

Revue bibliographique : l'hydroperoxyde lyase

Jérôme Delcarte (1), Marie-Laure Fauconnier (1), Phryné Hoyaux (1), Philippe Jacques (2), Philippe Thonart (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 : delcarte.j@fsagx.ac.be.

(2) Centre wallon de Biologie industrielle. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

Reçu le 1^{er} février 2000, accepté le 3 avril 2000.

L'hydroperoxyde lyase fait partie de la voie de la lipoxigénase, voie de transformation des acides gras polyinsaturés en un très large spectre de composés à fonctions chimiques et biologiques diverses. L'hydroperoxyde lyase agit sur les hydroperoxydes d'acides gras (principalement linoléique et linoléique). Elle y clive la liaison entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et un des carbones voisins pour donner un -oxo-acide ainsi que, selon les espèces, un aldéhyde, un hydrocarbure ou un alcool.

Mots-clés. Hydroperoxyde lyase, voie de la lipoxigénase, hydroperoxyde d'acide gras, acide linoléique, acide linoléique, aldéhydes à courte chaîne, 1-octèn-3-ol, composés à note verte.

Hydroperoxide lyase: a review. The hydroperoxide lyase belongs to the lipoxygenase pathway, pathway in which polyunsaturated fatty acids are transformed into a large spectrum of compounds with various chemical and biological functions. The hydroperoxide lyase acts on fatty acids hydroperoxides (mainly linoleic and linolenic). It cleaves the bond between carbon carrying the hydroperoxide function and a vicinal carbon giving an -oxo-acid and also depending on the species, an aldehyde, a hydrocarbon or an alcohol.

Keywords. Hydroperoxide lyase, lipoxygenase pathway, fatty acid hydroperoxides, linoleic acid, linolenic acid, short chain aldehydes, 1-octen-3-ol, green note compounds.

1. INTRODUCTION : LA VOIE MÉTABOLIQUE DE LA LIPOGENASE

La voie métabolique de la lipoxigénase est constituée d'une suite de réactions enzymatiques qui catalyse la transformation d'acides gras polyinsaturés en une large variété de composés (**Figure 1**). La première étape consiste en la libération d'acides gras polyinsaturés à partir de triglycérides par une acyle hydrolase. La lipoxigénase transforme ces acides gras polyinsaturés (ayant une structure (Z)1, (Z)4-pentadiénique) en 9- ou 13-hydroperoxyde de l'acide gras correspondant (Gardner, 1991 ; Fauconnier, Marlier, 1997). Ces hydroperoxydes sont métabolisés selon trois voies principales.

– *L'allène oxyde synthase* catalyse la conversion des hydroperoxydes d'acides gras en allènes oxydes, précurseurs des et -cétols. C'est par cette voie qu'est synthétisé l'acide jasmonique, une hormone de croissance, à partir du 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique (Song *et al.*, 1993).

– *La divinyle éther synthase* transforme les hydroperoxydes des acides linoléique et linoléique en

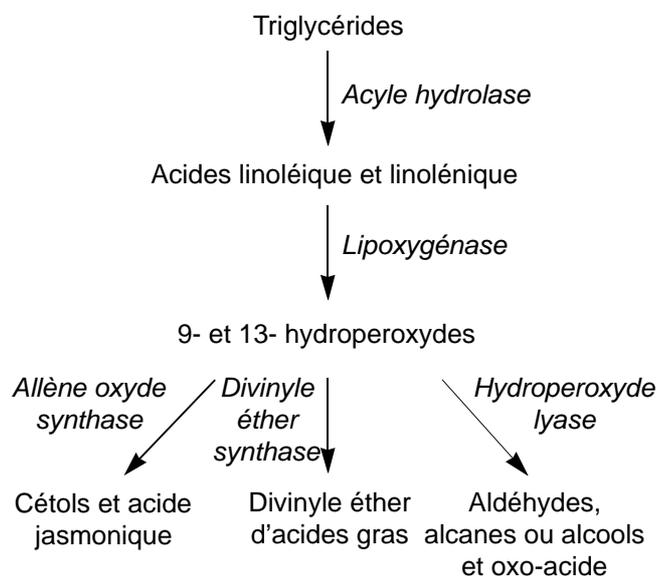


Figure 1. Les principales enzymes impliquées dans la voie de la lipoxigénase chez les plantes supérieures — *Main enzymes working in the lipoxygenase pathway in higher plants.*

divinyle éther d'acides gras (les acides colneléique, colnelénique, éthéroléique et éthérolénique) (Grechkin *et al.*, 1997 ; Weber *et al.*, 1999).

– L'hydroperoxyde lyase clive les hydroperoxydes pour donner un aldéhyde, un alcane ou un alcool et un oxo-acide (Gardner, 1991).

Cet article présente les caractéristiques ainsi que les schémas réactionnels des hydroperoxydes lyases chez les champignons, les algues et les plantes supérieures.

2. LES HYDROPEROXYDES LYASES

Les hydroperoxydes lyases sont classées en deux catégories : les hydroperoxydes lyases homolytiques et les hydroperoxydes lyases hétérolytiques. Les premières clivent la liaison entre le C portant la fonction hydroperoxyde et le C saturé. Les hydroperoxydes lyases hétérolytiques coupent la liaison entre le C porteur du groupement hydroperoxyde et le C insaturé (**Figure 2**).

2.1. Le clivage homolytique des hydroperoxydes

Le clivage homolytique des hydroperoxydes d'acides gras donne donc un alcool (ou un hydrocarbure) et un -oxo-acide (Gardner *et al.*, 1991). On retrouve généralement ce type de clivage chez les plantes inférieures comme les algues et les champignons.

Chez les champignons. Chez les champignons (plus précisément chez les Basidiomycètes et chez certains *Fungi imperfecti* comme *Penicillium* et *Aspergillus*), le 1-octèn-3-ol (composant essentiel de l'arôme d'ailleurs appelé "alcool de champignon") est synthétisé par la voie de la lipoxigénase. Les premiers auteurs à le démontrer furent Wurzenberger et Grosch (1984) chez *Psalliota bispora* (Lange) Moller et J. Schäffer. Pour eux, l'alcool provient de l'action d'une hydroperoxyde lyase homolytique spécifique de l'acide 10-hydroperoxy-8(*E*),12(*Z*)-octadécadiénoïque (le 10-hydroperoxyde de l'acide linoléique, en abrégé : 10-HPODE). L'autre fragment du clivage est l'acide 10-oxo-8(*E*)-décénoïque. En 1986, ces mêmes

auteurs mirent en évidence le 1, (*Z*)-5-octadièn-3-ol, le (*Z*)-2, (*Z*)-5-octadièn-1-ol et l'acide 10-oxo-(*E*)-8-décénoïque. Ces deux octadiénols proviendraient de l'action de deux hydroperoxydes lyases sur l'acide 10-hydroperoxy-8(*E*),12(*Z*),15(*Z*)-octadécatriénoïque (le 10-hydroperoxyde de l'acide linoléique, en abrégé 10-HPOTE) (**Figure 3**).

Assaf *et al.* (1997) confirment que le 1-octèn-3-ol et l'acide 13-hydroperoxy-9(*Z*), 11(*E*)-octadécadiénoïque (le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique, en abrégé 13-HPODE) sont issus de voies métaboliques différentes. Le 10-HPODE n'a pourtant jamais été détecté *in vivo* (Wurzenberger et Grosch (1984) ont travaillé avec des hydroperoxydes de synthèse). À ce jour, personne n'est parvenu à isoler une hydroperoxyde lyase issue de champignon.

C'est toutefois dans le chapeau et plus précisément dans les lamelles que la concentration d'1-octèn-3-ol est la plus élevée chez *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. (Mau *et al.*, 1992).

