



FICHE PROJET DE THESE pour ANNEE 2013-2014

Fiche à adresser, par voie électronique, à l'école doctorale avant le 14 janvier 2013

Discipline du Doctorat <i>Cf l'article 1^{er} de règlement intérieur de l'ED Indiquer le n° à 7 chiffres et l'intitulé (tout ou partie selon le cas)</i>	Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie 4200006
Mention du Doctorat <i>Cf l'article 1^{er} de règlement intérieur de l'ED Indiquer le n° de la section CNU et l'intitulé</i>	64 Biochimie et Biologie moléculaire
Domaine scientifique principal	Biochimie et Biologie moléculaire
Domaines scientifiques secondaires	Biotechnologie
Entités de rattachement - Centre de recherche (UMR LISA, UMR SPE, ERT, FRES, INRA-CIRAD) - Projet structurant	UMR CNRS 6134 SPE Biochimie et chimie des ressources naturelles
Direction de la thèse Préciser : (i) Nom, prénom ; (ii) tél et E-mail ; (iii) la qualité d'HDR(ou non) pour les non-Pr - Directeur - Co-directeur éventuel envisagé	Berti Liliane, 04 95 45 02 21, berti@univ-corse.fr Brunini, Virginie, 04 95 45 00 64, bronzini@univ-corse.fr
Collaborations extérieures éventuelles envisagées (convention de codirection, - de cotutelle ; entreprise...)	Université Upsala Suède EIPL Marseille
Type de financement visé <i>(barrer les mentions inutiles)</i>	Aucun - Contrat doctoral - Contrat Grand Organisme : CNRS ; INRA ; CEA Contrat d'Entreprise : CORSEMPLOI-2 ; CIFRE Autre (préciser) :
Connaissances et compétences requis chez l'étudiant	Solides connaissances en biochimie des protéines et en clonage et expression de protéines dans des systèmes hétérologues
Titre de la thèse	Production de molécules aromatiques par biocatalyse
Abstract 1 (5-8 lignes, police Arial 10) : Présentation explicite du projet de thèse – Aspects scientifiques <i>Finalité, méthodologie et problématique, intérêt scientifique, caractère innovant</i>	Nous avons cloné, exprimé chez <i>E.coli</i> et purifié la LOX et l'HPL recombinantes de l'olive. Nous allons cloner, exprimer et purifier d'autres HPL à partir d'autres espèces végétales. Ces enzymes vont être testées pour obtenir des fragrances nouvelles ou déjà connues ayant un intérêt économique. D'autres systèmes hôtes que <i>E.coli</i> vont également être testés.
Abstract 2 (5-8 lignes, police Arial 10) : Présentation des enjeux de la thèse <i>Adéquation avec la politique scientifique de l'UCPP - Intérêt de la recherche dans le cadre du développement régional</i>	La lipoxigénase (LOX) et l'hydroperoxyde lyase (HPL) sont les enzymes clés impliquées dans la production des arômes de l'huile d'olive. La voie de la lipoxigénase peut être utilisée de manière efficace comme outil biotechnologique pour la production de molécules aromatiques et de molécules à haute valeur ajoutée intéressant les secteurs alimentaire et cosmétique. Ces produits possèdent un label « naturel » très recherché par

Explication du Projet de thèse

1°) Présentation des aspects scientifiques du projet de thèse (½ page à 1 page environ, police Arial 10)
Finalité, méthodologie et problématique, intérêt scientifique, caractère innovant

Chez les végétaux supérieurs, les aldéhydes et les alcools provenant de la voie de la lipoxigénase sont responsables de l'odeur fraîche de l'herbe coupée dite "note verte". Leur biosynthèse résulte de l'oxydation des acides gras polyinsaturés en hydroperoxydes par la lipoxigénase, puis de leur clivage par l'hydroperoxyde lyase. L'utilisation des enzymes de la voie de la lipoxigénase comme outils biotechnologiques pour la production de ces composés constitue une application intéressante.

L'isolement des ADNc codant pour la lipoxigénase (LOX) et l'hydroperoxyde lyase (HPL) est une étape préalable indispensable pour : (i) l'utilisation des enzymes recombinantes dans des procédés biotechnologiques visant à produire les composés volatils d'intérêts à haute valeur ajoutée, (ii) envisager d'améliorer l'efficacité catalytique et/ou modifier la régio- et la stéréo-spécificité des enzymes recombinantes par mutagenèse dirigée.

