther synthase des bulbes d'ail est localisée dans les microsomes. Cette observation coïncide avec la découverte par Fahlstadius et Hamberg (1990) du fait que la divinyl éther synthase présente dans les tubercules de pomme de terre est une enzyme membranaire liée aux microsomes.

3.3. Propriétés de l'enzyme

Galliard et Phillips (1972) ont purifié partiellement la divinyl éther synthase en soumettant un extrait brut de tubercules de pomme de terre à une centrifugation, suivie d'une dialyse puis d'une précipitation fractionnée. L'enzyme responsable de la formation des éthers divinylés précipite entre 45 % et 65 % de sulfate d'ammonium. L'activité peut être conservée plusieurs semaines lorsque les préparations sont conservées entre 0 °C et 4 °C, sous forme de suspension dans une solution 2 M en sulfate d'ammonium à pH 7. La divinyl éther synthase de tubercules de pomme de terre possède une masse moléculaire supérieure à 100.000 Da (Galliard, Matthew, 1975). Ceci a été mis en évidence par le fait que l'enzyme élue dans le volume mort d'une colonne Séphadex G-150, alors que, dans les mêmes conditions la lipoxigénase (masse moléculaire proche de 100.000 Da) élue dans une fraction nettement séparée du volume mort de la

colonne. Dans les tubercules de pomme de terre, le pH optimum pour la formation des éthers divinylés d'acides gras à partir des 9-hydroperoxydes est aux environs de pH 9 (Galliard, Phillips, 1972). Cependant, si l'on considère la réaction enzymatique dans son ensemble (action lipoxigénase et divinyl éther synthase) le pH optimum pour la conversion des acides linoléique ou linolénique en éthers divinylés d'acides gras dans le tubercule de pomme de terre est de 7-7,5. Ce pH de 7,5 est donc un compromis entre le pH optimum de la lipoxigénase (pH 5,5) qui transforme les acides linoléique et linolénique en 9-hydroperoxydes et le pH optimum de la divinyl éther synthase (pH 9) qui transforme alors ces 9-hydroperoxydes en éthers divinylés d'acides gras. La divinyl éther synthase des tubercules de pomme de terre utilise spécifiquement les 9-hydroperoxydes des acides linoléique et linolénique comme substrat (Galliard, Matthew, 1975) tandis que la divinyl éther synthase présente dans les bulbes d'ail ne transforme que les 13-hydroperoxydes de ces mêmes acides gras (Grechkin *et al.*, 1995). Ceci est parfaitement en accord avec la spécificité des lipoxigénases présentes dans ces deux espèces végétales, puisque la lipoxigénase des tubercules de pomme de terre forme à plus de 95 % des 9-hydroperoxydes tandis que les bulbes d'ail expriment une lipoxigénase qui fournit majoritairement des 13-hydroperoxydes (Grechkin *et al.*, 1995). En outre, Grechkin et Hamberg (1996) ont réalisé une étude sur la stéréospécificité de la divinyl éther synthase de bulbes d'ail pour son substrat. Le mélange racémique de 13-(R,S)-hydroperoxydes d'acide linoléique est converti en acide étheroléique beaucoup plus lentement qu'une solution chirale de 13-(S)-hydroperoxydes. De plus, les hydroperoxydes du mélange racémique de 13-(R,S)-hydroperoxydes restant après réaction sont composés à 94 % de 13-(R)-hydroperoxydes. On peut donc en conclure que l'enzyme utilise préférentiellement les 13-(S)-hydroperoxydes. En utilisant les 9-hydroperoxydes de l'acide linoléique comme substrat, la divinyl éther synthase de tubercules de pommes de terre possède un Km de $6 \cdot 10^{-5}$ M. L'intervention d'un site enzymatique contenant un groupe thiol ou un ion métallique rapidement complexé dans le mécanisme réactionnel est peu probable. En effet, aucune inhibition de la formation des produits n'a été observée quand les composés suivants sont ajoutés au milieu réactionnel : p-chromomercurobenzoate (5mM), iodoacétamide (5mM), KCN (1mM) et EDTA (1mM).