Le 1-octèn-3-ol n'est pas le seul composé en C₈ produit chez les champignons. Les 1-octanol, 3-octanone, 3-octanol, 1-octèn-3-one, (*Z*)-2-octénal, (*Z*)-2-octèn-1-ol, (*Z*)-1,5-octadièn-3-one, 1, (*Z*)-5-octadièn-3-ol, (*Z*, *Z*)-2,5-octadiénal et (*Z*, *Z*)-2,5-octadièn-1-ol ainsi que l'hexanal (C₆) et le benzaldéhyde (C₇) ont, par exemple, été mis en évidence chez *Agaricus campestris* L. ex Fr (Tressl *et al.*, 1982). Un clivage homolytique catalysé par une hydroperoxyde lyase pourrait être à l'origine de la biosynthèse de ces composés en C₈.

Chez les algues. Chez *Oscillatoria sp.*, l'hydroperoxyde lyase clive les 13-HPODE pour donner du pentan-1-ol et l'acide 13-oxotridéca-9,11-diénoïque (Andrianarison *et al.*, 1989). Chez *Chlorella pyrenoidosa* Chick, le pentane ou le pentène sont produits selon que l'on utilise le 13-HPODE ou l'acide 13-hydroperoxy-9(*Z*),11(*E*),15(*Z*)-octadécatriénoïque (le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique, en abrégé : 13-HPOTE) comme substrat (**Figure 4**) (Vick, Zimmerman, 1989).

L'hydroperoxyde lyase de *Chlorella pyrenoidosa* est associée à la membrane cellulaire (Nunez *et al.*, 1998), a une masse moléculaire estimée à 48 000 Da et est active entre pH 6 et 8 (Vick, Zimmerman, 1989). Celle de *Oscillatoria sp.* a une masse de 56 000 Da, une température et un pH optimaux respectivement de 30°C et 6,4 (Andrianarison *et al.*, 1989).

Chez les plantes supérieures. Le clivage homolytique des hydroperoxydes ne serait pas rencontré uniquement dans des espèces végétales inférieures. Des produits de réaction provenant d'un clivage homolytique d'hydroperoxyde ont en effet été observés chez plusieurs plantes supérieures.

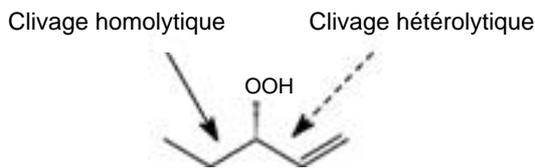


Figure 2. Les clivages homolytique et hétérolytique des hydroperoxydes d'acides gras catalysés par l'hydroperoxyde lyase — *Homolytic and heterolytic cleavages of fatty acids hydroperoxides catalysed by hydroperoxide lyase.*

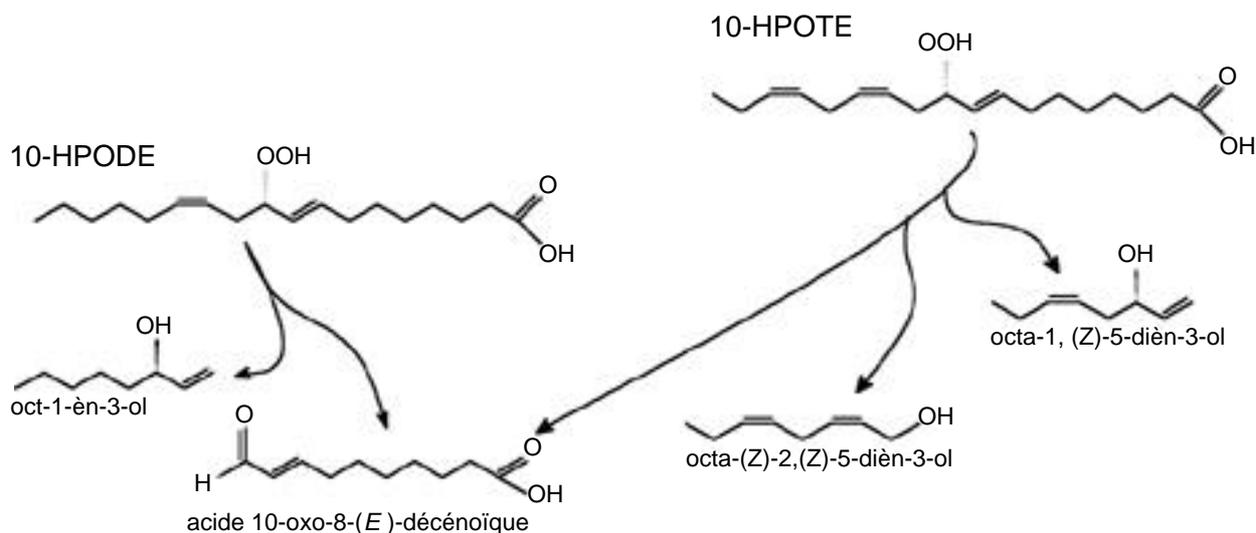


Figure 3. Clivages homolytiques des 10-hydroperoxydes des acides linoléique et linoléique chez les champignons. D'après Wurzenberger, Grosch (1984 ; 1986) ; Assaf *et al.* (1997) — *Homolytic cleavages of 10-hydroperoxide of linoleic and linolenic acids in mushrooms.* Adapted from Wurzenberger, Grosch (1984; 1986) ; Assaf *et al.* (1997).

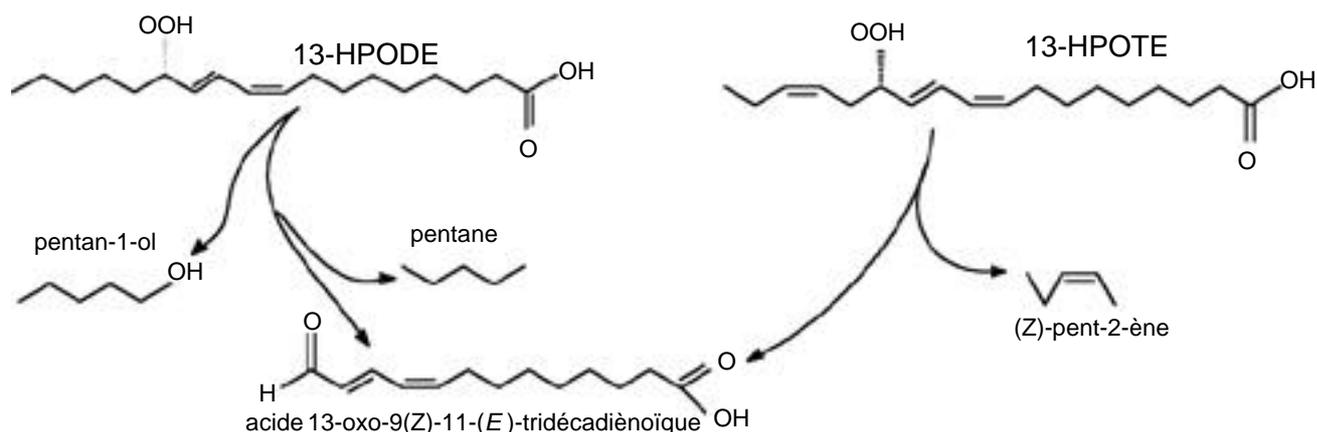


Figure 4. Clivages homolytiques des 13-hydroperoxydes des acides linoléique et linoléique chez les algues. D'après Andrianarison *et al.* (1989) ; Vick, Zimmerman (1989) — *Homolytic cleavages of 13-hydroperoxide of linoleic and linolenic acid in algae.* Adapted from Andrianarison *et al.* (1989) ; Vick, Zimmerman (1989).

Par exemple, le 1-pentèn-3-ol a été identifié chez *Agropyron repens* (L.) Beauv., le chiendent. Les auteurs font l'hypothèse d'une synthèse enzymatique plutôt que celle d'une dégradation spontanée (Berger *et al.*, 1986). Sept dimères de pentène ont été récemment caractérisés dans l'arôme d'huile d'olive vierge (Angerosa *et al.*, 1998).