Un ADNc codant pour une lipoxigénase appelée olive LOX1 a été isolé au laboratoire à partir d'olives de la variété Leccino au stade noir. Cet ADNc a été exprimé chez *E. coli* et la protéine recombinante a été purifiée et caractérisée biochimiquement. Une LOX d'olive mutée LOX1 F277A/Y280I possédant des propriétés catalytiques optimisées a également été obtenue et peut être facilement produite en grande quantité et obtenue de manière pure. D'autres mutants sont en cours de caractérisation.

L'hydroperoxyde lyase est le second partenaire de la voie. Elle clive les hydroperoxydes d'acides gras dérivant de l'action précédemment initiée par la lipoxigénase en aldéhydes. Un ADNc codant pour l'hydroperoxyde lyase (HPL) a également été isolé au laboratoire à partir d'olives de la variété Leccino. Les conditions d'expression, de purification et de conservation de l'hydroperoxyde lyase ont été mises au point. L'étude de l'action de l'HPL recombinante d'olive sur divers hydroperoxydes synthétisés au laboratoire indique que l'enzyme catalyse le clivage du 13S-hydroperoxyde d'acide linoléique.

Durant cette thèse, nous allons utiliser l'HPL d'olive combinée à l'action de diverses LOX (LOX1 d'olive sauvage et mutée, LOX1 purifiée de soja ...) afin de tester l'efficacité de chaque combinaison d'enzyme permettant de produire des fragrances connues et nouvelles. Dans ce but, nous avons déjà débuté des tests sur différents substrats (acide docosahexaénoïque, acide eicosapentaénoïque, acide arachidonique) dont les résultats sont en cours de traitement. Nous envisageons de tester d'autres acides gras polyinsaturés comme substrats afin de déterminer s'ils peuvent servir à l'élaboration de nouveaux composés volatils ayant un intérêt économique. Nous envisageons également d'isoler des ADNc codant pour des HPL de même spécificité ou de spécificités différentes à partir de divers végétaux (pêche, menthe, ...) afin d'agrandir le choix des enzymes candidates pouvant être utilisées dans ces procédés biotechnologiques.

Afin d'améliorer les conditions de production et de purification de l'HPL (quantité et qualité de l'enzyme) nous allons tester d'autres systèmes hôtes d'expression que *E. coli* permettant la sécrétion de l'enzyme dans le milieu de culture (autres bactéries et/ou levures).

2°) Présentation des enjeux de la thèse (½ page à 1 page environ, police Arial 10)

Adéquation avec la politique scientifique de l'UCPP - Intérêt de la recherche dans le cadre du développement régional

Les saveurs et fragrances sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels comme la parfumerie, l'industrie pharmaceutique, la cosmétologie et les industries agroalimentaires. Les aldéhydes en C6, comme le cis-3-hexénal, l'hexanal et le trans-2-hexénal sont des composés volatils connus pour leur rôle physiologique et leur contribution dans l'arôme des fruits et des huiles issues des fruits oléagineux comme l'olive. Ces molécules composent, en partie, l'odeur spécifique d'herbe coupée, la "note verte" très utilisée dans les secteurs alimentaires et cosmétiques. Au niveau cellulaire, la cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la formation de ces composés volatils à partir d'acides gras polyinsaturés est appelée voie de la Lipoxygénase.

Bien que cette voie de biosynthèse soit présente dans différents tissus chez les plantes comme les feuilles et les fruits, les produits issus de cette voie sont présents en très faible quantité dans les plantes et leur extraction à partir de matériel brut est très coûteuse. L'utilisation des enzymes de la voie de la lipoxygénase comme outils biotechnologiques pour la production de ces composés constitue une application séduisante puisqu'elle permet de produire un composé de manière sélective, à moindre coût et d'attribuer le label "naturel" à cette production. L'industrie des saveurs est particulièrement concernée par cette évolution puisque les consommateurs affirment leur préférence pour les aromatisants naturels et freinent la progression de l'utilisation des arômes synthétiques dans les produits alimentaires et, dans une certaine mesure, les produits de parfumerie. Les procédés actuels qui utilisent la farine de soja comme source de lipoxygénase et la pulpe de fruits (essentiellement exotiques) comme source d'hydroperoxyde lyase ne sont pas très performants et sont tributaires d'approvisionnement soumis aux aléas climatiques ou politiques. En outre, l'utilisation de ces matières premières ne permet pas une réaction spécifique, engendrant un faible rendement en composés volatils désirés et générant de grandes quantités de déchets. L'utilisation d'enzymes recombinantes (LOX et HPL) est encore peu exploitée et constitue une voie alternative susceptible de répondre à la demande croissante en ces composés. L'usage de ces enzymes permettra la production sélective du produit volatil désiré, et donc l'obtention de ces molécules de manière plus efficace.