3.4. Mécanismes réactionnels

Des expériences réalisées à l'aide de produits marqués ont permis de comprendre le mode d'action de l'enzyme (Crombie *et al.*, 1986 ; Fahlstadius, Hamberg,

1990). Un ^{18}O provenant des oxygènes marqués de la fonction hydroperoxyde des 9-hydroperoxydes des acides linoléique ou linoléique est intégré au sein de l'éther divinyle pour en constituer la fonction éther. Dès lors, ces auteurs proposent un mécanisme de réaction : la protonation du groupe hydroperoxy suivie de la perte d'eau conduit à un ion époxy-carbonium instable. Une perte d'hydrogène en C8 et la rupture de la liaison entre C9 et C10 conduit aux acides colneléique et colnelénique (**Figure 3**). L'élimination de l'hydrogène en position C8 n'est probablement pas catalysée par l'enzyme. En effet, le pH optimal de la divinyl éther synthase étant de 9, des groupes basiques

sont disponibles dans le milieu réactionnel et favorisent l'élimination de l'hydrogène de l'ion époxy-carbonium en C8 (Crombie *et al.*, 1986). Par ailleurs, Fahlstadius et Hamberg (1990) ont tenté de déterminer si l'élimination de cet atome d'hydrogène est stéréospécifique. Pour ce faire, ils ont formé de l'acide linoléique contenant un atome deutérium en position C8, et ce de manière stéréospécifique pour obtenir d'une part du [(8R-2H)] et d'autre part du [8S-2H)]. Ces derniers auteurs ont conclu que lors de la conversion de l'acide gras en acide colneléique il y a une élimination sélective de l'hydrogène pro-R en C8.