Un autre exemple est celui du soja. On y retrouve des produits qui proviennent d'un clivage homolytique des 13-HPOTE : le 2-pentèn-1-ol et son fragment complémentaire l'acide 13-oxo-tridéca-9(Z),11(E)-diénoïque (Kondo *et al.*, 1995) ainsi que le 1-pentèn-

3-ol et des dimères de pentène (Salch *et al.*, 1995). Les avis de ces deux auteurs divergent cependant quand il faut déterminer quelle enzyme catalyse la réaction. Kondo *et al.* (1995) affirment que c'est une hydroperoxyde lyase homolytique sans toutefois parvenir à l'isoler et à la caractériser. Pour Salch *et al.* (1995), c'est la lipoxygénase qui est la responsable du clivage homolytique des hydroperoxydes. Les mêmes auteurs démontrent que cette activité secondaire de la lipoxygénase est vingt-quatre fois plus importante en conditions anaérobiques. Le mécanisme réactionnel est proposé à la **figure 5**.

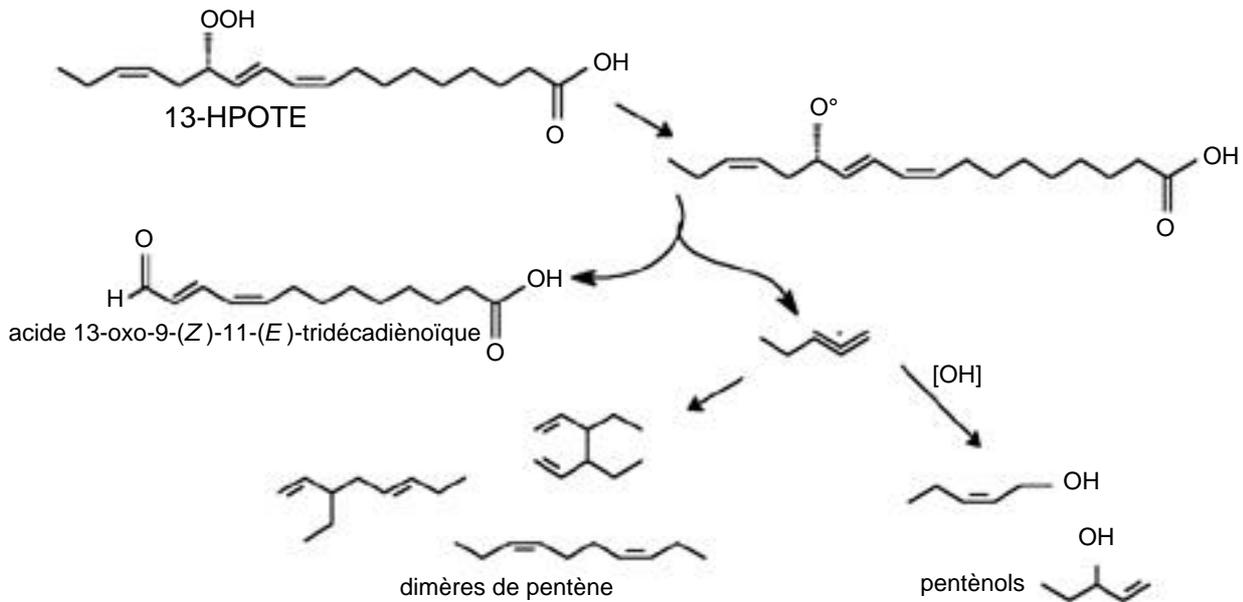


Figure 5. Clivage homolytique des hydroperoxydes catalysé par la lipoxygénase de soja. D'après Kondo *et al.* (1995) ; Salch *et al.* (1995) — *Homolytic cleavage of hydroperoxides catalysed by soybean lipoxygenase.* Adapted from Kondo *et al.* (1995) ; Salch *et al.* (1995).

Une réaction entre la lipoxygénase de soja et le 13-HPODE donne des produits analogues : *n*-pentane et acide 13-oxo-tridécadiénoïque (Garssen *et al.*, 1971). Le clivage des hydroperoxydes n'est donc pas l'exclusivité de l'hydroperoxyde lyase. D'autres enzymes, comme la lipoxygénase, ont aussi cette propriété (dans un rôle secondaire).

2.2. Le clivage hétérolytique des hydroperoxydes

Caractéristiques générales. L'hydroperoxyde lyase a été, à ce jour, mise en évidence dans une quarantaine de végétaux appartenant à des familles variées (Fauconnier, 1997). Si l'on admet qu'elle est à l'origine des molécules dites "à note verte", elle pourrait être très largement distribuée dans le règne végétal.

Chez les plantes supérieures, l'hydroperoxyde lyase est membranaire ; sa masse moléculaire se situe entre 170 et 200 kDa. Elle serait composée de plusieurs sous-unités (3 ou 4) d'environ 50 kDa. La zone de pH optimum de son activité enzymatique se situe entre 5,5 et 8. Elle présente la particularité d'être inhibée de manière irréversible par son substrat (les hydroperoxydes d'acide gras) mais les mécanismes d'inhibition, tout comme ceux de la réaction, sont inconnus (Vick, Zimmerman, 1976 ; 1987 ; Schreier, Lorenz, 1982 ; Olias *et al.*, 1990 ; Shibata *et al.*, 1995b ; Itoh, Vick, 1999).

Récemment, des auteurs ont montré que l'hydroperoxyde lyase est une protéine hémique qui

appartient à la superfamille des cytochromes P450 (CYP74B) (Shibata *et al.*, 1995a ; Matsui *et al.*, 1996 ; Itoh, Vick, 1999).

Classement et catalyse. Les hydroperoxydes lyases des végétaux supérieurs sont divisées en trois classes selon leur spécificité pour leur substrat.

– *Hydroperoxydes lyases spécifiques des 9-hydroperoxydes* : on les trouve chez la poire (fruits et feuilles) ; le 9-hydroperoxyde de l'acide linoléique (9-HPODE) est clivé et donne le (Z)-3-nonanal et l'acide 9-oxononanoïque (Kim, Grosch, 1981 ; Gargouri, Legoy, 1998).

– *Hydroperoxydes lyases spécifiques des 13-hydroperoxydes* : ces enzymes ont été mises en évidence dans les feuilles de tomate (Schreier, Lorenz, 1982), les feuilles de thé (Hatanaka *et al.*, 1982b), les plantules de pastèques (Vick, Zimmerman, 1976), les feuilles de l'arabette de Thalium (Bate *et al.*, 1998), les feuilles et les hypocotyles de tournesol (Itoh, Vick, 1999) et dans des cellules de tabac cultivées *in vitro* (Sekiya *et al.*, 1984).

– *Hydroperoxydes lyases agissant à la fois sur les 9- et les 13-hydroperoxydes* : le fruit de concombre contient une activité hydroperoxyde lyase pour les deux isomères (Galliard, Phillips, 1976). Cependant, Matsui *et al.* (1989) sont parvenus à séparer ces deux activités qu'ils ont attribuées à deux isoenzymes. Les lyases issues de feuilles de haricot et de plantules de luzerne possèdent aussi cette double activité (Matthew, Galliard, 1978 ; Noordermeer *et al.*, 1999).

La **figure 6** résume les possibilités du clivage hétérolytique des 9- et 13-hydroperoxydes des acides linoléique et linolénique rencontrés chez les plantes supérieures. Elle ne prend pas en compte des modifications "post-clivage" telles que les isomérisations ou les réductions en alcool.

Localisation. L'enzyme est présente aussi bien dans des tissus photosynthétiques que non-photosynthétiques. On la retrouve dans des organes divers : feuilles, cotylédons, fruits, plantules, racines et même dans les graines.

Dans le fruit de poivron vert, l'hydroperoxyde lyase se situe sous l'épiderme, là où la densité cellulaire est la plus élevée (Shibata *et al.*, 1995b). Chez *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Bate *et al.* (1998) ont mis en évidence l'hydroperoxyde lyase surtout dans l'inflorescence, un peu moins dans les siliques et les racines, et très peu dans les feuilles. Gardner *et al.* (1991) précisent que l'affinité pour les 9- ou les 13-hydroperoxydes peut varier selon les organes d'une même plante.

Les auteurs sont unanimes pour affirmer que les hydroperoxydes lyases de plantes supérieures sont membranaires. La solubilisation de l'enzyme nécessite l'emploi de détergent (habituellement le Triton X-100). Dans les feuilles de thé (Hatanaka *et al.*, 1982a), d'épinard (Vick, Zimmerman, 1987 ; Blée, Joyard, 1996) et d'arabette (Bate *et al.*, 1998), l'enzyme est attachée aux membranes des chloroplastes. Blée et Joyard (1996) vont plus loin dans leurs investigations : ils précisent que l'enzyme est accrochée à la

membrane de l'enveloppe du chloroplaste et non aux thylakoïdes (elle est également absente du stroma). Dans les tissus non verts, les sites d'ancrage peuvent être la membrane de l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique.

L'hydroperoxyde lyase au cours du développement de la plante. L'activité peut être modulée par le stade physiologique de la plante. Ainsi, chez le poivron vert, le maximum d'activité apparaît six jours après la germination (Matsui *et al.*, 1997). Chez le haricot, l'activité est plus élevée dans les feuilles jeunes que dans les feuilles âgées (Sekiya *et al.*, 1982). D'une manière générale, l'activité est importante dans les cellules en division et chute rapidement quand celles-ci passent en phase stationnaire.

Rôles physiologiques. Vick (communication personnelle) a démontré que l'expression de la lyase chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.) pouvait être induite par les métaux lourds (Mn, Cd et Cu), l'anion superoxyde et même par le 13-HPOTE, le substrat de la lyase. L'hydroperoxyde lyase est aussi plus abondante en cas de blessure. Par contre, l'acide jasmonique ne semble pas induire son expression (Bate *et al.*, 1998).

Les aldéhydes synthétisés par l'hydroperoxyde lyase ont des propriétés antifongiques (formation de bases de Schiff avec les groupements aminés) (Gardner, 1979). Croft *et al.* (1993) ont observé un accroissement important des quantités de (*E*)-2-hexénal et de (*Z*)-3-hexénol émises par les feuilles de

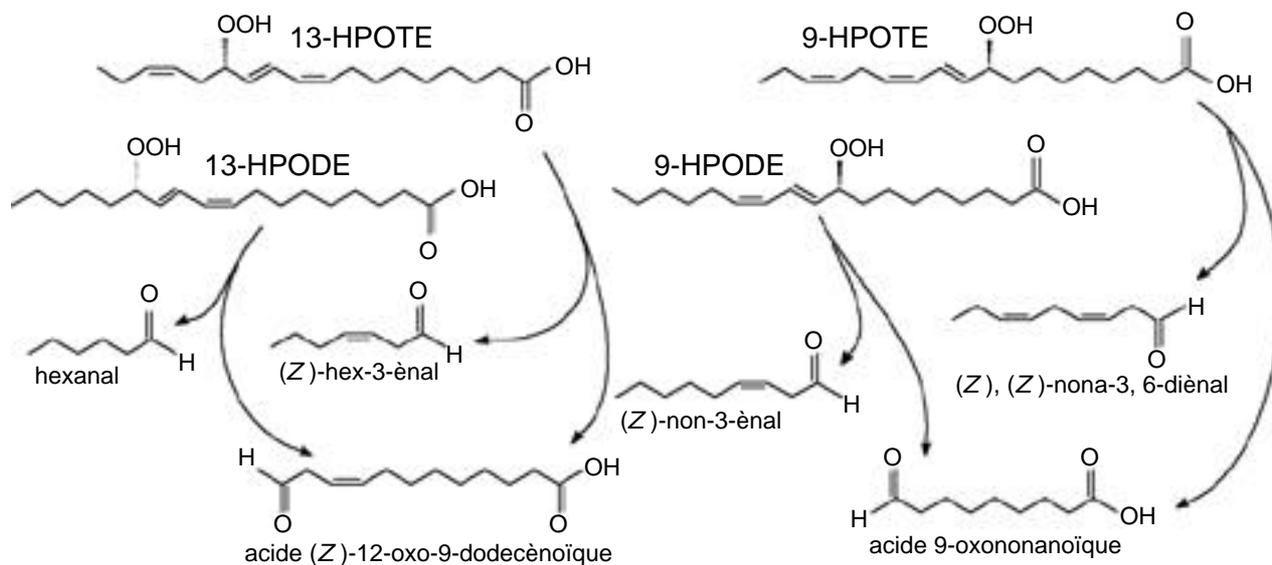


Figure 6. Clivage hétérolytique des 9- et 13-hydroperoxydes chez les plantes supérieures. D'après Hatanaka *et al.* (1975) ; Phillips, Galliard (1978) ; Sanz *et al.* (1997) — *Heterolytic cleavage of the 9- and 13-hydroperoxides in higher plants.* Adapted from Hatanaka *et al.* (1975) ; Phillips, Galliard (1978) ; Sanz *et al.* (1997).

haricot quinze heures après inoculation de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Ils ont aussi montré que ces composés en C₆ inhibaient la croissance du pathogène. Les effets apparaissent à partir d'une concentration de 6 µM pour le (*E*)-2-hexénal. Deng *et al.* (1993) ont également démontré l'effet inhibiteur sur la croissance de *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* et *Pseudomonas syringae* pv. *angulata*. Les composés insaturés ((*E*)-2-hexénal et (*E*)-2-hexèn-1-ol) sont plus efficaces que les composés saturés (hexanal et 1-hexanol).

L'acide 12-oxo-9(*Z*)-dodécénoïque est, quant à lui, le précurseur de l'acide traumatique, considéré comme une hormone de croissance. En effet, il induit des tumeurs chez les tomates vertes (Treshow, 1955), stimule la croissance des cals et accélère l'abscission des pétioles (Strong, Kruitwagen, 1967 ; Zimmerman, Coudron, 1979). L'acide traumatique ne semble pas avoir d'effet inhibiteur sur la croissance de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Croft *et al.*, 1993).

L'hydroperoxyde lyase est une protéine héminique.

Shibata *et al.* (1995a) et Itoh et Vick (1999) ont montré, respectivement chez le poivron vert et le tournesol, que l'hydroperoxyde lyase est une protéine héminique et qu'il s'agit d'un hème *b*. Les premiers ont également avancé qu'on trouvait 2,2 moles de hème par mole d'enzyme (rappelons qu'ils suspectent la présence de trois sous-unités). Le noyau hème serait lié à la protéine à proximité de son extrémité carboxy terminale (à un résidu cystéine en position 441 pour un total de 480 acides aminés pour une sous-unité de l'enzyme chez le poivron vert) (Matsui *et al.*, 1996).

L'hydroperoxyde lyase est un cytochrome P450.

Matsui *et al.* (1996) ont cloné dans *Escherichia coli* une sous-unité entière du gène de l'hydroperoxyde lyase de poivron vert et l'ont séquencé. Ils ont ainsi mis en évidence de nombreuses homologies (dans la région du C terminal) avec les cytochromes P450. L'hydroperoxyde lyase constitue donc une nouvelle sous-famille baptisée CYP74B. La sous-famille la plus proche est la CYP74A (allène oxyde synthase) qui présente 40 % d'homologie. Plus récemment, Bate *et al.* (1998) ont effectué un travail comparable pour le gène d'*Arabidopsis thaliana* et ils obtiennent 78 % d'homologie avec la séquence de la lyase du poivron vert, l'homologie avec l'allène oxyde synthase étant de 57 %. Ces comparaisons sont réalisées entre séquences protéiques déduites du gène correspondant.