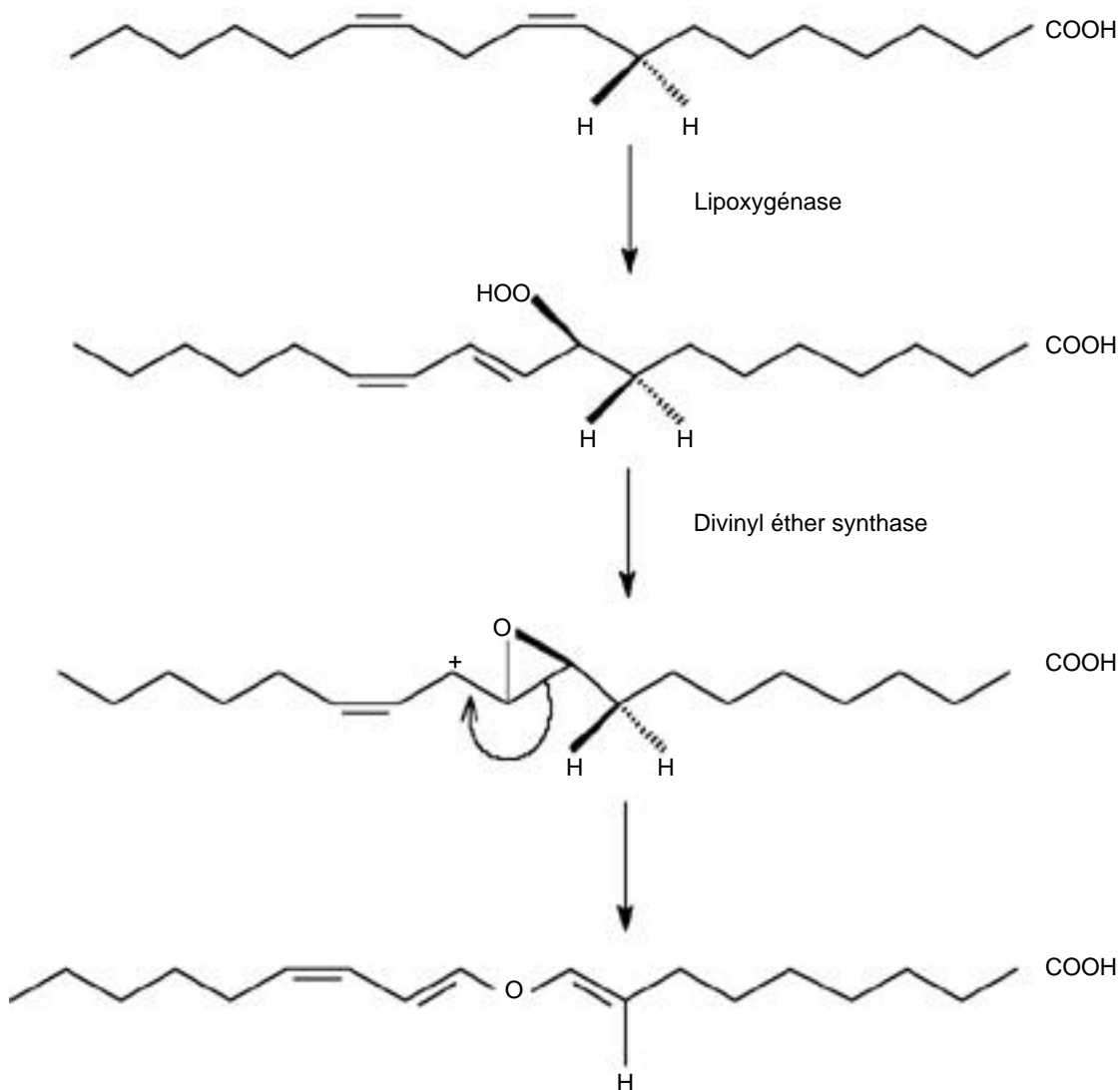


Figure 3. Mécanisme de formation de l'acide colneléique par la divinyl éther synthase (adapté de Fahlstadius et Hamberg, 1990) — *Mechanism for the formation of colnelic acid through the action of divinyl ether synthase (adapted from Fahlstadius and Hamberg, 1990).*

3.5. Dégradation des éthers divinylés d'acides gras

Une étude sur la dégradation des acides colneléique et colnelénique (Galliard, Phillips, 1973) nous montre qu'il existe deux grands systèmes de clivage de ces composés :

- un système non-enzymatique catalysé par des ions Fe^{2+}
- un système catalysé par une enzyme présente dans les tubercules de pomme de terre.

Les produits de dégradation obtenus par l'intermédiaire de chacun des systèmes sont identiques : les acides colneléique et colnelénique sont tout d'abord transformés en un composé instable non encore identifié ; celui-ci sera alors clivé en oxo-acide (l'acide 9-oxo-nonanoïque) et en aldéhyde insaturé ((Z)-3-nonènal dans le cas de l'acide colneléique et (E)-2, (Z)-6-nonadiènal dans le cas de l'acide colnelénique) (Crombie *et al.*, 1986). On remarquera que ces produits sont identiques à ceux issus de l'action de l'hydroperoxyde lyase sur les hydroperoxydes des acides linoléique et linoléique. Les deux systèmes mentionnés ci-dessus possèdent également des propriétés similaires en ce qui concerne le pH optimum de dégradation (pH 5-5,5), la consommation d'oxygène (0,6-0,7 mole d' O_2 consommée par mole d'éther dégradée) et les inhibiteurs de réaction.

Le clivage de l'acide colneléique est inhibé :

- par de faibles concentrations d'antioxygènes (hydroxytoluène de butyle, hydroxyanisole de butyle), ce qui suggère un mécanisme de dégradation radicalaire, aussi bien pour le système enzymatique que non-enzymatique ;
- par quelques agents chélatants (diéthylthiocarbamate, diphenylthiocarbazon), ce qui laisse supposer que l'enzyme impliquée dans le mécanisme enzymatique est une métalloprotéine. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il a été démontré que la lipoxigénase de soja et la ferredoxine (deux protéines à fer non hémique) sont également capables de dégrader l'acide colneléique.

En outre, Galliard et Phillips (1973) ont également montré que les éthers divinylés d'acide gras sont instables en conditions acides et se décomposent alors en produits identiques à ceux issus des deux systèmes de dégradation mentionnés plus haut.

4. RÔLES PHYSIOLOGIQUES DES ÉTHERS DIVINYLIQUES D'ACIDES GRAS

De manière générale, les composés issus de la voie de la lipoxigénase semblent être impliqués lors de réponse de la plante contre des agressions extérieures

ainsi que dans la réparation de blessures, même si le rôle exact joué par ces molécules est encore incertain. Weber *et al.* (1999) ont récemment mené une étude sur l'éventuelle implication des acides colneléique et colnelénique dans la défense de la plante de pomme de terre contre *Phytophthora infestans*, l'agent responsable du mildiou. Cette maladie, qui entraîna en Irlande au 19^e siècle une famine causant la mort de plus d'un million de personnes, reste particulièrement problématique dans la culture de la pomme de terre à notre époque. Ces chercheurs ont analysé l'accumulation d'acide colneléique et colnelénique dans deux cultivars différents de pomme de terre : Bintje, qui est particulièrement sensible à *Phytophthora infestans*, et Matilda, un cultivar plus résistant. Aucune trace d'éther divinylé n'a été détectée dans les feuilles saines et blessées de chacun des cultivars ; par contre, ces composés ont été retrouvés dans les feuilles infectées par le mildiou. Les quantités d'acides colneléique et colnelénique accumulées sont cependant beaucoup plus importantes (environ douze fois supérieures) chez la variété Matilda que chez la variété Bintje. Ces quantités atteignent, pour le cultivar Matilda, $15,65 \pm 3,74$ nmol/g de matière fraîche pour l'acide colneléique et $23,63 \pm 8,22$ nmol/g de matière fraîche pour l'acide colnelénique. Il semble donc que les éthers divinylés d'acide gras contribuent à la défense de la plante contre *Phytophthora infestans*. En effet, Weber *et al.* (1999) ont montré que ces composés inhibent la croissance du mycélium ainsi que la germination des cytopores de *Phytophthora infestans*. Le mode d'action de ces molécules n'est pas encore connu même si deux hypothèses ont été émises par ces auteurs. La première suppose que les éthers divinylés, en pénétrant dans les cellules, se décomposent en fragments cytotoxiques tels l'acide 9-oxo-nonadiénoïque (voir 3.5.). La deuxième hypothèse suggère que les acides colneléique et colnelénique sont des régulateurs naturels de l'expression des gènes de défense de la plante. En outre, cette implication des acides colneléique et colnelénique dans les mécanismes de défense de la plante contre un agent pathogène a également été retrouvée chez le tabac (*Nicotiana tabacum* L.) lors de la réponse contre l'attaque du virus de la mosaïque (Weber *et al.*, 1999).