Itoh et Vick (1999) ont noté que l'hydroperoxyde lyase de tournesol présente une forte absorbance vers 400 nm et que les inhibiteurs de P450 avaient un effet défavorable sur son activité.

Il subsiste néanmoins quelques différences majeures entre l'hydroperoxyde lyase et les autres enzymes de la superfamille des cytochromes P450.

– *L'hydroperoxyde lyase ne présente qu'une faible affinité pour le CO* alors que les autres enzymes P450 sont capables de le fixer sur leurs groupements héminiques et présentent ainsi une absorbance importante à 450 nm (d'où le nom est d'ailleurs tiré) (Matsui *et al.*, 1996 ; Itoh, Vick, 1999). Cependant, Lau *et al.* (1993) et Pan *et al.* (1995) ont remarqué que respectivement l'allène oxyde synthase et la "rubber particle protein" (deux autres cytochromes P450) ont aussi une faible affinité pour la fixation du CO. L'hydroperoxyde lyase n'est donc pas un cas isolé. Itoh et Vick (1999) expliquent ce phénomène par un noyau hème qui serait enfoui dans la structure protéique.

– *L'hydroperoxyde lyase clive les hydroperoxydes alors que les enzymes P450 catalysent des réactions de monoxygénation.* La plupart des cytochromes P450 sont des enzymes qui catalysent des réactions de transfert d'oxygène vers des substrats apolaires. L'enzyme P450 utilise le NADPH pour réduire le dioxygène : un atome O est réduit en eau tandis que le second est transféré vers une large variété de substrats endogènes (stéroïdes, acides gras,...) ou exogènes. L'hydroperoxyde lyase, par contre, catalyse une réaction de clivage d'hydroperoxydes. Il existe d'autres exceptions : la "rubber particle protein" et l'allène oxyde synthase sont des P450 qui ne catalysent pas de transfert d'oxygène (Lau *et al.*, 1993 ; Pan *et al.*, 1995 ; Matsui *et al.*, 1996).

– *L'hydroperoxyde lyase agit sans cofacteur*, tout comme l'allène oxyde synthase et la "rubber particle protein" (Lau *et al.*, 1993 ; Pan *et al.*, 1995). Par contre, les enzymes P450 utilisent de l'oxygène moléculaire et une NADPH-P450-réductase.

Les hydroperoxydes d'acides gras : un substrat particulier.

Les hydroperoxydes d'acides gras sont des composés instables qui représentent un poison pour l'hydroperoxyde lyase : lorsqu'ils subissent sa catalyse, les hydroperoxydes d'acides gras inactivent l'hydroperoxyde lyase. Bien que la nature de l'inactivation soit pour l'instant inconnue, certains auteurs refusent l'idée d'une inhibition "classique" : des dialyses poussées opérées après réaction ne lèvent pas l'inhibition (Matsui *et al.*, 1992 ; Fauconnier *et al.*, 1997).

Une incubation de l'hydroperoxyde lyase de thé avec de l'acide 13-hydroxylinoléique (l'hydroxyacide dérivé du 13-HPODE) n'altère que très peu l'activité (Matsui *et al.*, 1992). La fonction hydroperoxyde doit donc jouer un rôle prépondérant dans l'inactivation. Gamage et Matsushita (1973) ont décrit l'inactivation de la ribonucléase, de la trypsine et de la pepsine par les hydroperoxydes des acides gras.

La fonction hydroperoxyde est une condition nécessaire mais pas suffisante pour expliquer l'inhibition : les hydroperoxydes de cumène et de butyle tertiaire possèdent cette fonction sans toutefois parvenir à inhiber l'hydroperoxyde lyase (Matsui *et al.*, 1991 et 1992).

Les mêmes auteurs ont montré que des molécules hydrophobes "piégeuses" de radicaux libres, bien qu'inhibant partiellement l'enzyme, préservent l'hydroperoxyde lyase d'une dégradation. Parmi ces molécules, on trouve l'hydroxytoluène de butyle et l' α -tocophérol. De l'observation de ces faits, Matsui *et al.* (1992) ont déduit l'hypothèse suivante : les hydroperoxydes sont reconnus spécifiquement par le site actif de l'enzyme. Ils y sont transformés en une espèce radicalaire (hydrophobe) qui détruit le groupement SH essentiel au fonctionnement de la lyase.

Mécanismes de réactions. À ce jour, aucun mécanisme précis de catalyse du clivage des

hydroperoxydes d'acides gras par l'hydroperoxyde lyase n'a pu être établi. Partant de la réaction de clivage des hydroperoxydes catalysée par un acide dans un solvant aprotique (Gardner, Plattner, 1984), Hatanaka (1993) tente d'expliquer la catalyse par l'hydroperoxyde lyase (**Figure 7**).

Pour Matsui (communication personnelle, 1998), le noyau hème de la lyase est situé dans le site actif, dans un "couloir hydrophobe" qui empêche les autres hydroperoxydes (comme l'hydroperoxyde de butyle tertiaire) de réagir. Il existerait une compétition entre un mécanisme radicalaire et un mécanisme ionique, tous deux catalysés par le groupement hème. Le mécanisme ionique génère l'aldéhyde à partir de l'hydroperoxyde et le mécanisme radicalaire causerait la dégradation de l'enzyme. Les produits de cette dernière réaction n'ont pas été précisés par l'auteur. Le mécanisme de formation de l'aldéhyde est le plus rapide mais il est toujours accompagné du second dont les effets sont irréversibles (**Figure 8**).

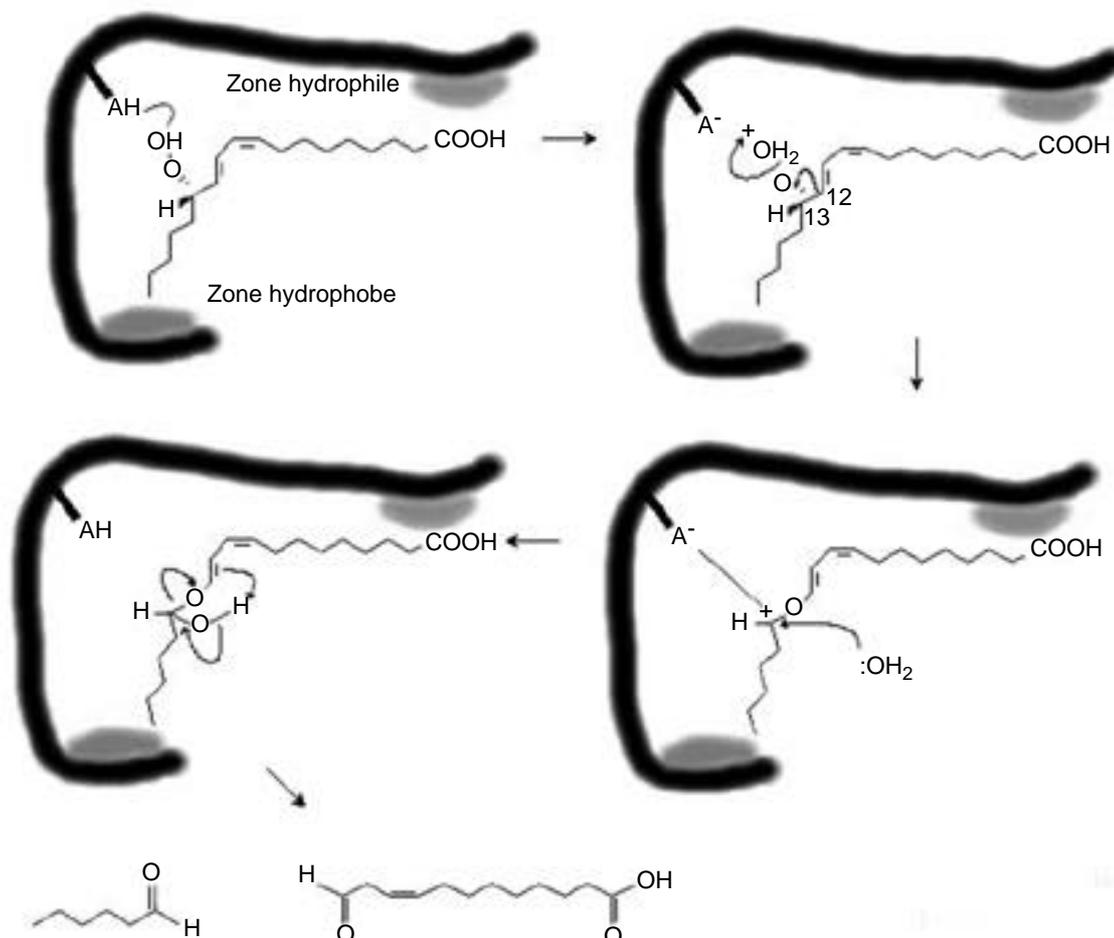


Figure 7. Mécanisme du clivage hétérolytique des hydroperoxydes par l'hydroperoxyde lyase chez les plantes supérieures. D'après Gardner, Plattner (1984) et Hatanaka (1993) — *Mechanism of the heterolytic cleavage of hydroperoxide by hydroperoxide lyase from higher plants. Adapted from Gardner, Plattner (1984) and Hatanaka (1993).*

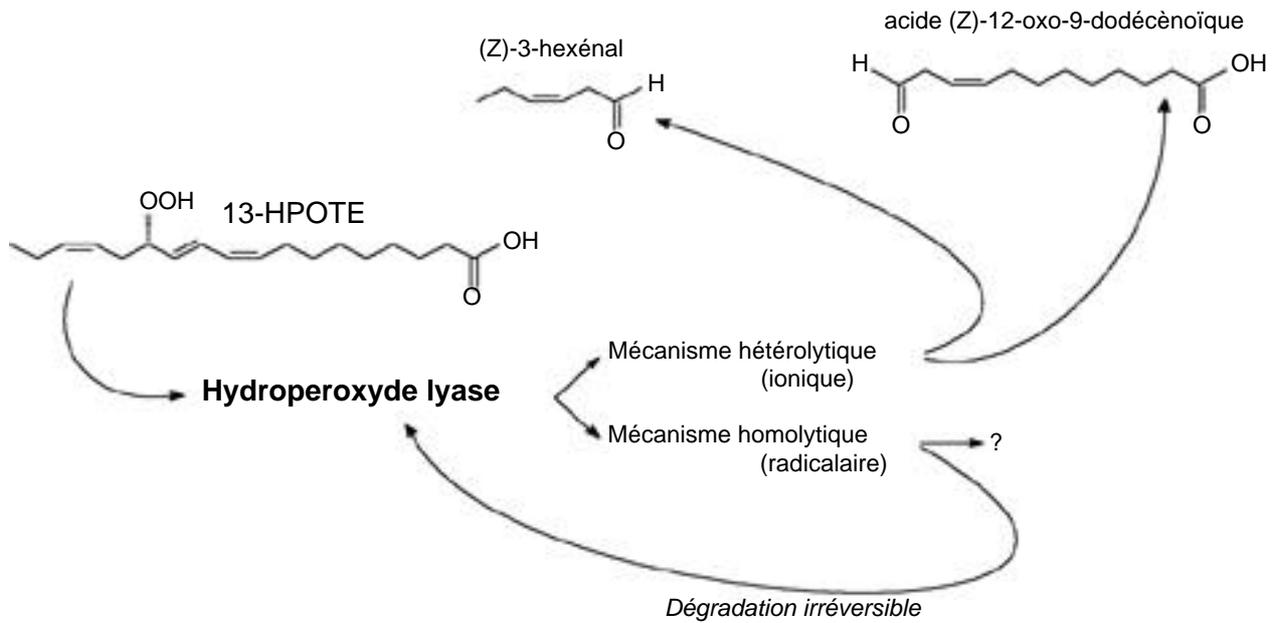


Figure 8. Compétition entre mécanismes ionique et radicalaire dans le site actif de l'hydroperoxyde lyase hétérolytique — *Competition between ionic and radical mechanisms in the active site of heterolytic hydroperoxide lyase.*

Inhibiteurs artificiels de l'activité de l'hydroperoxyde lyase. En ce qui concerne des inhibiteurs plus spécifiques, notons les avis unanimes sur l'effet inhibiteur de l'acide *p*-chloromercuribenzoïque ou du Hg^{2+} , suggérant la présence d'un groupement thiol dans le site actif (Vick, Zimmerman, 1976 ; Phillips, Galliard, 1978 ; Schreier, Lorenz, 1982 ; Hatanaka *et al.*, 1982b ; Matsui *et al.*, 1991 et 1992 ; Fauconnier *et al.*, 1997).

Le cyanure de potassium est un inhibiteur des cytochromes P450 (Salch *et al.*, 1995). Il n'inhibe pourtant pas l'hydroperoxyde lyase de pastèque à une concentration de 10mM (Vick, Zimmerman, 1976). Selon Schreier et Lorenz (1982), il n'inhibe pas non plus la lyase de la tomate (à une concentration de 1mM). Par contre, Phillips et Galliard (1978) observent une perte de 20 % de l'activité de la lyase de concombre (fruits) lors de l'ajout de KCN 1 mM.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes de cumène et de butyle tertiaire n'inhibent pas ou peu la lyase (Matsui *et al.*, 1991 et 1992).

Le bleu de méthylène, à une concentration de 0,2 mM, inhibe plus de 80 % de l'activité de la lyase (Matsui *et al.*, 1991).

L'activité hydroperoxyde lyase dans le règne animal. Selon Bate *et al.* (1998), il n'y a pas de voie métabolique analogue à l'hydroperoxyde lyase dans le règne animal. Ce n'est vrai que si l'on se limite au clivage hétérolytique catalysé par l'hydroperoxyde lyase de plantes supérieures. En effet, un clivage

homolytique, analogue à celui que l'on rencontre chez les algues, a été mis en évidence avec des cytochromes P-450 issus de microsomes de foie de lapin (P-450lm) (Vaz, Coon, 1987 ; Vaz *et al.*, 1990). Plus précisément, ces auteurs observent une formation de pentane (et du 13-oxo-acide complémentaire) lorsqu'ils font réagir du 13-HPODE "exogène" avec le P-450lm IIB4. Les produits ainsi obtenus sont identiques à ceux retrouvés chez *Chlorella pyrenoidosa* en partant des mêmes substrats (Vick, Zimmerman, 1989). Le mécanisme suspecté par les auteurs est une β -scission du radical alkoxy formé au cours d'une première étape de scission homolytique du 13-HPODE (Figure 9). Ce mécanisme a été confirmé récemment par Rota *et al.* (1997).

Une différence majeure subsiste toutefois entre l'hydroperoxyde lyase rencontrée chez les algues et le P-450lm IIB4 : la présence d'une réductase semble être indispensable pour la catalyse du P-450lm (Vaz, Coon, 1987) tandis que la nécessité d'une co-enzyme (ou d'un cofacteur) n'a jamais été mise en évidence avec l'hydroperoxyde lyase végétale.