5. CONCLUSION

La divinyl éther synthase est une enzyme très mal connue à plusieurs égards : sa présence n'est mentionnée que dans un nombre très restreint de plantes, ses propriétés ne sont décrites que de manière sommaire, ses rôles biologiques au sein de la plante sont loin d'être élucidés. Une étude approfondie de l'enzyme passant notamment par sa purification et sa

caractérisation permettrait d'étudier l'activité enzymatique de manière rigoureuse. Une mesure systématique de l'activité divinyl éther synthase couplée au dosage des produits formés en fonction de différentes conditions de stress devrait nous apporter des renseignements précieux quant aux rôles de l'enzyme dans la plante. Cette étude pourrait également être complétée par la mesure du taux d'expression du gène dans ces mêmes conditions.

Remerciements

Phryné Hoyaux est doctorante FRIA, Marie-Laure Fauconnier est chargée de recherches FNRS, Jérôme Delcarte est aspirant FNRS.

Bibliographie

- Caldelari D., Farmer E. (1998). Arapid assay for the coupled cell free generation of oxyipins. *Phytochemistry* **47**, p. 599–604.
- Crombie L., Morgan D., Smith E. (1986). The enzymic formation of colneleic acid, a divinyl ether fatty acid: experiments with [(9S)-¹⁸O₂]hydroperoxyoctadeca-(10^E),(12Z)-dienoic acid. *J. Chem. Soc.* **3**, p. 502–503.
- Fahlstadius P., Hamberg M. (1990). Stereospecific removal of the pro-R hydrogen at C-8 of (9S)-hydroperoxy-octadecadienoic acid in the biosynthesis of colneleic acid. *Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, p. 2027–2030.
- Fauconnier ML., Marlier M. (1997a). Revue bibliographique : les lipoxygénases du soja. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **1** (2), p. 125–141.
- Fauconnier ML., Marlier M. (1997b). Fatty acid hydroperoxides pathway in plants: a review. *Grasas Aceites* **48**, p. 30–37.
- Galliard T., Matthew J. (1975). Enzymic reactions of fatty acid hydroperoxides in extracts of potato tuber. *Biochim. Biophys. Acta* **398**, p. 1–9.
- Galliard T., Phillips D. (1972). The enzymic conversion of linoleic acid into 9-(nona 1', 3'-dienoxy) non-8-enoic acid, a novel unsaturated ether derivative isolated from homogenates of *Solanum tuberosum* tubers. *Biochem. J.* **129**, p. 743–753.
- Galliard T., Phillips D. (1973). Novel divinyl ether fatty acids in extracts of *Solanum tuberosum*. *Chem. Phys. Lipids* **11**, p. 173–180.
- Gardner HW. (1991). Recents investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**, p. 221–239.
- Gerwick WH. (1996). Epoxy allylic carbocations as conceptual intermediates in the biogenesis of diverse marine oxylipins. *Lipids* **31**, p. 1215–1231.
- Grechkin A., Fazliev F., Mukhtarova L. (1995). The lipoxygenase pathway in garlic (*Alium sativum* L.) bulbs: detection of the novel divinyl ether oxylipins. *FEBS Lett.* **371**, p. 159–162.
- Grechkin A., Hamberg M. (1996). Divinyl ether synthase from garlic (*Alium sativum* L.) bulbs: sub-cellular localization and substrate regio- and stereospecificity. *FEBS Lett.* **388**, p. 112–114.
- Siedow J. (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **42**, p. 145–158.
- Weber H., Chetelat A., Caldeleri D., Farmer E. (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**, p. 485–493.

(14 réf.)