3. CONCLUSIONS

L'hydroperoxyde lyase peut être considérée comme une enzyme de stress. Elle est surexprimée dans la plante lorsque cette dernière se trouve en présence d'organismes pathogènes ou de métaux lourds. Les molécules générées par cette enzyme présentent des intérêts fondamentaux et appliqués. L'oxo-acide est le précurseur d'une hormone de croissance. Les aldé-

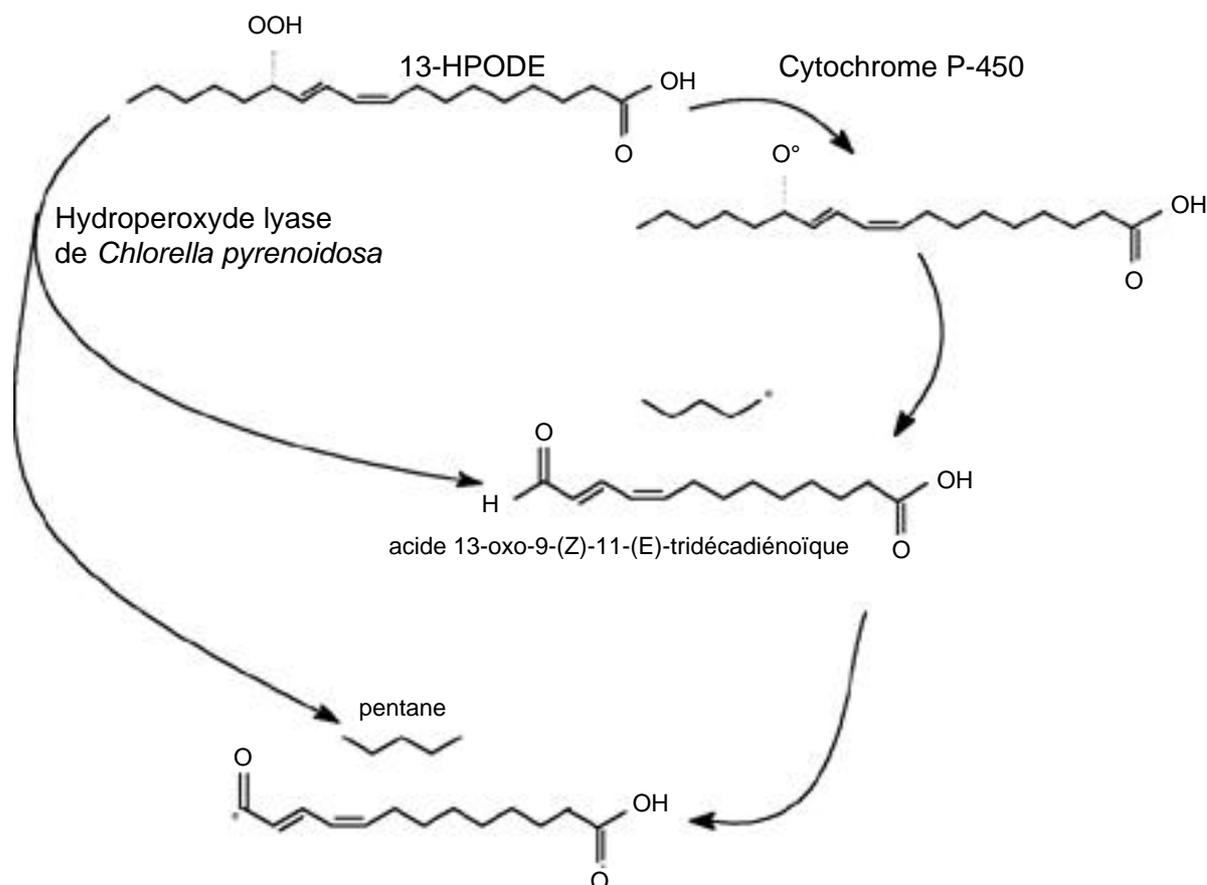


Figure 9. Réaction entre 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique et cytochrome P-450 de lapin. D'après Vaz et Coon (1987); Vaz *et al.* (1990); Vick et Zimmerman (1989), Rota *et al.* (1997) — *Reaction between 13-hydroperoxide of linoleic acid and rabbit cytochrome P-450. Adapted from Vaz and Coon (1987); Vaz et al. (1990); Vick and Zimmerman (1989), Rota et al. (1997).*

hydes à courtes chaînes, en plus de leurs propriétés antifongiques, sont recherchées par l'industrie aromatique pour leur odeur de type "note verte". L'inactivation de l'enzyme par son substrat reste l'obstacle majeur pour une production enzymatique de ces composés à hautes valeurs ajoutées. La compréhension des mécanismes d'inhibition de l'hydroperoxyde lyase est donc une étape clé dans la stratégie de production de ces aldéhydes à l'échelle industrielle.

Liste des abréviations

- 9-HPODE : acide 9-hydroperoxyoctadécadiénoïque
(le 9-hydroperoxyde de l'acide linoléique)
9-HPOTE : acide 9-hydroperoxyoctadécatriénoïque
(le 9-hydroperoxyde de l'acide linoléique)
10-HPODE : acide 10-hydroperoxyoctadécadiénoïque
(le 10-hydroperoxyde de l'acide linoléique)
10-HPOTE : acide 10-hydroperoxyoctadécatriénoïque
(le 10-hydroperoxyde de l'acide linoléique)

- 13-HPODE : acide 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque
(le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique)
13-HPOTE : acide 13-hydroperoxyoctadécatriénoïque
(le 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique)

Remerciements

Jérôme Delcarte et Marie-Laure Fauconnier remercient le Fonds National de la Recherche Scientifique pour leurs mandats respectifs d'aspirant du F.N.R.S. et de chargée de recherches.

Bibliographie

- Andrianarison RH., Beneytout JL., Tixier M. (1989). An enzymatic conversion of lipoxygenase products by a hydroperoxide lyase in Blue-Green Algae (*Oscillatoria* sp.). *Plant Physiol.* **91**, p. 1280–1287.

- Angerosa F., Camera L., d'Alessandro N., Mellerio G. (1998). Characterization of seven new hydrocarbon compounds present in the aroma of virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **46**, p. 648–653.
- Assaf S., Hadar Y., Dosoretz CG. (1997). 1-octen-3-ol and 13-hydroperoxylinoleate are products of distinct pathways in the oxidative breakdown of linoleic acid by *Pleurotus pulmonarius*. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, p. 484–490.
- Bate NJ., Sivasankar S., Moxon C., Riley JMC., Thompson JE., Rothstein SJ. (1998). Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Physiol.* **117**, p. 1393–1400.
- Berger RG., Kler A., Drawert F. (1986). The C₆-aldehyde-forming system in *Agropyron repens*. *Biochim. Biophys. Acta* **883**, p. 523–530.
- Blée E., Joyard J. (1996). Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* **110**, p. 445–454.
- Croft KPC., Jüttner F., Slusarenko AJ. (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol.* **101**, p. 13–24.
- Deng W., Hamilton-Kemp TR., Nielsen MT., Andersen RA., Collins GB., Hildebrand DF. (1993). Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. *J. Agric. Food Chem.* **41**, p. 506–510.
- Fauconnier ML. (1997). *Contribution à l'étude de la production du (E)-hex-2-énal naturel par synthèse enzymatique*. Thèse de doct. sci. agron., Fac. univ. Sci. agron., Gembloux (Belgique) 291 p.
- Fauconnier ML., Marlier M. (1997). Revue bibliographique : les lipoxygénases du soja. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **1** (2), p. 125–141.
- Fauconnier ML., Perez AG., Sanz C., Marlier M. (1997). Purification and characterization of tomato leaf (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hydroperoxyde lyase. *J. Agric. Food Chem.* **45** (11), p. 4232–4236.
- Galliard T., Phillips DR. (1976). The enzymatic cleavage of linoleic acid to C₉ carbonyl fragments in extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and the possible role of lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **431**, p. 278–287.
- Gamage PT., Matsushita S. (1973). Interactions of autoxidized products of linoleic acid with enzyme proteins. *Agric. Biol. Chem.* **37** (1), p. 1–8.
- Gardner HW. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *J. Agric. Food Chem.* **27**, p. 220–229.
- Gardner HW. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1084**, p. 221–239.
- Gardner HW., Plattner RD. (1984). Linoleate hydroperoxides are cleaved heterotically into aldehydes by a Lewis acid in aprotic solvent. *Lipids* **19** (4), p. 294–299.
- Gardner HW., Weisleder D., Plattner RD. (1991). Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine max*. *Plant Physiol.* **97**, p. 1059–1072.
- Gargouri M., Legoy MD. (1998). Biosynthesis and analysis of 3Z-nonenal. *Biotechnol. Lett.* **20** (1), p. 23–26.
- Garssen GJ., Vliegthart JFG., Boldingh J. (1971). An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem. J.* **122**, p. 327–332.
- Grechkin AN., Ilyasov AV., Hamberg M. (1997). On the mechanism of biosynthesis of divinyl ether oxylipins by enzyme from garlic bulbs. *Eur. J. Biochem.* **245**, p. 137–142.
- Hatanaka A. (1993). The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry* **34** (5), p. 1201–1218.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Harada T. (1975). Biosynthetic pathway of cucumber alcohol: *trans*-2,*cis*-6-nonadienol via *cis*-3,*cis*-6-nonadienal. *Phytochemistry* **14**, p. 2589–2592.
- Hatanaka A., Sekiya J., Kajiwara T., Munechika K. (1982a). Natural inhibitor for volatile C₆-aldehyde formation from C₁₈-unsaturated fatty acids. *Agric. Biol. Chem.* **43** (11), p. 2705–2710.
- Hatanaka A., Kajiwara T., Sekiya J., Inouye S. (1982b). Solubilization and properties of the enzyme-cleaving 13-L-hydroperoxylinolenic acid in tea leaves. *Phytochemistry* **21** (1), p. 13–17.
- Itoh A., Vick BA. (1999). The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, p. 531–540.
- Kim IS., Grosch W. (1981). Partial purification of a hydroperoxide lyase from fruits of pear. *J. Agric. Food Chem.* **29**, p. 1220–1225.
- Kondo Y., Hashidoko Y., Mizutani J. (1995). An enzymatic formation of 13-oxo-trideca-9,11-dienoic acid from 13-hydroperoxylinolenic acid by homolytic hydroperoxide lyase in elicitor-treated soybean cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta* **1255**, p. 9–15.
- Lau SMC., Harder PA., O'Keefe DP. (1993). Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P450 in many plant tissues. *Biochemistry* **32**, p. 1945–1950.
- Matsui K., Shibata Y., Kajiwara T., Hatanaka A. (1989). Separation of 13- and 9-hydroperoxide lyase activities in cotyledons of cucumber seedlings. *Z. Naturforsch.* **44c**, p. 883–885.
- Matsui K., Toyota H., Kajiwara T., Kakuno T., Hatanaka A. (1991). Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves. *Phytochemistry* **30** (7), p. 2109–2113.
- Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A. (1992). Inactivation of tea leaf hydroperoxide lyase by fatty acid hydroperoxide. *J. Agric. Food Chem.* **40**, p. 175–178.
- Matsui K., Shibutani M., Hase T., Kajiwara T. (1996). Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a

- cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett.* **394**, p. 21–24.
- Matsui K., Shibata Y., Tateba H., Hatanaka A., Kajiwara T. (1997). Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (1), p. 199–201.
- Matthew JA., Galliard T. (1978). Enzymatic formation of carbonyls from linoleic acid in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **17**, p. 1043–1044.
- Mau JL., Beelman RB., Ziegler G. (1992). 1-octen-3-ol in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Food Sci.* **57** (3), p. 704–706.
- Noordermeer MA., Veldink GA., Vliegthart JFG. (1999). Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase. *FEBS Lett.* **443**, p. 201–204.
- Nunez A., Foglia TA., Piazza GJ. (1998). A gas chromatographic-mass spectrometric method using poraPLOT column for the detection of hydroperoxide lyase in *Chlorella pyrenoidosa*. *Lipids* **33** (5), p. 533–538.
- Olias JM., Rios JJ., Valle M., Zamora R., Sanz LC., Axelrod B. (1990). Fatty acid hydroperoxide lyase in germinating soybean seedlings. *J. Agric. Food Chem.* **38**, p. 624–630.
- Pan Z., Durst F., Werck-Reichhart D., Gardner HW., Camara B., Cornish K., Backhaus RA. (1995). The major protein of Guayule Rubber Particles is a cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **270** (15), p. 8487–8494.
- Phillips DR., Galliard T. (1978). Flavour biogenesis. Partial purification and properties of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from fruits of cucumber. *Phytochemistry* **17**, p. 355–358.
- Rota C., Barr DP., Martin MV., Guengerich FP., Tomasi A., Manson RP. (1997). Detection of free radicals produced from the reaction of cytochrome P-450 with linoleic acid hydroperoxide. *Biochem. J.* **323**, p. 565–571.
- Salch YP., Grove MJ., Takamura H., Gardner HW. (1995). Characterization of a C-5,13-cleaving enzyme of 13(S)-hydroperoxide of linolenic acid by soybean seed. *Plant Physiol.* **180**, p. 1211–1218.
- Sanz C., Olias JM., Perez AG. (1997). Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In Tomas-Barberan FA., Robins RJ. (eds). *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Oxford: Clarendon Press, p. 125–155.
- Schreier P., Lorenz G. (1982). Separation, partial purification and characterisation of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato fruits. *Z. Naturforsch.* **37c**, p. 165–173.
- Sekiya J., Kamiuchi H., Hatanaka A. (1982). Lipoxygenase, hydroperoxide lyase and volatile C₆-aldehyde formation from C₁₈-fatty acids during development of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant. Cell Physiol.* **23** (4), p. 631–638.
- Sekiya J., Tanigawa S., Kajiwara T., Hatanaka A. (1984). Fatty acid hydroperoxide lyase in tobacco cells cultured *in vitro*. *Phytochemistry* **23** (11), p. 2439–2443.
- Shibata Y., Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A. (1995a). Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207** (1), p. 438–443.
- Shibata Y., Matsui K., Kajiwara T., Hatanaka A. (1995b). Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits. *Plant Cell Physiol.* **36**, p. 147–156.
- Song WC., Funk CD., Brash AR. (1993). Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, p. 8519–8523.
- Strong FE., Kruitwagen E. (1967). Traumatic acid: an accelerator of abscission in cotton explants. *Nature* **215**, p. 1380–1381.
- Treshow M. (1955). Physiology and anatomical development of tomato fruit tumor. *Am. J. Bot.* **42**, p. 198–202.
- Tressl R., Bahri D., Engel KH. (1982). Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *J. Agric. Food Chem.* **30**, p. 89–93.
- Vaz ADN., Coon MJ. (1987). Hydrocarbon formation in the reductive cleavage of hydroperoxides by cytochrome P-450. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, p. 1172–1176.
- Vaz ADN., Roberts ES., Coon MJ. (1990). Reductive scission of the hydroperoxides of fatty acids and xenobiotics: Role of alcohol-inducible cytochrome P-450. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, p. 5499–5503.
- Vick BA., Zimmerman DC. (1976). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings. *Plant Physiol.* **57**, p. 780–788.
- Vick BA., Zimmerman DC. (1987). Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol.* **85**, p. 1073–1078.
- Vick BA., Zimmerman DC. (1989). Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.* **90**, p. 125–132.
- Weber H., Chételat A., Caldelari D., Farmer EE. (1999). Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* **11**, p. 485–493.
- Wurzenberger M., Grosch W. (1984). The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushroom (*Psalliota bispora*). *Biochim. Biophys. Acta* **794**, p. 25–30.
- Wurzenberger M., Grosch W. (1986). Enzymatic oxidation of linolenic acid to 1, Z-5-octadien-3-ol, Z-2, Z-5-octadien-1-ol and 10-oxo-E-8-decenoic acid by a protein fraction from mushrooms (*Psalliota bispora*). *Lipids* **21** (4), p. 261–266.
- Zimmerman DC., Coudron CA. (1979). Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-10-dodecenoic acid. *Plant Physiol.* **63**, p. 536–541.